



**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"

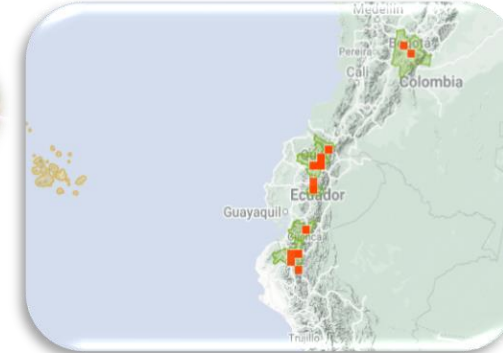
- ~ 140 especies
- Zonas tropicales-subtropicales
- Asia, Australia, América, África

- 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



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

**Arupo Rosado (*Chionanthus pubescens* Kunth)**

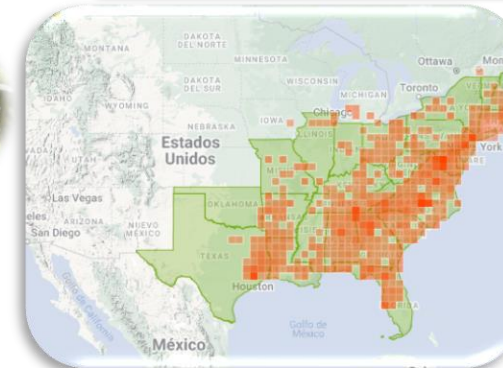


(iNaturalist, 2023)



(Benioff, 2021)

**Arupo Blanco (*Chionanthus virginicus* Linneo)**



(iNaturalist, 2023)



(Thaqu, 2017)



drupas



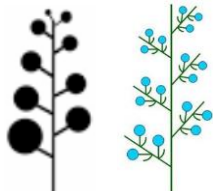
- ❖ PSM antioxidantes
- ❖ Especie introducida
- ❖ Uso ornamental y medicina popular
- ❖ Especie introducida en Ecuador



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
- pinosinol-4',4''-di-O-β-D-glucósido
- pinosinol-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)

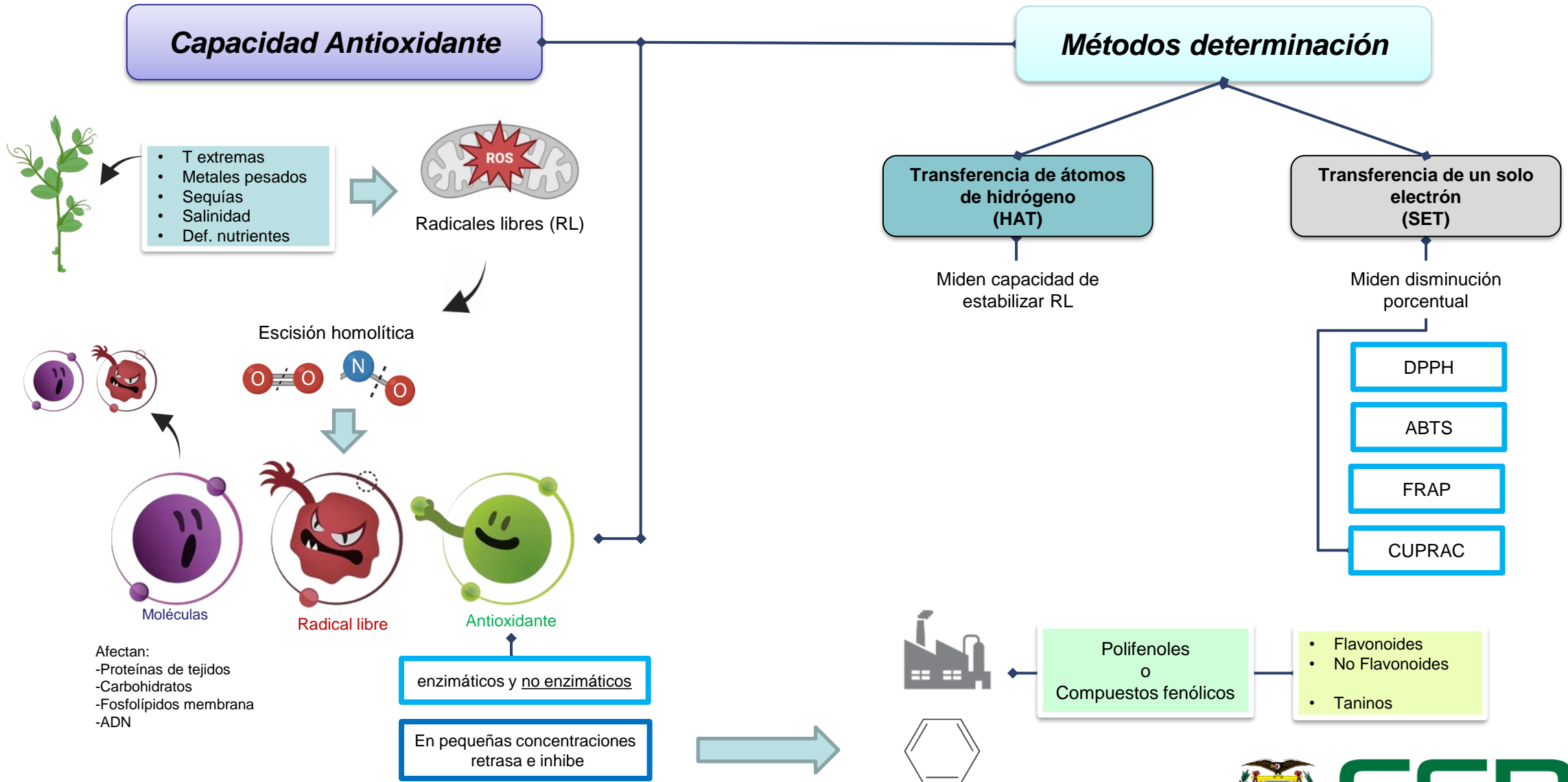
- Potencial agente terapéutico: envejecimiento y enf. degenerativas



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



# INTRODUCCIÓN





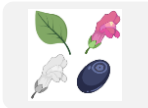
## Objetivo General



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.).

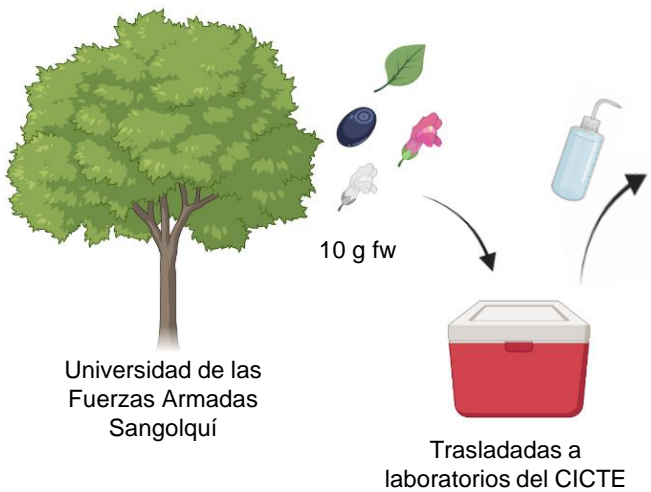




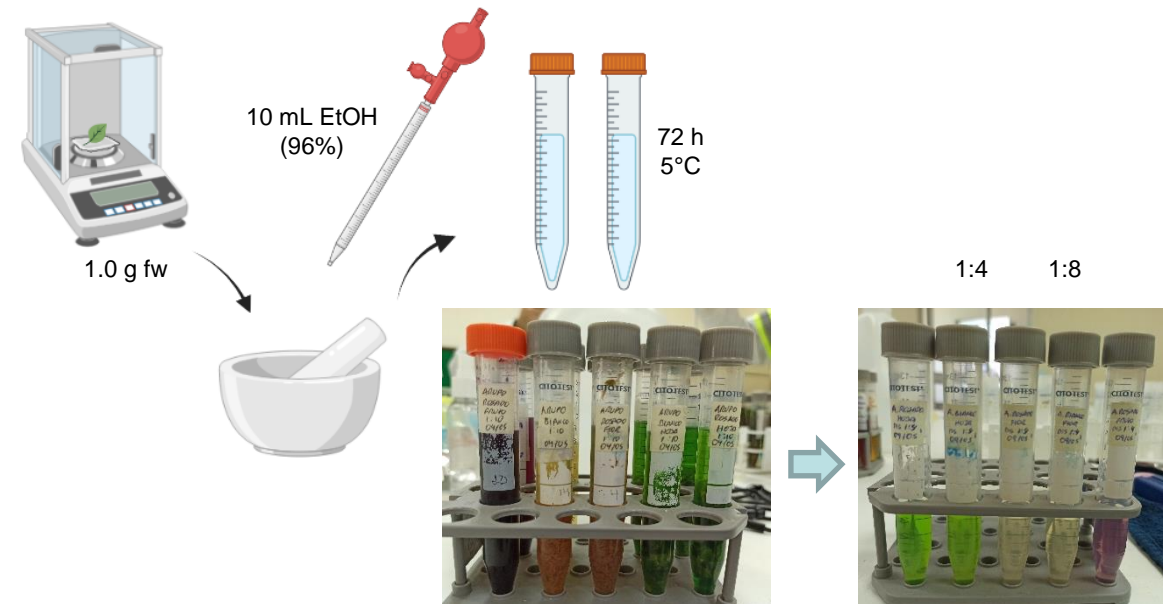
# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1 Recolección material vegetal



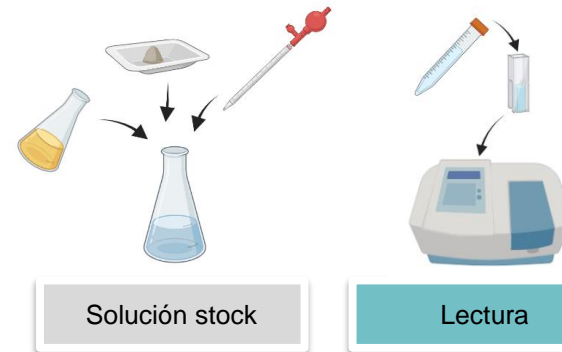
## 2 Obtención de extractos



**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

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O



DPPH

DPPH (0.15 mM)  
+ muestra

517 nm

ABTS

K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2.45  
mM)+sol. ABTS  
(7 mM)  
1:1 + muestra

734 nm

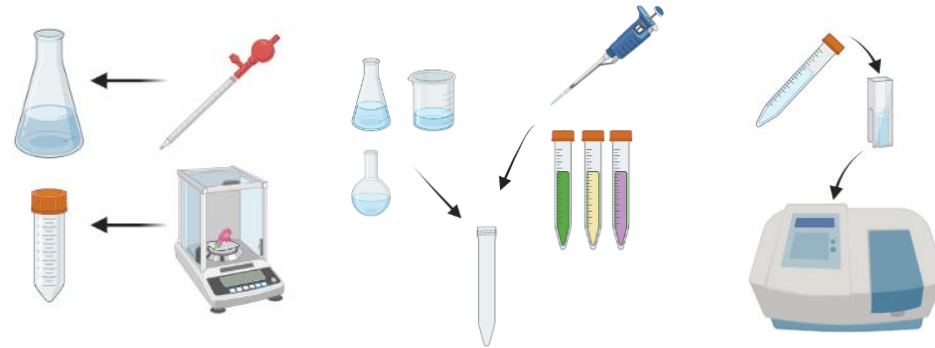
FRAP

tampón acetato  
(300 mM) +  
TPTZ (40 mM) +  
FeCl<sub>3</sub> (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 +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%) + agua

765 nm

Contenido de flavonoides totales (TFC)

Muestra + EtOH +  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (1 M)

+  $\text{AlCl}_3$  (10%) + agua

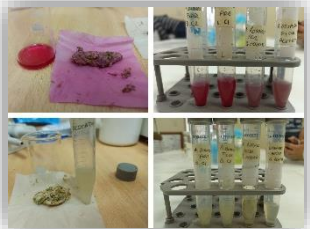
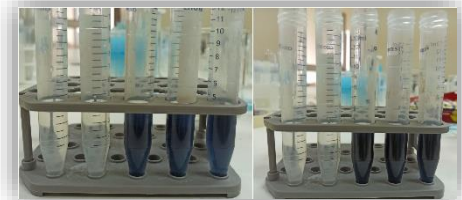
435 nm

Contenido antocianinas totales (TAC)

5 g flores y frutos +

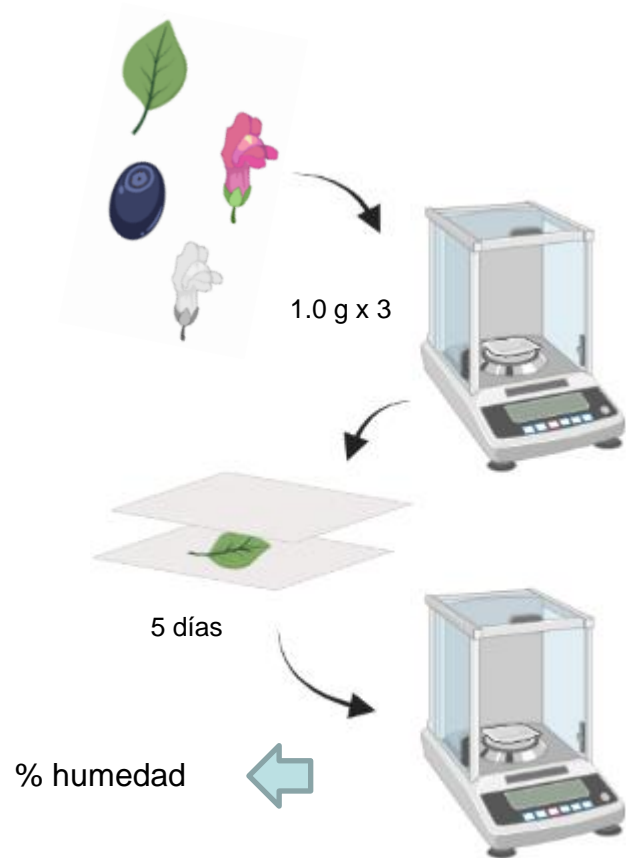
-buffer KCl (0.025 M; pH 1.0)  
-buffer  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (0.4 M; pH 4.5)

520 y 700 nm





## 4 Determinación del peso seco



## 5 Análisis estadístico

### Tratamientos

Diseño factorial mixto  
 $2 \times 3$  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

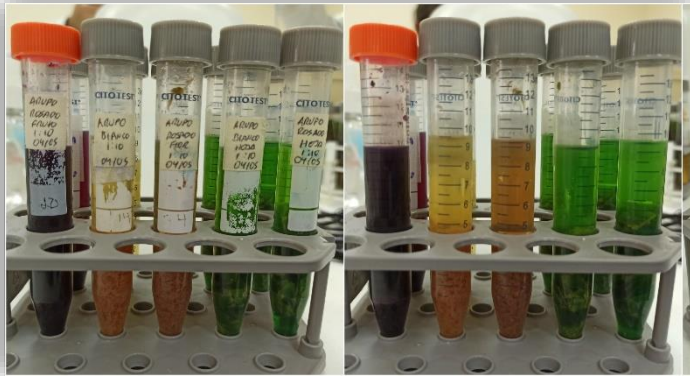
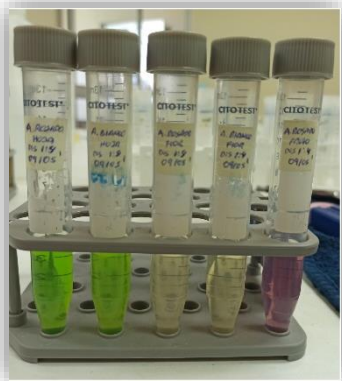


Figura 2. Diluciones de extractos



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

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

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

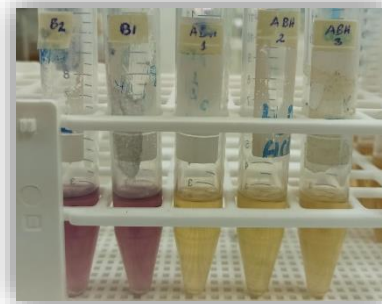


Figura 4. Porcentaje de inhibición

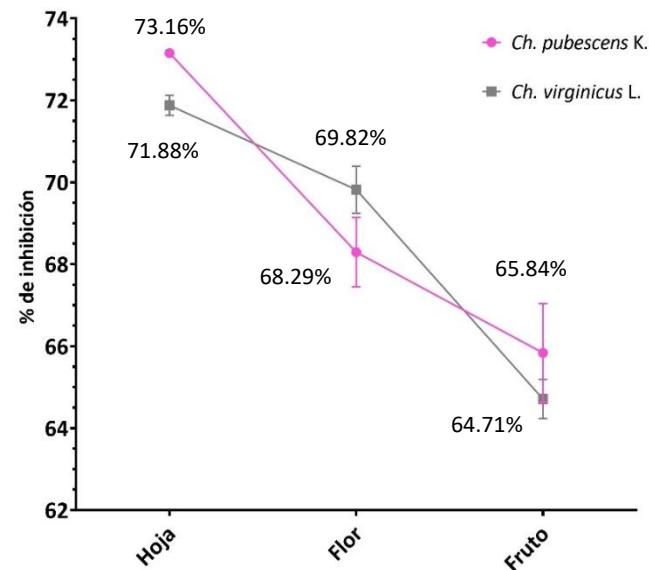


Figura 5. Comparación Kruskal Wallis

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 C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

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<sup>•+</sup>

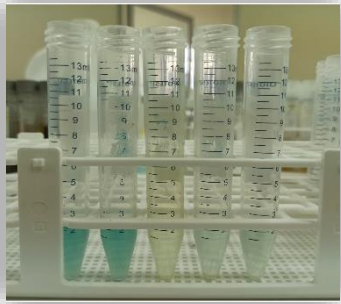


Figura 8. Porcentaje de inhibición

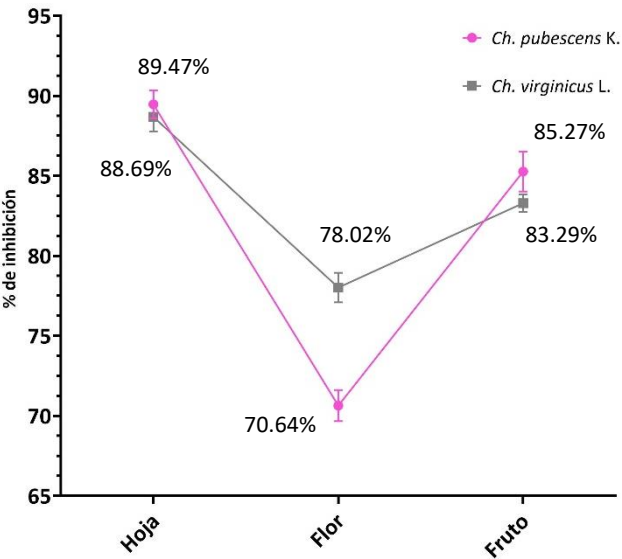


Figura 9. Comparación Kruskal Wallis

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 C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

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 Fe<sup>3+</sup>-TPTZ

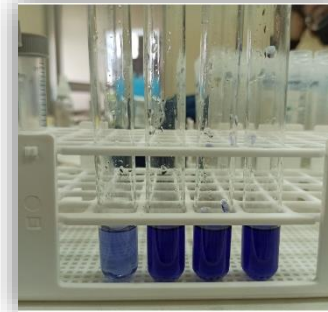


Figura 12. Potencial reductor

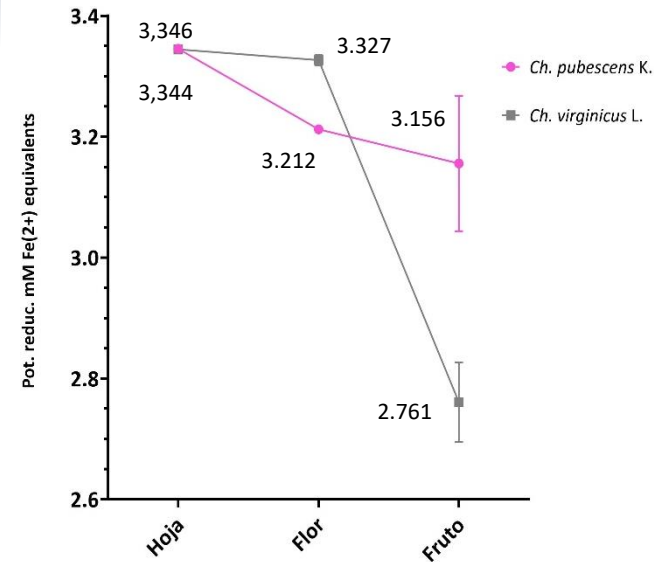


Figura 13. Comparación Kruskal Wallis

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 <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw	5	924,87	2,49
ABFr	mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw	5	767,51	18,32
ABH	mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw	5	929,79	0,68
ARF	mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw	5	893,07	0,51
ARFr	mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw	5	877,33	31,16
ARH	mg Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100g fw	5	930,10	0,78

Gülçin et al. (2006),  
Fe<sup>2+</sup>-ferrozina, Fe<sup>3+</sup>/ferrocianuro  
94.5% MeOH  
88.6% C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
> BHT, BHA, α-tocoferol y Trolox

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Determinación de compuestos fitoquímicos

### Determinación TPC

Figura 15. Reducción de FCR

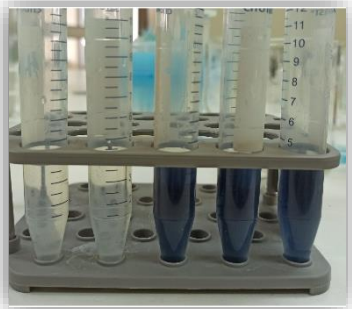
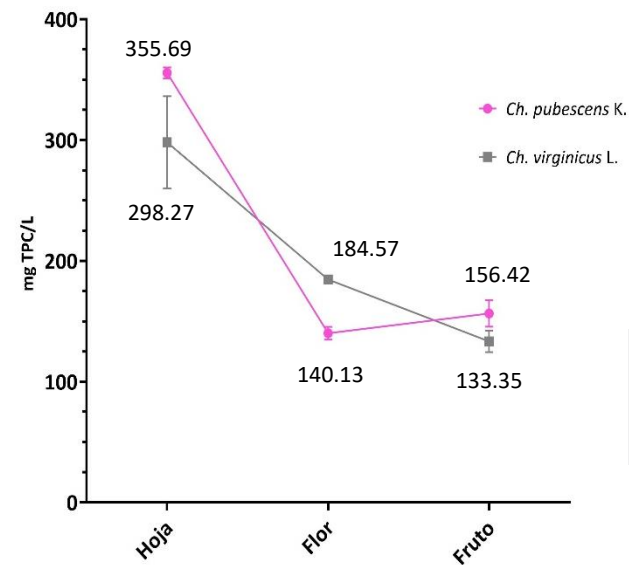


Figura 16. Contenido de fenoles totales



(Malta & Liu, 2014; Shraim et al., 2021)

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

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

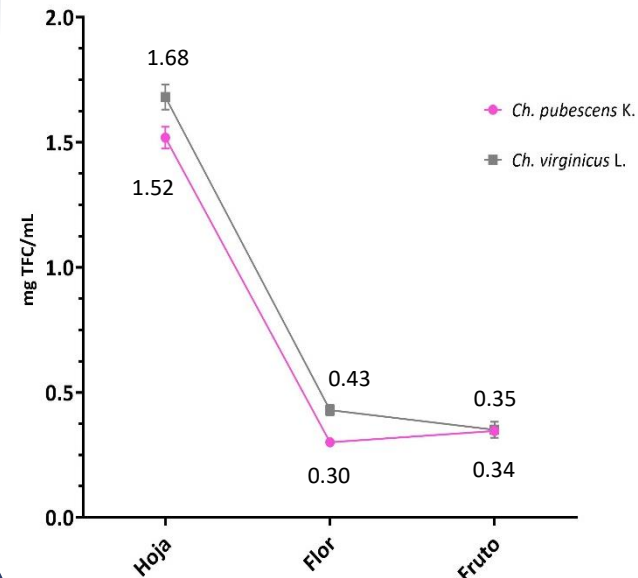
Figura 19. Formación quelatos



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



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Determinación de compuestos fitoquímicos

### Determinación TAC

Figura 23. Manipulación de pH con sistemas buffer

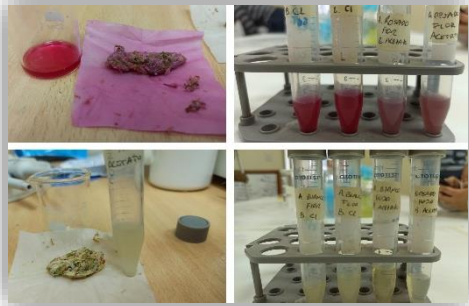


Figura 24. Contenido de antocianinas totales

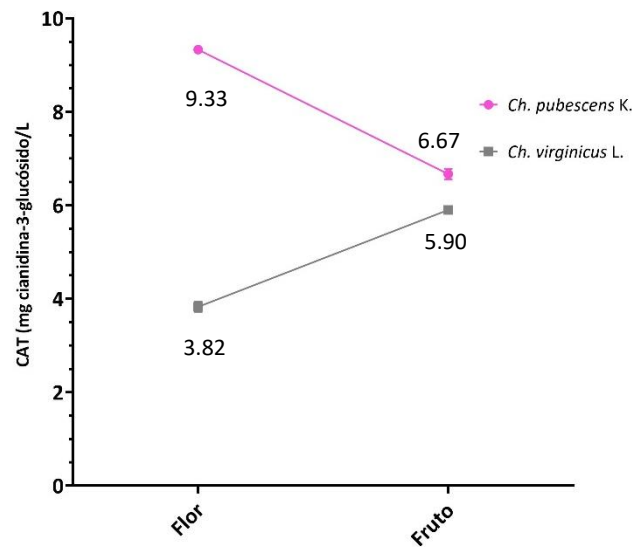


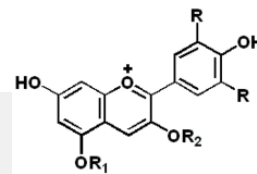
Figura 25. Comparación Kruskal Wallis

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<sup>-</sup>

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

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

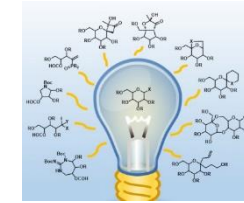
## Determinación del peso seco

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 Fe<sup>2+</sup>, 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.

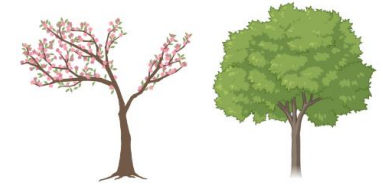


Se determinó que *Ch. pubescens* K. es una posible fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes que podrían aprovecharse como las de su pariente norteamericano (*Ch. virginicus* L.) y de Asia oriental (*Ch. retusus*).



# RECOMENDACIONES

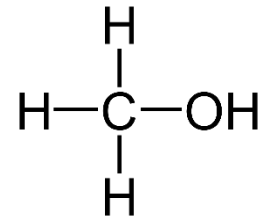
Para posteriores evaluaciones, identificar ejemplares en iguales estadios para la recolección de muestras, especialmente para el fruto donde se evidencio mayor diferencia de temporada en su fructificación y maduración.



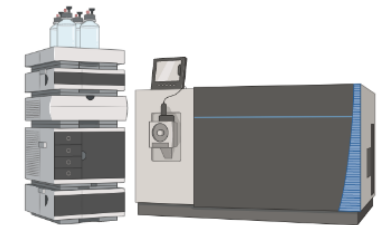
Realizar un análisis de distintas muestras (hojas, flores, fruto, corteza y corteza de raíz) empleando metanol por su mayor eficiencia de extracción y su posterior tratamiento con el fin de hacer una mejor comparación frente a la bibliografía existente.



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**

