



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación de las condiciones óptimas de fermentación con adición de levaduras
comerciales para la obtención de etanol del efluente de la extractora agrícola Río
Manso S. A.**

Autor: Stefany Nicole Recalde Villalba

Directora: Rafael Eduardo Vargas, M. SC.

Sangolquí, 25 de agosto de 2023



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**



INTRODUCCIÓN

La Palma Africana (*Elaeis guineensis*)



280.000 ha de
Palma Africana



400.00 Tn de
aceite de palma

ECUADOR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

INTRODUCCIÓN

Oleaceae

Chionanthus L.
"flores de nieve"

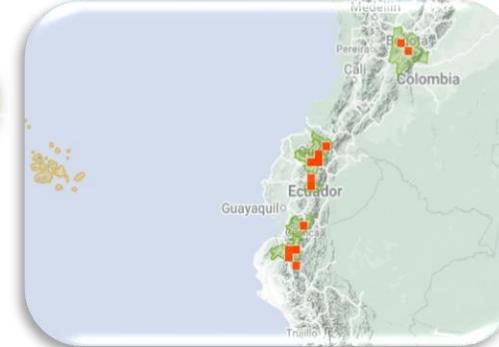
- ~ 140 especies
- Zonas tropicales-subtropicales
- Asia, Australia, América, África

- 1800 – 3050 msnm
- Hojas simples opuestas
- 6 – 8 m
- Tronco con lenticelas
- Monoica - Hermafrodita
- Floración anual (8 – 10 años)
- Flores en panículas (6-9)
- Fruto suave y amargo

Arupo Rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth)



- ❖ Tradicionalmente ornamental
- ❖ "Flora de Colombia" (2017)
- ❖ Uso de madera
- ❖ Sin estudios previos



(iNaturalist, 2023)

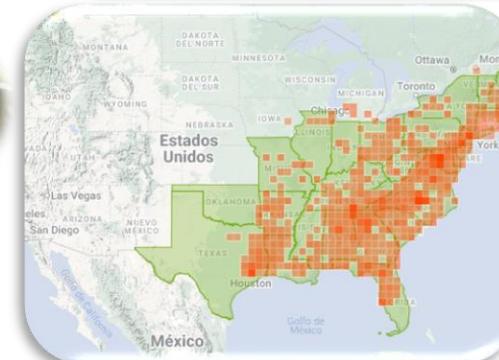


(Benioff, 2021)

Arupo Blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo)



- ❖ PSM antioxidantes
- ❖ Especie introducida
- ❖ Uso ornamental y medicina popular
- ❖ Especie introducida en Ecuador



(iNaturalist, 2023)



(Thaqu, 2017)



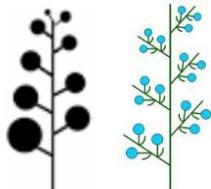
drupas



tropicales – perennes
Templadas - caducas



árboles - arbustos
3 – 25 m



Racimos (rosa, blanco amarillo, teñido)

- Ligados a su taxonomía
- Medicamentos, conservantes, pigmentos, resinas, pesticidas, etc.

Metabolitos secundarios en género *Chionanthus*

Chionanthus virginicus L.



(Thaqui, 2017)



- Colagogo
- Diurético
- Tónico
- Plaguicida

Secoiridoides:

- oleuropeína
- ligustrosido
- angustifoliósido B

Lignanos

- phillyrin
- pinosresinol-4',4''-di-O-β-D-glucósido
- pinosresinol-4''-O-β-D-glucósido
- phillyrin-2-O-β-D-glucósido
- phillyrin-6-O-β-D-glucósido

Chionanthus retusus



(Walton, 2022)



- Antipirético
- T. parálisis
- Antidiarréico
- Neuroprotector



10,7% flavonoides

- Quercentina
- Kaempferol
- Astragalina
- Nicotiflorina
- Luteolina
- Taxifolina

Chionanthus zeylanicus L.



(Garg, 2018)

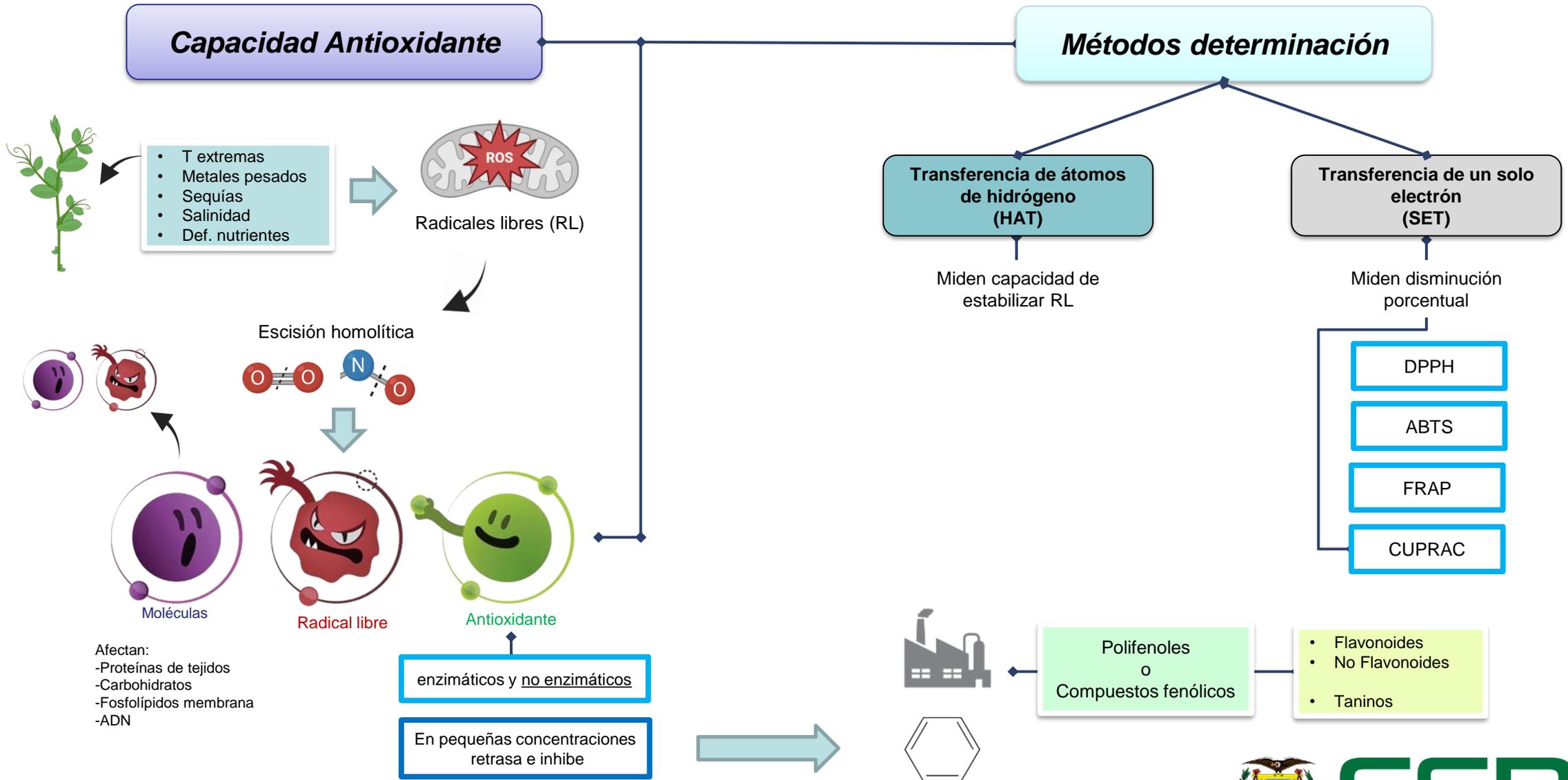


- Potencial agente terapéutico: envejecimiento y enf. degenerativas

- fenoles
- flavonoides
- esteroides
- terpenoides
- taninos
- lignina
- glucósidos



INTRODUCCIÓN



Objetivo General



Evaluar el contenido de metabolitos secundarios y carácter antioxidante en hojas, flores y frutos entre las especies de arupo rosado (*Chionanthus pubescens* K.) y blanco (*Chionanthus virginicus* L.) mediante métodos espectrofotométricos.



Objetivos Específicos



Recolectar muestras de hojas, flores y fruto de Arupo rosado (*Ch. pubescens* K.) y blanco (*Ch. virginicus* L.).



Obtener los extractos etanólicos a partir de las muestras recolectadas.



Cuantificar el contenido de metabolitos secundarios en las muestras de las dos especies mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, método colorimétrico del $AlCl_3$. y método del diferencial de pH.



Determinar el carácter antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos mediante el método DPPH, ABTS y FRAP.



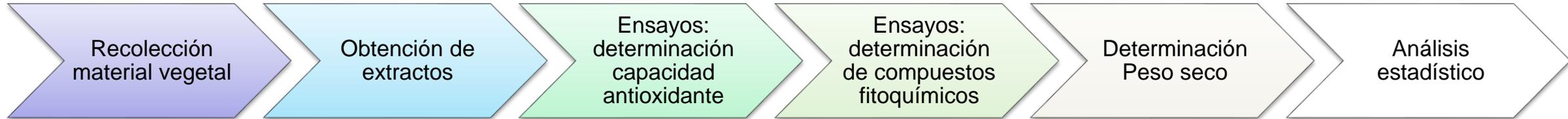
Comparar el carácter antioxidante y los metabolitos secundarios entre las dos especies del género *Chionanthus*.



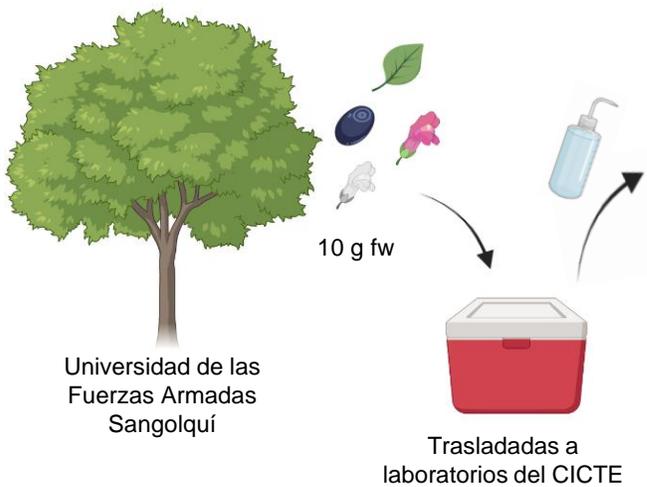
La concentración de metabolitos secundarios y el carácter antioxidante presente en hojas, flores y fruto de arupo rosado (*Ch. pubescens* K.) tiene una significancia estadísticamente mayor que en el arupo blanco (*Ch. virginicus* L.).



MATERIALES Y MÉTODOS



1 Recolección material vegetal



2 Obtención de extractos

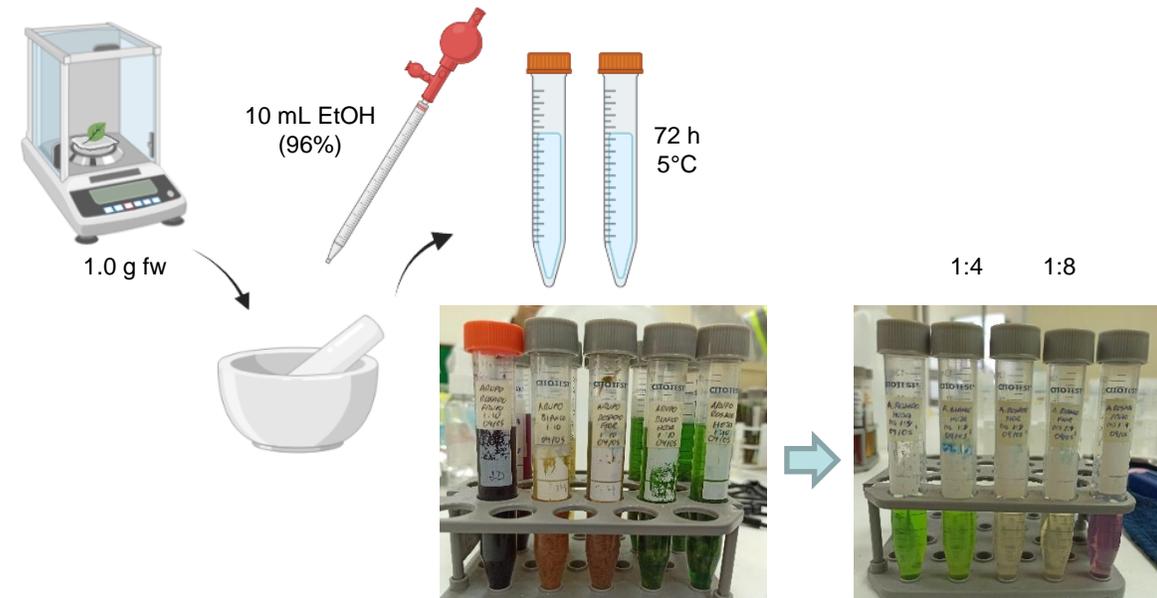
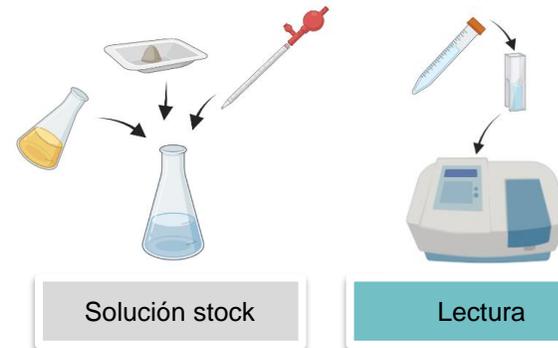


Tabla 1. Nomenclatura de las muestras evaluadas de las dos especies del género *Chionanthus*

Espece	Muestra	Código
Arupo Rosado/ <i>Chionanthus pubescens</i> K. (AR)	Hoja en estado maduro	AHR
	Flores rosadas	AHF
	Fruto en estado maduro	AHFr
Arupo Blanco/ <i>Chionanthus virginicus</i> L. (AB)	Hoja en estado maduro	ABH
	Flores blancas	ABF
	Fruto en estado maduro	ABFr

3 Determinación de capacidad antioxidante



- Blanco: EtOH
- Rep: 5

Curvas calibración:

Trolox

Trolox

FeSO₄·7H₂O



DPPH

DPPH (0.15 mM)
+ muestra

517 nm

ABTS

K₂S₂O₈ (2.45 mM)
+ sol. ABTS (7 mM)
1:1 + muestra

734 nm

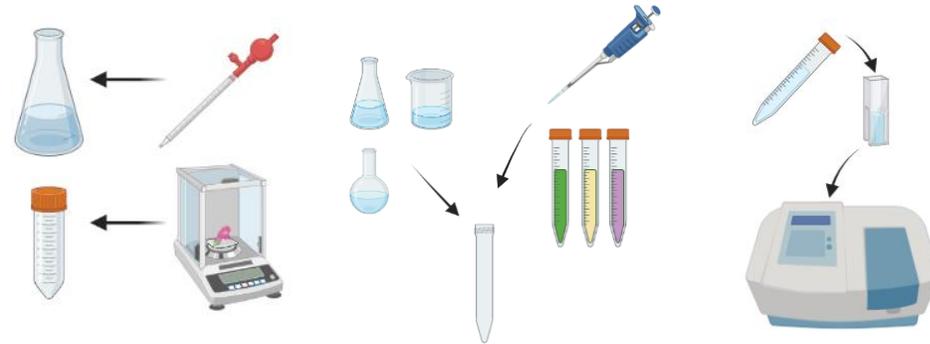
FRAP

tampón acetato (300 mM) +
TPTZ (40 mM) +
FeCl₃ (20 mM)
10:1:1 + muestra

593 nm



3 Determinación de compuestos fitoquímicos



- Blanco: EtOH
- Rep: 5

Curvas calibración:

Ac. gálico

Quercetina

Contenido de fenoles totales (TPC)

Folin-Ciocalteu (1 N)

F-C + Muestra + Na_2CO_3 (20%) + agua

765 nm

Contenido de flavonoides totales (TFC)

Muestra + EtOH + CH_3COONa (1 M)

+ AlCl_3 (10%) + agua

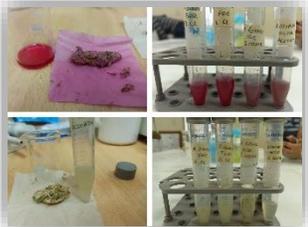
435 nm

Contenido antocianinas totales (TAC)

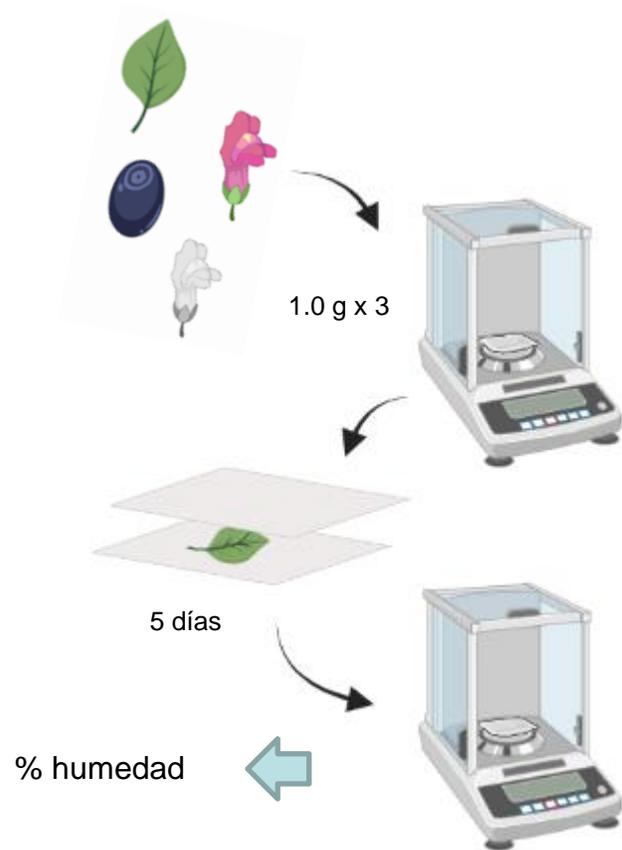
5 g flores y frutos +

-buffer KCl (0.025 M; pH 1.0)
-buffer CH_3COONa (0.4 M; pH 4.5)

520 y 700 nm



4 Determinación del peso seco



5 Análisis estadístico

Tratamientos

Diseño factorial mixto
 2×3 y 3^2

Análisis de varianza

Prueba de comparación
múltiple

Correlación Pearson

Software estadístico



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de extractos

Figura 1. Extractos etanólicos de muestras recolectadas



Figura 2. Diluciones de extractos



Ahmadi et al. (2019),
extraer pigmentos y
metabolitos

Borges et al. (2020),
MeOH – 7.2 %
EtOH – 4.1%

(Mfotie, 2021)

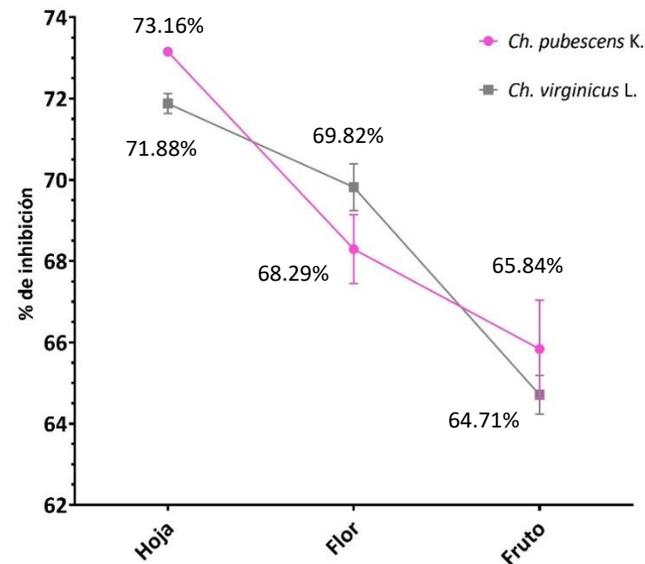
Determinación de capacidad antioxidante

Método DPPH

Figura 3. Reducción de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo



Figura 4. Porcentaje de inhibición



$$y = -0.9979x + 0.7211 \quad (R^2 = 0.993)$$

Figura 5. Comparación Kruskal Wallis

Trat. Medianas Ranks

ARH	0,20	3,00	A	
ABH	0,21	8,00	A	B
ABF	0,22	13,30	A	B C
ARF	0,24	17,70		B C D
ARFr	0,25	24,20		C D
ABFr	0,26	26,80		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 6. Resumen

Muestra	Variable	n	Media	D.E.
ABF	µmol trolox/g	5	18,09	0,15
ABFr	µmol trolox/g	5	16,80	0,12
ABH	µmol trolox/g	5	18,61	0,06
ARF	µmol trolox/g	5	17,71	0,21
ARFr	µmol trolox/g	5	17,08	0,31
ARH	µmol trolox/g	5	18,94	0,02

Gülçin et al. (2006),
86.6 % extracto MeOH
39.2 % extracto C₄H₈O₂

Gülçin et al. (2008),
85.2 % PDG
51.0 % Phillyrin
83.7% Ligustrosido
32.8% Oleuropeína



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de capacidad antioxidante

Método ABTS

$$y = -0.2489x + 0.7533 \quad (R^2 = 0.969)$$

Figura 7. Reducción de ABTS^{•+}



Figura 8. Porcentaje de inhibición

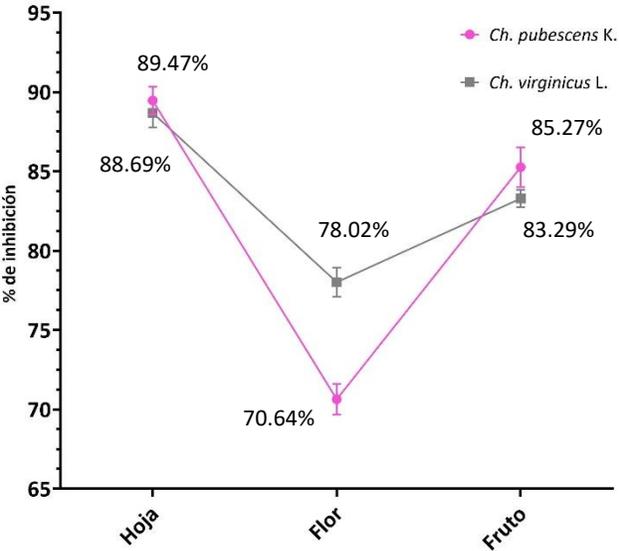


Figura 9. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medianas	Ranks
ARH	0,08	4,60 A
ABH	0,08	6,40 A
ARFr	0,11	13,20 A B
ABFr	0,13	17,80 B C
ABF	0,16	23,00 B C
ARF	0,22	28,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 10. Resumen

Muestra	Variable	n	Media	D.E.
ABF	µmol trolox/g	5	92,59	1,15
ABFr	µmol trolox/g	5	99,18	0,68
ABH	µmol trolox/g	5	105,93	1,13
ARF	µmol trolox/g	5	83,37	1,21
ARFr	µmol trolox/g	5	101,65	1,56
ARH	µmol trolox/g	5	106,90	1,11

Gülçin et al. (2006),
57.8 % extracto MeOH
99.9 % extracto C₄H₈O₂

Gülçin et al. (2008),
99.8 % PDG
35.7 % Phyllirin
97.2% Ligustosido
51.8% Oleuropeína

Método FRAP

$$y = 0.7056x + 0.028 \quad (R^2 = 0.999)$$

Figura 11. Reducción de Fe³⁺-TPTZ

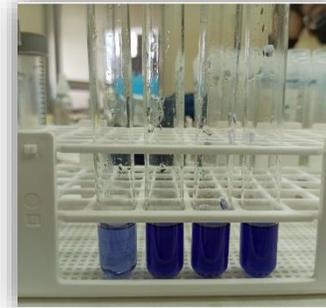


Figura 12. Potencial reductor

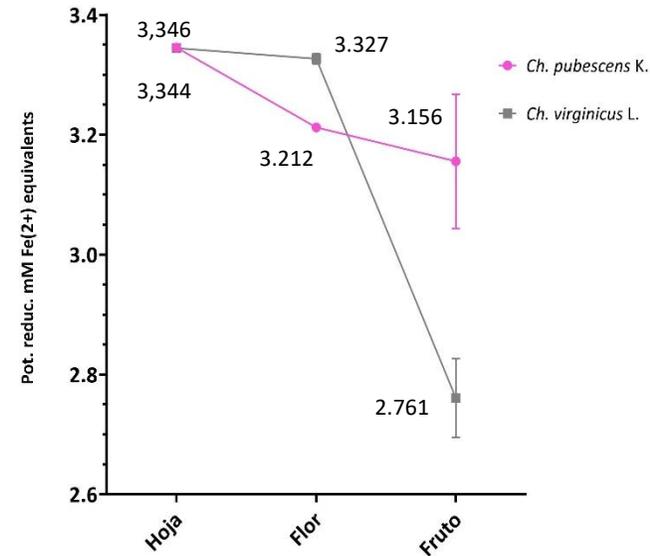


Figura 13. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medianas	Ranks
ABFr	1,94	3,00 A
ARFr	2,21	9,60 A B
ARF	2,24	11,40 A B
ABF	2,32	18,00 B C
ABH	2,33	25,10 C
ARH	2,33	25,90 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 14. Resumen

Muestra	Variable	n	Media	D.E.
ABF	mg Fe ₂ SO ₄ /100g fw	5	924,87	2,49
ABFr	mg Fe ₂ SO ₄ /100g fw	5	767,51	18,32
ABH	mg Fe ₂ SO ₄ /100g fw	5	929,79	0,68
ARF	mg Fe ₂ SO ₄ /100g fw	5	893,07	0,51
ARFr	mg Fe ₂ SO ₄ /100g fw	5	877,33	31,16
ARH	mg Fe ₂ SO ₄ /100g fw	5	930,10	0,78

Gülçin et al. (2006),
Fe²⁺-ferrozina, Fe³⁺/ferrocianuro
94.5% MeOH
88.6% C₄H₈O₂
> BHT, BHA, α-tocoferol y Trolox

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de compuestos fitoquímicos

Determinación TPC

Figura 15. Reducción de FCR

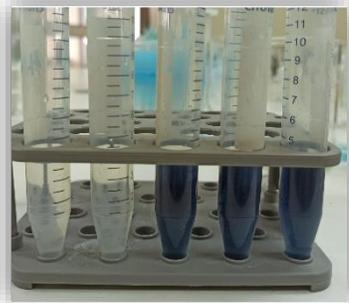
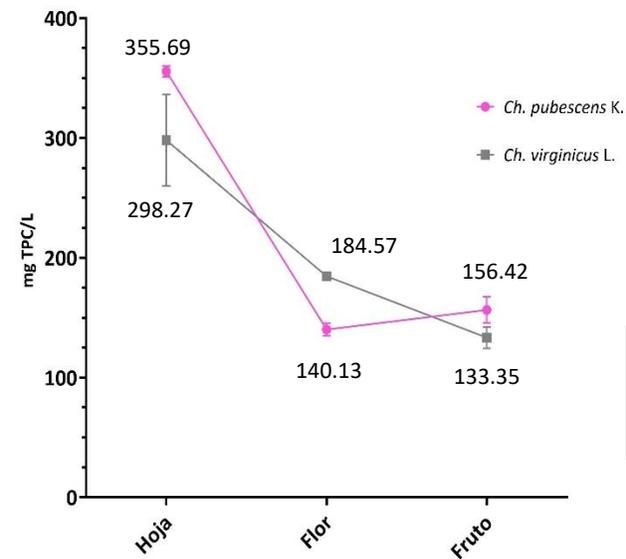


Figura 16. Contenido de fenoles totales



$$y = 0.0112x - 0.1759 \quad (R^2 = 0.979)$$

Figura 17. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medianas	Ranks	
ABFr	1,64	4,60	A
ARF	1,72	7,00	A
ARFr	2,01	12,40	A B
ABF	2,26	18,00	B C
ABH	3,35	24,00	C
ARH	4,13	27,00	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 18. Resumen

Muestra	Variable	n	Media	D.E.
ABF	mg GAE/100g	5	1476,55	16,08
ABFr	mg GAE/100g	5	1066,83	71,03
ABH	mg GAE/100g	5	2386,17	305,30
ARF	mg GAE/100g	5	1121,07	41,95
ARFr	mg GAE/100g	5	1251,36	87,65
ARH	mg GAE/100g	5	2845,55	35,28

Lee et al. (2019), *Chionanthus retusus*
Flores
125,4±3,3 mg GAE/g dw

DW: 75,86 mg GAE/g

Determinación TFC

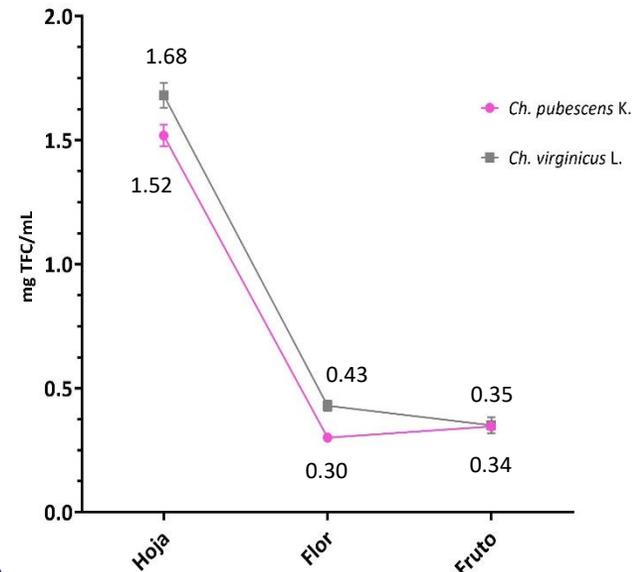
Figura 19. Formación quelatos



Afinidad
oxo, hidroxilo

Shraim et al. (2021), copigmentación
flavonoides - metales

Figura 20. Contenido de flavonoides totales



$$y = 1.4566x - 0.0265 \quad (R^2 = 0.994)$$

Figura 21. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medianas	Ranks	
ARF	0,47	3,00	A
ARFr	0,53	10,00	A B
ABFr	0,55	11,00	A B
ABF	0,66	18,00	B C
ARH	2,25	23,00	C
ABH	2,51	28,00	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 22. Resumen

Muestra	Variable	n	Media	D.E.
ABF	mg QE/g fw	5	17,19	0,86
ABFr	mg QE/g fw	5	14,02	1,29
ABH	mg QE/g fw	5	67,24	2,01
ARF	mg QE/g fw	5	12,05	0,26
ARFr	mg QE/g fw	5	13,83	0,39
ARH	mg QE/g fw	5	60,76	1,74

Lee et al. (2019), *Chionanthus retusus*
Flores
119,1±2,7 mg CA/g dw

DW: 88.29 mg QE/g

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de compuestos fitoquímicos

Determinación TAC

Figura 23. Manipulación de pH con sistemas buffer



Figura 24. Contenido de antocianinas totales

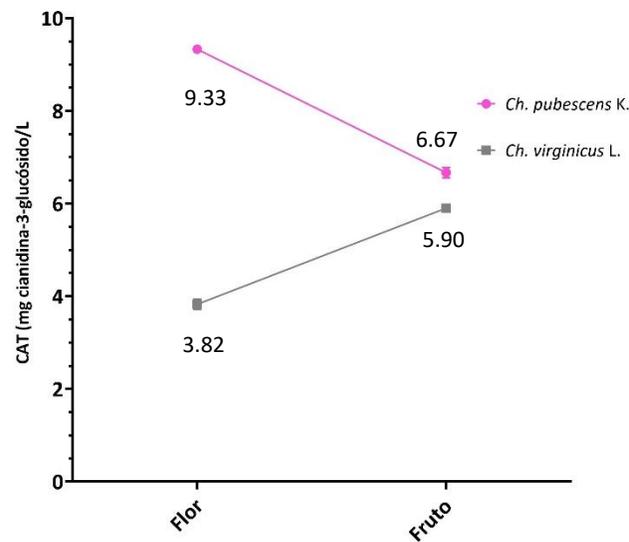


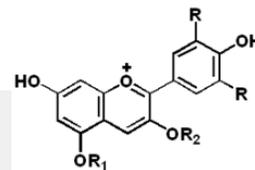
Figura 25. Comparación Kruskal Wallis

Trat.	Medianas	Ranks	
ABF	0,23	2,00	A ←
ABFr	0,35	5,00	A B
ARFr	0,40	8,00	B C
ARF	0,56	11,00	C ←

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 26. Resumen

Muestra	Variable	n	Media	D.E.
ABF	mg cianidina-3-glucosido/L..	3	3,83	0,11
ABFr	mg cianidina-3-glucosido/L..	3	5,90	0,08
ARF	mg cianidina-3-glucosido/L..	3	9,33	0,04
ARFr	mg cianidina-3-glucosido/L..	3	6,67	0,11



Taghavi et al. (2022),
Color <- carga anillo C
Fotoprotector, polinización, dispersión

Romero et al. (2021),
Latencia exógeno/endógeno

Correlación de Pearson

Figura 27. Coeficientes de correlación métodos capacidad antioxidante/composición metabólica

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	DPPH	ABTS	FRAP	TPC	TFC	CAT
DPPH	1,00	0,09	1,7E-08	9,2E-10	3,8E-08	9,4E-07
ABTS	0,32	1,00	0,68	5,4E-05	1,4E-05	3,0E-07
FRAP	0,83	0,08	1,00	4,4E-04	2,5E-03	0,01
TPC	0,86	0,67	0,60	1,00	0,00	1,8E-11
TFC	0,82	0,71	0,53	0,93	1,00	5,9E-12
CAT	-0,76	-0,78	-0,48	-0,90	-0,91	1,00

Sadeer et al. (2020),
DPPH – antioxidantes lipófilos

Platzer et al. (2021),
ABTS– antioxidantes hidrófilos y lipófilos

Echegaray et al. (2021),
FRAP – sustancias donadoras e⁻

Muzi & Hanandi (2019),
CAT – sujeta a interferencias

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

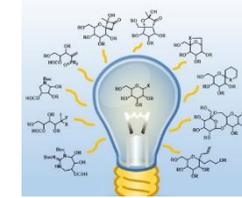
Determinación del peso seco

Tabla 2. Resumen de pesos frescos y secos de muestras

Muestra	% de humedad promedio
ARH	48,66±3,65
ABH	61,70±1,21
ARF	81,33±1,71
ABF	80,53±2,59
ARFr	59,34±2,92
ABFr	54,93±3,20

Jin et al. (2017),
50-80%
Ghast (2000),
80-90%

Haruna & Yahaya (2021); Holzmeyer et al. (2020)
Identificación y aislamiento recurrentes
Fracción de ~ 374 000 especies
+ 200 000 comp. bioactivos



Boyer et al (2011), extractos de raíz de *Ch. virginicus*
HPLC - 9 compuestos
Tintura: hepatitis, ictericia, dolor cabeza, fatiga,
estimulación apetito y de la digestión.

Wang (2022), *Ch. retusus*
Medicina oriental: antipirético, antitumoral,
antiinflamatorio, neuroprotector, antiviral, antioxidante,
tratamiento de parálisis y desorden estomacal.

Dincheva et al. (2023), productos naturales con mayor
compatibilidad biológica y similitud funcional



CONCLUSIONES



Se determinó que el mejor carácter antioxidante lo presentaron las hojas de *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L. frente al resto de muestras, con porcentajes de inhibición de radicales libres de 73,15% y 71,88% en el ensayo DPPH, 89,45% y 88,69% para el ensayo ABTS, y para el ensayo FRAP un potencial reductor de 3,346 mM y 3,344 mM equivalentes de Fe²⁺, respectivamente.



El contenido total de fenoles y flavonoides concordaron con los resultados del carácter antioxidante, las hojas de *Ch. pubescens* K. y *Ch. virginicus* L. mostraron las mayores concentraciones con valores de 2845,55 mg GAE/100 g fw y 2386,17 mg GAE/100 g fw para fenoles, y para flavonoides 60,758 mg QE/g fw y 67,242 mg QE/g fw, respectivamente.



El contenido total de antocianinas determinó una mayor concentración en flores de *Ch. pubescens* K. con una concentración de 9,332 mg cianidina-3-glucósido/L, seguido de los frutos de ambas especies con 6,668 mg cianidina-3-glucósido/L (ARFr) y 5,900 mg cianidina-3-glucósido/L (ABFr) y la menor concentración en las flores blancas de *Ch. virginicus* L. con 3,827 mg cianidina-3-glucósido/L.



La comparación del carácter antioxidante entre ambas especies del género *Chionanthus* determinó que no hubo diferencia significativa entre muestras, a excepción del contenido metabólico respecto a flores, donde el contenido de antocianinas en fue la mayor diferencia obtenida.

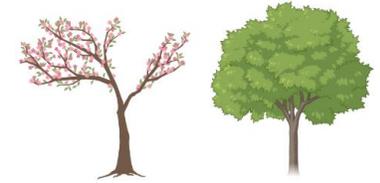


Se determinó que *Ch. pubescens* K. es una posible fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes que podrían aprovecharse como las de su pariente norteamericano (*Ch. virginicus* L.) y de Asia oriental (*Ch. retusus*).



RECOMENDACIONES

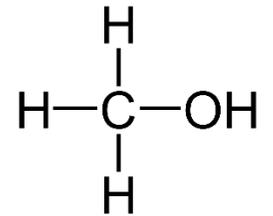
Para posteriores evaluaciones, identificar ejemplares en iguales estadios para la recolección de muestras, especialmente para el fruto donde se evidencio mayor diferencia de temporada en su fructificación y maduración.



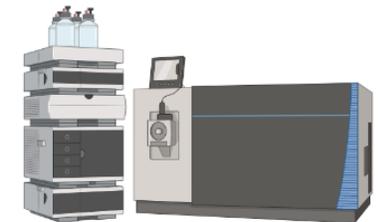
Realizar un análisis de distintas muestras (hojas, flores, fruto, corteza y corteza de raíz) empleando metanol por su mayor eficiencia de extracción y su posterior tratamiento con el fin de hacer una mejor comparación frente a la bibliografía existente.



Para el análisis de antocianinas, aplicar la extracción con metanol en un ambiente ácido (HCl) para una mayor recuperación y evitar la degradación del pigmento. Utilizar cloroformo para la eliminación de impurezas (carotenoides y clorofilas) absorbentes de luz que interviene durante la evaluación, separando los componentes solubles en agua y lípidos de los extractos.



Aplicar el método HPLC-MS para la identificación de los componentes presentes en *Ch. pubescens* K. para comparar con los descritos en bibliografía de *Ch. virginicus* L. y *Ch. retusus*.



AGRADECIMEINTOS



Raluca Alexandra Mihai, Ph. D.
Directora del proyecto

Laboratorio de Biotecnología del Centro
de Investigación de Aplicaciones Militares
“CICTE – ESPE”

Compañeros/as del laboratorio

Familia y Amigos

