



**Universitat de les
Illes Balears**
Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

**Extracción de compuestos antioxidantes del gel
de Aloe vera. Optimización del proceso mediante
la aplicación de la metodología de superficie de
respuesta**

Jaime Moreno Vallespir

Grau de Química

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 78219902F

Treball tutelat per Antoni Femenia Marroig
Departament de Química



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Aloe Vera, antioxidantes, metodología de superficie de respuesta, compuestos fenólicos

Índice

Resumen.....	4
1. Introducción	5
1.1. Antioxidantes.....	5
1.2. Metodología de superficie de respuesta.....	8
1.3. Aloe vera.....	10
2. Objetivos	13
3. Materiales y métodos.....	14
3.1. Material vegetal	14
3.2. Extracción mecánica de compuestos bioactivos.....	14
3.3. Análisis químico.....	15
3.4. Diseño experimental	16
3.5. Análisis estadístico	17
4. Resultados y discusión.....	18
4.1. Elección de los niveles de estudio de las variables del proceso de extracción	18
4.2. Aplicación del diseño experimental	19
4.3. Ajuste de los modelos de superficie de respuesta.....	20
4.4. Superficies de respuesta	24
4.5. Optimización y validación de los modelos	29
5. Conclusiones.....	30
6. Bibliografía.....	31

Resumen

La metodología de superficie de respuesta (MSR) ha sido utilizada para optimizar el proceso de extracción de antioxidantes a partir de gel de Aloe vera, para ello se utilizó un diseño experimental de tipo Box-Behnken.

El rendimiento de extracción, el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante, medida mediante los métodos ABTS y FRAP, fueron las respuestas analizadas en función de la temperatura (X_1 : 20-60 °C), del tiempo de extracción (X_2 : 2-10 min) y de la concentración de etanol (X_3 : 25-75 %).

Los resultados del rendimiento de extracción, la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS se ajustaron a modelos cuadráticos, mientras que los resultados correspondientes a la capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP no pudieron ser modelizados mediante la técnica MSR.

A partir de los modelos obtenidos se obtuvieron las superficies de respuesta del rendimiento de extracción, la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante mediante el método ABTS

Las condiciones que maximizaron (1) el rendimiento de extracción, (2) la cantidad de compuestos fenólicos totales y (3) la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS, fueron: (1) $X_1 = 32$ °C; $X_2 = 4$ min; $X_3 = 30$ %, (2) $X_1 = 60$ °C; $X_2 = 6$ min; $X_3 = 75$ %, y (3) $X_1 = 60$ °C; $X_2 = 6$ min; $X_3 = 75$ %, respectivamente. Utilizando estas condiciones, los valores máximos correspondientes al rendimiento de extracción, a los compuestos fenólicos totales y a la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS, fueron: 82 ± 2.8 %, 638 ± 91 mg AG/100 g de muestra, y 1099 ± 66 mg TROLOX/100 g de muestra, respectivamente.

Se realizó la validación del modelo utilizando el valor óptimo del rendimiento de extracción y puntos aleatorios, obtenidos mediante el software, para la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS. No se encontraron diferencias significativas entre los valores calculados y los resultados experimentales lo cual indica que los modelos obtenidos son apropiados para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción de antioxidantes a partir de gel de Aloe vera.

1. Introducción

1.1. Antioxidantes

1.1.1. Generalidades

Un antioxidante es una sustancia natural o sintética que previene la oxidación o inhibe las reacciones promovidas por el oxígeno o por peróxidos en la matriz en la que se encuentra. Los compuestos con actividad antioxidante se utilizan para limitar la peroxidación lipídica, la cual representa uno de los principales mecanismos de deterioro de los alimentos durante las etapas de procesado y almacenamiento (Göktürk Baydar, Özkan, & Yaşar, 2007).

Además, ensayos clínicos y estudios epidemiológicos han establecido una correlación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la aparición de enfermedades tales como inflamaciones, enfermedades cardiovasculares, cáncer y trastornos asociados a la edad. Los antioxidantes presentes en la dieta incluyen compuestos polifenólicos, vitaminas E y C y carotenoides. Estos compuestos son nutrientes eficaces en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Huang, Ou, & Prior, 2005).

Actualmente se cree que los compuestos que más contribuyen a la actividad antioxidante de las frutas y verduras son los compuestos fenólicos. La actividad antioxidante de un compuesto fenólico está relacionada con el número de grupos hidroxilo presentes en la estructura química. Por lo tanto la forma con la que estos compuestos neutralizarán los radicales libres dependerá de su concentración relativa en la matriz de la muestra. Además, los compuestos fenólicos pueden actuar de forma sinérgica, aditiva o antagonista para inhibir especies reactivas (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2009).

Los alimentos son una fuente importante de antioxidantes naturales los cuales permiten evitar los efectos tóxicos y cancerígenos que puede provocar diferentes antioxidantes sintéticos en los seres humanos (Göktürk Baydar et al., 2007). Por tanto, tal y como indican Huang et al. (2005), es de gran interés tanto para el público general como para médicos, nutricionistas o para investigadores que basan su trabajo en la salud y la alimentación conocer la capacidad antioxidante y los constituyentes de la comida que consumimos.

Debido a la complejidad de la composición de los alimentos separar cada compuesto antioxidante y estudiarlo individualmente es costoso e ineficiente; además, se deben tener en cuenta las posibles interacciones sinérgicas entre los compuestos antioxidantes en una mezcla de alimentos. Por lo tanto, es muy atractivo para los investigadores disponer de un método conveniente para la cuantificación rápida de la eficacia antioxidante en la prevención de enfermedades. Sin embargo, estos métodos aún no han sido desarrollados. Un ensayo de la capacidad antioxidante total utilizando una reacción química parece ser poco realista y no es fácil de conseguir, sin embargo, hay numerosos métodos publicados que afirman medir la capacidad antioxidante total *in vitro* (Re et al., 1999)

Debido a esta falta de un método estándar para medir la capacidad antioxidante de un alimento o de una muestra biológica se recomienda siempre el uso combinado de diferentes técnicas para medir la capacidad antioxidante de una muestra de forma más global (Huang et al., 2005).

Las técnicas para medir la capacidad antioxidante se basan principalmente en dos mecanismos de activación:

- Transferencia de átomos de hidrógeno (HAT): $\text{ROO}^\cdot + \text{HA} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}^\cdot$
- Transferencia de electrones (ET): $\text{M} (n) + e (\text{de HA}) \rightarrow \text{HA}^\cdot + \text{M} (n-1)$

La mayoría de los ensayos basados en la HAT monitorizan reacciones cinéticas competitivas, y la cuantificación se deriva de las curvas cinéticas. Métodos basados en la HAT, en general, se componen de un generador de radicales libres sintético, una sonda molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en la ET implican una reacción redox donde el oxidante es usado como un indicador de punto final de la reacción. La finalidad de los ensayos basados en la ET y en la HAT es medir la capacidad de eliminación de radicales (u oxidantes).

De entre los diferentes tipos de ensayos existentes, en el contexto del presente trabajo, cabe destacar tres técnicas espectrofotométricas basadas en la ET; en concreto, la cuantificación de compuestos fenólicos totales mediante el reactivo Folin-Ciocalteu, la medición de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS y la medición de la capacidad antioxidante mediante la reducción del ion férrico (FRAP).

1.1.2. Compuestos fenólicos totales mediante reactivo Folin-Ciocalteu

El reactivo Folin-Ciocalteu (FC) fue pensado inicialmente para el análisis de proteínas debido a su gran reactividad frente al aminoácido tirosina, el cual contiene un grupo fenol. Varios años más tarde Singleton & Rossi (1965) extendieron este método al análisis de compuestos fenólicos en vino, desde entonces este método ha encontrado numerosas aplicaciones. Actualmente al ensayo basado en el reactivo FC es conocido como el “método de fenólicos totales” aunque lo que realmente mide esta prueba es la capacidad reductora de la muestra.

El reactivo FC está compuesto por una mezcla de wolframato sódico ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), molibdato sódico ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ácido clorhídrico y ácido fosfórico. La naturaleza química exacta del reactivo FC no se conoce con exactitud pero se cree que contiene fosfowolframatos-molibdatos. Secuencias de varias reacciones de reducción llevan a especies de coloración azul, posiblemente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$. En esencia se cree que, debido a la facilidad del molibdeno de reducirse en el complejo, transcurre una reacción de transferencia de electrones entre los agentes reductores y el Mo (IV): $\text{Mo(VI)} + e^- \rightarrow \text{Mo(V)}$

El reactivo FC no es específico para componentes fenólicos ya que puede ser reducido por varios compuestos no fenólicos. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo FC solo bajo condiciones de basicidad (ajustado mediante una disolución de carbonato sódico a pH 10). La disociación de un protón de un grupo fenólico lleva a la formación de un anión fenolato que es capaz de reducir el reactivo FC. Los componentes azules formados por los fenolatos y el reactivo FC son independientes de la estructura de los componentes fenólicos lo cual descarta la posibilidad de que sean complejos formados entre el centro metálico y los componentes fenólicos.

Aun teniendo en cuenta que la naturaleza química del reactivo FC no está clara, la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el reactivo Folin-Ciocalteu es una prueba conveniente, simple y reproducible, que viene avalada por su utilización en numerosos estudios científicos.

1.1.3. Capacidad antioxidante mediante el método ABTS

Para este método se utiliza como oxidante el reactivo $\text{ABTS}^{\cdot-}$ generado mediante una reacción de peroxidación a partir del ABTS^{2-} (ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico)). Durante el ensayo, tal y como se observa en la Figura 1, se produce una reacción redox entre el $\text{ABTS}^{\cdot-}$, el cual tiene un pico de absorbancia a 730 nm, y los compuestos antioxidantes dando como resultado el ABTS^{2-} , el cual es incoloro. La reducción en la medida de la absorbancia permite conocer la capacidad antioxidante de la muestra en cuestión.

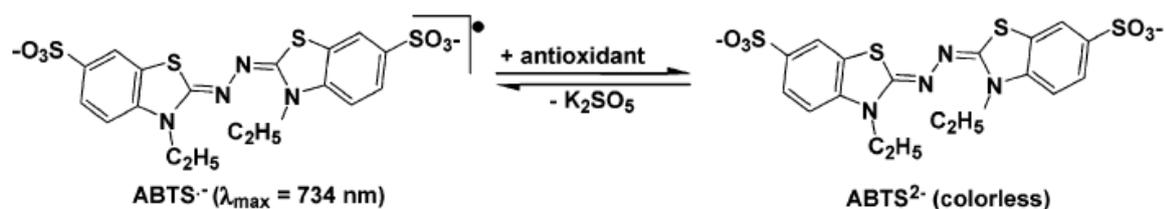


Figura 1. Funcionamiento del reactivo ABTS

1.1.4. Capacidad antioxidante mediante la reducción del ion férrico (FRAP)

El método FRAP hace uso de un complejo de hierro como agente oxidante, en concreto del complejo $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$, siendo TPTZ el ligando *2,4,6-tripirydyls-triazine*. La mayor diferencia respecto al método ABTS es que el método FRAP debe realizarse en condiciones ácidas (pH 3.6). Este ensayo se realiza normalmente en presencia de un tampón acetato.

Aunque la estequiometría ideal en el reactivo FRAP entre el Fe(III) y el TPTZ es 1 a 2, la práctica siempre se realiza con un exceso de Fe(III) debido a que el $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ no es el único agente oxidante. Estas especies se forman al unirse el Fe(III) a agentes quelantes provenientes de las propias muestras formando complejos capaces de reaccionar con los antioxidantes, con lo cual pueden dar problemas en la medición.

En la Figura 2 puede observarse la reacción que se produce durante el método FRAP. El complejo $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ reacciona con el compuesto antioxidante provocando la reducción del ión de hierro y dando como resultado el complejo $\text{Fe(II)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ el cual presenta una absorbancia máxima a 593 nm. En este caso es el aumento de la absorbancia lo que permite conocer la capacidad antioxidante de la muestra.

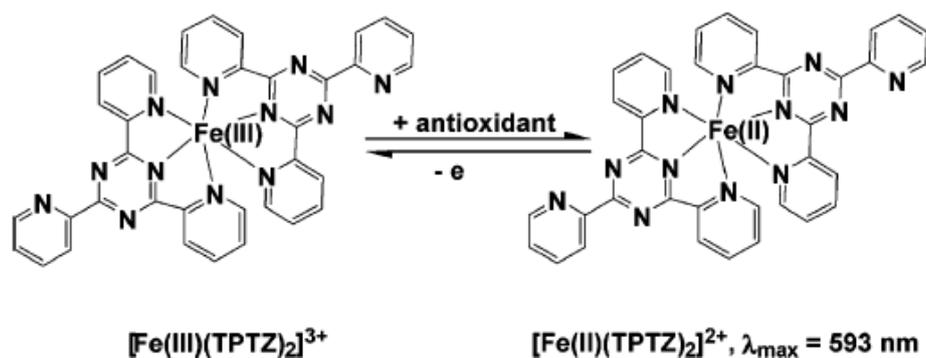


Figura 2. Reacción ocurrida durante el ensayo FRAP

1.1.5. Otros ensayos

Además de los ensayos mencionados, actualmente también se utilizan otros procedimientos para determinar la capacidad antioxidante de diferentes extractos. Entre estos métodos destacan los ensayos basados en el ion cobre, los cuales tienen muchas similitudes con el método FRAP. El reactivo utilizado en este tipo de ensayos es un complejo de Cu(II) que se reduce a Cu(I) durante la reacción. El reactivo más utilizado en este tipo de ensayos es el CUPRAC.

Otro ensayo también ampliamente utilizado es el ensayo DPPH. El reactivo utilizado es el 2,2-Difenil-1-picrilhidracil que contiene un radical nitrógeno estabilizado. Tiene la ventaja de ser un ensayo simple pero la desventaja de que muchas especies antioxidantes reaccionan muy lentamente o incluso llegan a ser inertes frente al DPPH, lo cual provoca que, en algunos casos, la capacidad antioxidante no sea cuantificada correctamente.

1.2. Metodología de superficie de respuesta

1.2.1. Optimización de un proceso

El proceso de optimización se refiere a la mejora de un sistema, un proceso o un producto con el fin de obtener el máximo beneficio de este. En el campo de la química el término optimización ha sido comúnmente usado para referirse la búsqueda de las mejores condiciones en las cuales un procedimiento permite obtener la mejor respuesta posible (Baş & Boyacı, 2007; Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escalera, 2008).

Tradicionalmente, el proceso de optimización se ha llevado a cabo evaluando la influencia de un solo factor sobre la respuesta experimental, manteniendo constantes las demás variables del proceso. Este proceso de optimización es conocido con el nombre de *una variable en un tiempo*. Sin embargo, la mayor desventaja de este proceso es que no estudia las posibles interacciones entre todos los factores involucrados en el sistema o proceso, siendo incapaz de describir completamente los efectos de las variables sobre la respuesta en estudio. Además, implica generalmente la realización de un gran número de experimentos para llevar a cabo la investigación, aumentando así la inversión tanto de tiempo como de carácter económico (Bezerra et al., 2008; Castillo, 2007; Nwabueze, 2010).

Con el objetivo de minimizar estos problemas, diferentes técnicas estadísticas de análisis multivariante han sido utilizadas. Un claro ejemplo del uso de este tipo de técnicas para llevar a cabo el proceso de optimización es la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) (Nwabueze, 2010).

La MSR es una técnica estadístico-matemática basada en el ajuste de los datos experimentales a una ecuación polinómica, la cual es capaz de describir el comportamiento de los datos y hacer previsiones estadísticas. Puede ser aplicada cuando una respuesta o conjunto de respuestas de interés son influenciadas por múltiples variables. El objetivo es optimizar el nivel de estas variables para obtener el mejor rendimiento del sistema. Para esto, diversas matrices

experimentales han sido desarrolladas (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Nwabueze, 2010).

Los diseños experimentales para los modelos de primer orden solo pueden ser utilizados cuando la representación del conjunto de datos no presenta ninguna curvatura. Para poder aproximar una función de respuesta a los datos experimentales, en el caso de que estos no pueden ser descritos por funciones lineales, se deben utilizar diseños experimentales para superficies de respuesta de segundo grado, tales como el diseño factorial de tres niveles, el diseño Box-Behnken, el diseño de composición central o el diseño Doehlert (Araujo & Brereton, 1996; Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007).

1.2.2. Diseño Box-Behnken

En los diseños tipo Box-Behnken los puntos experimentales están situados en una hiperesfera equidistantes del punto central (Figura 3).

Las principales características de este diseño son:

- Requiere un número de experimentos de acuerdo con la expresión $N = 2k(k-1) + cp$, donde k es el número de variables independientes y cp es el número de repeticiones del punto central.
- Las variables independientes son estudiadas en tres niveles equidistantes (-1, 0, +1).

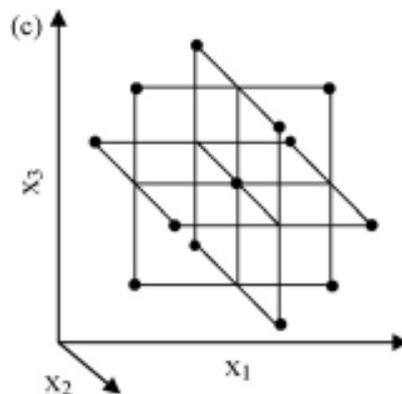


Figura 3. Diseño experimental Box-Behnken para tres variables

En comparación con el diseño original 3^3 con 27 experimentos, se observa que este diseño es más económico y eficiente necesitando solo 12 experimentos más las repeticiones del punto central. La Tabla 1 presenta los valores codificados a la aplicación de este diseño para tres variables.

Tabla 1. Valores codificados para un diseño Box-Behnken para 3 variables

x_1	x_2	x_3
-1	-1	0
1	-1	0
-1	1	0
1	1	0
-1	0	-1
1	0	-1
-1	0	1
1	0	1
0	-1	-1
0	1	-1
0	-1	1
0	1	1
0	0	0

1.3. Aloe vera

1.3.1. Generalidades

La *Aloe barbadensis* Miller, conocida comúnmente como Aloe vera (Figura 4), es la planta más importante del género Aloe perteneciente a la familia de las asfodeláceas o liláceas. El interés comercial y su popularidad han crecido enormemente en los últimos años debido a que es la materia prima más utilizada para la obtención de una gran variedad de ingredientes utilizados en la preparación de nuevos alimentos, en la formulación de productos cosméticos, así como en la industria farmacéutica (Domínguez-Fernández et al., 2012; Rodríguez-González et al., 2011).



Figura 4: Planta de Aloe vera

1.3.2. Estructura de la planta Aloe vera

Las hojas de Aloe vera crecen alrededor del tallo a nivel del suelo en forma de roseta, desde el centro hacia arriba crece el tallo que al florecer forma densos racimos de flores tubulares amarillas o rojas (Domínguez-Fernández et al., 2012; Reynolds & Dweck, 1999).

Las hojas tienen formas lanceoladas y dentadas con pinchos que sirven de protección a la planta. La estructura de las hojas (Figura 5) está formada por el exocarpio o corteza, la cual está cubierta de una cutícula delgada, la corteza representa aproximadamente del 20 al 30% del peso de toda la planta y dicha estructura es de color verde o verde azulado, dependiendo de diversos factores tales como la procedencia, el clima o el tipo de nutrición de la planta. El parénquima, conocido comúnmente como pulpa o gel se localiza en la parte central de la hoja y representa entre el 65 y el 80 % del peso total de la planta (Hamman, 2008; Reynolds & Dweck, 1999).

Entre la corteza y el gel, ocupando toda la superficie interna de la hoja, se encuentra el exudado que contiene los conductos de aloína; una serie de canales longitudinales de pocos milímetros de diámetro por donde circula la savia de la planta, conocida como acíbar. El acíbar se puede obtener dejando fluir el líquido de los conductos de aloína; dicha sustancia tiene usos farmacéuticos como laxante. La distinción entre el gel y el exudado es a menudo complicada debido a que los componentes del exudado pueden introducirse en el gel durante el proceso de separación (Rodríguez, Martín, & Romero, 2010).

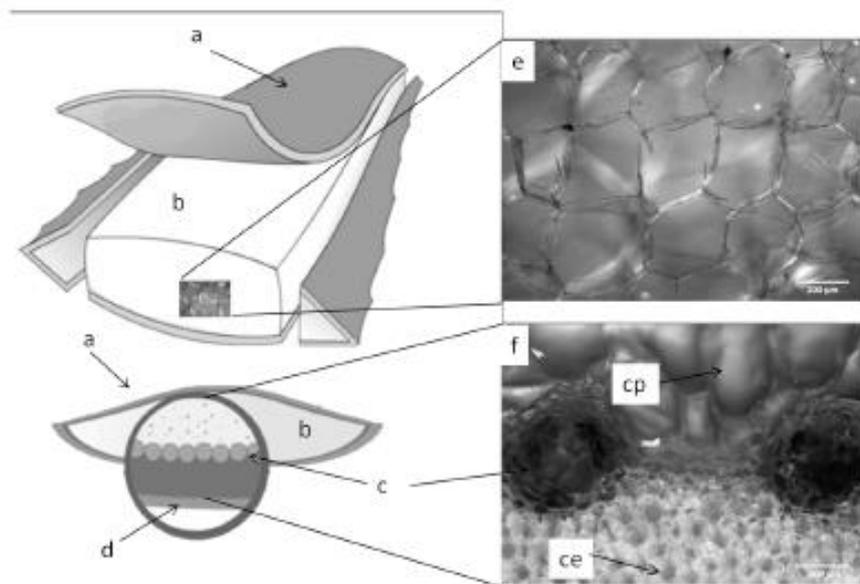


Figura 5. Estructura de la hoja de Aloe vera: a) corteza, b) gel o tejido parenquimático c) conductos de aloína del exudado, d) cutícula. En la figura se muestran imágenes de microscopía de luz tomadas a una magnificación de 5x de las células del parénquima (e) y de un corte seccional de la hoja de Aloe vera (f) donde se observan con gran detalle células internas de la corteza (ce), células del parénquima (cp) y conductos de aloína (c) (Domínguez-Fernández et al., 2012).

1.3.3. Composición química

En la hoja de Aloe vera hay más de 200 sustancias químicas aunque el componente mayoritario de estas es el agua, el resto de componentes se encuentran en una muy baja concentración. Los componentes mayoritarios de la materia seca son los carbohidratos (azúcares solubles y polisacáridos complejos) cuya composición varía dependiendo de la parte de la hoja considerada (Femenia, Sánchez, Simal, & Rosselló, 1999). Otros componentes minoritarios presentes en la hoja

son los compuestos fenólicos, proteínas, lípidos, ácidos orgánicos, aminoácidos, ciertas vitaminas y minerales, etc. (Rodríguez et al., 2010).

El exudado, de color amarillo, se caracteriza por la presencia de constituyentes fenólicos que son generalmente clasificados en dos principales grupos: las cromonas, como la aloesina, y las antraquinonas (libres y/o glicosiladas) como la aloína (isómeros A y B) y la aloe-emodina. La aloína es el principal componente del acíbar, que la planta secreta como defensa para alejar a posibles depredadores por su olor y sabor desagradable. También interviene en el proceso de control de la transpiración en condiciones de elevada insolación. En la fabricación de productos alimenticios a base de Aloe vera, éstos no deben contener aloína dado sus propiedades laxantes y alergénicas. Además de los componentes fenólicos el exudado contiene pequeñas cantidades de polisacáridos y azúcares libres, especialmente glucosa así como componentes alifáticos y volátiles (Boudreau & Beland, 2006; Choi & Chung, 2003; Eshun & He, 2004; Hamman, 2008; Rodríguez et al., 2010).

El gel de Aloe vera es el gel mucilaginoso obtenido de exprimir la sustancia gelatinosa del tejido parenquimático, el cual está compuesto por entre un 98.5 y 99.5% de agua. La mayor parte de la materia seca del gel de Aloe vera está compuesta por polisacáridos, con dos tipos principales de polímeros: el acemanano, un polisacárido de almacenamiento rico en unidades de manosa acetiladas el cual se encuentra dentro del protoplasma de las células, y una amplia variedad de polisacáridos que forman la matriz de la pared celular. El acemanano es una de las principales sustancias bioactivas de la planta de Aloe vera. Este polisacárido, presente en el gel, puede presentar también cierta acción antioxidante (Femenia, García-Pascual, Simal, & Rosselló, 2003; Femenia et al., 1999; Rodríguez-González et al., 2011). Otras sustancias presentes en el gel de Aloe vera son aminoácidos, glicoproteínas, enzimas, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos provenientes, en su mayor parte, del exudado (Rodríguez et al., 2010).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es optimizar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes a partir de una fuente natural, como es la planta de Aloe vera. Para poder cumplir este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Aplicar la metodología de superficie de respuesta a partir de un diseño experimental del tipo Box-Behnken, utilizando la temperatura, el tiempo de extracción y el porcentaje de etanol de una mezcla etanol:agua como variables del proceso.
- Desarrollar modelos polinomiales de superficie de respuesta para la estimación del rendimiento de extracción, la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos, y la capacidad antioxidante de los extractos determinada mediante los métodos ABTS y FRAP.
- Encontrar las condiciones de temperatura, tiempo y el porcentaje de etanol que maximicen el rendimiento de extracción, la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos y la capacidad antioxidante medida mediante los métodos ABTS y FRAP.
- Validar experimentalmente los modelos polinomiales de superficie de respuesta obtenidos.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Las hojas de Aloe vera utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por la empresa Aloe vera Farm S.L. Mallorca (<http://aloe-mallorca.com/es/>). La extracción del gel de Aloe Vera se realizó de acuerdo al método propuesto por Rodríguez-González et al. (2011), la piel fue removida y la sustancia mucilaginosa, conocida como gel de Aloe, fue extraída del interior. Posteriormente, el gel fue triturado y filtrado a través de un filtro metálico con un tamaño de poro de 3 mm de diámetro. El gel se congeló a -80 °C durante aproximadamente 8 h y posteriormente fue liofilizado. Finalmente, el polvo obtenido fue almacenado a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

3.2. Extracción mecánica de compuestos bioactivos

La extracción de los antioxidantes presentes en el gel de Aloe vera se realizó mediante una extracción mecánica de acuerdo a la metodología propuesta por Kim et al. (2014), con algunas modificaciones. Aproximadamente 0.1 g de polvo de gel de Aloe vera fueron colocados en un matraz Erlenmeyer con 45 mL de disolvente formado por etanol y agua en diferentes concentraciones. La mezcla fue calentada a diferentes temperaturas mediante un sistema de calefacción por recirculación de agua, manteniendo la temperatura deseada constante mediante un baño termostático (Figura 6). En el caso de temperaturas inferiores a los 30 °C, se colocó un sistema de refrigeración para alcanzar la temperatura establecida. Una vez alcanzada la temperatura correspondiente, la mezcla fue agitada a 700 rpm con un agitador magnético durante un tiempo determinado.

Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 2 h, el sobrenadante fue separado y almacenado a 4 °C para ser posteriormente concentrada, mientras que el precipitado fue deshidratado en una estufa de vacío a 60 °C y 0.8 bar. El residuo sólido fue pesado y el rendimiento de extracción fue calculado mediante la Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{P_0 - P_f}{P_0} \right) \cdot 100$$

Ecuación 1. Ecuación del rendimiento de la extracción

En la Ecuación 1 el P_0 es el peso original de la muestra y P_f es el peso final del residuo sólido obtenido tras la extracción.

Finalmente, el sobrenadante fue concentrado hasta un volumen aproximado de 10 mL con un rotavapor a 40 °C, operando en vacío. La muestra concentrada fue filtrada a través de un filtro con un tamaño de poro de \varnothing 0.45 μm y almacenada a 4 °C hasta su posterior análisis.

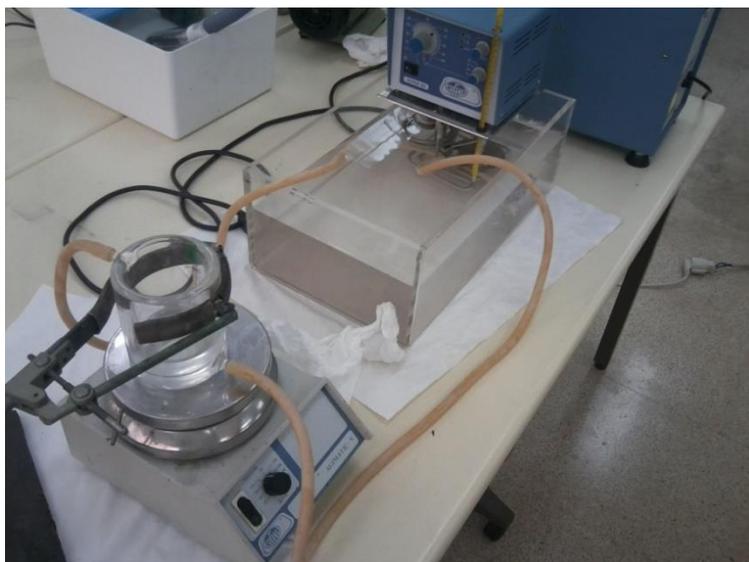


Figura 6. Montaje del sistema de extracción

3.3. Análisis químico

En el extracto se determinaron los siguientes parámetros químicos: cantidad de polifenoles totales y la capacidad antioxidante medida según los métodos ABTS y FRAP. Todos los parámetros químicos hicieron uso de métodos espectrofotométricos utilizando la lectura de microplacas de 96 pozos. A continuación se definen los parámetros utilizados para el análisis químico.

3.3.1. Polifenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para medir el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en los extractos de Aloe vera siguiendo el método propuesto por Singleton and Rossi (1965) con ciertas modificaciones para ser adaptado al análisis en microplacas descritas por González-Centeno et al. (2012).

La distribución de cada pozo de la placa fue la siguiente: 184 μL de agua, 24 μL del extracto concentrado, 12 μL del reactivo Folin-Ciocalteu y 30 μL de carbonato sódico al 20 % (p/v). Cada microplaca estaba formada por dos filas para la recta de calibrado y seis filas con las muestras (12 muestras con seis replicados de cada una). Para realizar el blanco de este análisis se utilizó agua destilada.

Después de una incubación de 20 min a 25 °C se realizó una lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Para la recta de calibrado se utilizó un estándar de ácido gálico con una concentración comprendida entre 0 y 12 ppm con 4 replicados para cada concentración.

3.3.2. Método ABTS

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos de Aloe Vera se usó el método ABTS propuesto por Re et al. (1999), incluyendo ciertas modificaciones para adaptarlo al análisis en microplacas descritas por González-Centeno et al. (2012).

Para la preparación del reactivo ABTS se mezcló (1:1, v/v) una disolución 7 mM de ABTS (ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico) con otra disolución de 2.45 mM de $K_2S_2O_8$. La mezcla se incubó durante 24 h en oscuridad. Para la determinación de la capacidad antioxidante se realizó una dilución del reactivo (2:25, v/v) con EtOH:H₂O (25:75, v/v) en el momento de hacer las lecturas.

En cada pozo de la microplaca se introdujeron 190 μ L del reactivo ABTS resultante y se incubó durante 20 min a 25 °C. Pasado este tiempo se realizó una medida de la absorbancia a 734 nm. Posteriormente se adicionaron 10 μ L del extracto concentrado de aloe vera o de la recta de calibrado a cada pozo correspondiente. Cada microplaca estaba formada por dos filas para la recta de calibrado y seis filas con las muestras (12 muestras con seis replicados de cada una). El blanco utilizado para este análisis fue EtOH:H₂O (25:75, v/v). Se dejó reaccionar a 25 °C y se realizó una lectura de absorbancia a la misma longitud de onda pasados 30 min.

El incremento de absorbancia se calculó por diferencia entre la segunda medida de absorbancia y la lectura inicial del blanco y se correlacionaron con la recta de calibrado obtenida a partir de concentraciones conocidas del estándar de Trolox (comprendidas entre 0 y 0.8 mM).

3.3.3. Método FRAP

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos de Aloe Vera también se utilizó el método FRAP propuesto por Benzie and Strain (1996) con ciertas modificaciones para adaptarlo al análisis con microplacas descritas por González-Centeno et al. (2012).

Para la preparación del reactivo FRAP se combinaron tres disoluciones diferentes en proporciones (1:1:10, v/v/v). Una disolución 0.01 M de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazine), otra 0.02 M de $FeCl_3 \cdot H_2O$ y un tampón acético-acetato (pH 3.6, preparado con 3.1 g de CH_3COONa y 16 ml de CH_3COOH glacial en 1 litro).

Se realizó el mismo procedimiento que para el método de ABTS, a la misma temperatura y durante el mismo tiempo de incubación, pero en este caso las lecturas de absorbancia se realizaron a 593 nm.

Al igual que en el método ABTS el incremento de absorbancia se calculó por la diferencia entre la segunda medida de absorbancia y la lectura inicial del blanco y se correlacionó con la recta de calibrado realizada a partir de concentraciones conocidas del estándar de Trolox, en este caso, comprendidas entre 0 y 1 mM.

3.4. Diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta (MSR) se utilizó para determinar las condiciones que maximizan las variables de respuesta elegidas. Para llevar a cabo la MSR se utilizó un diseño del tipo Box-Behnken (DBB) de tres variables.

El modelo matemático correspondiente al DBB es el siguiente (Ecuación 2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Ecuación 2. Modelo matemático del diseño Box-Benhken

donde Y hace referencia a la respuesta estudiada. En este trabajo las respuestas evaluadas fueron el rendimiento de la extracción, el contenido de compuestos fenólicos totales y las capacidades antioxidantes medida por los métodos ABTS y FRAP. Por otra parte, el término X se refiere a las variables utilizadas en el estudio, el término β_0 es la constante del modelo, mientras que los coeficientes del modelo están representados por β_i , β_{ii} y β_{ij} , los cuales representan a los efectos lineales, cuadráticos, y la interacción entre las variables i y j , respectivamente. Finalmente, el término ε representa el error experimental.

Las variables utilizadas en el DBB para la extracción de antioxidantes de la aloe vera fueron: la temperatura, el tiempo de extracción y la el porcentaje de etanol en el disolvente (mezcla etanol-agua). Los tres niveles en los que fueron estudiadas las variables se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles de las variables estudiadas

Variable	Unidades	Codificación	Niveles		
			-1	0	1
Temperatura	°C	X_1	20	40	60
Tiempo	min	X_2	2	6	10
[EtOH]	%	X_3	25	50	75

3.5. Análisis estadístico

Para analizar la regresión lineal múltiple de los diseños de la MSR se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los coeficientes de regresión para los términos lineales, cuadráticos, y las interacciones también se determinaron a partir de la regresión lineal múltiple.

La importancia de cada uno de los coeficientes de la regresión se evaluó estadísticamente calculando el valor t del error puro obtenido a partir de la réplica en el punto central. Los coeficientes de cada parámetro fueron utilizados para generar las correspondientes superficies de respuesta. Todos los cálculos y gráficos presentados en este estudio se realizaron utilizando el software Statistica (Statsoft versión 7.0, EE.UU.).

Para validar los modelos de la MSR se utilizaron diferentes parámetros como el análisis de falta de ajuste (LOF) y el valor de R^2 , los cuales fueron obtenidos mediante el ANOVA.

4. Resultados y discusión

4.1. Elección de los niveles de estudio de las variables del proceso de extracción

Con el objetivo de definir la región de estudio para el proceso de optimización de la extracción de compuestos fenólicos de gel de Aloe vera, se realizó un estudio previo de las variables más influyentes. Recientemente, Kim et al. (2014) realizaron un estudio de optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos del gel de Aloe vera. Estos autores, evaluaron el efecto de la temperatura (25-60 °C), el tiempo (1-4 h), la relación líquido:sólido (30-60 mL/g) y el porcentaje de etanol en el solvente etanol:agua (0-100 %), sobre el rendimiento de extracción, la concentración de Aloínas A y B, Aloesin, polisacáridos totales y compuestos polifenólicos; también se evaluó la actividad antioxidante determinada mediante los métodos FRAP, CUPRAC y DPPH. Estos autores observaron que las condiciones de temperatura y relación líquido: sólido, óptimas para la mayoría de las respuestas eran de 60 °C y ~450 mL/g, respectivamente. No obstante, el porcentaje de etanol en el solvente de extracción osciló desde un 25 % hasta un 80 %, en función de la fracción analizada. Finalmente, estos autores observaron que el tiempo no presentó ningún efecto significativo sobre las respuestas estudiadas, por lo que concluyeron que al cabo de 1 h de proceso se había logrado extraer más del 90 % de las fracciones de interés. Previamente, Rodríguez-González et al. (2011) y Rodríguez-González, Femenia, Minjares-Fuentes, and González-Laredo (2012) reportaron que el gel de Aloe vera presenta una elevada capacidad de retención de agua (30 g de agua/g) así como de hinchamiento (>300 mL/g), lo cual limita el uso de agua como solvente, por tal motivo es necesario realizar una mezcla de etanol:agua, con una concentración mínima de 25 % de etanol y una relación de líquido:sólido superior a los 300 mL/g, ya que concentraciones inferiores de etanol, promueven que la muestra capture el agua del solvente y se hinche haciendo inviable el proceso de extracción. Por otra parte, Akowuah, Mariam, and Chin (2009) y Alberti et al. (2014) determinaron que la aplicación de temperaturas superiores a 60 °C en el proceso de extracción de compuestos polifenólicos promueve su degradación.

Basados en estas premisas, se fijaron los niveles de estudio para las variables temperatura (20-60 °C) y porcentaje de etanol en el solvente (25-75 %). Por otra parte, la relación líquido:sólido se mantuvo constante a 450 mL/g, ya que relaciones inferiores promovieron la formación de gel. Sin embargo, para definir los niveles para la variable del tiempo se llevó a cabo un análisis exhaustivo, evaluando el rendimiento de extracción a diferentes tiempos (1, 5, 10, 20, 30, 60 min) manteniendo la temperatura y el porcentaje de etanol constantes a 40 °C y 50 %, respectivamente.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos del estudio del efecto del tiempo sobre el rendimiento de extracción de compuestos polifenólicos de gel de Aloe vera. En esta figura se puede observar que el máximo rendimiento se obtiene en los primeros 10 min de extracción. Un aumento del tiempo de extracción no promueve un incremento significativo del rendimiento de extracción. Por tanto, los niveles seleccionados para la variable tiempo de extracción fueron de 2, 6 y 10 min.

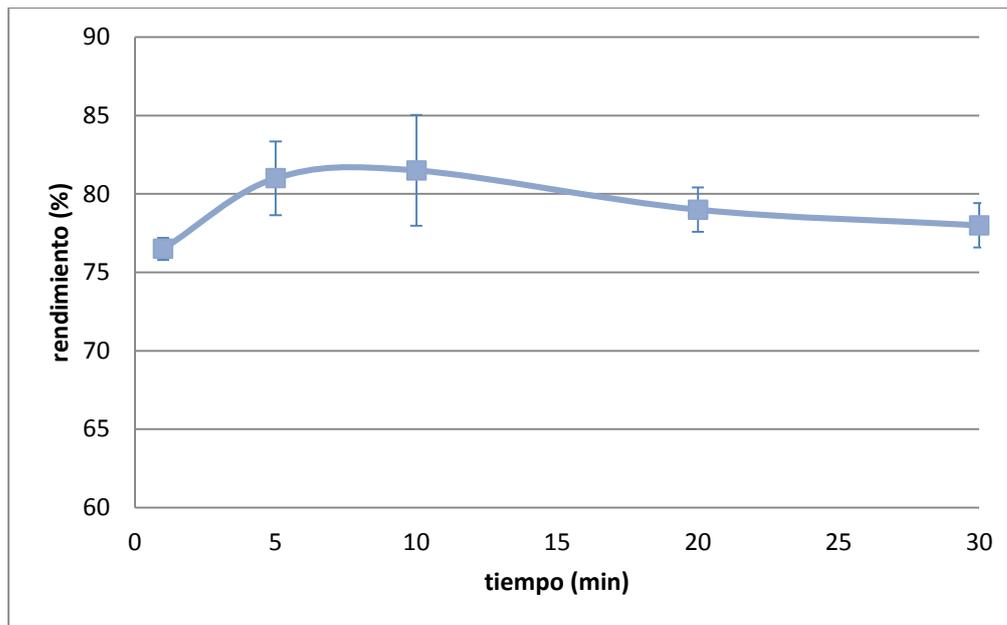


Figura 7. Relación entre el rendimiento de la extracción y el tiempo de extracción

4.2. Aplicación del diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta (MSR) fue utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción de antioxidantes del gel de Aloe vera. Con el objetivo de adaptar la MSR al proceso, se utilizó un diseño experimental de tipo Box-Behnken (DBB) de 3 variables con 3 réplicas del punto central.

Tabla 3. Resultados experimentales de las variables de respuesta en la extracción de antioxidantes del gel de Aloe vera

Exp	Variables			Experimental				Estimado			
	X ₁	X ₂	X ₃	Rendimiento	Fenoles totales	ABTS	FRAP	Rendimiento	Fenoles totales	ABTS	FRAP
1	0	1	1	53.06	314.18	244.64	107.16	52.17	313.30	301.57	157.23
2	1	-1	0	74.26	379.88	230.51	65.98	73.35	418.58	317.26	139.23
3	1	0	-1	79.21	552.09	408.28	197.42	79.22	512.50	378.46	174.24
4	0	1	-1	83.00	310.69	229.73	86.91	83.50	299.54	182.69	40.79
5	-1	1	0	73.74	250.86	189.53	69.75	74.65	212.15	102.78	-3.50
6	-1	-1	0	75.76	243.81	214.55	52.50	76.27	193.07	137.69	-16.81
7	0	0	0	82.35	339.81	294.41	53.98	79.80	315.48	243.52	61.17
8	0	-1	-1	84.00	279.92	262.15	94.74	84.89	280.81	205.22	44.67
9	-1	0	-1	85.86	299.13	520.37	69.54	84.45	348.98	654.15	188.91
10	0	-1	1	50.00	311.85	267.61	95.13	49.50	323.00	314.65	141.25
11	1	1	0	76.77	357.80	239.71	68.72	76.25	408.54	316.57	138.02
12	0	0	0	76.24	306.64	217.37	65.52	79.80	315.48	243.52	61.17
13	-1	0	1	46.53	289.95	266.12	108.79	46.52	329.53	295.94	131.97
14	1	0	1	49.02	637.75	1098.78	563.57	50.43	587.90	964.99	444.20
15	0	0	0	80.81	299.98	218.77	64.00	79.80	315.48	243.52	61.17

La Tabla 3 muestra los resultados experimentales de los 15 puntos experimentales del DBB para el rendimiento de extracción, el contenido de polifenoles totales, así como para la capacidad antioxidante determinada por los métodos ABTS y FRAP.

Los resultados mostraron una gran variabilidad para cada uno de los cuatro parámetros. En el caso del rendimiento de extracción los valores obtenidos se situaron entre un 46.5 % y un 85.9 %. Por otra parte, los compuestos fenólicos totales oscilaron entre 277.3 y 637.8 mg AG/100 g muestra. Mientras que para la capacidad antioxidante evaluada por los métodos ABTS y FRAP, los valores estuvieron comprendidos entre 189.5 y 1098.8, y entre 52.5 ya 563.6 mg TROLOX/100 g muestra, respectivamente. El rendimiento más alto se obtuvo en las siguientes condiciones: $X_1=20$ °C, $X_2=6$ min y $X_3=25$ %. Mientras que el contenido total de compuestos fenólicos, así como la mayor capacidad antioxidante evaluada tanto por el método ABTS como por el método FRAP, se registraron cuando se utilizaron las condiciones de extracción de: $X_1=60$ °C, $X_2=6$ min y $X_3=75$ %.

4.3. Ajuste de los modelos de superficie de respuesta

Con la finalidad de evaluar la significancia de los modelos de regresión lineal múltiple generados por la MSR se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 4). Los modelos de regresión lineal múltiple generados por la MSR están formados por tres componentes: un componente lineal, un componente cuadrático y un componente de interacción lineal, los cuales a su vez determinan el orden del modelo desarrollado.

En el caso del modelo obtenido para el rendimiento de la extracción tanto el componente lineal como el cuadrático fueron significativos ($p<0.05$). En el caso del modelo desarrollado para la cantidad de fenólicos totales, la componente cuadrática no fue significativa ($p>0.05$), aunque sí lo fue la componente lineal ($p<0.05$). Esto indica que el comportamiento de este parámetro puede ser descrito mediante una función lineal. Por otra parte, en el modelo desarrollado para la capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS aunque la componente lineal no fue significativa ($p>0.05$) si lo fue la componente cuadrática ($p<0.05$). Este hecho indica que el modelo desarrollado para esta respuesta es una función cuadrática o modelo de segundo orden.

Finalmente, todos los componentes del modelo de regresión formulado para la capacidad antioxidante determinada mediante método FRAP no fueron significativos ($p>0.05$), de ahí que el modelo de regresión para esta respuesta no fuera significativo.

Adicionalmente, se evaluó el análisis de la falta de ajuste (LOF) de los modelos desarrollados, con el objetivo de observar si estos se ajustaban correctamente a los datos experimentales. Un valor de $p>0.05$ en la prueba de LOF indica que el modelo formulado presenta un buen ajuste a los datos experimentales, siendo capaz de hacer predicciones de la respuesta. En este caso, el análisis de LOF mostró que los modelos formulados para el rendimiento de extracción, para la cantidad de compuestos fenólicos totales y, también, para el método ABTS, se ajustaron a los datos experimentales ($p>0.05$). En cambio el modelo formulado para el método FRAP presentó una evidente falta de ajuste ($p<0.05$).

Además, el coeficiente de correlación R^2 también fue utilizado para evaluar el porcentaje de respuestas que son explicadas por los modelos formulados. Los valores de R^2 fueron de 0.989 para el modelo del rendimiento de la extracción, mientras que para el modelo correspondiente al

contenido de compuestos fenólicos totales fue de 0.895 y para el modelo del método ABTS 0.893. En cambio, para el modelo del método FRAP se obtuvo un valor inferior de 0.743.

Tabla 4. ANOVA del DBB para la extracción de antioxidantes del gel de Aloe vera

	Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P	R ²
Rendimiento	Regresión	9	2741.60	304.62	53.50	0.000	0.989
	Lineal	3	2227.83	742.61	130.41	0.000	
	Cuadrático	3	483.65	161.22	28.31	0.001	
	Interacción	3	30.12	10.04	1.76	0.270	
	Falta de ajuste	3	8.25	2.75	0.27	0.844	
Fenólicos totales	Regresión	9	147785.00	16420.50	4.72	0.051	0.895
	Lineal	3	90603.00	30200.90	8.67	0.020	
	Cuadrático	3	54519.00	18173.00	5.22	0.053	
	Interacción	3	2663.00	887.70	0.25	0.855	
	Falta de ajuste	3	16499.00	5499.60	12.09	0.077	
ABTS	Regresión	9	661353.00	73484.00	4.64	0.053	0.893
	Lineal	3	104062.00	34687.00	2.19	0.208	
	Cuadrático	3	333843.00	111281.00	7.02	0.030	
	Interacción	3	223448.00	74483.00	4.70	0.064	
	Falta de ajuste	3	75347.00	25116.00	12.93	0.073	
FRAP	Regresión	9	171684.00	19076.00	1.61	0.312	0.743
	Lineal	3	67031.00	22343.60	1.89	0.250	
	Cuadrático	3	77785.00	25928.30	2.19	0.208	
	Interacción	3	26869.00	8956.20	0.76	0.565	
	Falta de ajuste	3	59178.00	197226.10	502.11	0.002	

Finalmente los términos individuales de cada uno de los componentes de los modelos también fueron analizados estadísticamente con el objetivo de observar aquellos que afectan significativamente a la respuesta del modelo. Para ello, se utilizaron los diagramas de Pareto con la finalidad de observar de forma gráfica la significancia de los diferentes términos. De igual forma este tipo de gráfico permite observar la jerarquía en importancia de los diferentes términos que intervienen en el modelo. Este análisis se realizó para cada uno de los modelos desarrollados, los cuales se muestran en los apartados siguientes.

4.3.1. Rendimiento de la extracción

La Figura 8 muestra el diagrama de Pareto que permite observar de forma gráfica los diferentes términos que presentan efectos significativos sobre el modelo formulado para el rendimiento de la extracción.

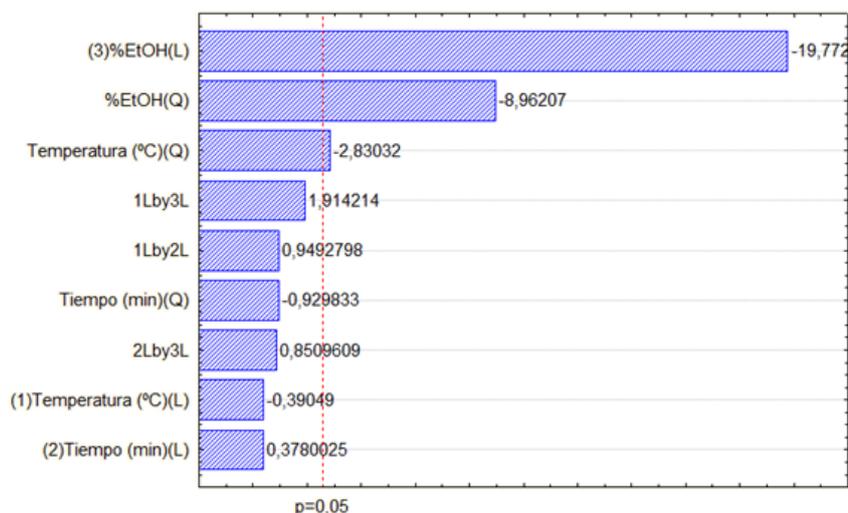


Figura 8. Diagrama de Pareto para el modelo del rendimiento de la extracción

Como puede observarse el término lineal del porcentaje de etanol fue el factor más importante de este modelo, seguido por los términos cuadráticos de la misma variable y de la temperatura ($p < 0.05$). Por otra parte, tanto los términos lineales de tiempo y temperatura, como el término cuadrático de tiempo y los términos de interacción mostraron ser no significativos ($p > 0.05$) para esta respuesta.

4.3.2. Extracción de compuestos fenólicos totales

Como puede observarse en la Figura 9, el efecto predominante sobre el modelo desarrollado para la extracción de polifenoles totales fue generado únicamente por el término lineal de la temperatura, indicando por tanto que esta variable es la más influyente ($p < 0.05$). Mientras que, los términos lineales del porcentaje de etanol y el tiempo, así como los términos cuadráticos y los términos de interacción mostraron ser no significativos ($p > 0.05$) para el proceso de extracción de polifenoles totales.

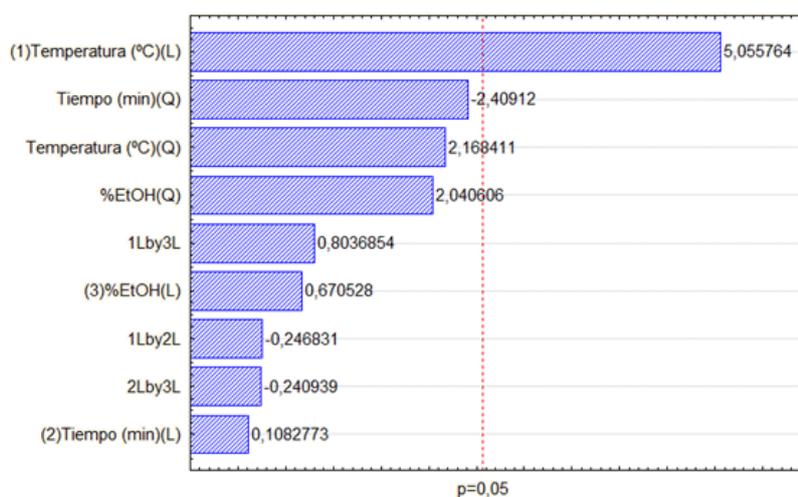


Figura 9. Diagrama de Pareto para la extracción de compuestos fenólicos totales

4.3.3. Capacidad antioxidante medida por el método ABTS

A partir de la Figura 10 cabe destacar como el efecto más importante sobre el modelo es debido a la interacción entre la temperatura y el porcentaje de etanol ($p < 0.05$), seguido por los términos cuadráticos del porcentaje de etanol y del tiempo. El resto de términos mostraron ser no significativos ($p > 0.05$) para este modelo.

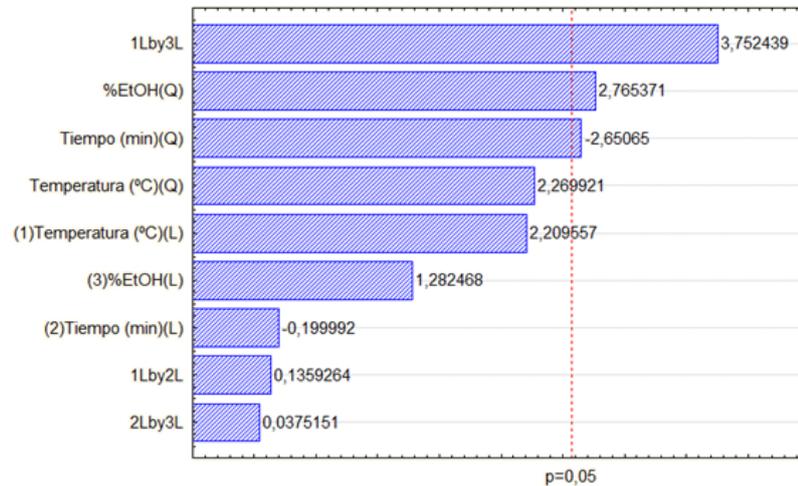


Figura 10. Diagrama de Pareto para la capacidad antioxidante medida con el método ABTS

4.3.4. Capacidad antioxidante medida con el método FRAP

En la Figura 11 puede observarse como los términos lineales, así como los términos cuadráticos y los de interacción mostraron no ser significativos para el desarrollo de un modelo de superficie de respuesta ($p > 0.05$). Este hecho indica que la capacidad antioxidante medida mediante el método FRAP no puede ser modelizada mediante la MSR en la región de estudio evaluada en este trabajo.

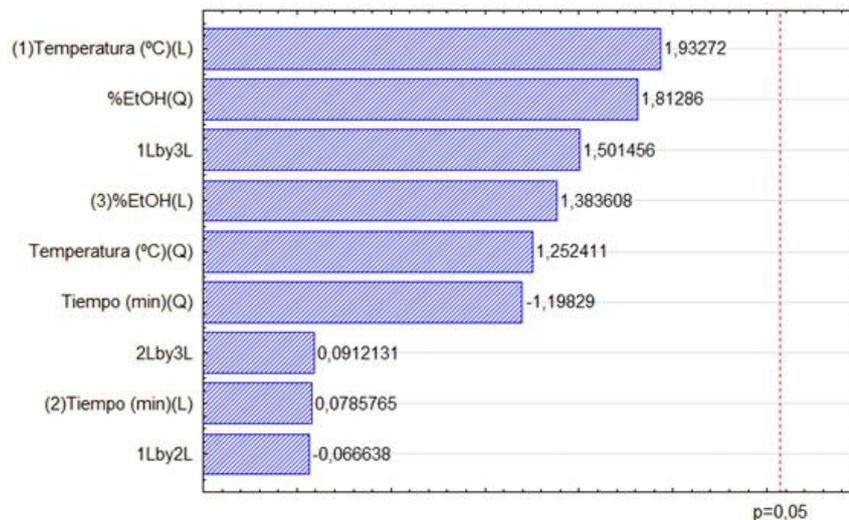


Figura 11. Diagrama de Pareto de la capacidad antioxidante medida con el método FRAP

4.3.5. Modelos de superficie de respuesta

En base a los resultados obtenidos a partir del ANOVA y de los diagramas de Pareto correspondientes a cada una de las variables de respuesta, se observó como el rendimiento de extracción, el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS pueden ser ajustadas mediante un modelo de superficie de respuesta, en cambio la capacidad antioxidante medida por el método de FRAP no pudo ser ajustada.

Por tanto, mediante la aplicación de la técnica de MSR se desarrollaron los correspondientes modelos para cada una de las respuestas antes mencionadas. Dichos modelos se muestran a continuación:

$$\text{Rendimiento} = 79.8 - 0.3X_1 + 0.3X_2 - 16.7X_3 - 3.5X_1^2 - 1.2X_2^2 - 11.1X_3^2 + 1.1X_1X_2 + 2.28X_1X_2 + X_2X_3$$

Ecuación 3. Ecuación del modelo correspondiente al rendimiento de la extracción

$$\text{Polifenoles} = 315.5 + 105.5X_1 + 2.26X_2 + 14X_3 + 66.6X_1^2 - 74X_2^2 + 62.6X_3^2 - 7.3X_1X_2 + 23.7X_1X_2 - 7.1X_2X_3$$

Ecuación 4. Ecuación del modelo correspondiente a la concentración de compuestos fenólicos totales

$$\text{ABTS} = 243.5 + 98.3X_1 - 8.9X_2 + 57X_3 + 148.7X_1^2 - 173.6X_2^2 + 181.2X_3^2 + 8.5X_1X_2 + 236.2X_1X_2 + 2.4X_2X_3$$

Ecuación 5. Ecuación del modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS

4.4. Superficies de respuesta

La superficie de respuesta es la representación gráfica del modelo generado mediante la regresión lineal múltiple. De esta forma es posible visualizar cada una de las respuestas en función de las variables o factores implicados en el proceso estudiado. Estas gráficas pueden ser presentadas en dos y tres dimensiones, las cuales son conocidas comúnmente como gráfica de contorno y gráfica de superficie, respectivamente.

4.4.1. Rendimiento de la extracción

Las Figura 12a, b y c muestran las representaciones gráficas del modelo desarrollado para el rendimiento de extracción en función de la temperatura, el tiempo de extracción y el porcentaje de etanol utilizado.

En la Figura 12a puede observarse una disminución del rendimiento de la extracción desde alrededor de un 65 hasta un 60 % al aumentar la temperatura de 20 a 60 °C, independientemente del tiempo de extracción utilizado.

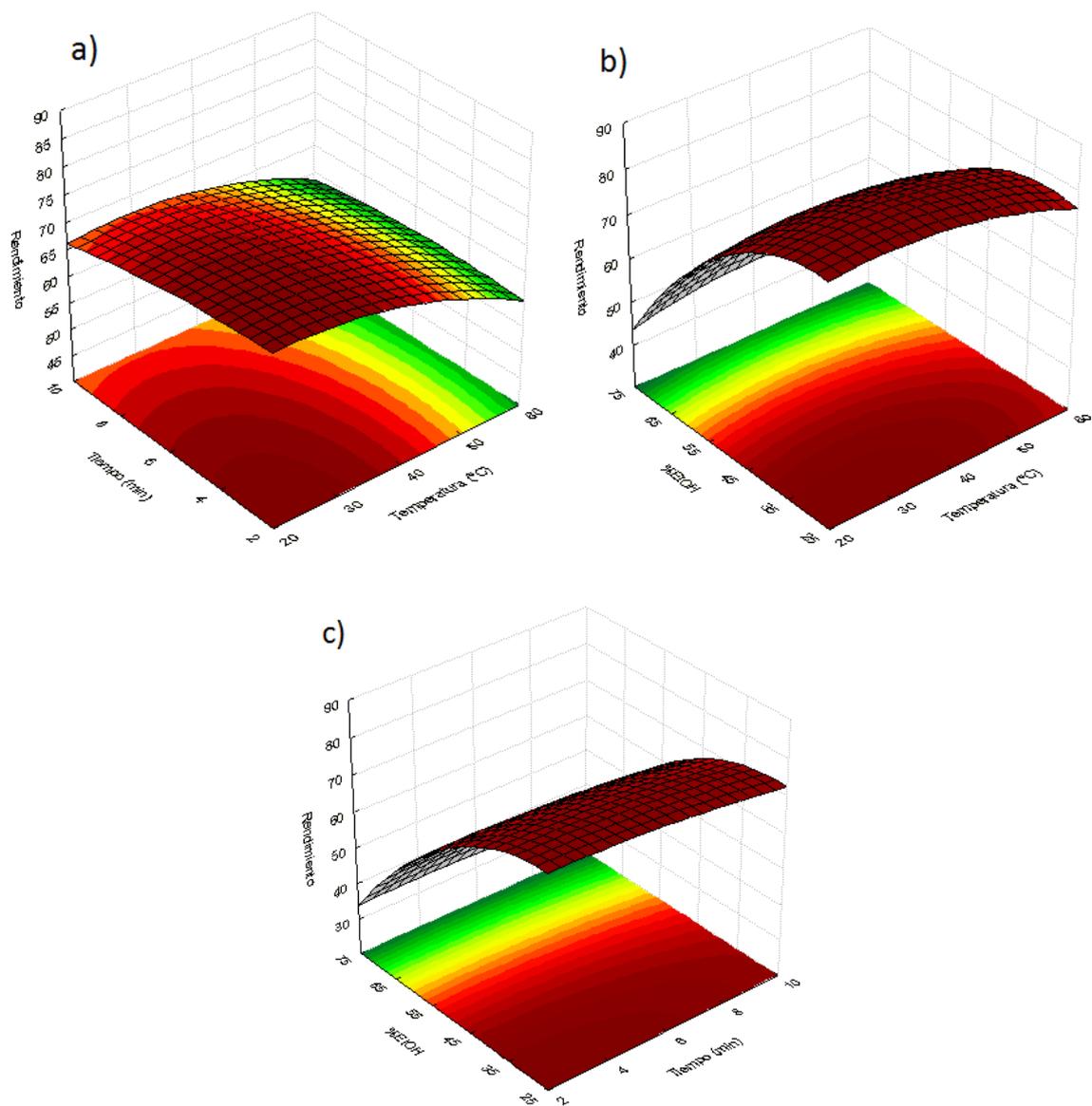


Figura 12. Superficies de respuesta para el rendimiento de la extracción

En las Figura 12b y 12c se observa como al aumentar la concentración de etanol de 25 a 75 % el rendimiento de la extracción se reduce desde aproximadamente un 70 hasta alrededor de un 40 %.

Estos resultados son coincidentes con los presentados por Kim et al. (2014), quienes también observaron como el rendimiento de la extracción de gel de Aloe vera disminuía al aumentar la concentración de etanol.

4.4.2. Compuestos fenólicos totales

En las Figura 13a, b y c pueden observarse las representaciones gráficas correspondientes al modelo desarrollado para la extracción de compuestos fenólicos totales.

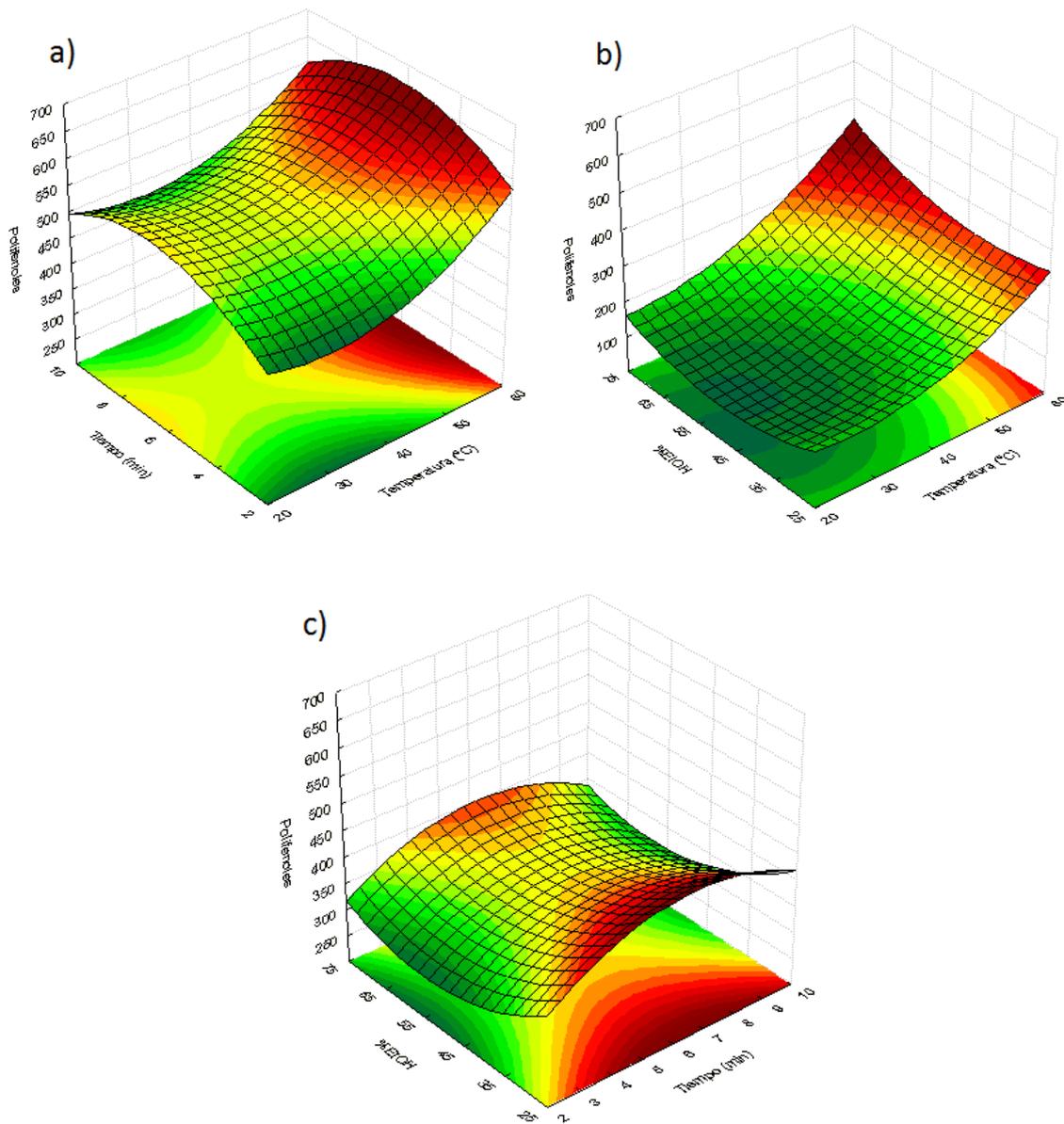


Figura 13. Superficie de respuesta para el contenido de compuestos fenólicos totales

En la Figura 13a puede observarse como, para un tiempo de extracción de 6 min, un aumento en la temperatura desde 30 hasta 60 °C, implica un incremento, en la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos, desde 500 hasta aproximadamente 650 mg AG/100 g muestra.

Por otra parte, al aumentar la temperatura, de 20 a 60 °C, y la concentración de etanol de 25 a 75 %, la concentración de compuestos fenólicos totales extraídos aumenta desde 150 hasta aproximadamente 550 mg AG/100 g muestra (Figura 13b). Este resultado es similar a lo reportado previamente por Liyana-Pathirana and Shahidi (2005) y Prasad et al. (2011) quienes reportaron que el contenido de compuestos fenólicos extraídos a partir de trigo y de la piel de *Mangifera pajang* Kosterm, respectivamente, aumentaba cuando la concentración de etanol en el solvente de extracción aumentaba desde aproximadamente 30 hasta un 70 %. Asimismo, Spigno, Tramelli, and De Faveri (2007) obtuvieron un elevado contenido en polifenoles, a partir de semillas de uva, cuando usaron una concentración de etanol del 50 %. Diversos autores sugieren que la extracción de los compuestos fenólicos es más eficaz con disolventes formados a partir de mezclas de

etanol:agua debido a que algunos compuestos fenólicos se encuentran glicosilados y la presencia de azúcares aumenta su solubilidad en agua (Alberti et al., 2014; Jayaprakasha, Girennavar, & Patil, 2008; Shahidi & Naczk, 2003; Spigno et al., 2007).

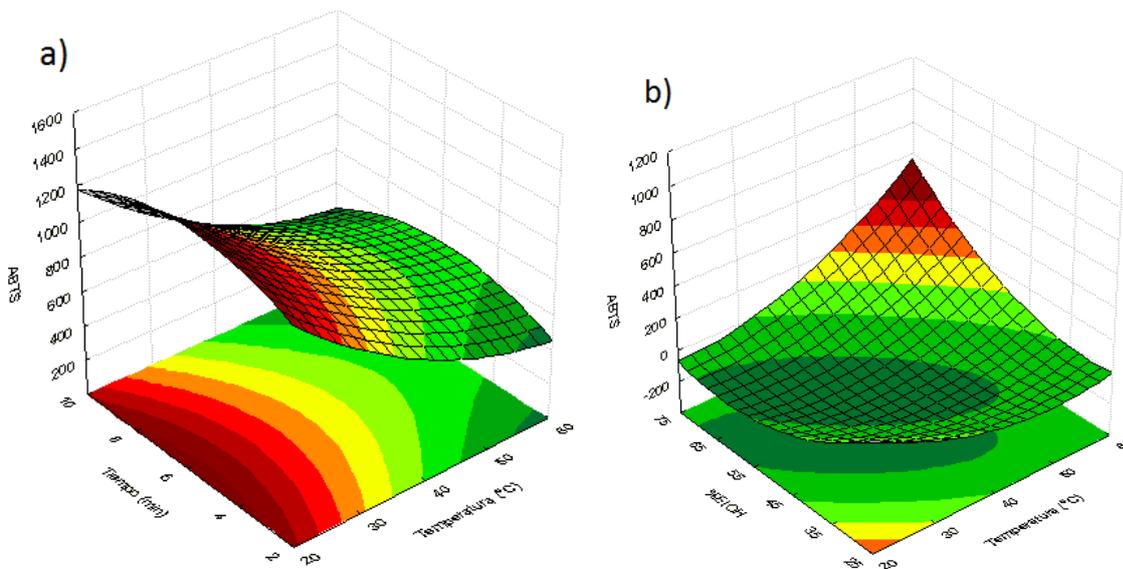
4.4.3. Capacidad antioxidante medida por el método ABTS

En las Figura 14a, b y c pueden observarse las representaciones gráficas correspondientes al modelo desarrollado para la capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS.

En la Figura 14a se observa como la temperatura tiene un efecto negativo sobre la capacidad antioxidante. Al aumentar la temperatura de extracción de 20 a 60 °C, la capacidad antioxidante se reduce aproximadamente de 1200 a 600 mg TROLOX/100 g de muestra. Así mismo, se observa cómo tras haber transcurrido aproximadamente unos 6 min de extracción se alcanza la mayor actividad antioxidante. Estos hechos no coinciden con lo observado por Kim et al. (2014) quienes observaron una influencia positiva de la temperatura con la capacidad antioxidante. No obstante Alberti et al. (2014), al medir la capacidad antioxidante mediante el método DPPH en manzanas, la temperatura si tuvo una influencia negativa sobre los valores obtenidos.

Por otra parte, en la Figura 14b, puede observarse como al incrementar la concentración de etanol desde 25 hasta un 75 % y la temperatura desde 20 hasta 60 °C, la capacidad antioxidante evaluada por el método ABTS aumenta desde valores inferiores a 200 hasta aproximadamente 600 mg TROLOX/100 g de muestra.

Adicionalmente, puede observarse que las extracciones llevadas a cabo utilizando concentraciones de etanol de 25 – 35 % y tiempos relativamente cortos, desde 2 – 10 min, promueven la obtención de extractos de gel de Aloe vera con una elevada capacidad antioxidante (Figura 14c).



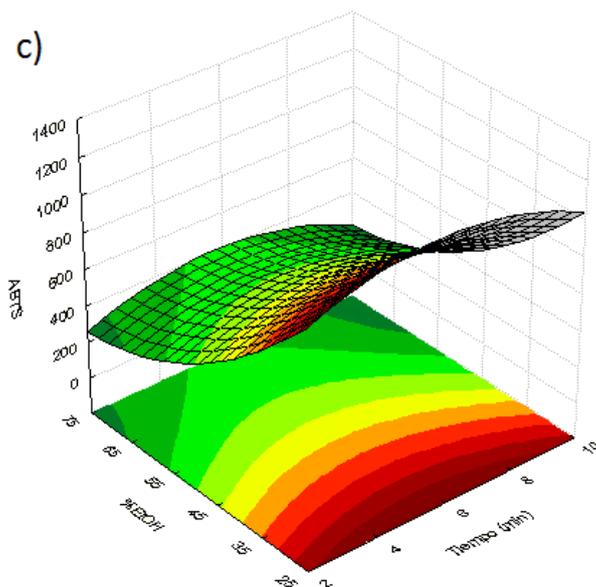


Figura 14. Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante medida con el método ABTS

4.4.4. Correlación

Recientemente, Jacobo-Velázquez and Cisneros-Zevallos (2009) sugirieron que la capacidad antioxidante estaba correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos presentes en plantas medicinales y diversos alimentos. Así, estos mismos autores observaron que cuando se obtienen bajos valores en el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), los compuestos no fenólicos tienen mayor relevancia sobre la capacidad antioxidante.

Con el objetivo de comprobar si existe alguna correlación entre las diferentes respuestas estudiadas en el presente trabajo, se realizó un estudio de correlación entre dichas respuestas. Los resultados del análisis de correlación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de los análisis de correlación

	Rendimiento	Polifenoles
Polifenoles	-0,249	
p	0,370	
ABTS	-0,330	0,796
p	0,229	0,000

Como se puede observar en la Tabla 5, no existe correlación entre el rendimiento de extracción y el resto de respuestas analizadas. Sin embargo si se obtuvo un valor de R^2 más elevado entre la respuesta de contenido de polifenoles y el método ABTS. Este valor sugiere que alrededor de un 20% de la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS no corresponde a compuestos polifenólicos. Este resultado confirma el hecho de que la capacidad antioxidante de un extracto no puede ser determinada por un solo método analítico, tal y como indican Huang et al. (2005).

4.5. Optimización y validación de los modelos

El software Statistica 7.0 se utilizó para encontrar las condiciones óptimas que maximizan cada una de las respuestas del proceso de extracción. En la Tabla 6 se muestran los valores de optimización de las tres variables de respuesta.

Tabla 6. Valores de las variables que maximizan el rendimiento de extracción, la cantidad de fenó totales y la capacidad antioxidante medida por el método ABTS.

Respuesta	Unidades	Variables de proceso		
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	EtOH (%)
Rendimiento	%	32	4	30
Fenólicos totales	mg AG/100 g de muestra	60	6	75
Capacidad antioxidante (ABTS)	mg TROLOX/100 g de muestra.	60	6	75

Para llevar a cabo la validación del rendimiento de extracción se utilizaron las condiciones óptimas presentes en la Tabla 6. En cambio, para llevar a cabo la validación de los modelos obtenidos para el contenido de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS, se identificaron nuevos puntos experimentales ya que las condiciones que maximizan estas respuestas ya se encuentran determinadas en el diseño experimental (Tabla 3). Los nuevos puntos fueron identificados de manera aleatoria por el software, con el objetivo de evaluar la validez de los modelos formulados.

Las nuevas condiciones experimentales así como los resultados de los 3 experimentos de validación pueden observarse en la Tabla 7, la cual incluye el valor calculado con el modelo formulado (valor estimado) y el valor obtenido de forma experimental.

Tabla 7. Validación de los modelos

Respuesta	Unidades	Variables de proceso			Valor estimado	Valor experimental
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	EtOH (%)		
Rendimiento	%	32	4	30	86.52	82±2.8
Fenólicos totales	mg AG/100 g de muestra	24	6	51	273.82	254±34
Capacidad antioxidante (ABTS)	mg TROLOX/100 g de muestra.	31	5	53	226.21	195±36

Como se puede comprobar en ninguno de los tres casos se observan diferencias significativas entre el valor estimado y el valor experimental, lo cual indica que los modelos formulados en el presente estudio permiten predecir con precisión los valores experimentales y, por tanto, pueden ser utilizados para optimizar el proceso de extracción de antioxidantes en el gel de Aloe vera.

5. Conclusiones

En el presente estudio se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con el objetivo de optimizar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes presentes en el gel de Aloe vera. A partir de los resultados obtenidos se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La combinación de los valores obtenidos mediante ANOVA, análisis de falta de ajuste (LOF) y el valor de R^2 indicaron que los datos experimentales del rendimiento de extracción, cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS se ajustan de forma significativa a un modelo cuadrático, mientras que los datos experimentales de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP no pudieron ser ajustados a este tipo de modelo.
- A partir de los diagramas de Pareto elaborados para cada respuesta se determinaron los diferentes términos que fueron influyentes para cada uno de los modelos obtenidos, así como la importancia de los mismos:
 - Para el rendimiento de extracción el término más importante fue el término lineal de la concentración de etanol, seguido por los términos cuadráticos del mismo y el de la temperatura.
 - En el caso de la cantidad de compuestos fenólicos totales el único término significativo fue el término lineal de la temperatura.
 - Para la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS el término más importante fue el término de interacción entre la temperatura y la concentración de etanol, seguido por los términos cuadráticos de la concentración de etanol y del tiempo de extracción.
 - En el caso de la capacidad antioxidante medida mediante el método FRAP ningún término resultó ser significativo.
- La similitud presentada entre las superficies de respuesta obtenidas de los compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS indica que la capacidad antioxidante determinada puede ser debida, en gran parte, a compuestos fenólicos.
- Mediante la MSR se determinaron las condiciones de temperatura, tiempo de extracción y concentración de etanol que maximizan cada una de las respuestas. Las condiciones y los valores máximos hallados fueron las siguientes:
 - Rendimiento de extracción: a 32 °C durante 4 min y utilizando etanol al 30 % como disolvente, se obtuvo un rendimiento del 82 ± 3 %.
 - Compuestos fenólicos totales: a 60 °C durante 6 min y utilizando etanol al 75 % como disolvente, se obtuvo una cantidad de compuestos fenólicos de 638 ± 9 mg AG/100 g de muestra.
 - Capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP: a 60 °C durante 6 min y utilizando etanol al 75 % como disolvente, se obtuvo un valor de 1099 ± 66 mg TROLOX/100 g de muestra.
- En el proceso de validación no se observaron diferencias significativas entre los valores experimentales y los valores estimados, lo cual indica que los modelos obtenidos son adecuados para la simulación del proceso de extracción de compuestos antioxidantes a partir del gel de Aloe vera.

6. Bibliografía

- Akowuah, G., Mariam, A., & Chin, J. (2009). The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Pharmacognosy Magazine*, 5(17), 81-85.
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149(0), 151-158.
- Araujo, P. W., & Brereton, R. G. (1996). Experimental design II. Optimization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(2), 63-70.
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Boudreau, M. D., & Beland, F. A. (2006). An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of Aloe Barbadensis (Miller), Aloe Vera. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 24(1), 103-154.
- Castillo, E. D. (2007). *Process Optimization: A Statistical Approach*: Springer.
- Choi, S., & Chung, M.-H. (2003). A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, 1(1), 53-62.
- Domínguez-Fernández, R. N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Alvarado-González, J. S., Calderón-Domínguez, G., Gutiérrez-López, G. F. (2012). El gel de Aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 23-43.
- Eshun, K., & He, Q. (2004). Aloe Vera: A Valuable Ingredient for the Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 91-96.
- Femenia, A., García-Pascual, P., Simal, S., & Rosselló, C. (2003). Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 397-405.
- Femenia, A., Sánchez, E. S., Simal, S., & Rosselló, C. (1999). Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, 39(2), 109-117.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., . . . dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
- Göktürk Baydar, N., Özkan, G., & Yaşar, S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18(9), 1131-1136.
- González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., & Teissedre, P.-L. (2012). Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 11850-11858.
- Hamman, J. (2008). Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel. *Molecules*, 13(8), 1599-1616.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.

- Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *Journal of Food Science*, 74(9), 107-113.
- Jayaprakasha, G. K., Girenavar, B., & Patil, B. S. (2008). Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*, 99(10), 4484-4494.
- Kim, S., Asnin, L., Assefa, A., Ko, E., Sharma, K., & Park, S. (2014). Extraction of Antioxidants from Aloe vera Leaf Gel: a Response Surface Methodology Study. *Food Analytical Methods*, 1-12.
- Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1), 47-56.
- Nwabueze, T. U. (2010). Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1768-1776.
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., & Ismail, A. (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised Mangifera pajang Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reynolds, T., & Dweck, A. C. (1999). Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*, 68(1-3), 3-37.
- Rodríguez-González, V. M., Femenia, A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Candelas-Cadillo, M. G., Simal, S., Rosselló, C. (2011). Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1675-1683.
- Rodríguez-González, V. M., Femenia, A., Minjares-Fuentes, R., & González-Laredo, R. F. (2012). Functional properties of pasteurized samples of Aloe barbadensis Miller: Optimization using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 225-232.
- Rodríguez, E. R., Martín, J. D., & Romero, C. D. (2010). Aloe vera as a Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(4), 305-326.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2003). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*: Taylor & Francis.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208.