

**EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS BIOACTIVOS A PARTIR DE
RESIDUOS AGROALIMENTARIOS**

ANA MARÍA ZULUAGA HURTADO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

**EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS BIOACTIVOS A PARTIR DE
RESIDUOS AGROALIMENTARIOS**

ANA MARÍA ZULUAGA HURTADO

Trabajo de grado en modalidad de investigación, presentado como requisito parcial para
optar al título de Químico.

Director:

DIANA MARÍA CHITO TRUJILLO, Ph.D.

Co-Directores:

MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.

Directora Grupo de investigación

Biotecnología, Calidad Mediambiental y Seguridad Agroalimentaria (BICAMSA)

MARIA LUZ SANZ

Investigador externo

Instituto de Química Orgánica General

CRISTINA SORIA

Investigador externo

Instituto de Química Orgánica General

ANA ISABEL RUÍZ

Investigador externo

Instituto de Química Orgánica General

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vii
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	2
2.1. Definición y clasificación de los carbohidratos	2
2.2. Propiedades biológicas de los carbohidratos	5
2.3. Presencia de carbohidratos bioactivos en vegetales.....	6
2.4. Extracción de carbohidratos bioactivos.....	10
2.5. Fraccionamiento de carbohidratos bioactivos	12
2.6. Análisis de carbohidratos bioactivos	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Adquisición, clasificación y tratamiento de muestras	17
4.2. Extracción de inositoles	18
4.3. Aplicación a residuos agroalimentarios.....	21
4.4. Extracción sólido-líquido (ESL) convencional.....	22
4.5. Fraccionamiento de carbohidratos.....	22
4.6. Análisis de carbohidratos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	22
4.7. Análisis estadístico.....	25
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	26
5.1. Estandarización del método analítico.....	26
5.2. Desarrollo y optimización de un método mediante EAM para la extracción de inositoles a partir de lechuga y escarola.....	42
5.3. Comparación del método de extracción asistido por microondas con la extracción sólido-líquido convencional.....	51
5.4. Obtención de extractos bioactivos a partir de distintos residuos agroalimentarios (hojas de lechuga y escarola y vainas de soja verde)	51
5.5. Fraccionamiento de carbohidratos.....	57
6. CONCLUSIONES	60
7. BIBLIOGRAFÍA	61
8. ANEXOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BSFTA	Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DE	Desviación estándar
EAD	Error absoluto de desviación
EAM	Extracción asistida por microondas
EFS	Extracción con fluidos super críticos
ELP	Extracción con líquidos presurizados
EP	Error de predicción
ESL	Extracción sólido-líquido
FOS	Fructooligosacáridos
GOS	Galactooligosacáridos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HMDS	Hexametildisilazano
I^T	índice de retención
PCOS	Síndrome de ovario poliquístico
R²	Coefficiente de regresión
RFOS	Oligosacáridos de la familia de la rafinosa
TFA	Ácido trifluoroacético
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsililderivados
TMSI	Trimetilsililimidazol
TMSO	Trimetilsililoximas
t_R	Tiempo de retención
d	Disolvente

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los inositoles.....	4
Figura 2. Formación de trimetilsilil derivados.	15
Figura 3. Gráfico Temperatura vs. Tiempo en la pantalla del microondas.	19
Figura 4. Perfil cromatográfico obtenido mediante CG-EM de los patrones de azúcares: (1) fructosa 1, (2) fructosa 2, (3) glucosa E, (4) glucosa Z, (5) sacarosa. PI: patrón interno.	26
Figura 5. Perfil cromatográfico obtenido por CG-EM de los patrones de inositoles: (1) Pinitol, (2) D-chiro-inositol y (3) myo-inositol. PI: patrón interno.	27
Figura 6. Fragmentaciones de inositoles libres.....	30
Figura 7. Fragmentación característica de metil-inositoles.....	30
Figura 8. Perfil cromatográfico del extracto obtenido mediante CG-EM a partir de 0,1 g de cantidad de muestra E4: (1) fructosa 1, (2) fructosa 2, (3) D-chiro-inositol, (4) glucosa E, (5) glucosa Z, (6) myo-inositol, (7) sacarosa. PI: patrón interno.	44
Figura 9. Comparación del porcentaje de inositoles extraídos a partir de: 0,1, 0,3 y 0,5 g de muestra E4.	44
Figura 10. Proceso de extracción en materiales vegetales.....	45
Figura 11. Representación gráfica del diseño experimental de Box-Behken.....	45
Figura 12. Diagrama de Pareto para la extracción de inositoles de E4.	48
Figura 13. Superficies de respuesta para la extracción de inositoles de E4 mediante EAM. (A) Temperatura y tiempo (B) Temperatura y etanol (C) Tiempo y etanol.	50
Figura 14. Diagrama de Pareto para la extracción de inositoles de L1.....	55
Figura 15. Superficies de respuesta para la extracción de inositoles de L1 mediante EAM. (A) Temperatura y etanol (B) Tiempo y etanol.	55
Figura 16. Perfil cromatográfico del extracto obtenido mediante CG-EM a partir de 0,5 g de la muestra L1: (1) pinitol, (2) fructosa 1, (3) fructosa 2, (4) D-chiro-inositol, (5) glucosa E, (6) glucosa Z, (7) myo-inositol, (8) sacarosa. PI: patrón interno.	57
Figura 17. Perfiles cromatográficos del extracto E4 a diferentes tiempos del tratamiento con levadura <i>Saccharomyces</i> . En color fucsia el control (A), en color negro durante el tratamiento después de 2h (B) y en color café después de 24h (C). (1) fructosa 1, (2) fructosa 2, (3) D-chiro-inositol, (4) glucosa E, (5) glucosa Z, (6) myo-inositol, (7) trehalosa.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de inositoles (mg/100g) en diferentes vegetales.	8
Tabla 2. Clasificación de las muestras de lechuga, escarola y vainas de soja verde.	17
Tabla 3. Variables independientes y sus niveles en el diseño experimental.	20
Tabla 4. Diseño experimental de Box-Behnken.	20
Tabla 5. Tiempos e índices de retención de los analitos de estudio.	27
Tabla 6. Prueba de normalidad para los inositoles en función de los días, Shapiro-Wilk.	31
Tabla 7. Prueba de normalidad para los azúcares en función de los días, Shapiro-Wilk.	31
Tabla 8. Prueba ANOVA para inositoles tomando el día como variable independiente.	32
Tabla 9. Prueba ANOVA para azúcares tomando el día como variable independiente.	32
Tabla 10. Datos de linealidad de inositoles y azúcares.	33
Tabla 11. Correlación de Pearson para inositoles.	34
Tabla 12. Correlación de Pearson para azúcares.	35
Tabla 13. Evaluación estadística de las pendientes e interceptos de las regresiones lineales obtenidas para los inositoles.	36
Tabla 14. Evaluación estadística de las pendientes e interceptos de las regresiones lineales obtenidas para los azúcares.	37
Tabla 15. ANOVA para evaluar la regresión lineal en las curvas de calibrado de inositoles.	38
Tabla 16. ANOVA para evaluar la regresión lineal en las curvas de calibrado de azúcares.	38
Tabla 17. Precisión instrumental evaluada como repetibilidad.	40
Tabla 18. Precisión instrumental evaluado como precisión intermedia.	41
Tabla 19. Límites de detección y de cuantificación de los analitos de estudio.	42
Tabla 20. Resultados de la optimización del tiempo de rampa.	43
Tabla 21. Resultados del diseño experimental Box-Behnken aplicado a la muestra E4. Las concentraciones de inositoles y azúcares están expresadas en mg/g muestra seca.	46
Tabla 22. Optimización de los ciclos de extracción para E4.	51
Tabla 23. Comparación de los métodos de extracción EAM y ESL.	51
Tabla 24. Contenido de inositoles (mg/g muestra seca) en las variedades de lechuga y escarola analizadas.	52
Tabla 25. Contenido de azúcares (mg/g muestra seca) en las variedades de lechuga y escarola analizadas.	52
Tabla 26. Resultados del diseño experimental Box-Behnken aplicado a la muestra de vainas de soja verde (L1).	54

RESUMEN

En la actualidad, la industria agroalimentaria busca alternativas al tratamiento de los residuos y subproductos que genera. Muchos de ellos son fuentes potenciales de productos de alto valor añadido, siempre y cuando se implemente el proceso adecuado de revalorización y reciclaje. El Departamento Nacional de Planeación en el año 2016, proyectó que para el 2017 se aprovecharía el 20% de los residuos que van a los rellenos sanitarios, sin embargo, no se logró superar el 17% (Peñaranda Gonzalez, Montenegro Gomez, & Giraldo Abad , 2017). Este constante desafío por encontrar estrategias que permitan el aprovechamiento de estos residuos abre nuevas vías de investigación.

Existen diferentes tipos de residuos agroalimentarios que pueden ser aprovechados por su alto contenido en compuestos bioactivos por industrias como la farmacéutica, cosmética, nutricional y plaguicida. Entre dichos compuestos bioactivos destacan los carbohidratos y en concreto los inositoles que son un grupo de carbohidratos de estructura cíclica que presentan diversas propiedades bioactivas tales como la disminución del nivel de azúcar en sangre al actuar de forma similar a la insulina. Estos compuestos se encuentran en vegetales tales como lechugas, escarola, etc. y en legumbres, entre otras fuentes.

En el presente estudio se desarrolló una metodología para la extracción asistida por microondas (EAM) de carbohidratos bioactivos, específicamente inositoles, a partir de lechuga, escarola y vainas de soja verde adquiridas en Colombia y España. Además, se estandarizó una metodología analítica por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para la identificación y cuantificación de los carbohidratos extraídos, la cual cumplió con los parámetros estadísticos requeridos como linealidad y precisión instrumental evaluada intra-día e inter-día.

Las condiciones óptimas para la extracción por EAM fueron: 0,1 g de muestra /10 mL de disolvente (20% etanol), 40°C, 30 min, y 1 ciclo de extracción para las lechugas y de 120°C, 16,5 min y 0% etanol para las vainas de soja verde.

El contenido total de inositoles se evaluó en cinco variedades de lechuga y en una variedad de escarola encontrándose valores entre 1,53 y 2,70 mg/g muestra seca para *D-chiro*-inositol y entre 2,72 y 3,38 mg/g muestra seca para *myo*-inositol, en el caso de las lechugas. Mientras que para la escarola se encontraron valores (superiores) tanto para *D-chiro*-inositol (4,92 mg/g muestra seca) como para el *myo*-inositol (3,75 mg/g muestra seca). En las vainas de soja verde el contenido total de inositoles encontrado fue de 57,96 mg/g muestra seca de pinitol, 1,29 mg/g muestra seca de *D-chiro*-inositol y 1,22 mg/g muestra seca de *myo*-inositol.

La extracción por EAM en condiciones óptimas permitió obtener un 26% más (5,42 mg/g muestra seca) de inositoles comparado con la extracción convencional sólido-líquido (4,01 mg/g muestra seca).

Con el fin de enriquecer los extractos en inosítoles, se implementó un procedimiento biotecnológico con levaduras del género *Saccharomyces*, logrando una remoción total de los azúcares que se coextraen con los inosítoles (sacarosa, fructosa y glucosa) a las 2 horas de tratamiento.

Por tanto, el método de extracción por EAM junto con el procedimiento de fraccionamiento selectivo empleando *S. cerevisiae* resulta prometedor para la obtención de extractos enriquecidos en inosítoles a partir de residuos agroalimentarios.

Palabras claves: EAM, CG-EM, carbohidratos prebióticos, inosítoles, *Lactuca*, *Cichorium*, *Glycine*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, existe un gran interés en la obtención de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales y, en especial, de residuos agroalimentarios, que puedan ser empleados como ingredientes en alimentos. En Colombia se generan 27.500 toneladas/día de residuos sólidos entre industriales y domésticos, de los cuales el 65% corresponde a residuos sólidos orgánicos dentro de los que se encuentran los residuos vegetales, los cuales están infrautilizados por falta de alternativas viables para su uso (Jaramillo Henao & Zapata Marquez, 2008). La obtención de carbohidratos bioactivos, tales como prebióticos o inositoles, a partir de dichos residuos, se podría considerar una propuesta atractiva para su aprovechamiento y revalorización, y es uno de los campos de investigación en desarrollo dentro del área de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Entre las implicaciones positivas para la salud humana asociadas a los carbohidratos prebióticos e inositoles, destaca la estimulación del sistema inmune, el incremento de la resistencia a la invasión de las bacterias intestinales patógenas, la mejora de la actividad intestinal, la protección contra el cáncer y el incremento de la biodisponibilidad de minerales (Ruiz Aceituno L., 2015).

La obtención de estos carbohidratos bioactivos a partir de matrices naturales, exige el desarrollo de métodos de extracción. Convencionalmente, se lleva a cabo a través de extracción sólido-líquido (ESL) empleando disolventes orgánicos o acuosos. Sin embargo, esta técnica implica un elevado consumo de disolventes, casi siempre de elevada calidad, largos tiempos de procesado y produce bajos rendimientos (Florez, Conde, & Dominguez, 2014). Debido a estas limitaciones en los últimos años se ha promovido la búsqueda de técnicas alternativas que aceleren la extracción, a través de la aplicación de algún tipo de energía, permitiendo la recuperación total de los analitos de una forma más rápida y eficaz. Entre dichas técnicas se encuentra la extracción asistida por microondas (EAM) (Florez, Conde, & Dominguez, 2014). Sin embargo, los reportes existentes en la literatura relacionados con la extracción de carbohidratos bioactivos por EAM a partir de residuos agroalimentarios son escasos. De hecho, hasta donde se sabe, sólo se ha empleado para la extracción de inositoles e inulina de brácteas de alcachofa (Ruiz Aceituno, Garcia Sarrio, Rodriguez B, Ramos, & Sanz, 2016). Por lo cual, resulta de interés el desarrollo de nuevos métodos basados en EAM para la extracción de carbohidratos bioactivos a partir de otras matrices alimentarias, como pueden ser las hojas de lechuga. En estos residuos se ha identificado la presencia de algunos inositoles (*chiro*-, *scyllo*- y *myo*-inositol) (Hernandez Hernandez O, Ruiz Aceituno, Sanz, & Martinez Castro, 2011). Por tanto, este trabajo plantea el desarrollo de un procedimiento de extracción asistida por microondas para obtener extractos enriquecidos en inositoles a partir de hojas de lechuga en tiempos cortos y con un consumo mínimo de disolvente.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Definición y clasificación de los carbohidratos

Los **carbohidratos** o sacáridos, son componentes esenciales de los organismos vivos y son, de hecho, la clase más abundante de moléculas biológicas (Voet & Voet, 2006). Están constituidos por átomos de C, H y O y muchos poseen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$. Se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos según el grado de polimerización.

Los **monosacáridos** son los carbohidratos más sencillos y están constituidos por una cadena de átomos de carbono a los que se unen grupos hidroxilo. Uno de los átomos de carbono tiene unido un grupo carbonilo; según éste se encuentre en posición terminal o no, reciben el nombre de aldosas o cetosas (Ruiz Aceituno L., 2015). Estos se caracterizan también por no tener enlaces glicosídicos con otras unidades.

En disolución, las conformaciones de cadena abierta de monosacáridos de mayor tamaño (aldopentosas y hexosas) aparecen en equilibrio con sus correspondientes formas cíclicas, estando estas últimas más favorecidas. Este equilibrio puede verse modificado en función del disolvente y de la composición y temperatura de la disolución. Las estructuras cíclicas son el resultado de la reacción de los alcoholes con aldehídos para formar hemiacetales y con cetonas para formar hemicetales (Voet & Voet, 2006).

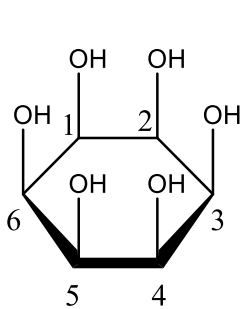
Las formas cíclicas más frecuentes son, un anillo de 6 átomos de carbono que se conoce como piranosa en analogía con el pirano, y un anillo de 5 átomos de carbono conocido como furanosas, en analogía con el furano. Tras la ciclación, el grupo carbonilo se convierte en un átomo de carbono asimétrico. El par de diasterómeros que resulta se conocen como anómeros (α y β) y el carbono del hemiacetal o hemicetal se considera como carbono anomérico (Ruiz Aceituno L., 2015).

Los **oligosacáridos**, son carbohidratos constituidos por entre dos y diez unidades de monosacáridos unidas por un enlace O-glicosídico. Según el número de unidades, pueden ser: disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, etc.

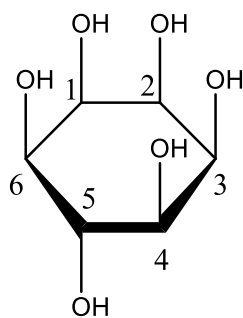
Los **polisacáridos**, están constituidos por un elevado número de monosacáridos que se unen entre sí mediante enlaces glicosídicos formando cadenas lineales o ramificadas.

Además de los mono, di y polisacáridos ya descritos, dentro del término carbohidratos se incluyen también las sustancias derivadas de los mismos, tales como ácidos aldónicos, aldáricos y urónicos (Nelson & Cox, 2009), y polialcoholes

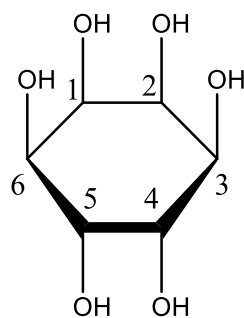
o **alditales** no cíclicos, en los cuales el grupo carbonilo de los monosacáridos puede reducirse mediante hidrógeno gaseoso en presencia de catalizadores metálicos para formar los correspondientes alditales, perteneciendo a este grupo el D-glucitol, D-manitol, D-sorbitol. Estas reducciones pueden ser también efectuadas mediante enzimas (Nelson & Cox, 2009). Existen además de los anteriores, polialcoholes cíclicos, conocidos como **ciclitales**, donde al menos tres de los carbonos poseen un grupo hidroxilo. Dentro de esta categoría se encuentran los inositales, cuya estructura es un anillo de seis carbonos con un grupo hidroxilo en cada uno de ellos. Con fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$ y nueve estereoisómeros posibles que se muestran en la **Figura 1**, se nombran con los prefijos: *cis-*, *epi-*, *allo-*, *neo-*, *myo-*, *muco-*, *D-chiro-*, *L-chiro-* y *scyllo-* (Al-Suod, Ligor, Ratiu, Rafinska, Gorecki, & Buszewski, 2017). La nomenclatura de estos compuestos se resume en las recomendaciones emitidas por la Comisión sobre la Nomenclatura de Química Orgánica de la IUPAC y por la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica 1973. Son la consecuencia de unas reglas provisionales de 1968 sobre la base de un informe del Subcomité de Nomenclatura de Ciclitales (Chemistry, 1973). Según estas reglas, la configuración relativa de los grupos hidroxilos en cuanto a la posición en el anillo, se describe como una fracción, donde el numerador indica los grupos hidroxilo u otros grupos por encima del plano del anillo y constituyen un conjunto, mientras que el denominador denota los grupos hidroxilo u otros por debajo de ese plano y forman otro conjunto. Por ejemplo, el 1,2,3,4,5,6/0-, corresponde al *cis*-inósitol (ver **Figura 1**).



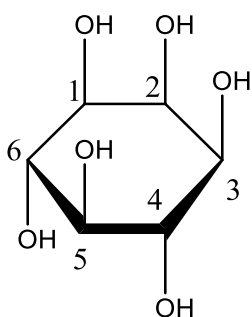
cis-Inositol
(1,2,3,4,5,6/0-)



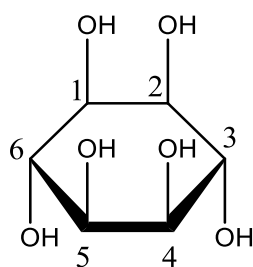
epi-Inositol
(1,2,3,4,5/6-)



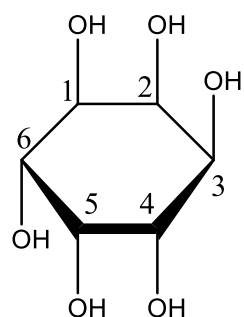
allo-inositol
(1,2,3,4/5,6-)



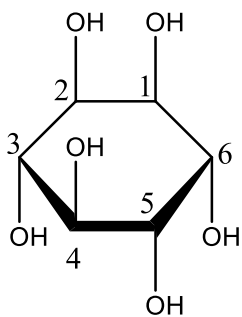
myo-Inositol
(1,2,3,5/4,6-)



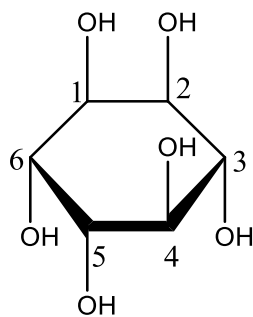
muco-Inositol
(1,2,4,5/3,6-)



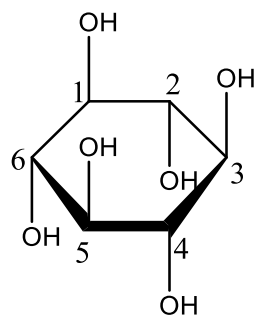
neo-Inositol
(1,2,3/4,5,6-)



D(+)-*chiro*-Inositol
(1,2,4/3,5,6-)



L(-)-*chiro*-Inositol
(1,2,4/3,5,6-)



scyllo-Inositol
(1,3,5/2,4,6-)

Figura 1. Estructuras químicas de los inositoles.

Para el caso, en que deba señalarse el prefijo D o L, deberá tenerse en cuenta que cuando la fórmula se dibuja de tal manera que el sustituyente en el átomo de carbono asimétrico de numeración más baja está por encima del plano del anillo y la numeración es en el sentido de las agujas del reloj el compuesto es L, si es antihorario el compuesto es D, es el caso del D-*chiro*-Inositol y el L-*chiro* Inositol.

2.2. Propiedades biológicas de los carbohidratos

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para la mayoría de las células, como es el caso del almidón en plantas y el glucógeno en animales. Por otra parte, algunos carbohidratos de alto peso molecular como celulosa, pectina o xilano determinan la estructura de las plantas, mientras otros, como la quitina, son el principal componente del exoesqueleto de insectos y crustáceos (Ruiz Aceituno L., 2015). Además de sus funciones energéticas y estructurales, los carbohidratos están implicados en diversos procesos biológicos, relacionados con alteraciones metabólicas o inducción de cambios en la microbiota intestinal (Corzo, y otros, 2015). Así, los carbohidratos prebióticos son ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador (Corzo, y otros, 2015). Entre ellos destacan los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS) y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOS), entre otros. Por otra, parte, los inositoles presentan un gran número de propiedades bioactivas y sobre ellos versará el presente estudio.

➤ Inositoles

De los nueve posibles estereoisómeros del inositol, en la naturaleza, se encuentran al menos cinco de ellos, *myo*-, *sycco*-, *muco*-, *neo*- y *chiro*-inositol, así como algunos derivados: los metil-inositoles (con uno o dos de los hidroxilos metilados), desoxi-inositoles (con uno o dos hidroxilos menos). En cambio los *epi*-, *allo*-, y *cis*-inositoles solo se obtienen por síntesis (Campbell, Goheen, & Donald, 2011). Los inositoles pueden encontrarse en forma libre, o bien, glicosilados, fosforilados o formando parte de fosfolípidos.

El ***myo*-inositol** es el estereoisómero más ampliamente distribuido en la naturaleza, seguido por los isómeros ópticamente activos D-(+)- y L-(-)- *chiro*-inositol (Indyk, Saldo, White, Dole, Gill, & Woollard, 2016). Se puede encontrar en su forma libre o unido a fosfolípidos, formando parte de las membranas de todas las células vivas (animales, plantas, bacterias, hongos), o bien, como ácido fítico, que es la principal forma de almacenamiento de fósforo en muchos tejidos vegetales.

El *myo*-inositol, juega un papel importante en varios procesos celulares, y participa en la inhibición selectiva de la recaptación de serotonina empleándose, por tanto,

en el tratamiento de la depresión, del trastorno obsesivo compulsivo (Nemets, Fux, Levine, & Belmaker, 2001), del trastorno de pánico (Palatnik, Fux, Frolov, & Benjamin, 2001) y de la bulimia nerviosa (Gelber, Levine, & Belmaker, 2001).

El *myo*-inositol libre está también implicado en el crecimiento y supervivencia celular (Eagle, Oyama, Levy, & Freeman, 1956), en el desarrollo y función de los nervios periféricos (Chau, Lee, Law, Chung, & Chung, 2005), en la osteogénesis (Dai, Chung, Miao, Lau, Chan, & Kung, 2011) y en la reproducción (Beemster, Groenen, & Steegers Theunissen, 2002).

El **D-*chiro*-inositol** y el **L-*chiro*-inositol** se pueden encontrar en plantas e insectos pero generalmente en sus formas metiladas como pinitol (3-O-metil-D-*chiro*-inositol) y quebracitol (2-O-metil-L-*chiro*-inositol), respectivamente (Larne, 2002).

El **D-*chiro*-inositol** ha demostrado ser efectivo contra la sensibilidad anormal a la insulina (resistencia a la insulina) (Genazzani, 2016). Esta molécula es considerada un insulinoimético y ha demostrado ser eficiente en la reducción de la glucosa post-prandial (Croze & Soulage, 2013). Se ha estudiado también el uso del D-*chiro*-inositol en el tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (PCOS), al estar éste asociado con la insulinoresistencia y la hiperinsulinemia. La suplementación oral con este inositol mejora la sensibilidad a la insulina, además de reestablecer la ovulación en un gran porcentaje (86%) de las pacientes con este síndrome (Genazzani, 2016).

Al derivado metilado del D-*chiro*-inositol, el pinitol, se le atribuyen varios beneficios biológicos, el más importante de ellos es el de poseer una actividad semejante a la insulina, habiéndose verificado su efecto hipoglucémico en ratas con diabetes mellitus, en las que se comprobó un descenso significativo en la glucosa sanguínea (Kim, Joo, Kim, & Kim, 2005).

Por otra parte, algunos inositoles como el D- y L-*chiro*, *allo*-, *cis*-, *epi*-, *muco*-, *neo*- y *scyllo*-inositol, se usan para tratar alteraciones como dislipemias, hipercolesterolemia o enfermedades cardiovasculares, aportando propiedades fisiológicas mejoradas con respecto a las que parece aportar el hexaniacinato de *myo*-inositol (Ruiz Aceituno L., 2015).

2.3. Presencia de carbohidratos bioactivos en vegetales

Los carbohidratos, como ya se ha mencionado anteriormente, son componentes mayoritarios de muchos alimentos. Además de estar presentes de forma natural en los mismos, pueden añadirse para mejorar las propiedades nutritivas, tecnológicas o funcionales del alimento (Rodríguez Sanchez, 2015).

A continuación se presenta el contenido y las fuentes vegetales de los inositoles, objeto de investigación en este trabajo.

Los inositoles se encuentran sobre todo en los alimentos de origen vegetal, siendo su presencia en los alimentos de origen animal menos frecuente y más baja (Ruiz Aceituno L., 2015). En la **Tabla 1**, se muestra el contenido en inositoles en alimentos vegetales.

Las legumbres destacan por su alto contenido en *myo*-inositol y en los derivados de inositol, metil- y glucosil-inositol. Por otra parte, se reportan distintos contenidos de *myo*-inositol y *D-chiro*-inositol en las siete variedades de lechuga estudiadas en las dos investigaciones encontradas en la literatura, por lo que se hace necesario realizar más estudios con esta muestra. Cabe resaltar que la variedad de lechuga con mayor contenido de inositoles es la hoja de roble.

Tabla 1. Contenido de inositoles (mg/100g) en diferentes vegetales.

Vegetal (Nombre común)	<i>myo</i>-inositol	<i>D-chiro</i>-inositol	Metil-inositol	Glicosil-inositol	Referencia
Hojas de achicoria	18,2	19,9	nd*	nd	[1]
Endibia	3,0-11,0	3,1	nd	nd	[1],[53]
Escarola	4,1	4,4	nd	nd	[1]
Alcachofa	3,0-11,0	21,6	nd	nd	[1]
Lechuga Batavia	10,9	8,2	nd	nd	[1]
Lechuga Iceberg	8,4	8,3	nd	nd	[1]
Lechuga Hoja de roble	8,0	32,6	nd	nd	[1]
Lechuga Lollo rosso	0,5	9,0	nd	nd	[1]
Lechuga Romana	4,1-17,0	3,5	nd	nd	[1],[53]
Lechuga Crespa	18,4	13,2	nd	nd	[1]
Lechuga roja	22,0	nd	nd	nd	[53]
Espinaca	1,2	nd	nd	nd	[1]
Cebolla	22,2	nd	nd	nd	[1]
Rábano	4,4-10,0	nd	nd	nd	[1],[53]
Repollo	9,0-18,1	nd	nd	nd	[1],[53]
Soja verde	30-100 ^a	11-675 ^a	600-900 ^a	500-700 ^a	[40],[54]

Tabla 1. (Continuación).

Vegetal (Nombre común)	<i>myo</i>-inositol	<i>D-chiro</i>-inositol	Metil-inositol	Glicosil-inositol	Referencia
Tomate	43-840	nd	nd	nd	[53],[55]
Lenteja	70-1100 ^a	9 ^a	110-400 ^a	120-300 ^a	[40],[54],[56]
Alubias	nd	nd	200 ^a	nd	[54]
Garbanzo	122-300 ^a	2 ^a	195-1260 ^a	80 ^a	[40],[56]
Alfalfa	123-169 ^a	nd	39-71 ^a	127-169 ^a	[57]
Mung bean	nd	43-579	nd	nd	[58]
Altramuz	100-307 ^a	54-162 ^a	105-659 ^a	86-300 ^a	[56], [59]
Zanahoria	220-980	nd	nd	nd	[60]
Apio	5	nd	nd	nd	[53]
Hinojo	540	nd	nd	nd	[60]
Okra	26-37	nd	nd	nd	[53]
Coliflor	18	nd	nd	nd	[53]
Brocoli	12,0-30,0	nd	nd	nd	[53]
Cilantro	2280	nd	nd	nd	[60]
Perejil	540	nd	nd	nd	[60]
Frijol	60 ^a	nd	80 ^a	50 ^a	[56]
Guisante	100 ^a	nd	50 ^a	nd	[56]
Alforfón	78 ^a	59 ^a	nd	nd	[40]

^a referido a peso seco * nd: no detectado

Teniendo en cuenta que los vegetales son la principal fuente de inositoles, y que diariamente se generan en Colombia 27.500 toneladas de residuos sólidos, industriales y domésticos, entre los que se encuentran los residuos vegetales (Jaramillo Henao & Zapata Marquez, 2008), la extracción de estos carbohidratos bioactivos para su posible uso como ingredientes funcionales, presenta gran interés. Esta propuesta abriría nuevas vías de revalorización de dicha materia, que en la actualidad se encuentra infravalorada por falta de alternativas viables para su uso.

2.4. Extracción de carbohidratos bioactivos

En general, la extracción de inositoles a partir de vegetales se lleva a cabo a través de procesos de extracción sólido-líquido (ESL) a partir de la muestra molida y secada previamente, empleando disolventes orgánicos o acuosos.

La ESL de carbohidratos se puede acelerar mediante agitación mecánica o la aplicación de ultrasonidos. Sin embargo, la ESL también se caracteriza por una reducida selectividad, el empleo de grandes volúmenes de disolvente, los largos tiempos de extracción y una elevada manipulación de la muestra. Debido a estas limitaciones en los últimos años se ha promovido la búsqueda de técnicas alternativas que aceleren la extracción a través de la aplicación de algún tipo de energía, entre las que se encuentran la extracción asistida por microondas (EAM), extracción con líquidos presurizados (ELP) y extracción con fluidos supercríticos (EFS). Entre ellas, destaca la EAM que permite realizar extracciones eficaces con un ahorro considerable de tiempo y un bajo consumo de disolventes y energía.

La EAM se ha aplicado ampliamente para la extracción de polisacáridos (Smiderle , Morales , Gil Ramirez, de Jesus, Gilbert Lopez, & Lacomini, 2017), compuestos fenólicos (Bhuyan, Vuong, Chalmers, Altena, Bowyer, & Scarlett, 2015), aceites (Thakker , Parikh, & Desai, 2016) y proteínas (Phongthai, Taik Lim, & Rawdkuen, 2016) de plantas terrestres, algas, residuos agrícolas, agroalimenticios y biomasa lignocelulósica. Sin embargo, se ha aplicado escasamente para la extracción de carbohidratos de bajo peso molecular, y en concreto de ciclitoles.

Recientemente, Ruiz y otros (2016) aplicaron la EAM para la obtención de inositoles a partir de brácteas externas de alcachofa, empleando como disolvente agua y requiriendo cortos tiempos de extracción (3 min).

Al ser la EAM una técnica alternativa prometedora se ha elegido como técnica de extracción en este trabajo. Sus principios y fundamentos se describen a continuación.

➤ Extracción asistida por microondas

Las microondas son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, con una frecuencia que oscila entre los 0,3 y 300 GHz, correspondiente a una longitud de onda de 1 m a 1 mm, que se caracteriza por desplazarse en forma de ondas sinusoidales. La mayoría de equipos comerciales operan a frecuencias fijas, en general de 2.45 GHz. Su principal efecto al interactuar con las moléculas es la generación de energía térmica. (Salomon Izquierdo, Bermello Crespo, Marquez Conde, Lopez Hernandez, Gonzalez Sanabia, & Llopiz Yurell, 2013).

La aplicación de las microondas a un medio origina la migración electroforética de los iones siguiendo el campo eléctrico producido por las microondas (Nadagouda, Speth, & Varma, 2011). La dirección de los iones cambia tantas veces como lo haga el signo del campo. La resistencia del medio a esta migración provoca colisiones entre las moléculas, lo que genera calor. Al mismo tiempo, las moléculas dipolares tratan de alinearse con el campo eléctrico. El consecuente proceso de alineación, cambio de dirección y realineación de los dipolos conduce a colisiones entre ellos y las moléculas circundantes, lo que genera energía y un aumento de la temperatura del medio. Estos procesos de conducción iónica y de rotación de dipolos ocurren de manera simultánea y resultan en la transformación de la energía de microondas en energía térmica (Zhang, Yang, & Wang, 2011) y en un calentamiento casi inmediato de la muestra.

En general, la capacidad de las moléculas para absorber la energía de microondas aumenta al hacerlo su constante dieléctrica (ϵ'). Mientras que la ϵ' de un disolvente puede ser considerada un indicativo de su capacidad para ser polarizado en un campo eléctrico, la llamada pérdida dieléctrica (ϵ'') es una medida de la eficacia del disolvente para disipar la energía de microondas absorbida en calor. La relación entre estos dos valores es el factor de disipación ($\ln \delta = \epsilon'' / \epsilon'$) y determina la eficiencia del proceso de extracción para un determinado disolvente (Ruiz Aceituno L., 2015).

El equipo de microondas que se emplea es otro factor relevante para la propagación eficiente de microondas en el sistema de extracción. En la actualidad existen diversos tipos de equipos de laboratorio y hornos domésticos modificados disponibles para la extracción de compuestos activos. El equipo de microondas generalmente se divide en función del modo de irradiación: multimodo o modo simple. La mayoría de los aplicadores de microondas en uso doméstico y experimental son de tipo multimodo. Se generan varios modos dependiendo de la propiedad dieléctrica y la geometría de los materiales irradiados. Para evitar un calentamiento desigual, se utilizan ventiladores, agitadores y una base giratoria. Por el contrario un aplicador monomodo produce un campo electromagnético enfocado en un punto particular al generar una onda estacionaria dentro del aplicador (Tsubaki, Onda, Hiraoka, Fujii, Azuma, & Wada, 2017).

Un multimodo puede trabajar hasta 1800 W de potencia (CEM), mientras que un monomodo puede hacerlo hasta 300-400 W.

Los sistemas de extracción con microondas pueden ser de recipiente abierto o de recipiente cerrado. En los primeros, la temperatura máxima de operación es el punto de ebullición del disolvente a presión atmosférica y se han utilizado sobre todo para la extracción de metales y compuestos organometálicos. Los sistemas cerrados permiten trabajar a temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente sin evaporación significativa del mismo. Estas elevadas temperaturas de operación suelen resultar en eficacias de extracción altas en tiempos cortos y con un mínimo consumo de disolvente. En general, este tipo de sistemas permiten el tratamiento simultáneo de entre 4 y 48 muestras (Ruiz Aceituno L., 2015).

La temperatura precisa del microondas se puede medir con un termómetro de fibra óptica insertado dentro de uno de los vasos. Los termómetros de radiación infrarroja pueden medir la temperatura de la superficie exterior del reactor, sin embargo, deben usarse con cuidado porque a veces no reflejan la temperatura precisa del sistema de reacción.

Los vasos o recipientes de extracción suelen ser de materiales transparentes a las microondas, como vidrio o algunos plásticos (poliéter imida, teflón, tetrafluorometoxil, etc) y se escogen dependiendo del disolvente, temperatura y presión a emplear.

Existen elementos de seguridad como membranas de fractura en los recipientes de extracción que se rompen a presiones superiores a 200 psi o vasos con autocierre que se abren y cierran rápidamente para evitar sobrepresiones.

2.5. Fraccionamiento de carbohidratos bioactivos

Después de la extracción, generalmente se obtiene una mezcla de ciclitos solubles en el disolvente junto con otros carbohidratos procedentes de la fuente vegetal que pueden interferir en sus propiedades. Por tanto, en ocasiones, una etapa de fraccionamiento de dichos carbohidratos resulta imprescindible para su posible uso como ingrediente alimentario (Ruiz Aceituno L., 2015). Sin embargo, dicho fraccionamiento no resulta trivial debido principalmente a la similitud de sus estructuras y a la diferencia de sus concentraciones. Este fraccionamiento también es útil para el análisis / caracterización de los carbohidratos de interés presentes en dichas mezclas complejas (Al-Suod, Ligor, Ratiu, Rafinska, Gorecki, & Buszewski, 2017). Por tanto, dependiendo de la composición de la muestra y la finalidad del extracto, puede ser necesaria la separación de carbohidratos según sus enlaces glicosídicos, las unidades monoméricas que los constituyen o su grado de polimerización.

Son muchas las estrategias aplicadas para lograr un fraccionamiento de carbohidratos, desde el empleo de técnicas cromatográficas como la cromatografía de exclusión molecular o la cromatografía de intercambio iónico (Rodríguez Sanchez, 2015); (Michael Saska, 1994), hasta de técnicas de separación por membranas como la nano y ultrafiltración (Lopez Leiva & Guzman , 1955); (Goulas, Kapasakalidis, Sinclair , Rastall, & Grandison, 2002). Sin embargo, los rendimientos obtenidos no son siempre adecuados y los procesos son largos y laboriosos.

También se han empleado, aunque en menor medida, tratamientos microbiológicos, usando principalmente bacterias del género *Zymomonas* y levaduras del género *Saccharomyces*. Crittenden y otros (2002), usaron células inmovilizadas de la bacteria *Zymomonas mobilis* para eliminar la glucosa, la fructosa y la sacarosa de mezclas de oligosacáridos de calidad alimentaria, dichos carbohidratos fueron totalmente fermentados en 12 h, sin necesidad de adicionar nutrientes o controlar el pH, generando etanol y dióxido de carbono como productos y sorbitol como subproducto. Las levaduras son capaces de fermentar mono y disacáridos comunes, pero, dado que estos organismos no poseen carbohidrasas, no pueden hidrolizar la mayor parte de los oligosacáridos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha usado satisfactoriamente para la eliminación de carbohidratos comunes de bajo peso molecular (D-glucosa, D-fructosa, D-manosa y D-galactosa) en distintas preparaciones de carbohidratos ((Zhengyi, Min, Lili, & Yumei, 2008) ; (Hernandez, Ruiz Matute, Olano, Moreno, & Sanz, 2009) ; (Yoon, Mukerjea, & Robyt, 2003)). Monosacáridos menos comunes como la D-ribosa, D-xilosa, D-ramnosa, no son eliminados por dicha levadura. Ruiz y otros (2013), lograron la eliminación de mono y disacáridos en 3 horas y la conservación del contenido total de inositoles en extractos de legumbres empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Zhengyi y otros (2008), estudiaron la acción de una levadura del género *Kluyveromyces*, que actuó efectivamente en la fermentación de glucosa, galactosa y lactosa.

Por tanto, el empleo de levaduras para la obtención de extractos enriquecidos en inositoles, libres de otros carbohidratos interferentes, a partir de residuos agroalimentarios podría ser de interés para su escalado en la industria alimentaria.

2.6. Análisis de carbohidratos bioactivos

El análisis de carbohidratos se ha llevado a cabo mediante métodos químicos, enzimáticos e instrumentales. Los métodos químicos se basan en la reacción de los carbohidratos con agentes que dan lugar a complejos o precipitados que se pueden determinar mediante gravimetría, espectrofotometría o mediante valoraciones colorimétricas. Los métodos enzimáticos son específicos, lo que dificulta su aplicación en análisis de muestras complejas, como son las provenientes de alimentos. Los métodos instrumentales se basan en el empleo de diversas técnicas como polarimetría, refractometría, densitometría, resonancia magnética nuclear, infrarrojo, etc. Sin embargo, son las técnicas cromatográficas (cromatografía de

gases y de líquidos), y sus acoplamientos a espectrometría de masas, las más empleadas para la caracterización de carbohidratos bioactivos, tanto a nivel cualitativo (determinación de su estructura) como cuantitativo (determinación de su concentración). Entre ellas, la más empleada para el análisis de carbohidratos de bajo peso molecular, que son los que se contemplan en este trabajo de investigación, es la cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (CG) es una técnica con un alto poder de resolución, sensibilidad y selectividad y además, junto con el acoplamiento a la espectrometría de masas, hace que sea una técnica muy versátil para la caracterización de carbohidratos (Corzo, y otros, 2015).

Debido a que los inositoles no son compuestos volátiles, se requiere de una etapa de derivatización para incrementar su volatilidad, previa a su análisis, mediante reacciones basadas en la sustitución de todos los átomos de hidrógeno por grupos no polares.

Existe un gran número de reacciones de derivatización tales como la formación de metil éteres, acetatos, trifluoro acetatos, trimetilsilil éteres, trimetilsilil oximas, trimetilsilil alquil oximas, tio acetatos (Ruiz Matute, Hernandez Hernandez , Rodriguez Sanchez, Sanz, & Martinez Castro, 2011).

Entre todas ellas la formación de de trimetilsilil derivados (TMS) es la más empleada. La reacción de sililación depende de tres factores principales: el reactivo de sililación, disolvente y adición de catalizador. Como reactivos sililantes se pueden emplear: hexametildisilazano (HMDS), trimetilclorosilano (TMCS), trimetilsililimidazol (TMSI) o bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) o combinaciones de los mismos (Sanz & Martinez Castro, 2007). Como disolvente se utiliza piridina o dimetilsulfóxido. Como catalizador de la reacción se emplea ácido trifluoroacético (Ruiz Aceituno L., 2015). La temperatura de reacción varía entre la temperatura ambiente y los 60°C. Aunque las reacciones de sililación son inmediatas se suele emplear un tiempo mínimo de 30 min para garantizar la que la reacción sea completa (Ruiz Aceituno, Ramos, Martinez Castro, & Sanz , 2012).

La desventaja de estos derivados, son la formación de hasta cinco formas sililadas para los azúcares reductores correspondientes a las distintas formas tautoméricas del carbohidrato (α y β piranosa, α y β furanosa y cadena abierta), lo que dificulta el análisis en mezclas complejas (Hernandez Hernandez O., 2012). Una solución a este problema es la oximación del carbono anomérico previo a la sililación, obteniéndose así trimetilsilil-oximas (TMSO) en dos sencillos pasos de derivatización (ver **Figura 2**) y reduciéndose a dos el número de picos cromatográficos para cada carbohidrato reductor correspondientes a las formas *syn*- (E) y *anti*- (Z). Los carbohidratos no reductores son convertidos a sus trimetilsilil éteres preservando el anillo hemiacetalico y dando lugar a un solo pico cromatográfico (Ruiz Matute, Hernandez Hernandez , Rodriguez Sanchez, Sanz, &

Martinez Castro, 2011) Este proceso, por tanto, es uno de los más empleados en la bibliografía para la derivatización de mezclas complejas de carbohidratos reductores.

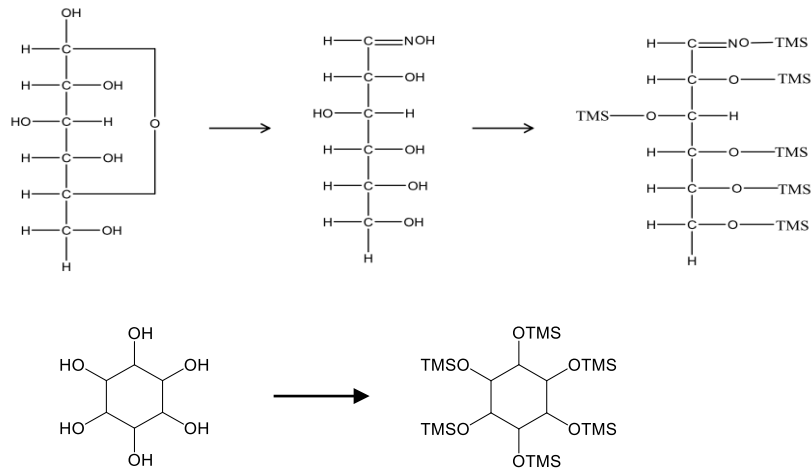


Figura 2. Formación de trimetilsilil derivados.

Para el análisis de mono, di y trisacáridos por cromatografía de gases se emplean columnas generalmente de polimetildisiloxano, con dimensiones que oscilan entre 10- 50 m de longitud, 0,1-0,5 mm de diámetro y de 0,02-2 μm de fase y con un rango de temperaturas que varía entre 60 $^{\circ}\text{C}$ y 330 $^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, el empleo de columnas con grupos carborano presentes en la estructura principal del polisiloxano, incluso fabricadas en capilares de sílice recubiertos de aluminio en lugar de poliimida, resistentes a temperaturas elevadas, ha permitido extender su aplicación hasta oligosacáridos de grado de polimerización 7 (Montilla, van de Lagemaat, Olano, & Castillo, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un procedimiento de extracción asistida por microondas (EAM) para la obtención de extractos enriquecidos en inositoles a partir de hojas de lechuga como residuo agroalimentario.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la composición cuali- y cuantitativa de carbohidratos de bajo peso molecular de hojas de lechuga y escarola, con especial énfasis en carbohidratos bioactivos (inositoles) mediante CG-EM.
- Comparar el procedimiento de extracción optimizado mediante EAM con un método de ESL convencional.
- Optimizar un método para el fraccionamiento selectivo de inositoles y otros carbohidratos de bajo peso molecular (fructosa, glucosa, sacarosa, pinitol, D-*chiro*-inositol y *myo*-inositol).
- Evaluar la eficacia de la EAM para la obtención de extractos concentrados en inositoles a partir de distintos residuos agroalimentarios: hojas de escarola y vainas de soja verde.

4. METODOLOGIA









4.1. Adquisición, clasificación y tratamiento de muestras

4.1.1. Adquisición y clasificación de muestras vegetales

Se estudiaron seis variedades de hojas de lechuga (*Lactuca sativa*), dos de ellas colectadas en Popayán (Departamento del Cauca, Colombia) y las otras cuatro fueron adquiridas en Madrid (España).

Además, se estudió una (1) muestra de hoja de escarola (*Cichorium endivia*) adquirida en Madrid (España) y una de vainas de soja verde (*Glycine max*) colectadas en (Madrid, España). Las especificaciones correspondientes a estas muestras se encuentran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación de las muestras de lechuga, escarola y vainas de soja verde.

Variedades	Familia	Género	Procedencia	Código	Imagen
Lechuga romana	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	España	E1	
Lechuga trocadero	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	España	E2	
Lechuga iceberg	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	España	E3	
Lechuga hoja de roble	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	España	E4	
Lechuga crespa	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	Colombia	C1	
Lechuga batavia	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	Colombia	C2	
Escarola	Asteraceae	<i>Cichorium</i>	España	E5	
Soja verde (Edamame)	Fabaceae	<i>Glycine</i>	España	L1	

4.1.2. Tratamiento de muestras

El material vegetal adquirido fue seleccionado, separando las hojas sanas en el caso de las lechugas y escarola y las vainas en el caso de la soja. Estas muestras se pusieron en cajas de petri y se recubrieron con papel vinipel. Las cajas de petri se sumergieron en un recipiente que contenía nitrógeno líquido, con el fin de congelar las muestras y posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización empleando un liofilizador Free Zone 2.5, marca Labconco, modelo #7670520 (Houston, USA).

Una vez que el material vegetal estuvo seco, fue triturado en un molinillo Delhi marca Moulinex (Barcelona, España) hasta obtener un polvo fino, que después fue tamizado en un tamiz Advantech No. 35 (Taipéi, República de China), de tamaño de malla 500 μm . Las muestras obtenidas fueron almacenadas en viales de vidrio debidamente rotulados.

4.2. Extracción de inositoles

4.2.1. Extracción asistida por microondas (EAM)

Los extractos se obtuvieron utilizando un equipo de microondas de recipiente cerrado Mars 6 con tecnología one touch (CEM, Matthews, USA), equipado con una sonda para control de temperatura y magnetrones secuenciales. Los vasos de extracción empleados son de teflón (Green Chem, CEM). Todos los procesos de extracción fueron bajo agitación. La optimización del método se llevó a cabo con la muestra de lechuga hoja de roble (E4).

4.2.1.1. Optimización del tiempo que tarda el equipo en alcanzar la temperatura programada

La potencia del microondas se fijo a 1200 W y se simuló extracciones con 40 mL de mezcla agua:etanol en distintas proporciones (0:100; 50:50; 30:70 y 100:0, v:v), distribuidos en 4 vasos de microondas cada uno con 10mL. El agua que se empleó tanto para las optimizaciones como para la obtención de extractos fue ultrapura (18.2 M Ωcm) y se adquirió con el sistema Mili-Q Advantage 10 (Millipore, USA).

El equipo se programó a distintas temperaturas (entre 40 y 120°C) y se evaluaron los tiempos necesarios para alcanzar cada una de dichas temperaturas sin fluctuaciones. Los ensayos se monitorearon mediante un gráfico Temperatura vs. tiempo en la pantalla del microondas, como se observa en la **Figura 3**.

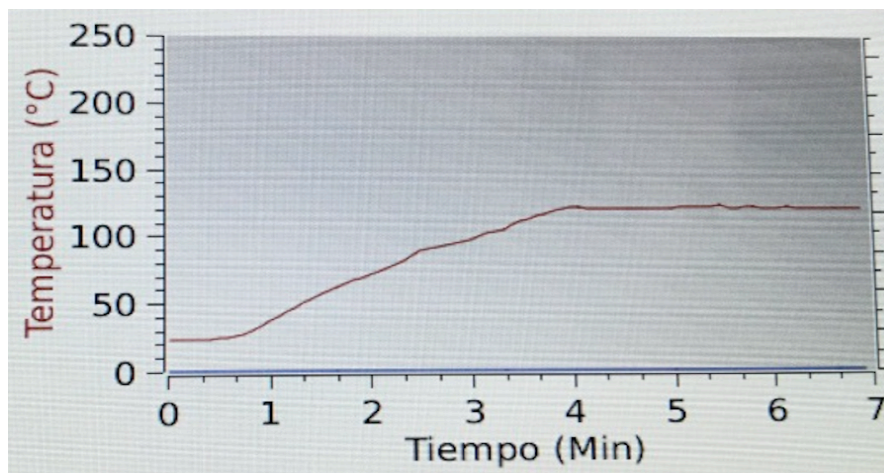


Figura 3. Gráfico Temperatura vs. Tiempo en la pantalla del microondas.

4.2.1.2. Optimización de la cantidad de muestra

Para la optimización de la cantidad de muestra se realizaron extracciones con 0,1, 0,3 y 0,5 g, en condiciones de trabajo intermedias (85°C, 16,5 min) establecidas con base al diseño experimental indicado en la sección 4.2.1.3, utilizando como disolvente agua, en las proporciones y disposición expuestas en el ítem anterior. Los extractos resultantes de los ensayos fueron enfriados inmediatamente con hielo y centrifugados a 8.500 rpm durante 10 min con el fin de separar el sobrenadante para su posterior análisis. Para pesar las cantidades estudiadas se empleó una balanza analítica Mettler Toledo (Columbus, USA).

4.2.1.3. Optimización del disolvente de extracción, tiempo y temperatura

Para establecer las condiciones óptimas de extracción se siguió un diseño experimental de Box-Behnken seleccionando como factores el disolvente (d): agua:etanol, (v/v), el tiempo de extracción (t) y la temperatura (T), según se indica en las **Tablas 3 y 4**. Este diseño consta de un total de 15 experimentos, incluyendo tres puntos centrales para estimar el error experimental y se llevó a cabo en un orden aleatorio. Los rangos experimentales para los factores evaluados fueron: $T = 40-120^{\circ}\text{C}$, $t = 3-30$ min, y disolvente = agua:etanol 100:0 - 30:70 (v/v). Cada experimento se realizó por duplicado.

Tabla 3. Variables independientes y sus niveles en el diseño experimental.

Variable independiente	Código	Niveles de factores		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	T	40	80	120
Tiempo (min)	t	3	16,5	30
Disolvente (% etanol)	d	0	35	70

Tabla 4. Diseño experimental de Box-Behnken.

NÚMERO EXPERIMENTO	T (°C)	t (min)	d (% etanol)
1	80	30	0
2	40	30	35
3	40	16,5	0
4	120	16,5	0
5	80	30	70
6	40	16,5	70
7	120	16,5	70
8	40	3	35
9	80	3	70
10	80	3	0
11	120	3	35
12	80	16,5	35
13	80	16,5	35
14	80	16,5	35
15	120	30	35

El modelo cuadrático propuesto para la optimización fue:

$$R = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 t + \beta_3 d + \beta_{1,1} T^2 + \beta_{2,2} t^2 + \beta_{3,3} d^2 + \beta_{1,2} Tt + \beta_{1,3} Td + \beta_{2,3} td + \varepsilon \quad (\text{Ec } 1)$$

Donde β_0 es el intercepto, los β_i son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los $\beta_{i,i}$ son los coeficientes para los términos cuadráticos, los $\beta_{i,j}$ son los coeficientes para la interacción de los factores i-j y ε es el término del error aleatorio.

Para la optimización del método EAM se consideraron individualmente dos variables de respuesta (R): R₁, contenido total de inositoles expresado en mg/g muestra seca; R₂, contenido total de azúcares expresado en mg/g muestra seca. Las condiciones experimentales que maximizan R₁ y minimizan R₂ se obtienen del análisis de la respuesta múltiple.

Los extractos obtenidos de todos los experimentos, fueron enfriados inmediatamente con hielo y centrifugados a 8.500 rpm durante 10 min separando el sobrenadante para su posterior análisis según se indica en la sección 4.6.

4.2.1.4. Optimización de los ciclos de extracción

Con el fin de realizar una extracción exhaustiva de los compuestos de interés, el proceso de extracción de la muestra E4 se llevó a cabo en las condiciones óptimas encontradas en los ítems anteriores. El extracto resultante (C1) fue enfriado y centrifugado (8.500 rpm, 10 min). Una vez separado el sobrenadante para su posterior análisis, el residuo fue tratado de nuevo con disolvente y sometido a otros dos ciclos de extracción (C2 y C3). Los extractos resultantes se analizaron según se indica en la sección 4.6.

4.3. Aplicación a residuos agroalimentarios

El método de extracción EAM optimizado fue aplicado a las seis variedades de lechuga y a la variedad de escarola de la tabla 2, los extractos resultantes fueron enfriados, centrifugados (8500 rpm, 10 min) y se recuperaron los sobrenadantes para su análisis como se describe en 4.6. La extracción de cada variedad se realizó por duplicado. Para la muestra de vainas de soja verde se realizó un nuevo diseño de experimentos al tratarse de un tipo de muestra diferente. Igualmente, se aplicó el diseño experimental de Box-Behnken para optimizar el efecto de los factores de T, t y d (porcentaje de etanol) para la obtención de extractos enriquecidos en inositoles. Los rangos experimentales para los factores evaluados fueron T=50-120°C, t= 3-30 min, y disolvente= agua:etanol 100:0 - 50:50 (v/v). En este caso los rangos experimentales de T y t fueron similares a los empleados para las hojas de lechugas, pero el porcentaje de etanol en el disolvente fue entre 0 y 100% al prever que podrían coextraerse otros carbohidratos de mayor peso molecular. La cantidad de muestra y el volumen de disolvente utilizado se fijaron en 0.5 g y 10 mL según trabajos previos llevados a cabo en el grupo de investigación del CSIC para este tipo de legumbre (Carrero, Mansukhani, Ruiz, Martínez, Ramos, & Sanz, 2018). Cada experimento se realizó por duplicado. De forma similar a los estudios realizados con las hojas de lechuga se consideraron individualmente dos variables de respuesta (R): R₃, contenido total de inositoles expresado en mg/g muestra seca y R₄, contenido total de azúcares expresado en mg/g muestra seca. Las condiciones experimentales que maximizan R₃ y minimizan R₄ se obtienen del análisis de la respuesta múltiple.

4.4. Extracción sólido-líquido (ESL) convencional

Se realizó una extracción sólido-líquido bajo agitación con E4 aplicando las condiciones óptimas encontradas para la EAM (T, t, d). Los extractos resultantes fueron enfriados, centrifugados (8.500 rpm, 10 min) y se analizaron como se describe en la sección 4.6, comparándolos con lo encontrado en las extracciones llevadas a cabo por EAM (4.3).

4.5. Fraccionamiento de carbohidratos

Se aplicó el procedimiento previamente desarrollado y optimizado por Aceituno y otros (2013). En tubos eppendorf de 15 mL, se pesaron 0,125 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, (type II, Sigma Chemical) y se incubaron con 1 mL de agua ultrapura durante 30 min, a 37°C y 500 rpm en un thermomixer (Marshall Scientific, USA). Posteriormente se añadieron 10 mL del extracto E4. Se tomaron alícuotas a tiempo 0, 2, 5, 8 y 24 horas de tratamiento, estas fueron centrifugadas dos veces a 4400 g durante 10 min para remover la levadura y de esta forma poder ser analizadas como se indica en la sección 4.6. El procedimiento de fraccionamiento se llevó a cabo por duplicado.

4.6. Análisis de carbohidratos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

4.6.1. Procedimiento de derivatización

En un tubo eppendorf de 2 mL, se añadieron 0,30 mL de extracto y 0,25 mL de patrón interno fenil β -D-glucopiranosido (Sigma Aldrich, USA). Posteriormente, se evaporó el disolvente en un concentrador miVac Duo (Genevac, Ipswich, Inglaterra). A continuación se realizó la oximación, añadiendo 350 μ L de una solución 2,5% de cloruro de hidroxilamina en piridina anhidra, calentando a 75°C durante dos ciclos de 15 min. Finalmente, la sililación se llevó a cabo añadiendo 350 μ L de hexametildisilazano (HMDS) y 35 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) para catalizar la reacción, calentado a 45°C durante 30 min.

Las muestras derivatizadas se centrifugaron a 8.100 rpm durante 10 min y el sobrenadante se sometió al análisis por CG-EM.

4.6.2. Análisis cualitativo y cuantitativo mediante CG-EM

El análisis de las muestras derivatizadas se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases 6890 acoplado a un detector de masas cuadrupolar 5973 (Agilent Technologies, USA), siguiéndose el método de Carrero y otros (2018). Para el análisis cromatográfico se empleó una columna capilar ZB-5, 5% fenil metil silicona (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de espesor de película; Phenomenex, USA) y utilizando como gas portador helio a un flujo de 0,8 mL/min. La temperatura del horno se programó empezando a 200°C (10 min) subiendo a 15°C/min hasta 270°C y a 1°C/min hasta 290°C, finalmente la temperatura subió a 15°C/min hasta 320°C (15 min). Las inyecciones (1 µL) se hicieron en modo Split (1:20) a 300°C y de forma manual.

El espectrómetro de masas operó en el modo impacto electrónico a 70 eV, escaneando en un rango de masas: 40-700 *m/z*. La línea de transferencia y la fuente de ionización se mantuvieron a 280°C y 230°C, respectivamente. La adquisición de datos se hizo empleando el software HP ChemStation (Agilent Technologies).

4.6.2.1. Identificación de los carbohidratos mediante CG-EM

La identificación de los carbohidratos se realizó con base a los tiempos de retención cromatográfica de patrones y/o a sus índices de retención (I^T) que fueron comparados con los reportados por la literatura (Hernandez Hernandez O, Ruiz Aceituno, Sanz , & Martinez Castro, 2011). Los I^T se calcularon inyectando una muestra de alcanos C17-C40 en las condiciones de trabajo ya especificadas anteriormente. Mediante el programa Statgraphics se estableció cuál era la mejor ecuación que describía cada segmento de la rampa de temperatura y se extrapolaron cada uno de los tiempos de retención de los analitos a la ecuación correspondiente. Los espectros de masas de los patrones también se utilizaron para este fin, comparándolos con los que se encuentran en las librerías de espectros como la Wiley 9 (New Jersey, USA) y artículos previos (Ruiz Aceituno, Rodriguez Sanchez, Ruiz Matute, Ramos , Soria , & Sanz, 2013).

4.6.2.2. Cuantificación de los carbohidratos mediante CG-EM

La cuantificación de los carbohidratos se realizó mediante curvas de calibrado y empleando el método de patrón interno.

Para ello se preparó una solución madre de azúcares que contenía fructosa, glucosa y sacarosa en agua-etanol 50% v/v de concentración de 1mg/mL. Esta solución fue diluida después en agua-etanol 50% v/v para preparar la solución de trabajo, de concentración 0,1mg/mL. A partir de estas soluciones de trabajo se prepararon los siete puntos de la curva de calibración. Tomando volúmenes de 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 y

0,1 mL de la solución de concentración de 1mg/mL se prepararon los cinco puntos de la curva de calibrado de concentraciones: 0,5;0,4;0,3;0,2;0,1 mg/mL. Tomando volúmenes de 0,5 y 0,1 mL de la solución de concentración 0,1 mg/mL se prepararon los dos puntos de la curva de calibrado de concentraciones: 0,05;0,01 mg/mL. A cada punto de la curva se añadió 0,25 mL de patrón interno fenil-β-D-glucopiranosido 1mg/mL.

De igual forma, se preparó una solución madre de inosítoles que contenía pinitol, D-*chiro*-inositol y *myo*-inositol en agua-etanol 50% v/v de concentración de 1mg/mL. Esta solución fue diluida después en agua-etanol 50% v/v para preparar la solución de trabajo, de concentración 0,1mg/mL. Tomando un volumen de 0,1mL de la solución de concentración de 1mg/mL se preparó el punto de la curva de calibrado de concentración: 0,1 mg/mL. Tomando volúmenes de 0,5; 0,1; 0,075 y 0,05 mL de la solución de concentración 0,1 mg/mL se prepararon los cuatro puntos de la curva de calibrado de concentraciones: 0,05;0,01;0,0075;0,005 mg/mL. A cada punto de la curva se añadió 0,25 mL de patrón interno fenil-β-D-glucopiranosido 1mg/mL.

4.6.2.3. Estandarización del método de cuantificación

Para la estandarización del método de cuantificación se evaluaron los siguientes parámetros:

Repetibilidad: se realizaron nueve determinaciones (3 concentraciones/3 replicados) cubriendo el rango de linealidad, como lo sugiere la ICH guidelines (ICH, 2005). Estas determinaciones se hicieron en el mismo día, por el mismo analista y en el mismo equipo.

Precisión intermedia: se hicieron nueve determinaciones (3 concentraciones/3 replicados) cubriendo el rango de linealidad examinando la precisión en tres días diferentes, por el mismo analista y en el mismo equipo.

La repetibilidad y precisión intermedia se evaluaron en función del coeficiente de variación (%CV).

Linealidad: Se preparó una curva de calibrado para inosítoles y otra para azúcares, cada una con las concentraciones descritas anteriormente por triplicado y se analizaron durante tres días diferentes. La linealidad se evaluó mediante pruebas estadísticas.

Límites de detección y cuantificación: El límite de detección se calculó como 3 veces la relación señal/ ruido (S/N). El límite de cuantificación se calculó considerando 10 veces más la relación S/N.

4.7. Análisis estadístico

El diseño experimental y los parámetros del modelo (Ec 1) se estimaron mediante el software StatGraphics Centurion XV (Statistical Graphics Corporation, USA). Los resultados de la estandarización del método de cuantificación se procesaron utilizando el programa estadístico SPSS (IBM, USA) versión 20.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Estandarización del método analítico

5.1.1. Análisis cualitativo mediante CG-EM

Las **Figura 4 y 5** muestran los perfiles cromatográficos y los tiempos de retención (t_R) de los patrones de fructosa (8,0 y 8,2 min), glucosa (9,6 y 10,2 min) y sacarosa (18,4 min), y de pinitol (5,8 min), *D-chiro*-inositol (8,4 min) y *myo*-inositol (11,8 min), respectivamente. Ambos perfiles comparten un pico a 14,6 min que corresponde al patrón interno fenil- β -D-glucopiranosido.

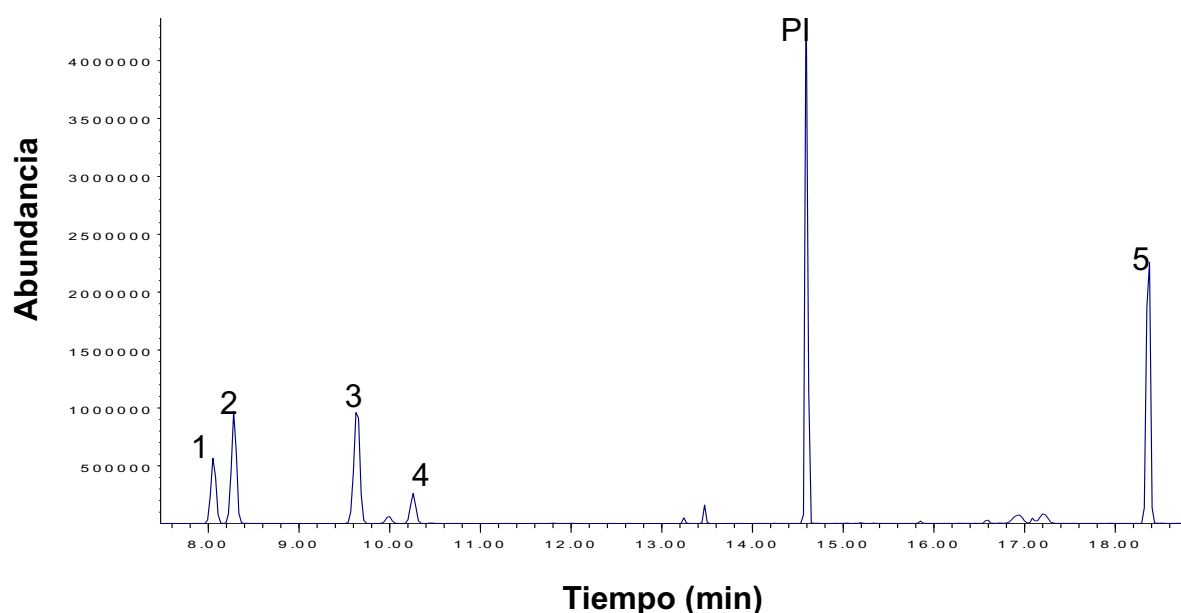


Figura 4. Perfil cromatográfico obtenido mediante CG-EM de los patrones de azúcares: (1) fructosa 1, (2) fructosa 2, (3) glucosa E, (4) glucosa Z, (5) sacarosa. PI: patrón interno.

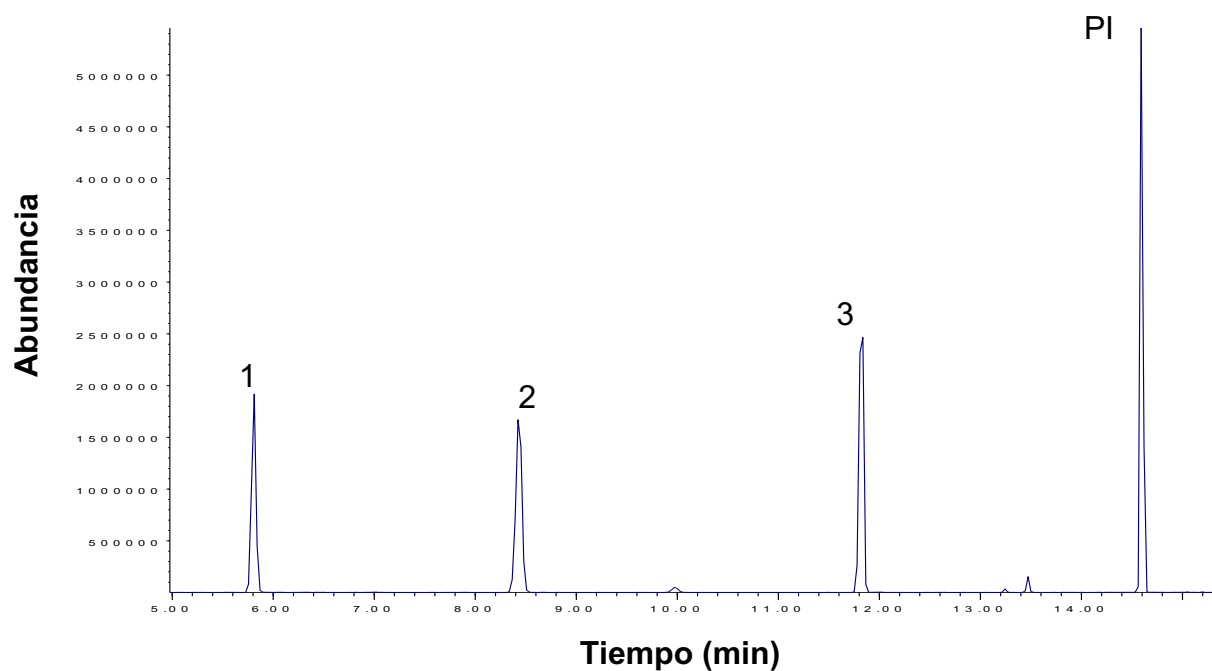


Figura 5. Perfil cromatográfico obtenido por CG-EM de los patrones de inositoles: (1) Pinitol, (2) *D-chiro*-inositol y (3) *myo*-inositol. PI: patrón interno.

En la **Tabla 5** se muestran los índices de retención (I^T) calculados para los analitos. Dichos valores coinciden con lo reportado en la bibliografía para estos compuestos derivatizados (Ruiz Aceituno, Rodriguez Sanchez, Ruiz Matute, Ramos , Soria , & Sanz, 2013).

Tabla 5. Tiempos e índices de retención de los analitos de estudio.

No. pico	Analito	t_R (min)	I^T
1	Pinitol	5,8	1861
2	Fructosa 1	8,0	1981
3	Fructosa 2	8,2	1989
4	<i>D-chiro</i> -inositol	8,4	1997
5	Glucosa 1	9,6	2029
6	Glucosa 2	10,2	2052
7	<i>myo</i> -inositol	11,8	2134
8	Sacarosa	18,4	2670

Los espectros de masa obtenidos para los derivados de inositoles y azúcares y sus respectivas estructuras químicas se presentan en el anexo 1.

Los espectros de masas de los inositoles libres (*D-chiro-*, *myo-*) tienen los siguientes iones característicos: m/z 265, 305, 318, 367, 432, 507, 522, 612 (Ruiz, Carrero, Ruiz, Ramos, Sanz, & Martínez, 2017). Para distinguir entre *D-chiro-* y *myo-* debe observarse principalmente la abundancia de los iones m/z 305 y 318; en el *D-chiro*-inositol el ion 318 es más abundante que el 305, lo contrario se observa para el caso del *myo*-inositol (ver Anexo 1). La proporción entre estos iones 305/318 generalmente es de 1.8 para el caso de *myo-* y de 0.8 para el *D-chiro-* (Sherman, Eilers, & Goodwin, 1970).

La abundancia de los iones 432, 507, 522 y 612 es mayor en el caso del *myo*-inositol.

El ion 522 resulta probablemente de la eliminación de un grupo trimetilsilanol (ver **Figura 6**). Posteriormente, la pérdida de un metilo radical resulta en el ion 507. El ion 432 resulta de la pérdida de un grupo trimetilsilanol a partir de A. El ion 318 resulta de que B sufre una reacción retro-Diels-Alder, obteniéndose el dienófilo (m/z 318) y el dieno (m/z 204). El ion 305 resulta de una reacción de transposición de un átomo de hidrógeno 1,5 en A.

Todas las fragmentaciones descritas son propuestas y no existe evidencia suficiente para establecer que se trate de dichos fragmentos. La interpretación de los efectos del estereoisomerismo sobre la fragmentación en moléculas como los inositoles es muy difícil (Sherman, Eilers, & Goodwin, 1970) y existe poca bibliografía acerca de este tema.

Los espectros de masas de los metil-inositoles como el pinitol se caracterizan por la presencia de los iones m/z 89, 159, 247, 260, 375 y 449, ausentes en los espectros de los inositoles libres (Binder & Haddon, 1984).

El ion 260 que es el que principalmente se utiliza para distinguir entre metil-inositoles e inositoles libres posiblemente resulte de la pérdida inicial de un grupo trimetilsilanol seguida de una apertura del anillo (ver **Figura 7**).

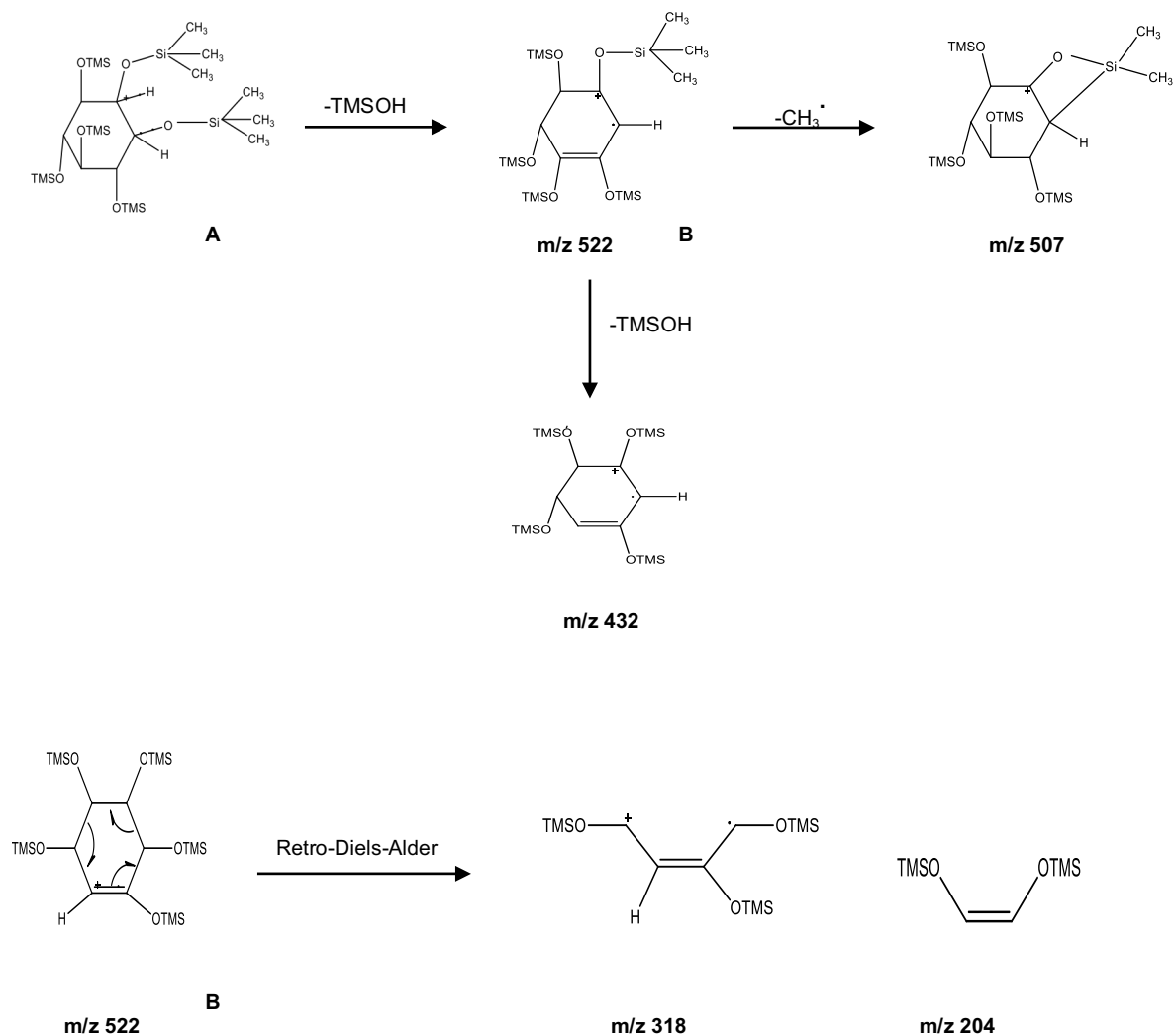
Los inositoles libres y metilados comparten el ion 73, además de la tripleta m/z 191, 204, 217, característicos del anillo piranosa sililada; la abundancia relativa de estos iones es $204 < 191 < 217$ (Ruiz, Carrero, Ruiz, Ramos, Sanz, & Martínez, 2017). Según la literatura el ion 73 corresponde a $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, el ion 103 corresponde a $\text{TMSO}=\text{CH}_2$, el 191 corresponde a $\text{TMSOCH}=\text{OTMS}$, el ion 147 corresponde a $\text{TMSO}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, 217 corresponde $\text{TMSO}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CHOTMS}$ (Sherman, Eilers, & Goodwin, 1970).

En cuanto a los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, los iones más abundantes en los espectros de masas corresponden a las pérdidas consecutivas de grupos trimetilsilanol.

El ion 319 característico de la glucosa se debe a una rotura en posición β respecto a la oxima seguida de la pérdida de un grupo trimetilsilanol.

El ion 307 que aparece en la fructosa se debe particularmente a una rotura en posición β respecto a la oxima.

El ion 437 que aparece en la sacarosa es debido a la pérdida del grupo CH_2OTMS . Los iones m/z 73, 103, 147 y 217 son comunes a los inosítoles y a los azúcares y corresponden a los fragmentos descritos anteriormente.



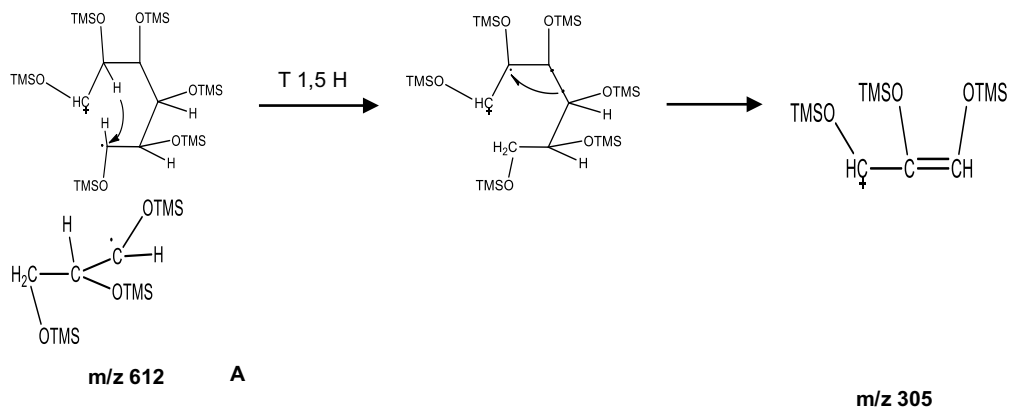


Figura 6. Fragmentaciones de inositoles libres.

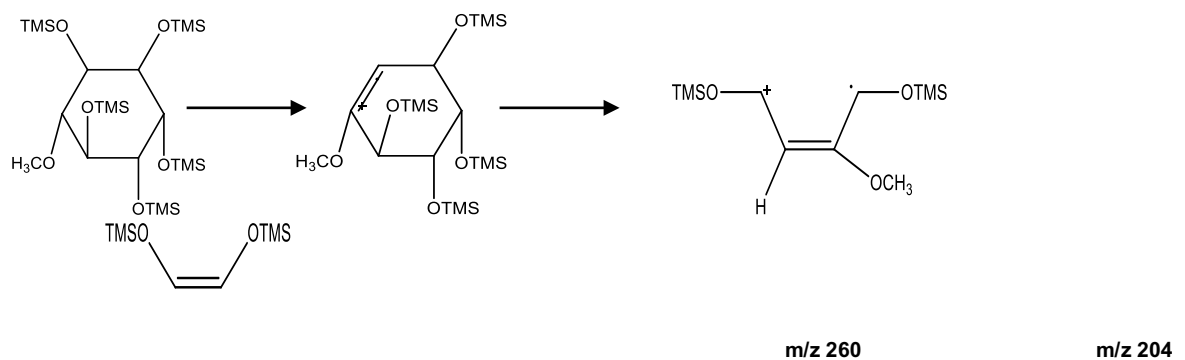


Figura 7. Fragmentación característica de metil-inositoles.

5.1.2. Parámetros analíticos

5.1.2.1. Curvas de calibrado

Para establecer si la relación área vs. concentración en las curvas de calibrado no varía significativamente con el tiempo y de este modo utilizar los datos de los nueve replicados de cada punto de la curva (ver anexo 2 y 3) se llevaron a cabo las siguientes pruebas estadísticas para las diferentes pendientes.

➤ Prueba de Normalidad

Para comprobar la hipótesis de la distribución normal de los datos obtenidos de los análisis ejecutados y de este modo poder realizar otros contrastes estadísticos se

utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, debido a que el tamaño de muestra era menor a 50. Las hipótesis estadísticas para verificar la normalidad son las siguientes:

H_0 (Hipótesis nula): Los datos proceden de una distribución normal .

H_A (Hipótesis alternativa): Los datos no proceden de una distribución normal.

La hipótesis nula se rechaza cuando el nivel crítico o de significancia es menor a 0,05.

En la **Tabla 6** se observa que los valores de significancia para pinitol, *D-chiro*-inositol y *myo*-inositol son superiores a 0,05, lo que permitió aceptar la hipótesis nula y considerar entonces que en función de los días, los resultados de las pendientes siguen una distribución normal.

Tabla 6. Prueba de normalidad para los inositoles en función de los días, Shapiro-Wilk.

Día	Pinitol		D-chiro-inositol		myo-inositol	
	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia
1	0,931	0,493	0,982	0,746	0,948	0,561
2	0,804	0,125	0,923	0,464	0,981	0,734
3	0,988	0,792	0,782	0,073	0,95	0,571

En la **Tabla 7** se observa que los valores de significancia para los azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa son también superiores a 0,05, es decir, normales.

Tabla 7. Prueba de normalidad para los azúcares en función de los días, Shapiro-Wilk.

Día	Fructosa		Glucosa		Sacarosa	
	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia	Estadístico	Significancia
1	0,993	0,838	0,882	0,330	0,789	0,088
2	0,920	0,452	0,857	0,260	0,958	0,608
3	0,899	0,384	0,941	0,531	0,979	0,723

➤ Prueba ANOVA

Una vez establecida la normalidad de los resultados se aplicaron pruebas paramétricas como el análisis de varianza ANOVA. Este análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula: las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa: por lo menos una de las poblaciones difiere de las

demás. Si el nivel crítico asociado al estadístico F es menor que 0,05, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias.

La prueba ANOVA para los valores de las pendientes de inositoles y azúcares obtenidas durante el mismo día y en días diferentes (**Tablas 8 y 9**), muestra que los valores de significancia asociados a los estadísticos F son mayores de 0,05, es decir, que no existen diferencias significativas entre las pendientes, ni en el mismo día ni en días diferentes. Estos resultados permiten concluir que la relación de área vs. concentración no varía significativamente con el tiempo.

Tabla 8. Prueba ANOVA para inositoles tomando el día como variable independiente.

Inositol		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Pinitol	Inter-grupos	0,024	2	0,012	1,045	0,408
	Intra-grupos	0,069	6	0,011		
	Total	0,093	8			
D-chiro- inositol	Inter-grupos	0,024	2	0,012	1,858	0,235
	Intra-grupos	0,039	6	0,007		
	Total	0,064	8			
myo- inositol	Inter-grupos	0,024	2	0,012	1,285	0,343
	Intra-grupos	0,055	6	0,009		
	Total	0,079	8			

Tabla 9. Prueba ANOVA para azúcares tomando el día como variable independiente.

Azúcar		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fructosa	Inter-grupos	0,000	2	0,000	0,063	0,940
	Intra-grupos	0,022	6	0,004		
	Total	0,023	8			
Glucosa	Inter-grupos	0,001	2	0,001	0,142	0,870
	Intra-grupos	0,022	6	0,004		
	Total	0,023	8			
Sacarosa	Inter-grupos	0,078	2	0,039	2,893	0,132
	Intra-grupos	0,081	6	0,013		
	Total	0,159	8			

Las pruebas estadísticas ejecutadas anteriormente señalaron que la relación de área vs. concentración no varía significativamente con el tiempo, por lo que se pudieron promediar las áreas de las 9 replicas de cada punto de la curva para obtener la curva de calibrado a utilizar para la cuantificación de cada analito en los extractos de lechuga, escarola y soja verde (ver anexo 4). En la **Tabla 10** se recopilan los datos de las rectas de regresión de cada analito.

Tabla 10. Datos de linealidad de inositoles y azúcares.

Analito	Pendiente	Intercepto	R²
Pinitol	1,2419	0,0069	0,99824
D-chiro-inositol	1,4981	0,0083	0,99717
<i>myo</i> -inositol	1,6899	0,0139	0,99844
Fructosa	1,7042	0,1387	0,99404
Glucosa	1,7678	0,1488	0,99257
Sacarosa	2,9976	0,3668	0,98914

Para evaluar estadísticamente los parámetros de linealidad de las curvas de calibrado obtenidas se utilizaron las siguientes pruebas.

➤ **Correlación de Pearson**

La correlación evalúa el grado de relación entre la variable X (concentración) y la variable Y (área). El coeficiente de correlación r de Pearson es un valor adimensional que oscila entre -1 y +1. El valor cero se da cuando no existe ninguna correlación entre las variables analizadas; el valor -1 implica una correlación perfecta de carácter inverso o indirecto y el valor +1 una correlación perfecta de tipo directo, es decir, cuando una variable crece la otra también lo hace. Este coeficiente se evaluó estadísticamente contrastando las siguientes hipótesis:

H_0 (Hipótesis nula): No existe correlación significativa entre las variables X e Y.

H_A (Hipótesis alternativa): Existe correlación significativa ente las variables X e Y.

El criterio de aceptación de la hipótesis nula es que el valor de significancia sea mayor a 0,05. Como se observa en las **Tablas 11 y 12**, los valores de significancia para todos los analitos son 0,000, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe una correlación altamente significativa entre el área y la concentración. El coeficiente de correlación de Pearson para pinitol, *D-chiro*-inositol, *myo*-inositol fue de 0,999, para la fructosa $r=0,997$, glucosa $r=0,996$ y sacarosa $r=0,995$.

Tabla 11. Correlación de Pearson para inositoles.

Correlaciones		Pinitol		D-chiro-inositol		myo-inositol	
		Área	Nivel de concentración n	Área	Nivel de concentración n	Área	Nivel de concentración
Área	Correlación de Pearson	1	0,999	1	0,999	1	0,999
	Sig. (bilateral)		0,000		0,000		0,000
	N	5	5	5	5	5	5
Nivel de concentración n	Correlación de Pearson	0,999	1	0,999	1	0,999	1
	Sig. (bilateral)	0,000		0,000		0,000	
	N	5	5	5	5	5	5

Tabla 12. Correlación de Pearson para azúcares.

Correlaciones		Fructosa		Glucosa		Sacarosa	
		Área	Nivel de concentración	Área	Nivel de concentración	Área	Nivel de concentración
Área	Correlación de Pearson	1	0,997	1	0,996	1	0,995
	Sig. (bilateral)		0,000		0,000		0,000
	N	7	7	7	7	6	6
Nivel de concentración	Correlación de Pearson	0,99	1	0,99	1	0,995	1
	Sig. (bilateral)	0,00		0,00		0,000	
	N	7	7	7		6	6

➤ **Evaluación estadística pendiente e intercepto**

Para evaluar estadísticamente la pendiente y el intercepto se plantean las siguientes hipótesis:

Pendiente

H₀ (Hipótesis nula): La pendiente no es significativamente diferente de cero. La hipótesis se rechaza si la prueba estadística es significativa, es decir, Sig. ≤0,05.

Intercepto

H₀ (Hipótesis nula): El intercepto no es significativamente diferente de cero. La hipótesis se rechaza si la prueba estadística es significativa, es decir, Sig. ≤0,05.

Según los resultados de la **Tablas 13 y 14**, la significancia estadística para las pendientes tanto de inosoles como de azúcares fue inferior a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la pendiente es significativamente diferente de cero. La significancia estadística para los interceptos fue superior a 0,05, por lo que se acepta la hipótesis nula y se concluye que el intercepto no es significativamente diferente de cero.

Tabla 13. Evaluación estadística de las pendientes e interceptos de las regresiones lineales obtenidas para los inosoles.

Inositol	Modelo	Coef.No estandarizado		Coef. Tipificados Beta	t	Sig
		B	Error típ			
Pinitol	Intercepto	-0,007	0,006		-1,164	0,329
	Pendiente	1,242	0,030	0,999	41,195	0,000
D-chiro- inositol	Intercepto	-0,008	0,009		-0,894	0,437
	Pendiente	1,498	0,046	0,999	32,538	0,000
myo- inositol	Intercepto	-0,014	0,008		-1,678	0,192
	Pendiente	1,690	0,039	0,999	43,751	0,000

Tabla 14. Evaluación estadística de las pendientes e interceptos de las regresiones lineales obtenidas para los azúcares.

Azúcar	Modelo	Coef.No estandarizado		Coef. Tipificados Beta	t	Sig
		B	Error típ			
Fructosa	Intercepto	-0,139	0,071		-1,94	0,110
	Pendiente	1,704	0,059	0,997	28,882	0,000
Glucosa	Intercepto	-0,149	0,079		-1,895	0,117
	Pendiente	1,768	0,068	0,996	25,844	0,000
Sacarosa	Intercepto	-0,367	0,191		-1,923	0,127
	Pendiente	2,998	0,157	0,995	19,091	0,000

➤ **ANOVA para evaluar la regresión lineal**

Para evaluar estadísticamente la regresión lineal se emplea la prueba de ANOVA, contrastando las siguientes hipótesis:

H_0 (Hipótesis nula): no hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$).

H_A (Hipótesis alternativa): hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$).

El criterio de aceptación de la hipótesis nula es que el valor de significancia sea mayor a 0,05.

En las **Tablas 15 y 16** se observa que la significancia para las regresiones de todos los analitos fue menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe regresión significativa en las curvas de calibración de todos los analitos.

Tabla 15. ANOVA para evaluar la regresión lineal en las curvas de calibrado de inositoles.

Inositol	Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Pinitol	Regresión	0,158	1	0,158	1697,051	0,000
	Residual	0,000	3	0,000		
	Total	0,158	4			
D-chiro- inositol	Regresión	0,239	1	0,239	1058,726	0,000
	Residual	0,001	3	0,000		
	Total	0,240	4			
myo- inositol	Regresión	0,347	1	0,347	1914,166	0,000
	Residual	0,001	3	0,000		
	Total	0,348	4			

Tabla 16. ANOVA para evaluar la regresión lineal en las curvas de calibrado de azúcares.

Azúcar	Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fructosa	Regresión	11,058	1	11,058	834,165	0,000
	Residual	0,066	5	0,013		
	Total	11,124	6			
Glucosa	Regresión	10,697	1	10,697	667,928	0,000
	Residual	0,08	5	0,016		
	Total	10,777	6			
Sacarosa	Regresión	31,721	1	31,721	364,477	0,000
	Residual	0,348	4	0,087		
	Total	32,069	5			

Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de la linealidad permiten concluir que el método instrumental empleado para la determinación de inositoles y azúcares es lineal en el rango de concentraciones establecidas.

➤ **Precisión instrumental**

La precisión indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para las réplicas de un mismo patrón, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas; usualmente se expresa en términos de desviación estándar (s) o del coeficiente de variación (CV). Se evalúa a tres niveles: precisión intermedia, repetibilidad y reproducibilidad.

En este estudio la precisión instrumental se evaluó como la repetibilidad y la precisión intermedia .

La **Tabla 17** recopila los resultados de repetibilidad para los analitos de estudio. Los porcentajes del coeficiente variación están entre 1,1 y 7,4 % para los inositoles, y entre 2,4 y 9,6% para azúcares. El porcentaje aceptado por la AOAC (AOAC Guidelines for Single Laboratory, 2002) para la repetibilidad es 15% por lo que los resultados obtenidos se ajustan a la norma.

Tabla 17. Precisión instrumental evaluada como repetibilidad.

[Pinitol]/[PI]*	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%CV
0,39	0,50	0,52	0,45	0,49	7,47
0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	2,48
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	1,14
[D-chiro-]/[PI]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%CV
0,40	0,61	0,56	0,57	0,58	4,93
0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	5,21
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,29
[myo-]/[PI]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%CV
0,43	0,74	0,77	0,67	0,73	7,65
0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	5,53
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	2,11
[Fructosa]/[PI]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%CV
2,16	3,73	3,57	3,45	3,58	3,81
0,86	1,35	1,14	1,23	1,24	8,74
0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	2,54
[Glucosa]/[PI]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%CV
2,04	3,59	3,59	3,38	3,52	3,44
0,82	1,32	1,09	1,18	1,20	9,69
0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	2,46
[Sacarosa] / [PI]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%CV
2,08	6,35	6,21	5,54	6,03	7,11
0,42	0,70	0,74	0,72	0,72	2,72
0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	3,65

*[PI]= concentración de patrón interno.

[Analitos]= concentración de analitos: pinitol, D-chiro-, myo-, fructosa, glucosa y sacarosa.

En la **Tabla 18** se encuentra los resultados de la precisión intermedia de todos los analitos de estudio. Los coeficientes de variación están por debajo de 15% a excepción de la última concentración de la fructosa, para la cual el %CV fue de 18. La AOAC admite coeficientes hasta del 20% a concentraciones bajas, por lo que estaría dentro de lo que la norma contempla.

Tabla 18. Precisión instrumental evaluado como precisión intermedia.

[Pinitol]/[PI]	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	%CV
0,39	0,45	0,45	0,43	0,45	2,17
0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	7,73
0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	11,51
[D-chiro-]/[PI]	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	%CV
0,40	0,56	0,57	0,55	0,56	1,55
0,04	0,05	0,05	0,04	0,05	3,91
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	8,74
[myo-]/[PI]	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	%CV
0,43	0,67	0,69	0,68	0,68	1,78
0,04	0,05	0,05	0,04	0,05	9,26
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	6,29
[Fructosa] / [PI]	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	%CV
2,16	3,73	3,68	3,37	3,59	5,44
0,86	1,35	1,16	1,40	1,30	9,75
0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	18,76
[Glucosa] / [PI]	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	%CV
2,04	3,59	3,71	3,39	3,56	4,56
0,82	1,32	1,13	1,31	1,25	8,66
0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	5,11
[Sacarosa] / [PI]	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	%CV
2,08	5,84	6,21	6,21	6,09	3,57
0,42	0,74	0,74	0,62	0,70	9,58
0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	7,27

*[PI]= concentración de patrón interno.

[Analitos]= concentración de analitos: pinitol, D-chiro-, myo-, fructosa, glucosa y sacarosa.

➤ Límites de detección y cuantificación

De acuerdo con Foley y Dorsey (1984), el límite de detección LOD se calcula como tres veces la relación señal ruido (S/N), mientras que para el límite de cuantificación LOQ la relación es de 10 veces. Los resultados de LOD y LOQ se presentan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Límites de detección y de cuantificación de los analitos de estudio.

Analito	LOD (μg)	LOQ (μg)
Pinitol	0,030	0,100
D- <i>chiro</i> -	0,026	0,086
<i>myo</i> -	0,011	0,035
Glucosa	0,254	0,845
Fructosa	0,369	1,231
Sacarosa	0,160	0,533

5.2. Desarrollo y optimización de un método mediante EAM para la extracción de inositoles a partir de lechuga y escarola

5.2.1. Optimización del tiempo que tarda el equipo en alcanzar la temperatura fijada

Teniendo en cuenta los relativamente altos contenidos de inositoles encontrados en las hojas de lechuga “hoja de roble” en estudios previos (Hernandez Hernandez O, Ruiz Aceituno, Sanz , & Martinez Castro, 2011), se seleccionó esta muestra para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción por EAM.

En primer lugar, se evaluaron los tiempos necesarios para alcanzar las temperaturas de trabajo con el microondas. Esta rampa de tiempo se optimizó con el fin de garantizar que la extracción iniciara a la temperatura fijada y no por encima o por debajo de esta, además de que dicho tiempo fuera el menor posible para, de este modo, tener mayor control sobre la extracción.

El tiempo de rampa puede variar en función del disolvente y del número de muestras que se extraen (Teo, Tan, Yong, Hew, & Ong, 2009). Por tanto, el tiempo de rampa se optimizó para tres disolventes (agua, etanol y mezclas agua:etanol (50:50, v/v)) y para un número fijo de vasos de extracción (cuatro). Los resultados obtenidos se observan en la **Tabla 20**. En contra de lo descrito en la bibliografía, no se observaron diferencias en función del disolvente empleado. Como era de esperar, el mayor tiempo de rampa (4 min) se requirió para alcanzar la temperatura máxima de trabajo (120°C), mientras que los 40°C se alcanzaron en tan solo 2 min.

Tabla 20. Resultados de la optimización del tiempo de rampa.

Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (min)
Agua	40	2
Etanol		
Agua-Etanol		
Agua	80	3
Etanol		
Agua-Etanol		
Agua	120	4
Etanol		
Agua-Etanol		

5.2.2. Optimización de la cantidad de muestra

Una vez optimizada la rampa de tiempo/temperatura del microondas, se procedió a optimizar la cantidad de muestra a emplear en cada extracción. Para ello se fijó un volumen de 10 mL de agua y se evaluaron distintas cantidades de muestra (entre 0,1 y 0,5 g) seleccionándose unas condiciones de tiempo y temperatura de extracción intermedias (85°C, 16,5 min) tal y como se indica en la sección 4.2.1.2. Los extractos resultantes se analizaron mediante CG-EM, previa derivatización. La **Figura 8** muestra el perfil cromatográfico de un extracto de lechuga E4 (0,1 g) sometido a derivatización. La asignación de los compuestos se realizó por comparación de los índices de retención y espectros de masas de los distintos picos cromatográficos con los de los patrones comerciales (sección 5.1.1).

El perfil cromatográfico de los extractos obtenidos en esta sección, muestra los azúcares como la fructosa (8,0, 8,2 min) y glucosa (9,6, 10,2 min). La sacarosa se encuentra en cantidades por debajo del límite de cuantificación. También se muestran los inositoles como el D-*chiro*-inositol (8,4 min) y el *myo*-inositol (11,8 min)(ver **Figura 8**). Este perfil cromatográfico concuerda con lo reportado previamente por Hernández y otros (2011).

Los demás picos cromatográficos que se observan y no se encuentran numerados corresponden a impurezas en la columna.

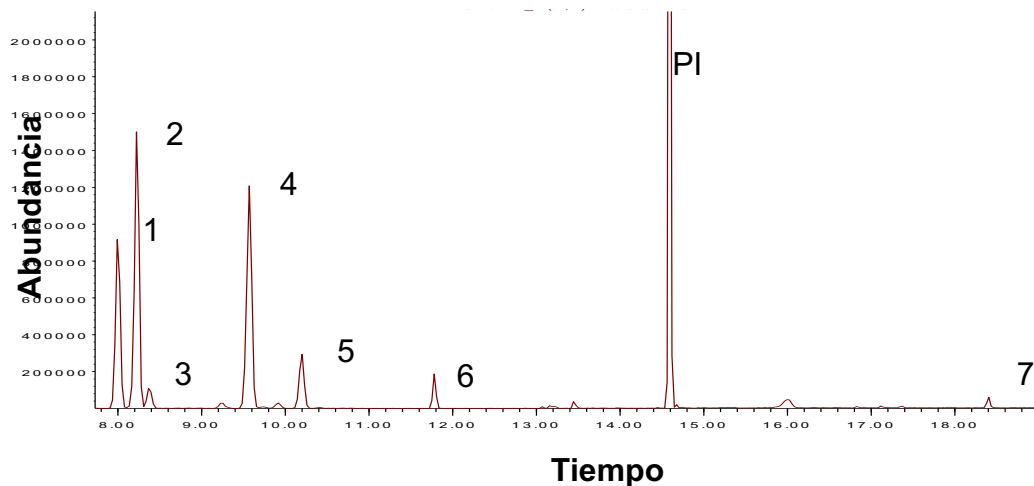


Figura 8. Perfil cromatográfico del extracto obtenido mediante CG-EM a partir de 0,1 g de cantidad de muestra E4: (1) fructosa 1, (2) fructosa 2, (3) D-*chiro*-inositol, (4) glucosa E, (5) glucosa Z, (6) *myo*-inositol, (7) sacarosa. PI: patrón interno.

La **Figura 9** muestra las concentraciones de inositoles extraídas mediante EAM empleando distintas cantidades de muestra. Observando estos resultados, se seleccionó 0,1g como cantidad óptima pues se extrae un 30% más de inositoles frente a 0,3 g y un 34% más frente a 0,5 g (ver **Figura 9**).

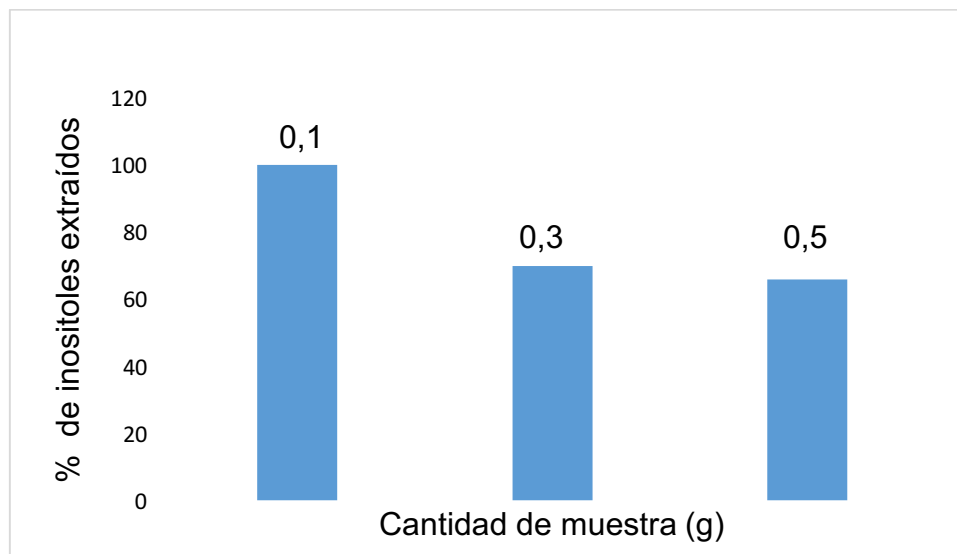


Figura 9. Comparación del porcentaje de inositoles extraídos a partir de: 0,1, 0,3 y 0,5 g de muestra E4.

La extracción de solutos a partir de materiales vegetales es un proceso de transferencia de masa que implica: (1) penetración del solvente en el material sólido; (2) solubilización-desorción de los solutos provenientes de la matriz sólida; (3) difusión a la superficie y (4) transferencia a la solución externa (ver **Figura 10**) por lo que entre mayor cantidad de muestra el disolvente se puede saturar, al no ser el volumen empleado suficiente para extraer todos los analitos presentes, disminuyendo el rendimiento de extracción (Florez, Conde , & Dominguez, 2014).

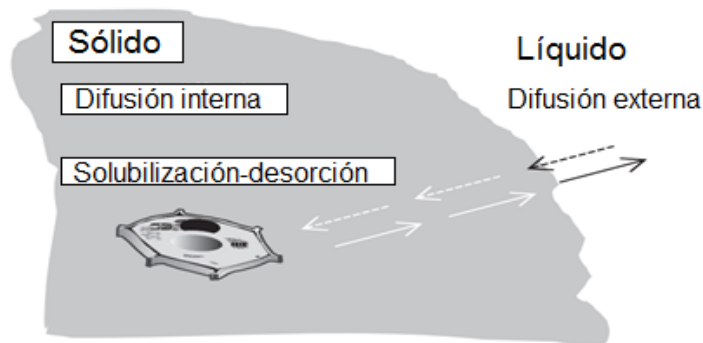


Figura 10. Proceso de extracción en materiales vegetales.

5.2.3. Optimización del método de extracción asistida por microondas

La influencia de las variables temperatura (T), tiempo (t) y disolvente (d) sobre la extracción de los inositoles: *D-chiro-* y *myo-* y los azúcares: fructosa y glucosa a partir de la muestra E4, se estudió mediante la ejecución de un diseño experimental de Box-Behnken.

La **Figura 11**, muestra el diseño de Box-Behnken de tres factores (Tiempo, temperatura, disolvente). Los puntos del diagrama representan los experimentos a realizar. A los puntos que aparecen representados se suman los tres puntos centrales, haciendo un total de 15 experimentos.

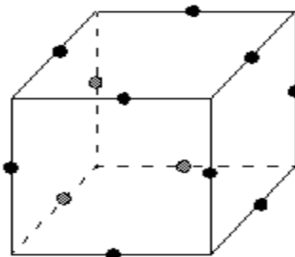


Figura 11. Representación gráfica del diseño experimental de Box-Behnken.

La variable de respuesta R1 (contenido total de inositoles) fue la variable a maximizar, mientras que R2 (contenido total de azúcares) la variable a minimizar, teniendo en cuenta que estas moléculas pueden coextraerse e interferir en la bioactividad relacionada con el metabolismo de los carbohidratos cíclicos (inositoles) de los extractos obtenidos.

Las concentraciones (mg/g muestra seca) totales de inositoles (*D-chiro-*, *myo-*) y totales de azúcares (fructosa, glucosa) obtenidas bajo las diferentes condiciones experimentales (ver **Tabla 4**) se encuentran recopiladas en la **Tabla 21**, las concentraciones se encontraron mediante interpolación de las diferentes áreas obtenidas sobre las curvas de calibrado (ver **Tabla 10**).

Tabla 21. Resultados del diseño experimental Box-Behnken aplicado a la muestra E4. Las concentraciones de inositoles y azúcares están expresadas en mg/g muestra seca.

NÚMERO EXPERIMENTO	Inositol (DE)	Azúcar (DE)
1	4,92 (0,31)	37,82 (0,45)
2	7,18 (0,02)	110,50 (0,25)
3	5,52 (0,11)	63,99 (0,64)
4	4,42 (0,47)	93,58 (21,31)
5	5,56 (0,25)	90,05 (4,33)
6	4,15 (0,08)	37,96 (1,24)
7	5,45 (0,62)	55,19 (7,54)
8	5,82 (0,92)	87,15 (16,63)
9	4,33 (0,19)	40,82 (3,18)
10	5,37 (0,51)	34,69 (0,63)
11	5,14 (0,05)	52,26 (0,41)
12	5,17 (0,30)	56,65 (4,59)
13	4,91 (0,24)	43,77 (4,19)
14	5,51 (0,18)	76,02 (3,23)
15	6,15 (1,61)	50,35 (11,35)

DE: desviación estándar (n=2).

Las concentraciones totales de inositoles variaron entre 4,15 y 7,18 mg/g muestra seca, entre tanto las concentraciones totales de azúcares variaron entre 34,69 y 110,50 mg/g muestra seca.

La temperatura es de primordial importancia para garantizar una extracción eficiente. En general, valores altos de temperatura mejoran los rendimientos de

extracción como resultado de una mayor difusividad del disolvente en la matriz, desorción y partición de solutos en el disolvente (Camel, 2000). Sin embargo algunos autores reportan la obtención de mayores rendimientos de extracción para carbohidratos bioactivos utilizando temperaturas relativamente bajas (60°C) (Ruiz Aceituno, Garcia Sarrío, Rodríguez B, Ramos, & Sanz, 2016). En este trabajo la temperatura se evaluó entre 40-120°C, de forma similar a lo descrito por Ruiz y otros (2016) para la extracción de inositoles a partir de brácteas externas de alcachofa.

Como se puede observar en la **Tabla 21**, en general, a menor temperatura de extracción la cantidad de inositoles extraídos fue mayor de forma similar a lo observado por Ruiz y otros (2016).

Como en otras técnicas de extracción, el tiempo es un parámetro cuya influencia debe tenerse en cuenta. En general, un aumento del tiempo de extracción puede dar lugar a una mayor cantidad de analitos extraídos, aunque no siempre es así ya que a mayor tiempo puede tener lugar una mayor degradación de los analitos o alcanzar un máximo y no extraerse más cantidad. La extracción de compuestos activos a partir de vegetales mediante EAM varía desde unos pocos minutos hasta media hora (Chan, Yusoff, Ngho, & Kung, 2011), por ello se contemplaron tiempos entre 3-30 min. En general, los resultados de la **Tabla 21** evidencian que a mayores tiempos de extracción, mayor el contenido total de inositoles.

Debido a que los analitos de interés son altamente polares, con coeficientes de reparto octanol-agua de $\log P = -2,11 \pm 0,49$ (Raks, Al Soud, & Buszewski, 2018), los solventes más empleados para su extracción son: agua (Baumgartner, Ritzmann, Haas, Amado, & Neukom, 1986), etanol (Raks, Al Soud, & Buszewski, 2018), metanol (Jawla, Kumar, & Khan, 2013) o mezclas de estos (Kawai & Kumazawa, 2012). Los dos primeros solventes son considerados seguros desde el punto de vista alimentario, también se denominan disolventes GRAS (Generally Recognized As Safe), por lo que fueron los solventes seleccionados para las extracciones. Estudios previos han mostrado que el disolvente es la variable que más condiciona la extracción de inositoles (Florez, Conde, & Dominguez, 2014) y generalmente utilizando agua o etanol como disolvente se han logrado los mejores rendimientos. Con el fin de que las extracciones sean más selectivas, se emplean también mezclas de agua:etanol. Por lo anterior, se realizaron ensayos, donde el porcentaje de etanol varió entre 0 y 70% (agua:etanol 100:0, v/v – agua:etanol 0:70, v/v). En la **Tabla 21** se observa que los mayores rendimientos se obtuvieron empleando una proporción agua:etanol 65:35, v/v.

Con los resultados de la **Tabla 21** se empleó la metodología de superficie de respuesta con el fin de calcular los coeficientes del modelo cuadrático propuesto en la Ec 1 y determinar cuáles de ellos afectan significativamente R1 y R2, además de establecer sus valores óptimos. También se consideró si por medio de un análisis de respuesta múltiple era posible al mismo tiempo maximizar R1 y minimizar R2 con determinados valores de las variables T, t y d.

En lo que respecta a la superficie de respuesta de los inositoles R1 el empleo del software Statgraphics permitió establecer la relación entre el valor de la respuesta y las variables. Como se observa en el diagrama de Pareto (ver **Figura 12**), la variable *dd* fue la primera variable que se incorporó de forma significativa a un nivel del 95% ($P < 0,05$) seguida por la interacción temperatura-disolvente (*Td*) y el tiempo. El resto de los términos no fueron significativos. Se observa que la variable disolvente tiene un efecto negativo sobre R3, es decir, entre mayor el porcentaje de disolvente empleado menor será el valor de R3. Por el contrario el tiempo tiene un efecto positivo, es decir, entre mayor sean los tiempos de extracción mayor resultará el valor de R3.

Diagrama de Pareto Estandarizado para inositoles

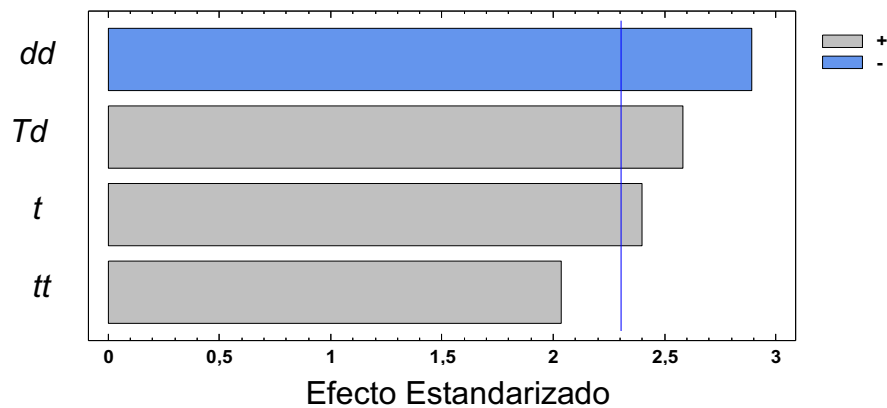


Figura 12. Diagrama de Pareto para la extracción de inositoles de E4.

La ecuación de regresión cuadrática obtenida después de excluir los términos no significativos fue:

$$R1 = 6,17111 + 0,015T + 0,0596273t + 0,00554945d + 0,00269072t^2 - 0,000569074d^2 + 0,000428571Td \text{ (Ec 2)}$$

Este modelo cuadrático explicó el 69% de la variabilidad de la respuesta R1. Dos criterios determinan la validez de los modelos: el coeficiente de regresión (R^2) y el porcentaje de error absoluto de desviación (EAD) entre los resultados obtenidos experimentalmente y los calculados por el modelo (Nde, Boldor, & Astete, 2015). Un modelo se considera válido si $R^2 \geq 0,7$ y/o $EAD \leq 10\%$ (Samavati, 2013). El valor obtenido del coeficiente de regresión en este estudio fue cercano a 0,7 y el valor de EAD fue de 6,25%. Por lo tanto el modelo puede considerarse válido. Para asegurar

la validez del modelo se efectuó también la prueba estadística de falta de ajuste que con un valor $P=0,2220$ mostró ser no significativo al 95% de confianza, lo que implica que el modelo representa los datos de manera satisfactoria (Ahmad, Liew, Yarmo, & Said, 2012). Asimismo, se utilizó el error de predicción (EP), para evaluar la utilidad del modelo. El EP es la diferencia entre un valor y su estimación en un modelo de regresión (Quevedo & Perez, 2014). Para este modelo se obtuvo un valor de EP bajo ($EP= 3,5$) que indica un adecuado ajuste del modelo (Gharibzahedi, Mousavi, Khodaiyan, & Hamed, 2012). El coeficiente de variación calculado fue de 5,8%, lo que indica que el modelo es preciso y confiable.

En la **Figura 13** se muestran las superficies de respuestas obtenidas para R1.

Las condiciones óptimas para la extracción de inosítoles arrojadas por el programa Statgraphics fueron: 40°C, 30 min y 20% de etanol.

Respecto a la variable dependiente R2 (contenido total en carbohidratos interferentes), el análisis ANOVA de los resultados mostró que ninguna de las variables en estudio eran estadísticamente significativas ($P<0,05$ al 95% de nivel de confianza), por lo cual, no se pudo establecer un modelo que describiera correctamente la variabilidad de R2. Por tanto, y a la hora de determinar las condiciones óptimas de extracción se consideró únicamente aquellas que daban lugar a un mayor rendimiento en inosítoles.

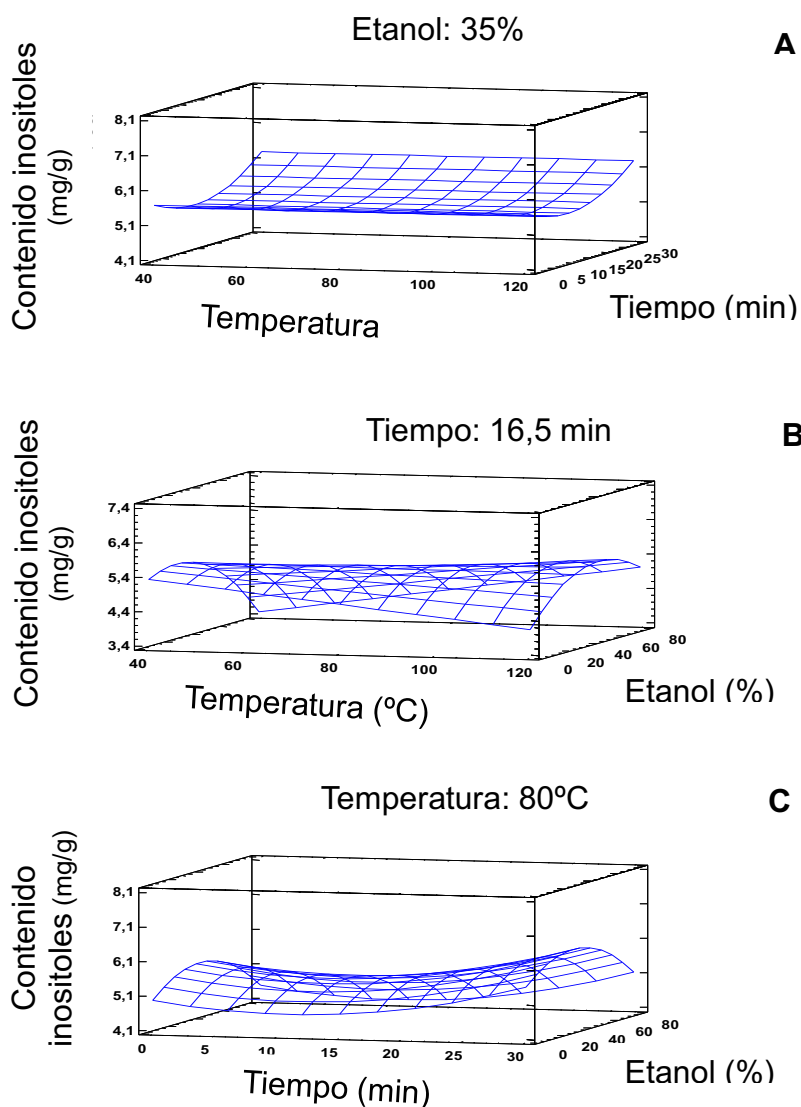


Figura 13. Superficies de respuesta para la extracción de inositoles de E4 mediante EAM. (A) Temperatura y tiempo (B) Temperatura y etanol (C) Tiempo y etanol.

5.2.4. Optimización de los ciclos de extracción

Para garantizar una extracción completa de los inositoles, se realizaron tres ciclos consecutivos de extracción a la muestra E4 bajo las condiciones óptimas, los resultados se muestran en la **Tabla 22**. En el primer ciclo se extrajeron casi la totalidad de los inositoles 95%. El 5% restante fue extraído en el segundo ciclo ya que en el tercer ciclo no se observó la presencia de los compuestos de interés. Por tanto se concluyó que un solo ciclo era suficiente para la obtención de extractos ricos en inositoles a partir de hojas de lechuga, pues si bien quedó un 5% sin

extraerse, el gasto de energía y disolvente que implicaba una segunda extracción no era favorable.

Tabla 22. Optimización de los ciclos de extracción para E4.

Analito	Porcentaje ciclo 1 (%)	Porcentaje ciclo 2 (%)	Porcentaje ciclo 3(%)
Fructosa	96,59	3,41	0,00
D- <i>chiro</i> -inositol	95,52	4,48	0,00
Glucosa	97,44	2,56	0,00
<i>myo</i> -inositol	95,06	4,94	0,00

5.3. Comparación del método de extracción asistido por microondas con la extracción sólido-líquido convencional

La muestra E4 fue sometida a un proceso de extracción por EAM y ESL convencional bajo las condiciones óptimas indicadas en la sección anterior (40°C, 30 min, 20% etanol, 1 Ciclo), con el fin de comparar los dos métodos de extracción. La **Tabla 23** muestra las concentraciones de inositolos y azúcares extraídas mediante ambas técnicas. Por medio de EAM se logró extraer un 26% más (5,42 mg/g) de inositolos que con ESL (4,01 mg/g). Este documento es el primer reporte de extracción de inositolos a partir de lechuga utilizando energía microondas.

Tabla 23. Comparación de los métodos de extracción EAM y ESL.

Técnica de extracción	D-<i>chiro</i>-inositol mg/g (DE)	<i>myo</i>-inositol mg/g (DE)	Fructosa mg/g (DE)	Glucosa mg/g (DE)
MW hoja roble	2,70 (0,07)	2,72 (0,04)	48,10 (0,45)	47,20 (0,45)
ESL hoja roble	1,88 (0,44)	2,13 (0,23)	30,09 (6,01)	30,27 (5,17)

DE: desviación estándar (n=2).

5.4. Obtención de extractos bioactivos a partir de distintos residuos agroalimentarios (hojas de lechuga y escarola y vainas de soja verde)

Los parámetros y variables optimizadas para la muestra E4 fueron aplicados a las otras cinco variedades de lechuga y a una muestra de escarola. Los resultados obtenidos para el contenido total de inositolos se reportan en la **Tabla 24** y para los azúcares en la **Tabla 25**.

Tabla 24. Contenido de inositoles (mg/g muestra seca) en las variedades de lechuga y escarola analizadas.

Código	D-chiro-inositol (DE)	myo-inositol (DE)
E1	1,55 (0,31)	3,38 (0,47)
E2	1,80 (0,02)	3,25 (0,10)
E3	1,53 (0,17)	2,81 (0,37)
E4	2,70 (0,07)	2,72 (0,04)
E5	4,92 (0,32)	3,75 (0,13)
C1	1,85 (0,09)	2,79 (0,14)
C2	1,55 (0,04)	3,37 (0,01)

DE: desviación estándar (n=2).

Tabla 25. Contenido de azúcares (mg/g muestra seca) en las variedades de lechuga y escarola analizadas.

Código	Fructosa (DE)	Glucosa (DE)	Sacarosa (DE)
E1	153,30 (26,14)	183,71 (30,16)	20,82 (1,83)
E2	166,65 (4,49)	255,55 (0,68)	11,36 (0,08)
E3	140,81 (16,27)	188,99 (18,68)	12,18 (0,52)
E4	48,10 (0,45)	47,20 (0,45)	tr
E5	128,36 (8,33)	145,90 (8,75)	11,99 (0,07)
C1	51,67 (1,11)	54,55 (0,94)	14,63 (0,63)
C2	146,35 (5,10)	183,90 (2,09)	21,85 (0,77)

DE: desviación estándar (n=2).tr: trazas.

El contenido total de azúcares encontrado para el género *Lactuca* varió entre 48,10-166,65; 47,20-255,55; 11,36-21,85 mg/g muestra seca para fructosa, glucosa y sacarosa respectivamente. Por otro lado, el contenido total de inositoles varió entre 1,53-2,70; 2,72-3,38 mg/g muestra seca para D-*chiro*- y *myo*-inositol, respectivamente. Las mayores concentraciones de D-*chiro*-inositol se obtuvieron en la muestra E4 (lechuga hoja de roble), y de *myo*-inositol en la muestra E1 (lechuga Romana).

El contenido total de azúcares encontrado para el género *Cichorium* fue de 128,36; 145,90; 11,90 mg/g muestra seca para fructosa, glucosa y sacarosa, respectivamente. En cuanto al contenido de inositoles, este fue superior al encontrado en las variedades de lechuga: 4,92 y 3,75 mg/g muestra seca para D-*chiro*- y *myo*-, respectivamente.

El contenido total de azúcares e inositoles obtenido empleado la extracción asistida por microondas a una temperatura de 40°C durante 30 min fue 51 y 26 veces mayor respectivamente a lo reportado por los autores Hernandez y otros (2011), quienes llevaron a cabo la extracción de manera convencional a una temperatura de 60°C durante 1 h. Estos resultados evidencian la acción satisfactoria de las microondas y del método desarrollado para la extracción de los inositoles, empleando una menor temperatura 40°C y disminuyendo el tiempo de extracción.

Investigaciones previas mostraron que el género *Lactuca* tenía un mayor contenido de inositoles que el género *Cichorium* (Hernandez Hernandez O, Ruiz Aceituno, Sanz , & Martinez Castro, 2011), por el contrario, en este estudio se evidencia que los mayores contenidos fueron obtenidos en la muestra de escarola. Sin embargo, sería necesario analizar un mayor número de muestras para poder establecer conclusiones definitivas.

Así mismo, se llevó a cabo la extracción de inositoles a partir de una muestra de vainas de soja verde. Sin embargo, teniendo en cuenta que las lechugas pertenecen a la familia de las Asteraceas y la soja verde a las Fabaceas y para poder comprobar si las condiciones de extracción variaban con el tipo de muestra a considerar, se llevó a cabo un nuevo diseño de experimentos.

Las concentraciones (mg/g muestra seca) totales de inositoles (D-*chiro*- y *myo*-inositol) y totales de monosacáridos (fructosa, glucosa) en la muestra L1 obtenidas bajo las diferentes condiciones experimentales se recogen en la **Tabla 26**. Las concentraciones se calcularon mediante interpolación de las diferentes áreas obtenidas sobre las curvas de calibrado (ver **Tabla 10**).

Tabla 26. Resultados del diseño experimental Box-Behnken aplicado a la muestra de vainas de soja verde (L1).

Número experimento	T (°C)	t (min)	d (%)	Inositol (DE)	Azúcar (DE)
1	120	16,5	0	47,62 (2,23)	35,20 (1,39)
2	85	16,5	50	33,32 (5,51)	42,98 (4,69)
3	85	16,5	50	32,39 (2,48)	38,3 (2,90)
4	120	30	50	32,97 (0,48)	39,21 (1,10)
5	120	16,5	100	20,24 (0,04)	19,97 (0,39)
6	85	16,5	50	41,47 (1,04)	47,97 (0,87)
7	50	16,5	0	37,12 (3,25)	46,46 (1,85)
8	50	30	50	26,84 (2,26)	35,13 (1,98)
9	50	16,5	100	7,32 (0,07)	9,51 (0,06)
10	85	30	0	46,47 (10,09)	28,15 (7,35)
11	85	30	100	16,13 (1,00)	19,25 (1,39)
12	50	3	50	41,43 (1,67)	48,7 (0,58)
13	120	3	50	35,05 (1,74)	41,17 (0,05)
14	85	3	0	41,86 (0,74)	48,00 (2,53)
15	85	3	100	10,47 (0,61)	14,93 (0,64)

DE: desviación estándar (n=2).

Las concentraciones totales de inositoles variaron entre 7,32 y 47,62 mg/g muestra seca, y las de azúcares variaron entre 9,51 y 48,00 mg/g muestra seca.

En lo que respecta a la superficie de respuesta de los inositoles R3, los coeficientes más significativos ($P < 0,05$) fueron d y dd, como se puede observar en el diagrama de Pareto (ver **Figura 14**) estos efectos sobrepasan la línea de significancia estadística, lo que sugiere que cualquier cambio en la variable d y la interacción dd afectará la respuesta R3, es decir, el contenido de inositoles extraídos. El efecto de la variable disolvente como se observa en el diagrama de Pareto tiene un efecto negativo, es decir, entre mayor el porcentaje de disolvente empleado menor será el valor de R3. Las demás variables independientes e interacciones no sobrepasan la línea de significancia estadística, es decir, que no tienen influencia alguna por lo cual no aparecen en la ecuación 3.

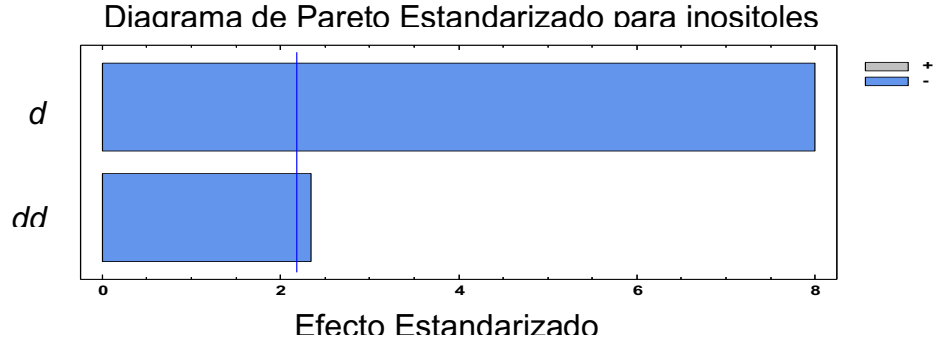


Figura 14. Diagrama de Pareto para la extracción de inositoles de L1.

La ecuación de regresión cuadrática que se obtuvo después de excluir los términos no significativos fue:

$$R3 = 43,2675 - 0,0421679 d - 0,00255107 d^2 \text{ (Ec 3)}$$

Este modelo cuadrático explicó el 85% de la variabilidad de la respuesta R3, lo que indicó la validez del método. En la **Figura 15** se muestran las superficies de respuestas obtenidas para R3.

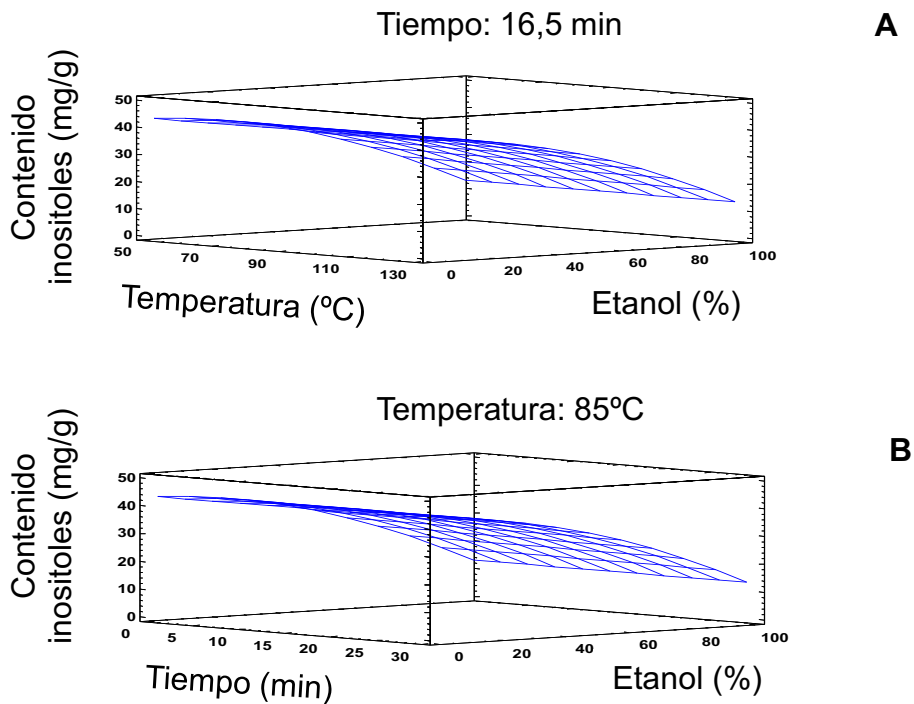


Figura 15. Superficies de respuesta para la extracción de inositoles de L1 mediante EAM. (A) Temperatura y etanol (B) Tiempo y etanol.

Las condiciones óptimas para la extracción de inositoles proporcionadas aplicando este modelo fueron: 120°C, 16,5 min y 0% de etanol, condiciones muy diferentes que las obtenidas para las hojas de lechuga.

En cuanto al análisis ANOVA de los resultados para la respuesta R4 (contenido total en carbohidratos interferentes), de forma similar al estudio realizado con las hojas de lechuga, mostró que ninguna de las variables en estudio eran estadísticamente significativas ($P < 0,05$ al 95% de nivel de confianza) y, por tanto, no se pudo establecer un modelo que describiera correctamente la variabilidad de esta respuesta, seleccionándose como óptimas las indicadas para extracción de inositoles.

En estas condiciones se realizó una extracción de L1, obteniéndose: 57,96 mg/g muestra seca de Pinitol, 1,29 mg/g muestra seca de *D-chiro*-inositol y 1,22 mg/g muestra seca de *myo*-inositol. Se evidencia que el contenido de *D-chiro*-inositol y *myo*-inositol encontrados en la vaina de soja verde son inferiores a los encontrados en las variedades de lechuga y escarola (ver **Tabla 25**). Los resultados encontrados en este estudio confirman que la vaina de soja verde, a diferencia de la lechuga y escarola, es una fuente importante del metilinositol o pinitol, al cual se le atribuyen varios beneficios biológicos, entre los que se destaca poseer una actividad semejante a la insulina.

En la **Figura 16** se observa el perfil cromatográfico del extracto obtenido bajo las condiciones óptimas.

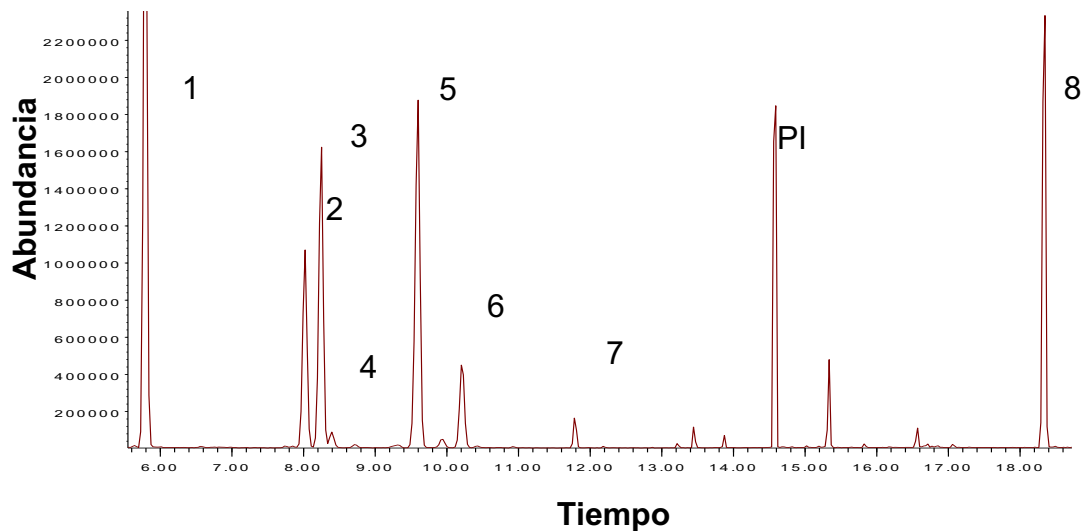


Figura 16. Perfil cromatográfico del extracto obtenido mediante CG-EM a partir de 0,5 g de la muestra L1: (1) pinitol, (2) fructosa 1, (3) fructosa 2, (4) D-*chiro*-inositol, (5) glucosa E, (6) glucosa Z, (7) *myo*-inositol, (8) sacarosa. PI: patrón interno.

5.5. Fraccionamiento de carbohidratos

La presencia de los monosacáridos fructosa y glucosa en los extractos destinados a la obtención de alimentos funcionales para personas diabéticas aumentan su contenido calórico y se constituyen en un interferente importante para la bioactividad esperada. Considerando la inevitable e indeseada coextracción de estos monosacáridos y la imposibilidad de minimizar su extracción modificando factores como el tiempo, temperatura y disolvente en su extracción mediante EAM, se aplicó un procedimiento de fraccionamiento basado en el empleo de levaduras del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) para la selectiva eliminación de dichos azúcares, y de este modo obtener una fracción concentrada de los compuestos de interés (inositoles).

Para optimizar el método de fraccionamiento se seleccionó la muestra de hojas de lechuga E4.

Se evidenció un efecto inmediato de la levadura sobre la concentración de glucosa y fructosa. A tiempo 0 de interacción entre la levadura previamente activada con agua, y el extracto se observó una disminución en la concentración de la glucosa de aproximadamente 1,5 mg/g y de 2,1 mg/g para la fructosa. A pesar que ambos azúcares comparten los mismos componentes de transporte de membrana, la velocidad de disminución de la concentración es ligeramente mayor para la fructosa que para la glucosa. Amore y otros (1989), comprobaron que, la fructosa inhibe la

absorción de glucosa por la levadura *Saccharomyces* en un 44%, y que la glucosa inhibe en un 56% la absorción de fructosa en presencia de cantidades equimolares, sin embargo, en este caso la cantidad de fructosa es ligeramente mayor que la de glucosa lo que favorece la absorción de la primera por parte de la levadura para metabolizarla con mayor velocidad. Se observó que transcurridas dos horas de tratamiento no hay cantidades detectables ni de glucosa ni de fructosa lo que indica que el procedimiento resultó eficaz para la eliminación de estos azúcares en este tiempo.

Por otra parte, se detectó un incremento en la concentración del disacárido trehalosa que aparece como producto del metabolismo de la levadura. A las dos horas de reacción alcanzó su concentración más alta. Dado que el contenido calórico de este carbohidrato es considerable, se debe garantizar su eliminación. Tras 8 horas de tratamiento, la misma levadura ha metabolizado la trehalosa y sólo resta un 10,8% de ella en el medio, y su eliminación se logra por completo después de 24h de tratamiento.

El contenido de D-*chiro*-inositol y *myo*-inositol permaneció estable durante el tiempo de incubación, es decir, que el procedimiento de fraccionamiento resulta eficaz, pues no altera los niveles de concentración de inosítoles.

En la **Figura 17** se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos para el extracto antes del tratamiento (control) y después de 2 y 24 h de tratamiento. Como se indicó previamente la fructosa ($I^T = 1981; 1989$, pico 1,2) y glucosa ($I^T = 2029; 2052$, pico 4,5) desaparecen al cabo de 2 h. El D-*chiro*-inositol ($I^T = 1997$, pico 3) y el *myo*-inositol (2134, pico 6) no se ven afectados y, se evidencia la aparición de la trehalosa ($I^T = 2745$, pico 7) producto de la fermentación de los monosacáridos. Estos compuestos se identificaron a partir de sus tiempos de retención y espectros de masas los cuales fueron contrastados con bases de espectros y literatura.

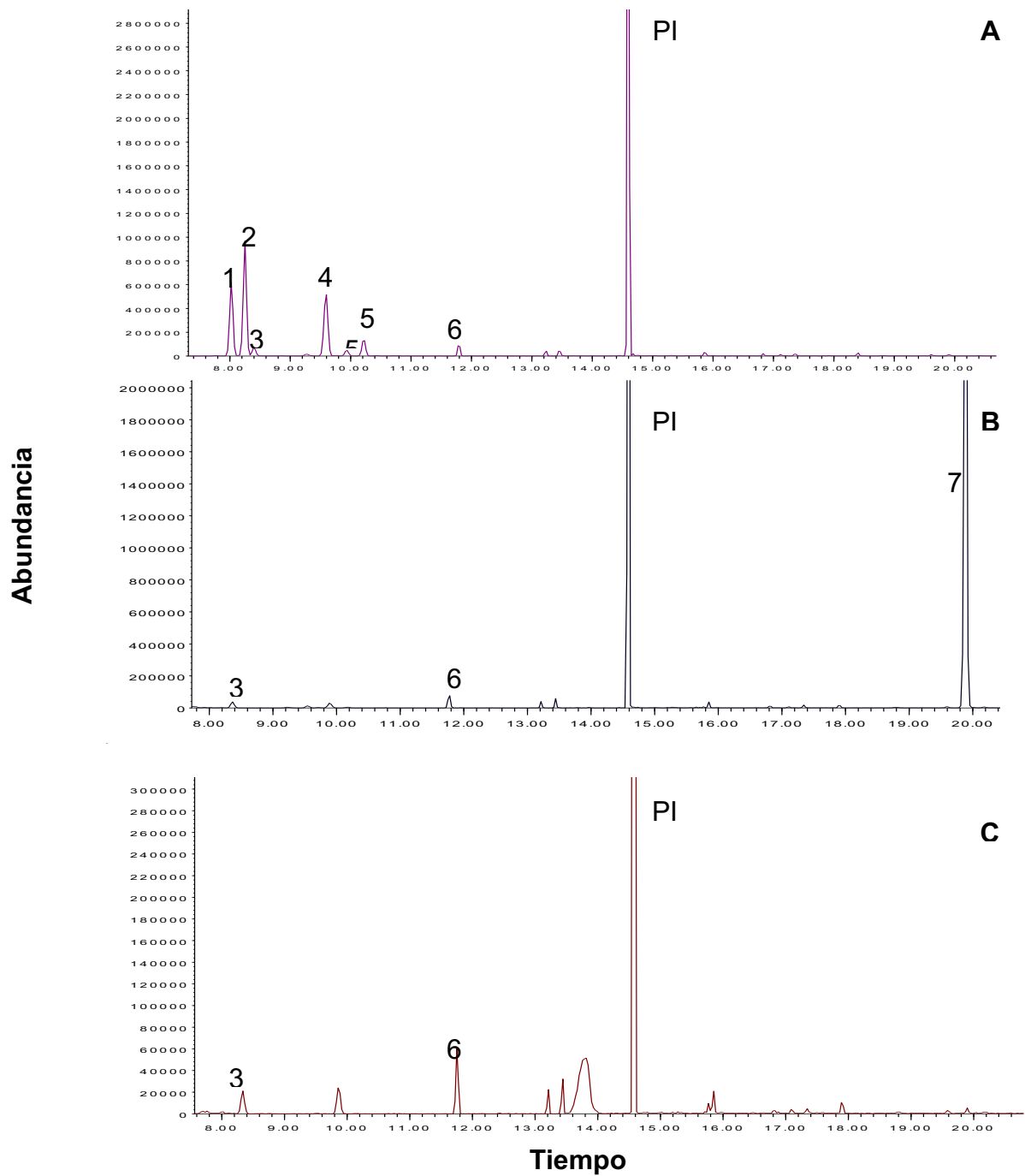


Figura 17. Perfiles cromatográficos del extracto E4 a diferentes tiempos del tratamiento con levadura *Saccharomyces*. En color fucsia el control (A), en color negro durante el tratamiento después de 2h (B) y en color café después de 24h (C). (1) fructosa 1, (2) fructosa 2, (3) *D-chiro*-inositol, (4) glucosa E, (5) glucosa Z, (6) *myo*-inositol, (7) trehalosa.

6. CONCLUSIONES

- El análisis por CG-EM permitió determinar la composición cualitativa de carbohidratos de bajo peso molecular (azúcares e inositoles) en extractos de hojas de lechuga, escarola y vainas de soja verde.
- Se estandarizó el método de cuantificación evaluando los parámetros de linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación. El modelo de calibración mostró ser lineal entre 0,100-0,005 mg de pinitol; 0,097-0,005 mg de *D-chiro*-inositol y 0,103-0,005 mg de *myo*-inositol. El método fue reproducible con una precisión intra-día entre 0,29 a 7,65% y una precisión inter-día entre 1,55 a 11,51%. Los límites de detección y cuantificación para pinitol fueron de 0,030 µg y 0,100 µg, respectivamente; 0,026 µg y 0,086 µg, respectivamente, para el *D-chiro*-inositol y 0,011 µg y 0,035 µg, respectivamente para el *myo*-inositol.
- El diseño de experimentos Box-Behnken ha demostrado ser un método eficaz y rápido para estudiar la influencia del tiempo de extracción, temperatura y el disolvente para la obtención de extractos enriquecidos en inositoles.
- El método de extracción mediante EAM en condiciones óptimas permitió la obtención de rendimientos de extracción de inositoles de las hojas de lechuga superiores a los logrados por el método convencional (extracción sólido-líquido), empleando menores tiempos de extracción.
- Las condiciones óptimas encontradas para la extracción de inositoles a partir de vainas de soja verde fueron diferentes a las correspondientes para las hojas de Asteraceae, por lo tanto es importante controlar el proceso de extracción para cada tipo de matriz.
- El tratamiento de los extractos obtenidos por EAM con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para el fraccionamiento selectivo, permitió la eliminación total de los azúcares fructosa y glucosa a las 2 horas de tratamiento, sin alterar los niveles de concentración de inositoles. La eliminación de la trehalosa producida se logró a las 24 h de tratamiento. El método de extracción por EAM resulta prometedor para la obtención de extractos enriquecidos en inositoles a partir de residuos agroalimentarios.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M., Liew, S., Yarmo, M., & Said, M. (2012). Optimization of Protease Extraction from Horse Mango (*Mangifera foetida* Lour) Kernels by a Response Surface Methodology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76 (8), 1438-1444.
- Al-Suod, H., Ligor, M., Ratiu, I. A., Rafinska, K., Gorecki, R., & Buszewski, B. (2017). A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols. *Phytochemistry Letters*, 20, 507-519.
- Amore Tony, Ruseel, I., & Stewart, G. (1989). Sugar utilization by yeast during fermentation. *Industrial Microbiology*, 4, 315-324.
- AOAC Guidelines for Single Laboratory. (2002). Recuperado el 28 de mayo de 2018, de https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
- Baumgartner, S., Ritzmann, R., Haas, J., Amado, R., & Neukom, H. (1986). Isolation and identification of cyclitols in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Agricultural and Food Chemistry*, 34 (5), 827-829.
- Beemster, P., Groenen, P., & Steegers Theunissen, R. (2002). Involvement of inositol in reproduction. *Nutrition Reviews*, 60 (3), 80-87.
- Bhuyan, D., Vuong, Q., Chalmers, A., Altena, I., Bowyer, M., & Scarlett, C. (2015). Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 69, 290-299.
- Binder, R., & Haddon, W. (1984). Analysis of o-Methylinositols by Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Carbohydrate Research*, 129, 21-32.
- Braz de Oliveira, A. J., Correia Goncalves, R. A., Cantuaria Chieritto, T., dos Santos, M. M., Mera de Souza, L., Gorin, P. A., y otros. (2011). Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry*, 129 (2), 305-311.
- Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19 (4), 229-248.
- Campbell, J. A., Goheen, S. C., & Donald, P. (2011). Extraction and Analysis of Inositols and Other Carbohydrates from Soybean Plant Tissues. En *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products* (págs. 422-446). Dora Krezhova.
- Carrero, C., Mansukhani, D., Ruiz, A. I., Martinez, I., Ramos, L., & Sanz, M. L. (2018). Extraction and characterization of low molecular weight bioactive carbohydrates from mung bean (*Vigna radiata*). *Food Chemistry*, 266, 146-154.
- CEM. (s.f.). CEM. Recuperado el 20 de Mayo de 2018, de <http://cem.com/es/>
- Cieslak, A., Gulewicz, K., & Lopez, P. (2011). Cyclitols, galactosyl cyclitols and raffinose family oligosaccharides in Mexican wild lupin seeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72 (2), 109-114.

Clements , R., & Darnell, B. (1980). Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet. *Clinical Nutrition* , 33 (9), 1954-1967.

Corzo, N., Alonso , J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., y otros. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria* , 99-118.

Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (2002). Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 58 (3), 297-302.

Croze, M. L., & Soulage, C. O. (2013). Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie* , 95 (10), 1811-1827.

Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung , F. W. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Chromatography A* , 1218 (37), 6213-6225.

Chau, J. F., Lee, M., Law, J. W., Chung, S. K., & Chung, S. S. (2005). Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. *FASEB* , 19 (13), 1887-1889.

Chauhan, P., Gupta, K., & Bani, S. (2011). The immunosuppressive effects of *Agryolobium roseum* and pinitol in experimental animals. *International Immunopharmacology* , 11, 286-291.

Chemistry, I. C. (1973). Nomenclature of Cyclitols. Londrés, UK.

Dai, Z., Chung, S., Miao, D., Lau, K., Chan, A., & Kung, A. (2011). Sodium/myo-inositol cotransporter 1 and myo-inositol are essential for osteogenesis. *Bone and Mineral Research* , 26 (3), 582-590.

Eagle, H., Oyama, V., Levy, M., & Freeman, A. (1956). Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *Science* , 123 (3202), 845-847.

Florez, N., Conde , E., & Dominguez, H. (2014). Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Chemical Technology and Biotechnology* , 90 (4), 590-607.

Foley, J., Dorsey, J. (1984). Clarification of the limit of detection in chromatography. *Chromatographia* , 18 (9), 503-511.

Gelber, D., Levine, J., & Belmaker, R. H. (2001). Effect of inositol on bulimia nervosa and binge eating. *Eating Disorders* , 29 (3), 345-348.

Genazzani, A. D. (2016). Inositol as putative integrative treatment for PCOS. *Reproductive BioMedicine Online* , 33 (6), 770-780.

Gharibzahedi, S., Mousavi, S., Khodaiyan, F., & Hamed, M. (2012). Optimization and characterization of walnut beverage emulsions in relation to their composition and structure. *Biological Macromolecules* , 50, 376-384.

Gonzalez Alvarez, D. O. (2013). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal*. Corporación Universitaria Lasallista.

Goulas, A., Kapasakalidis, P., Sinclair , H., Rastall, R., & Grandison, A. (2002). Purification of oligosaccharides by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* , 209 (1), 321-335.

- Hernandez Hernandez , O., Ruiz Aceituno, L., Sanz , M., & Martinez Castro, I. (2011). Determination of free inositols and other low molecular weight carbohydrates in vegetables. *Agricultural and Food Chemistry* , 59 (6), 2451-2455.
- Hernandez Hernandez, O. (2012). *Desarrollo de nuevos métodos para la caracterización estructural de carbohidratos prebióticos y péptidos funcionales de interés alimentario. Estudio de su bioactividad*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Química-Física Aplicada, Madrid.
- Hernandez, O., Ruiz Aceituno, L., Sanz, M. L., & Martinez Castro, I. Determination of Free Inositols and Other Low Molecular Weight Carbohydrates in vegetables. *Agricultural and Food Chemistry* , 59 (6), 2451-2455.
- Hernandez, O., Ruiz Matute, A. I., Olano, A., Moreno, F. J., & Sanz, M. L. (2009). Comparation of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *International Dairy Journal* , 19 (9), 531-536.
- Horbowicz , M., Obendorf, R., McKersie, B., & Donald, V. (1995). Soluble saccharides and cyclitols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, leaflets, and mature seeds. *Plant Science* , 109 (2), 191-198.
- ICH. (2005). *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology*. Recuperado el 20 de Mayo de 2018, de https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- Indyk, H. E., Saldo, S. C., White, P. M., Dole, M. N., Gill, B. D., & Woollard, D. C. (2016). The free and total myo-inositol contents of early lactation and seasonal bovine milk. *International Dairy Journal* , 56, 33-37.
- Jaramillo Henao, G., & Zapata Marquez, L. (2008). *Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia*. Tesis especialización, Medellín.
- Jawla, S., Kumar, Y., & Khan, M. (2013). Isolation of Antidiabetic Principle from *Bougainvillea spectabilis* Willd (Nyctaginaceae) Stem Bark. *Pharmaceutical Research* , 12 (5), 761-765.
- Johnson, C., Thavarajah, D., Combs, G., & Thavarajah, P. (2013). Lentil (*Lens culinaris* L.): A prebiotic-rich whole food legume. *Food Research International* , 51 (1), 107-113.
- Kawai, S., & Kumazawa, K. (2012). (+)- Pinitol as a major soluble carbohydrate in soybean plant. *Soil Science and Plant Nutrition* , 28 (2), 269-273.
- Kim, J. I., Joo, H. J., Kim, J. C., & Kim, J. J. (2005). Determination of total chiro-inositol content in selected natural materials and evaluation of the antihyperglycemic effect of pinitol isolated from soybean and carob. *Food science and biotechnology* , 14 (4), 441-445.
- Larne, J. (2002). D-chiro-inositol-its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *International Journal of Experimental Diabetes Research* , 3 (1), 47-60.

Lopez Leiva, M. H., & Guzman, M. (1955). Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permates. *Process Biochemistry*, 30 (8), 757-762.

Malinowska, R. J., Kuzmanova, S., & Winkelhausen, E. (2011). Oligosaccharide Profile in Fruits and Vegetables as Source of Prebiotics and Functional Foods. *Food Properties*, 949-965.

Martinez, C., Frias, J., & Vidal, C. (2005). Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91 (4), 645-649.

Michael Saska, M. D. (1994). *Patente n° US5482631A*. USA.

Minitab. (s.f.). *Diseños de superficie de respuesta*. Recuperado el 29 de mayo de 2018, de <http://www.minitab.com/es-mx/support/>

Montilla, A., van de Lagemaat, J., Olano, A., & Castillo, M. (2006). Determination of oligosaccharides by conventional High-Resolution Gas Chromatography. *Chromatographia*, 63 (9-10), 453-458.

Nadagouda, M. N., Speth, T. F., & Varma, R. S. (2011). Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures. *Accounts of Chemical Research*, 44 (7), 469-478.

Nde, D., Boldor, D., & Astete, C. (2015). Optimization of microwave assisted extraction parameters of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil using the Doehlert's experimental design. *Industrial Crops and Products*, 65, 233-240.

Nelson, D., & Cox, M. (2009). *Principios de Bioquímica*. New York, USA: W.H. Freeman and Company.

Nemets, B., Fux, M., Levine, J., & Belmaker, R. H. (2001). Combination of Antidepressant Drugs: The case of Inositol. *Human Psychopharmacology*, 16, 37-43.

Palatnik, A., Fux, M., Frolov, K., & Benjamin, J. (2001). Double-Blind, Controlled, Crossover Trial of Inositol Versus Fluvoxamine for the Treatment of Panic Disorder. *Clinical Psychopharmacology*, 21 (3), 335-339.

Passos, C. P., & Coimbra, M. A. (2013). Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 94 (1), 626-633.

Peñaranda Gonzalez, L. V., Montenegro Gomez, S. P., & Giraldo Abad, P. A. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Investigación Agraria y Ambiental*, 8 (2).

Phongthai, S., Taik Lim, S., & Rawdkuen, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*, 70, 146-154.

Quemener, B., & Brillouet, J. M. (1983). Ciceritol, a pinitol digalactoside form seeds of chickpea, lentil and white lupin. *Phytochemistry*, 22 (8), 1745-1751.

Quevedo, H., & Perez, B. (2014). Análisis de estadísticos como R^2 , s , criterio Cp y PRESS, para evaluar la utilidad del modelo polinomial. En H. Quevedo, & B. Perez, *Estadística para Ingeniería y Ciencias* (págs. 399-342). Iztapalapa, México: Patris.

Raks, V., Al Soud, H., & Buszewski, B. (2018). Isolation, Separation, and Preconcentration of Biologically Active Compounds from Plant Matrices by Extraction Techniques. *Chromatographia*, 81 (2), 189-202.

Rodriguez Sanchez, S. (2015). *Nuevos métodos de obtención y análisis de extractos vegetales enriquecidos en iminoazúcares bioactivos*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Química-Física Aplicada, Madrid.

Ruiz, L., Carrero, C., Ruiz, M., Ramos, L., Sanz, M., & Martinez, I. (2017). Characterization of cyclitol glycosides by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Chromatography A*, 1484, 58-64.

Ruiz Aceituno, L. (2015). *Nuevos métodos de extracción y fraccionamiento de carbohidratos bioactivos*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Química-Física Aplicada, Madrid.

Ruiz Aceituno, L., Garcia Sarrio, M. J., Rodriguez B, A., Ramos, L., & Sanz, M. L. (2016). Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, 196, 1156-1162.

Ruiz Aceituno, L., Ramos, L., Martinez Castro, I., & Sanz, M. (2012). Low molecular weight carbohydrates in pine nuts from *Pinus pinea* L. *Agricultural and Food Chemistry*, 60 (19), 4957-4959.

Ruiz Aceituno, L., Rodriguez Sanchez, S., Ruiz Matute, A., Ramos, L., Soria, A., & Sanz, M. (2013). Optimisation of a biotechnological procedure for selective fractionation of bioactive inositols in edible legume extracts. *Science of Food and Agriculture*, 93 (11), 2797-2803.

Ruiz Matute, A. I., Hernandez Hernandez, O., Rodriguez Sanchez, S., Sanz, M., & Martinez Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 879, 1226-1240.

Salomon Izquierdo, S., Bermello Crespo, A., Marquez Conde, T., Lopez Hernandez, O. D., Gonzalez Sanabria, M. L., & Llopiz Yurell, J. C. (2013). Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14 (2).

Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 95, 588-597.

Sanz, M. L., & Martinez Castro, I. (2007). Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1153 (1-2), 74-89.

Sanz, M. L., Villamiel, M., & Martinez Castro, I. (2004). Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry*, 87 (3), 325-328.

Schweizer, T., Horman, I., & Wursch, P. (1978). Low molecular weight carbohydrates from leguminous seeds; a new disaccharide: Galactopinitol. *Food and Agriculture*, 29 (2), 148-154.

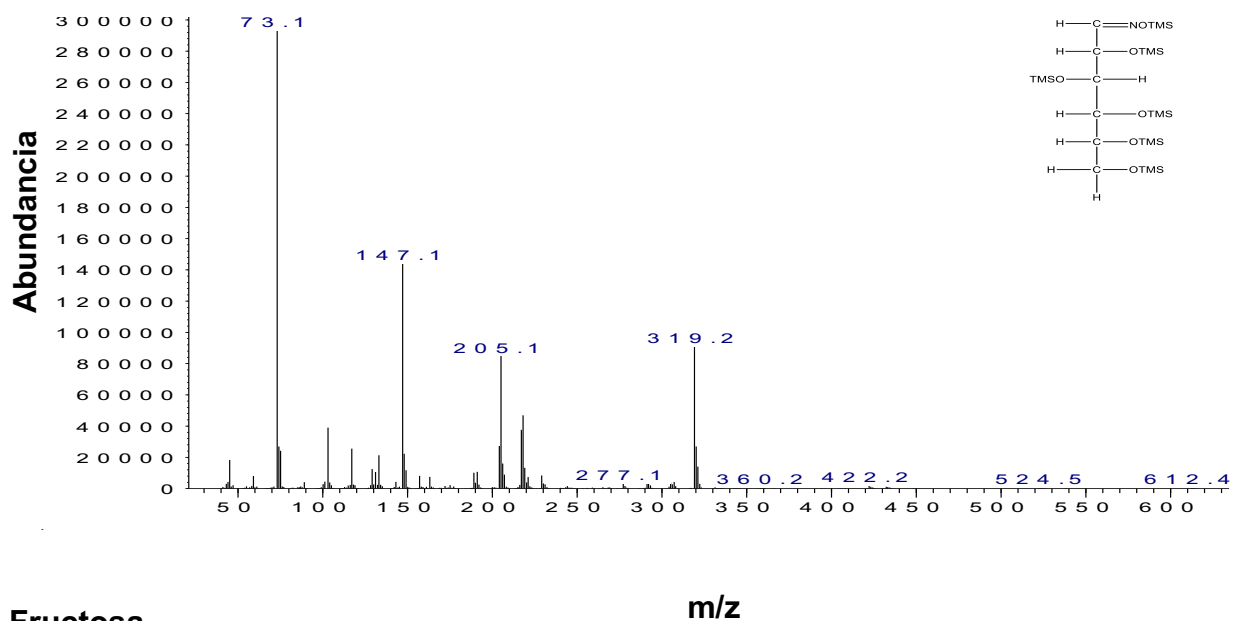
Sherman, W., Eilers, N., & Goodwin, S. (1970). Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry of the Inositol Trimethylsilyl Ethers and Acetate Esters. *Mass Spectrometry*, 3, 829-840.

- Smiderle , F. R., Morales , D., Gil Ramirez, A., de Jesus, L. I., Gilbert Lopez, B., & Lacomini, M. (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain B-d-glucans from mushrooms. *Carbohydrate Polymers* , 156, 165-174.
- Soria, A., Sanz, M., & Villamiel, M. (2009). Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC-MS. *Food Chemistry* , 114 (2), 758-762.
- Tatke, P., & Jaiswal, Y. (2011). An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Application in Herbal Drug Research. *Medicinal Plants* , 5 (1), 21-31.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W., Hew, C. S., & Ong, E. S. (2009). Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Separation Science* , 32 (4), 613-622.
- Thakker , M. R., Parikh, J. K., & Desai, M. A. (2016). Microwave-assisted extraction of essential oil from the leaves of *Pinarosa*: Multi-response optimization and predictive modelling. *Industrial Crops and Products* , 86, 311-319.
- Tsubaki, S., Onda, A., Hiraoka, M., Fujii, S., Azuma, J. I., & Wada, Y. (2017). Microwave-Assited Water Extraction of Carbohydrates From Unutilized Biomass. *Water Extraction of Bioactive Compunds* , 199-219.
- Voet, D., & Voet, J. (2006). *Bioquímica*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Yao, Y., Cheng, X., & Ren , G. (2011). Contents of D-chiro-Inositol, Vitexin, and Isovitexin in Various Varieties of Mung Bean and Its Products. *Agricultural Sciences in China* , 10 (11), 1710-1715.
- Yoon, S., Mukerjea, R., & Robyt, J. (2003). Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydrate Research* , 338 (10), 1127-1132.
- Zhang, H. F., Yang, X. H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science and Technology* , 22 (12), 672-688.
- Zhengyi, L., Min, X., Lili, L., & Yumei, L. (2008). Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochemistry* , 43 (8), 896-899.

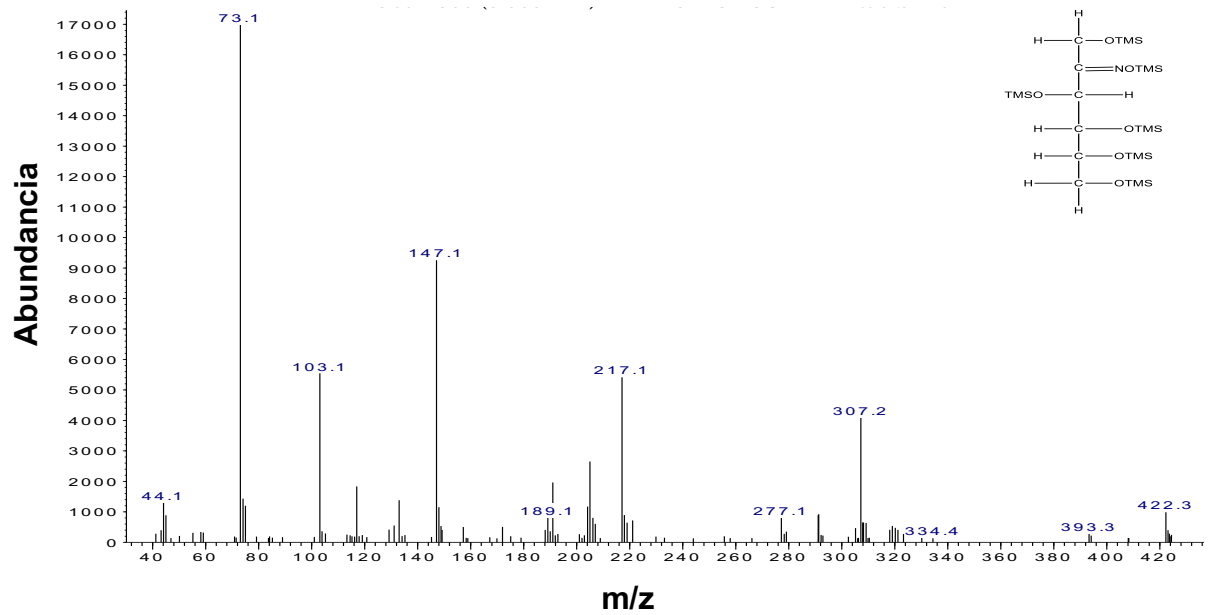
8. ANEXOS

ANEXO 1. Espectros de masas de los analitos

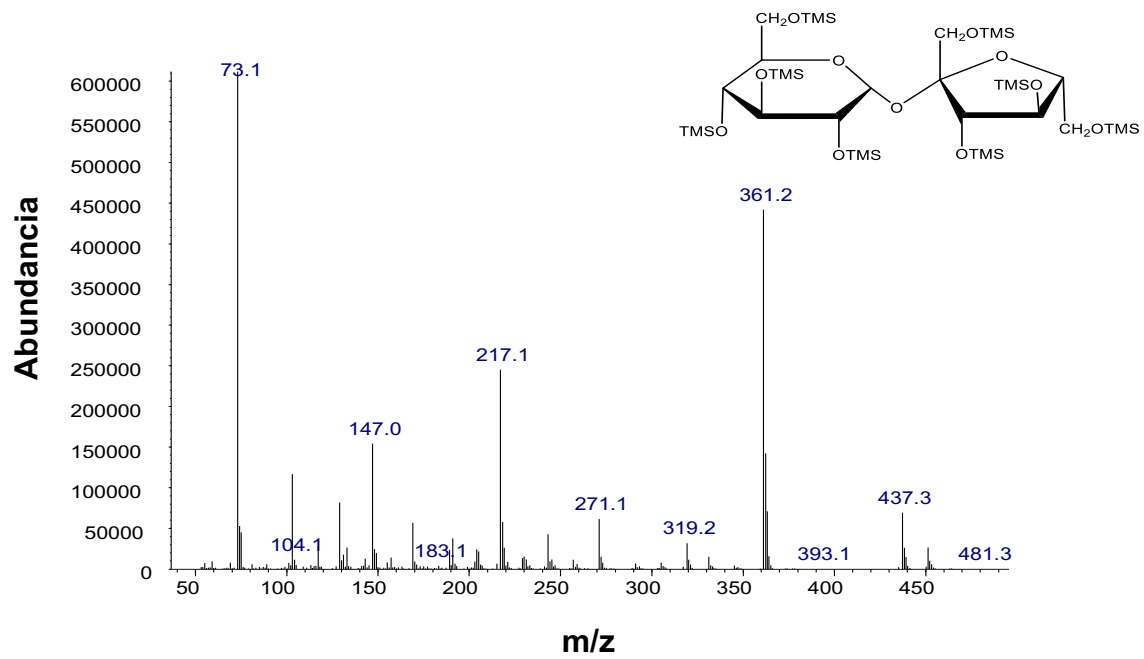
Glucosa



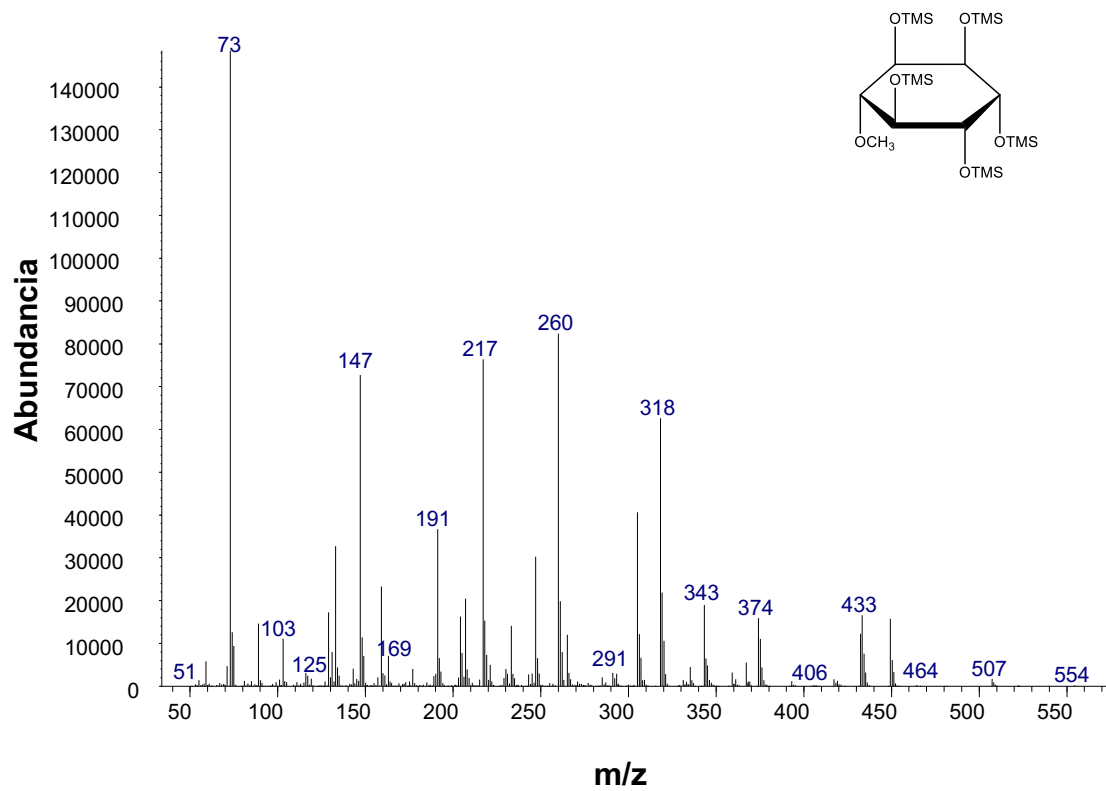
Fructosa



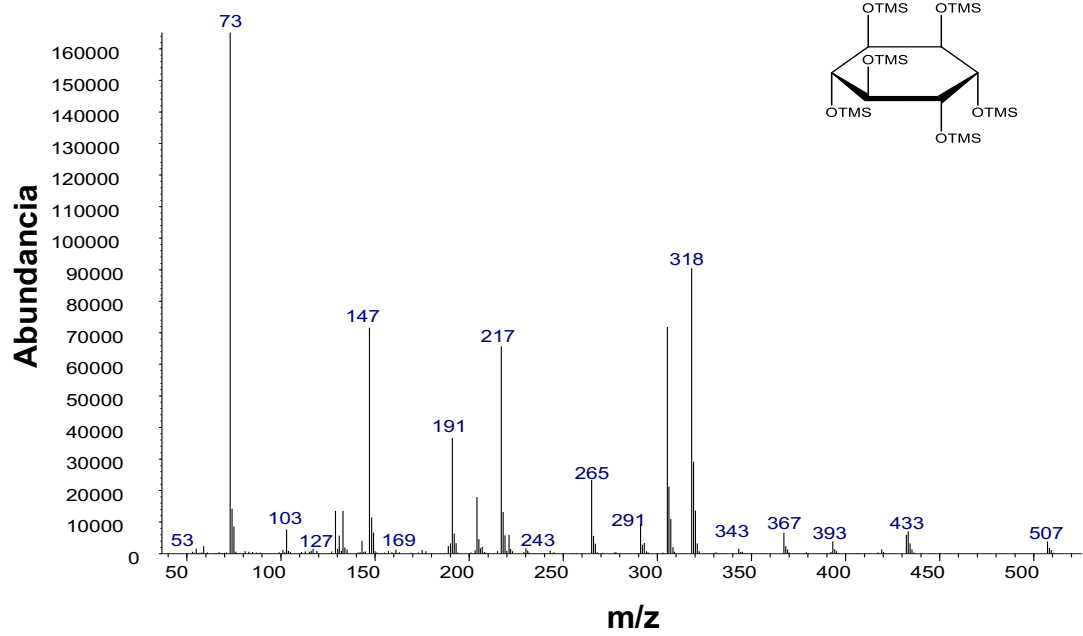
Sacarosa



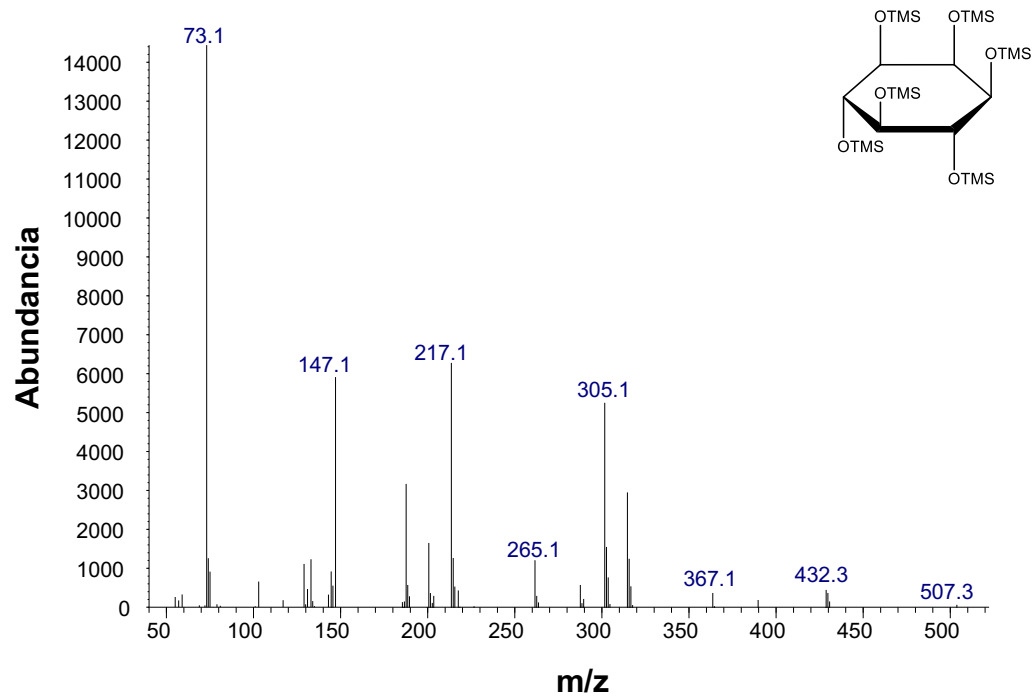
Pinitol



D-chiro-inositol



myo-inositol



ANEXO 2. Datos de replicados de las curvas de calibración en el mismo día y en días diferentes.

	Día 1			Día 2			Día 3		
[Pinitol]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0,39019181	0,496350301	0,517279553	0,446504116	0,562613518	0,450559544	0,454057201	0,428643035	0,448746008	0,4341
0,195095905	0,247386885	0,240854284	0,244120585	0,255442948	0,249714986	0,252578967	0,269553948	0,23662027	0,2531
0,039019181	0,040264586	0,041365541	0,03936517	0,039707658	0,037920867	0,036535218	0,038527537	0,029411451	0,0301
0,029264386	0,026925048	0,027761422	0,028974428	0,030263318	0,037037075	0,027737593	0,028819529	0,022456648	0,0201
0,019509591	0,016408402	0,016786614	0,016597508	0,015979207	0,015262521	0,015620864	0,013286523	0,013137816	0,0131

	Día 1			Día 2			Día 3		
[D-chiro-inositol]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0,397995646	0,611721615	0,653641154	0,555016824	0,611463648	0,558254664	0,566945582	0,538344226	0,552393408	0,5501
0,198997823	0,312172614	0,298805736	0,305489175	0,318861884	0,313569876	0,31621588	0,336198944	0,296133837	0,3161
0,039799565	0,047060139	0,051934197	0,046397584	0,048086242	0,050697395	0,045677787	0,052523256	0,038037169	0,0431
0,029849673	0,032553688	0,033391577	0,034023168	0,033266712	0,04071271	0,032304771	0,031761236	0,025142199	0,0251
0,019899782	0,01893764	0,018952711	0,018945176	0,018906056	0,018795102	0,018850579	0,016196357	0,016155302	0,0161

	Día 1			Día 2			Día 3		
[myo-inositol]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0,425021563	0,739019361	0,774291167	0,665406004	0,737628253	0,668389118	0,688717748	0,66795994	0,632183232	0,6821
0,212510782	0,352817348	0,348819541	0,350818444	0,382505292	0,366659323	0,374582307	0,391721591	0,350590905	0,3711
0,042502156	0,053006228	0,058368748	0,053225918	0,05566437	0,060316633	0,050603678	0,056259834	0,043705417	0,0441
0,031876617	0,036197968	0,037492052	0,035610604	0,037003407	0,045285779	0,03618957	0,035209792	0,027345221	0,0301
0,021251078	0,021057106	0,021963156	0,021510131	0,02106624	0,020726163	0,020896201	0,019023773	0,019046961	0,0191

ANEXO 2. (continuación)

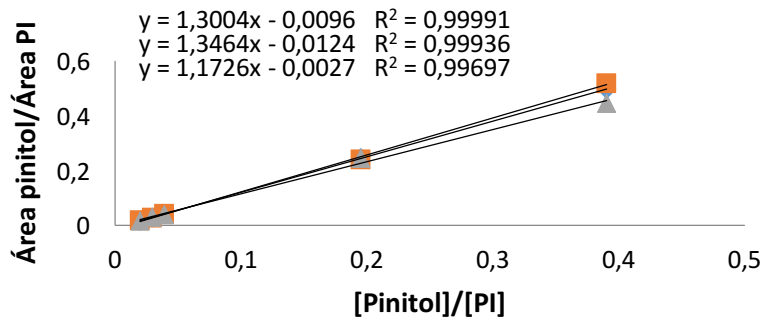
	Día 1			Día 2			Día 3		
[Fructosa]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
2,155090976	3,726335673	3,567679262	3,454910517	3,675676195	3,365563911	3,406993703	3,365563911	3,525667092	3,666028
1,724072781	2,911395194	2,883329463	2,897362329	3,079050361	2,991280352	3,035165357	2,991280352	2,919101312	2,955190
1,293054586	2,067711249	2,07027026	2,068990755	1,930399277	1,724726278	1,827562777	1,724726278	2,090818978	1,907772
0,862036391	1,351611026	1,1363908	1,225476071	1,159298423	1,399312677	1,05215948	1,399312677	1,166220922	1,078703
0,431018195	0,620661469	0,587962049	0,604311759	0,569364425	0,599165194	0,58426481	0,599165194	0,445605227	0,522385
0,215509098	0,237265541	0,249791902	0,243528721	0,232316209	0,251226313	0,241771261	0,251226313	0,229413302	0,240319
0,04310182	0,036309513	0,037679925	0,035902369	0,037663295	0,030645675	0,036374408	0,026199123	0,026198341	0,018781

	Día 1			Día 2			Día 3		
[Glucosa]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
2,0433729	3,587095171	3,594359562	3,38086415	3,713315753	3,391102914	3,235298733	3,391102914	3,345995152	3,368549
1,63469832	2,822181667	2,835270537	2,828726102	3,030999601	2,973408028	3,002203815	2,973408028	2,924264983	2,948836
1,22602374	2,017497707	2,027720239	2,022608973	1,900858274	1,675653693	1,788255983	1,675653693	2,056904007	1,86627
0,81734916	1,322510396	1,093587236	1,175224923	1,128584454	1,310211593	1,028954546	1,310211593	1,119150727	1,022674
0,40867458	0,588148654	0,564643205	0,576395929	0,54431339	0,561554932	0,552934161	0,561554932	0,421552336	0,491553
0,20433729	0,222336197	0,230575607	0,226455902	0,216546061	0,233458508	0,225002284	0,233458508	0,211796403	0,222627
0,040867458	0,031188051	0,032499252	0,031116578	0,032301692	0,029187158	0,034164962	0,029187158	0,040509704	0,023732

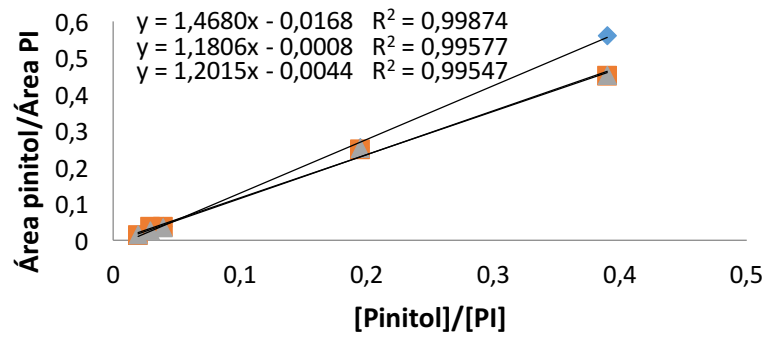
	Día 1			Día 2			Día 3		
[Sacarosa]	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
2,078284799	6,155317507	5,835078919	5,682057602	6,34714765	6,207271287	5,543948676	6,207271287	6,214980412	6,156847
1,662627839	4,134351478	4,607603002	4,37097724	5,509495174	4,702173082	5,105834128	4,702173082	4,905176897	4,803674
1,246970879	2,848794687	3,019396386	2,934095537	2,936995424	2,727214791	2,832105107	2,727214791	3,327884766	3,027549
0,41565696	0,736990809	0,744396444	0,740693626	0,698441709	0,737537371	0,71798954	0,737537371	0,624641392	0,681089
0,20782848	0,275359689	0,275002198	0,275180943	0,232121319	0,282606987	0,257364153	0,282606987	0,259189494	0,270898
0,041565696	0,024686053	0,031861484	0,029328379	0,037997993	0,035456635	0,037517072	0,035456635	0,03672268	0,025772

ANEXO 3. Curvas de calibrado de las réplicas durante 3 días

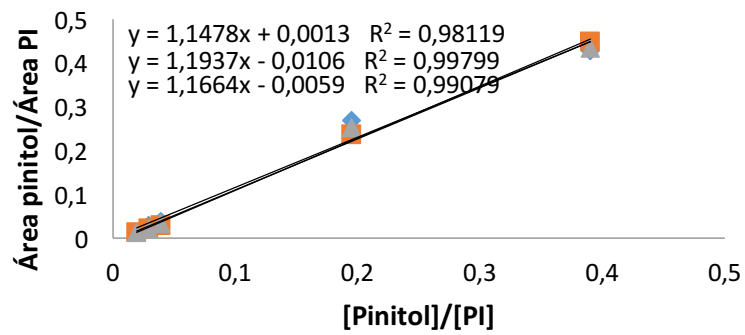
Curva calibrado réplicas día 1



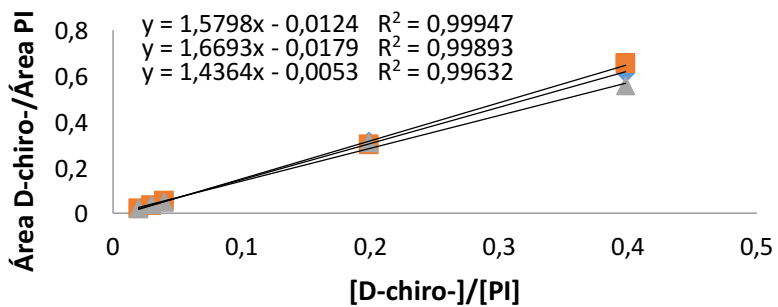
Curva calibrado réplicas día 2



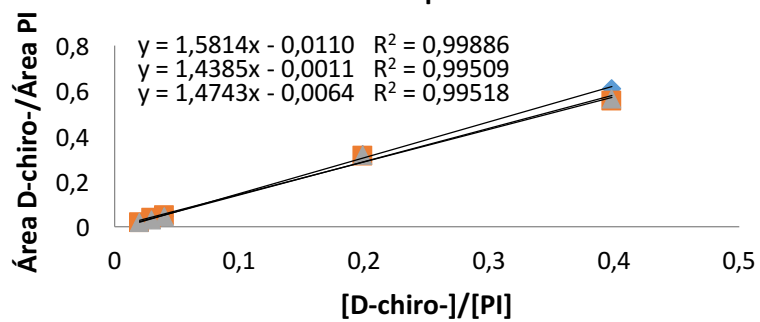
Curva calibrado réplicas día 3



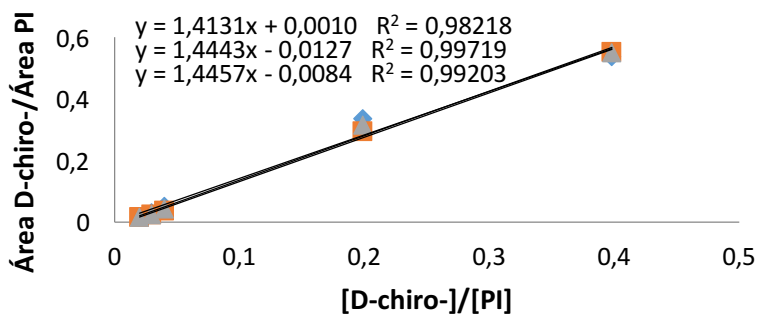
Curva calibrado réplicas día 1



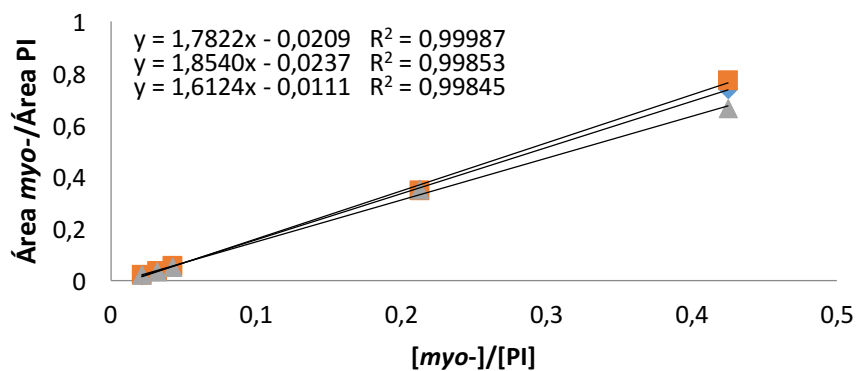
Curva calibrado réplicas día 2



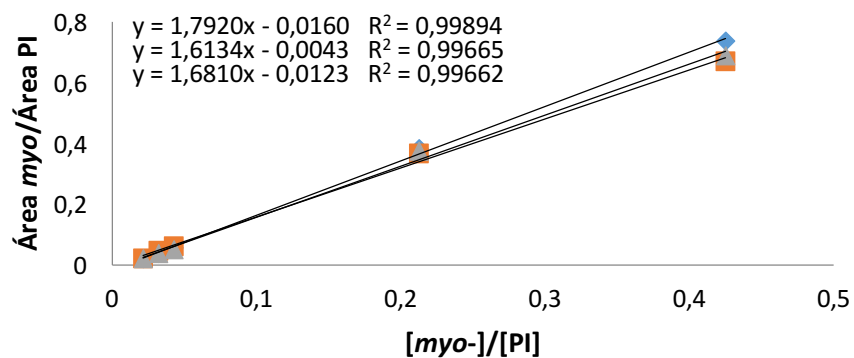
Curva calibrado réplicas día 3



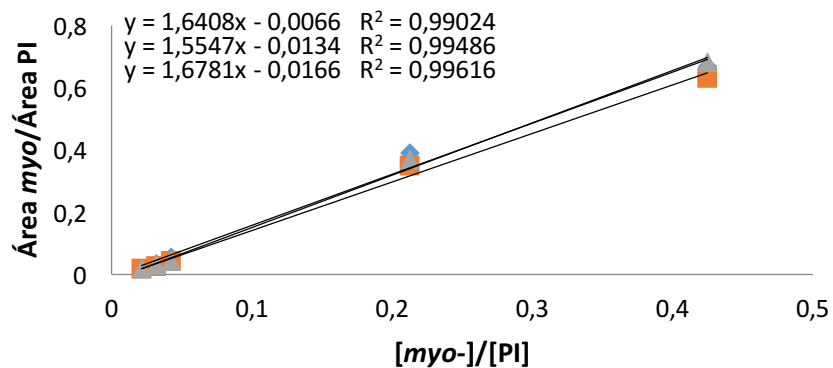
Curva calibrado réplicas día 1



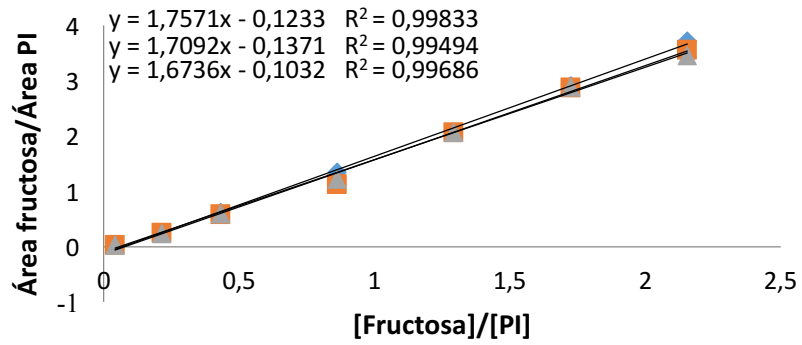
Curva calibrado réplicas día 2



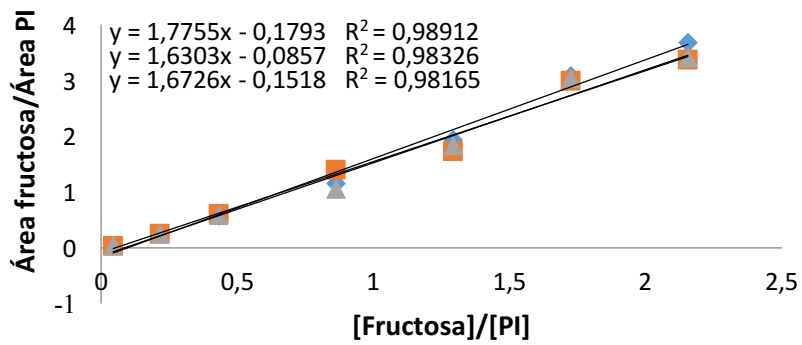
Curva calibrado réplicas día 3



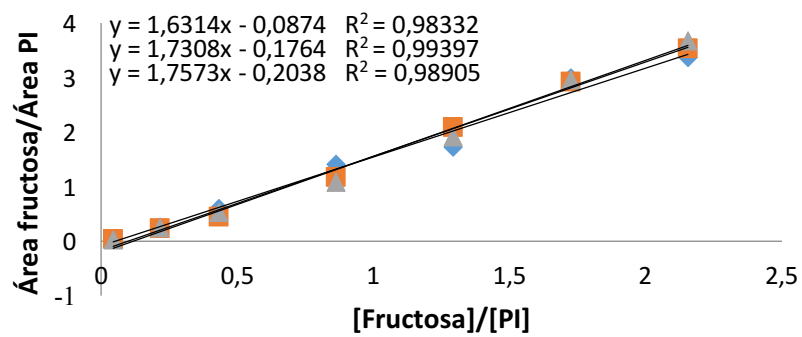
Curva calibrado réplicas día 1



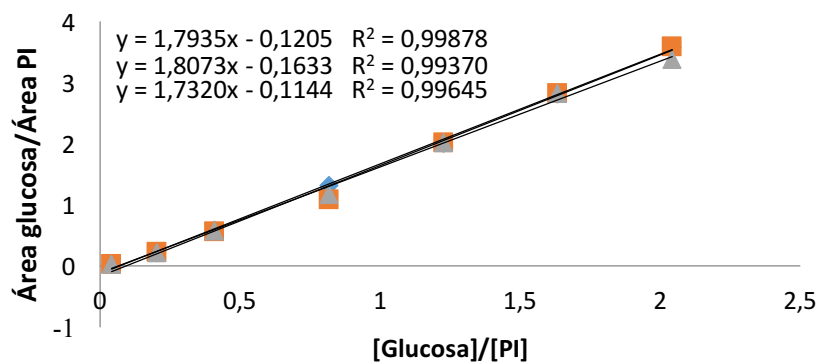
Curva calibrado réplicas día 2



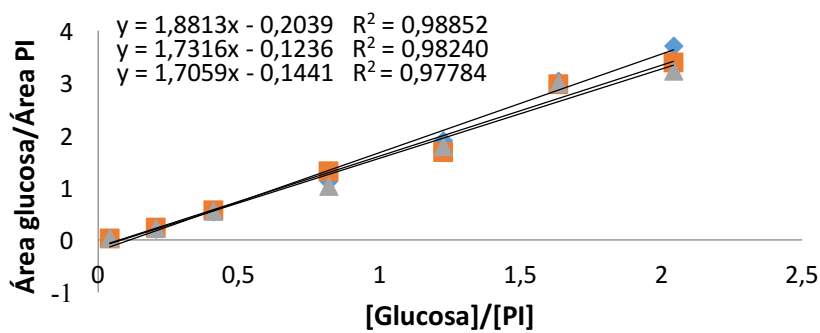
Curva calibrado réplicas día 3



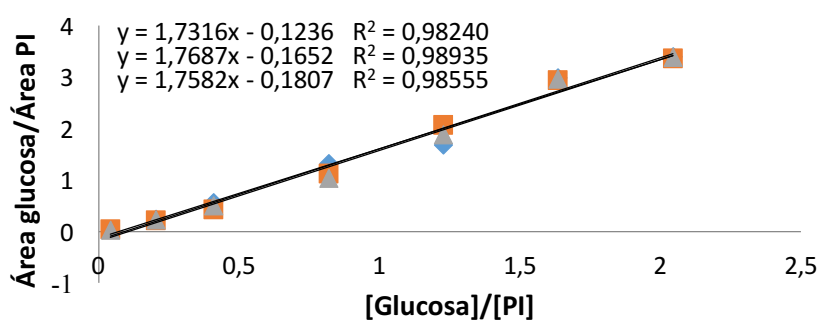
Curva calibrado réplicas día 1



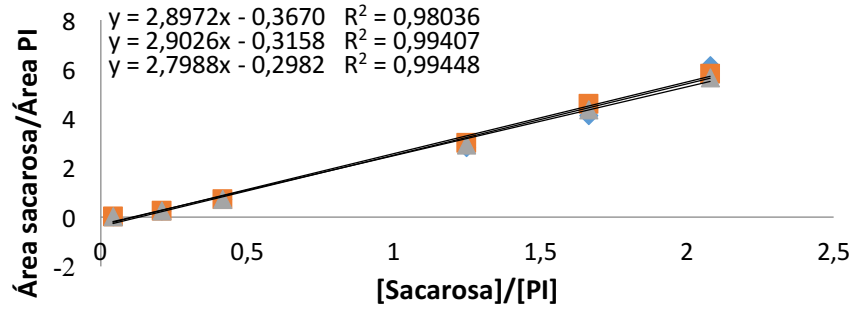
Curva calibrado réplicas día 2



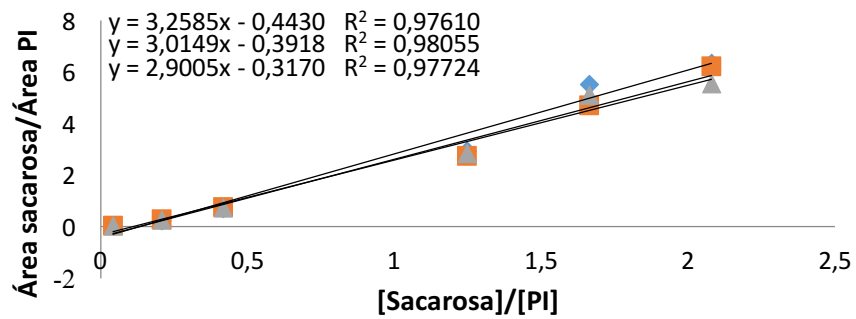
Curva calibrado réplicas día 3



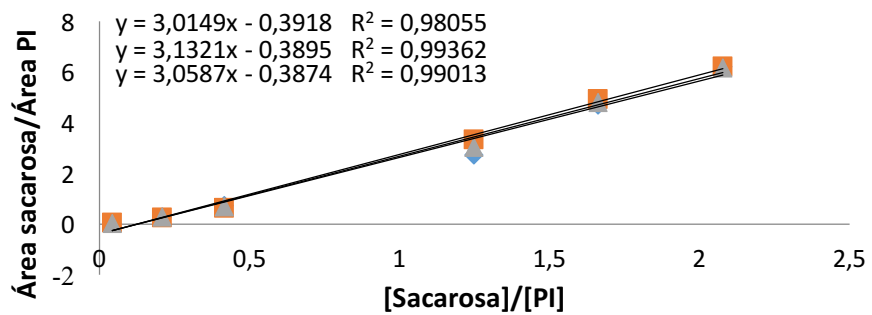
Curva calibrado réplicas día 1



Curva calibrado réplicas día 2



Curva calibrado réplicas día 3



ANEXO 4. Datos para curvas de calibración utilizadas para la cuantificación

[Pinitol]	Promedio	Desviación
0,39019181	0,471072549	0,044826
0,195095905	0,249928887	0,0095672
0,039019181	0,037424085	0,0037545
0,029264386	0,027869883	0,0046279
0,019509591	0,015143514	0,001523

[D-chiro]	Promedio	Desviación
0,397995646	0,577546258	0,0387649
0,198997823	0,312623815	0,0119112
0,039799565	0,047051575	0,0045788
0,029849673	0,032030801	0,0047215
0,019899782	0,017990528	0,001362

[myo-]	Promedio	Desviación
0,425021563	0,695131281	0,0454098
0,212510782	0,365519	0,0156903
0,042502156	0,052830915	0,0057795
0,031876617	0,035612883	0,0049714
0,021251078	0,020480567	0,001142

[Fructosa]	Promedio	Desviación
2,155090976	3,528268779	0,131035208
1,724072781	2,962572839	0,062875778
1,293054586	1,934775387	0,140980011
0,862036391	1,218720639	0,12620321
0,431018195	0,570320593	0,051328923
0,215509098	0,241873263	0,007532501
0,04310182	0,031750474	0,006329641

[Glucosa]	Promedio	Desviación
2,0433729	3,445298154	0,142998209
1,63469832	2,926588807	0,07477423
1,22602374	1,892381269	0,142803167
0,81734916	1,167901144	0,112696243
0,40867458	0,540294575	0,049149987
0,20433729	0,224695214	0,006944163
0,040867458	0,031543018	0,004231845

[Sacarosa]	Promedio	Desviación
2,078284799	6,038880089	0,263320608
1,662627839	4,760162119	0,376683685
1,246970879	2,931250141	0,17457663
0,41565696	0,713257516	0,037407919
0,20782848	0,267814446	0,015156978
0,041565696	0,032755496	0,004794781

ENTREGA DE LOS INFORMES FINALES DE LOS TRABAJOS DE GRADO Y
AUTORIZACIÓN DE SU USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Yo, Ana María Zuluaga Hurtado, mayor de edad, vecino de Popayán,
identificado con la cédula de ciudadanía No. 1062321316 de Siber de Quilichao
actuando en nombre propio, en mi calidad de autor del trabajo de grado, del trabajo de
investigación, o de la tesis denominada(o):

Extracción y análisis de carbohidratos bioactivos a
partir de residuos agroalimentarios

hago entrega del ejemplar respectivo y de sus anexos de ser el caso, en formato digital
o electrónico (CD o DVD) y autoriza a la UNIVERSIDAD DEL CAUCA, para que en los
términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, decisión Andina 351 de
1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, utilice y use
en todas sus formas, los derechos patrimoniales de reproducción, comunicación
pública, transformación y distribución (alquiler, préstamo público e importación) que me
corresponden como creador de la obra objeto del presente documento. PARÁGRAFO:
La presente autorización se hace extensiva no sólo a las facultades y derechos de uso
sobre la obra en formato o soporte material, sino también para formato virtual,
electrónico, digital óptico, uso en red, Internet, extranet, intranet, etc., y en general para
cualquier formato conocido o por conocer.

EL AUTOR – ESTUDIANTE, manifiesta que la obra objeto de la presente autorización
es original y la realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, por lo tanto la
obra es de su exclusiva autoría y detenta la titularidad sobre la misma. PARAGRAFO:
En caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en
cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL AUTOR / ESTUDIANTE,
asumirá toda la responsabilidad, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados;
para todos los efectos la Universidad actúa como tercero de buena fe.

Para constancia se firma el presente documento en dos (02) ejemplares del mismo valor
y tenor, en Popayán, a los días del mes de de dos mil dieciocho 2018.

EL AUTOR / ESTUDIANTE:

(Firma) Ana María Zuluaga H.

Nombre Ana María Zuluaga Hurtado



Gestión Administrativa
Gestión de Admisiones, Registro y Control Académico
Acta para Sustentación Pública de Trabajo de Grado

Código: PA-GA-4.2-FOR-13

Versión: 1

Fecha de Actualización: 10-05-2016

Trabajo de Investigación	<input checked="" type="checkbox"/>	Pasantía	<input type="checkbox"/>	Seminario	<input type="checkbox"/>
Práctica Social	<input type="checkbox"/>	Monografía	<input type="checkbox"/>	Preparatorios	<input type="checkbox"/>

Fecha: 13 de septiembre de 2018

Facultad: Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación

Lugar: Sala virtual Atenea

Hora: 11:00 a.m

Programa:	Química	
1. Alumno: Ana María Zuluaga	C.C: 1062321316	Código: 102112011090
2. Alumno:	C.C:	Código:
3. Alumno:	C.C:	Código:
4. Alumno:	C.C:	Código:
5. Alumno:	C.C:	Código:
6. Alumno:	C.C:	Código:
7. Alumno:	C.C:	Código:
8. Alumno:	C.C:	Código:

Nombre del Director: Dra. Diana María Chito

Nombre del Trabajo: Extracción y análisis de carbohidratos bioactivos a partir de residuos agroalimentarios

INFORME SOBRE LA SUSTENTACIÓN

Cumplimiento de Objetivos:

Si, se cumplen satisfactoriamente

Desarrollo Metodológico:

Fue el adecuado para el desarrollo experimental y cumplimiento de los objetivos. Estos fueron científicamente correctos

Logros del Trabajo o Aportes:

Se logra la optimización el proceso de extracción de inositolos mediante microondas



Universidad
del Cauca

Gestión Administrativa
Gestión de Admisiones, Registro y Control Académico
Acta para Sustentación Pública de Trabajo de Grado

Código: PA-GA-4.2-FOR-13

Versión: 1

Fecha de Actualización: 10-05-2016

Se considera el Trabajo de Grado de alto valor académico para que se le confiera:

MENCION HONORIFICA SI NO

CALIFICACIÓN DE LAUREADO SI NO

Otorgadas respectivamente por los Consejos de Facultad y Académico.

Sustentar brevemente: (Si es del caso ampliar el concepto por escrito, con Vº Bº del Depto. Anexo que debe hacer llegar al Consejo de Facultad):

CALIFICACIÓN FINAL		OSERVACIONES ADICIONALES
APROBADO	<input checked="" type="checkbox"/>	
APLAZADO	<input type="checkbox"/>	
NO APROBADO	<input type="checkbox"/>	

JURADOS

NOMBRE: Dr. Germán Cuervo Ochoa	NOMBRE: Dr. Luis Alberto Lenis V
FIRMA:	FIRMA:
C.C. N°: 4.280.394	C.C. N°: 16.687.208

NOMBRE: Dra. Tania Milena Gutiérrez V Coordinadora Programa de Química	NOMBRE:
FIRMA:	FIRMA:
C.C. N°: 48.600.287	C.C. N°: