

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS DE LAS HOJAS DE TECA (*TECTONA GRANDIS L.*) UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Sonnia E. Barzola-Miranda^{1*}, Alicia Casariego-Año², Margarita Nuñez de Villavincencio³ y José L. Rodríguez-Sánchez³

¹Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Campus Manuel Haz Álvarez. Av. Quito km 1,5 vía Santo Domingo de los Tsáchilas. EC.120301. Quevedo, Ecuador.

³Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carr. al Guatao, km 3½, C.P. 19200, La Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba.

E-mail: facultadci@uteq.edu.ec

RESUMEN

Las hojas de teca (*Tectona grandis L.*), subproducto de la industria maderera, pueden emplearse como fuente de colorante rojo, por lo que esta investigación se trazó como objetivo conocer las condiciones óptimas para la extracción de los pigmentos rojos de las hojas secas con el diseño factorial incompleto (tres factores en tres niveles) tipo Box-Behnken. Las variables independientes fueron: temperatura de extracción (30 a 60 °C), concentración alcohólica (30 a 90 % v/v) y relación sólido-líquido (1:10 a 1:20 $g \times mL^{-1}$) y como variable de respuesta masa de pigmentos extraídos. Todas las variables independientes contribuyen significativamente al modelo cuadrático con buen ajuste de los datos. Las condiciones óptimas para la extracción de los pigmentos fueron: temperatura 52 °C, concentración alcohólica 64 % v/v y relación sólido-líquido 1:16 m/v . Bajo estas condiciones óptimas, los valores experimentales coincidieron con los pronosticados por el modelo cuadrático verificando su validez.

Palabras clave: teca, *Tectona grandis*, colorante natural, extracción, optimización.

ABSTRACT

Optimizing conditions for pigments extraction from teak leaves (*Tectona grandis L.*) using response surface methodology

The teak leaves (*Tectona grandis L.*), byproduct of the wood industry, can be used as a source of red dye, so this research was aimed at knowing the optimal conditions for the extraction of the red pigments of the dried leaves using the incomplete factorial design (three factors in three levels) type Box-Behnken. The independent variables were: extraction temperature (30-60 °C), alcohol concentration (30-90 % v/v) and solid-liquid ratio (1:10-1:20 $g \times mL^{-1}$) and as response variable mass of extracted pigments. The results showed that all the independent variables contribute significantly to the quadratic model with good adjustment of the experimental data. The optimal conditions for the extraction of the pigments were: temperature 54 °C, alcohol concentration 64 % v/v and solid-liquid ratio 1:16 m/v . Under these optimal conditions, the experimental values agreed with those predicted by the quadratic model, verifying its validity.

Keywords: teak, *Tectona grandis*, natural colorant, extraction, optimization.

INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis L.*) es un árbol frondoso de la familia de las Lamiáceas, originario del sudeste asiático, que crece en las regiones tropicales. Es muy apreciado por su madera, lo que ha conducido a la proliferación de grandes plantaciones en África y América

***Sonnia Esther Barzola Miranda:** Ingeniera Química, Magister en Diseño Curricular y Magister en Procesamiento de Alimentos. Docente Principal de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo desde 1988 hasta la actualidad. Coordinadora de Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Directora del proyecto de Investigación "Evaluación de las propiedades de extractos de hojas, tallos y frutos de especies autóctonas del Ecuador en la preservación de alimentos".

Central y del Sur. Las hojas de este árbol, como subproducto de la industria maderera, han sido usadas en la medicina tradicional, empleándose los extractos como antiinflamatorio, antihelmíntico y cicatrizante de heridas (1, 2). Investigaciones recientes han informado la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y quinonas (3) que confieren actividad antibacteriana (4), larvicida (5) y antioxidante (6) y también el empleo de los extractos como colorante de textiles (7, 8). Al respecto, ante la creciente demanda de colorantes naturales apropiados para la industria alimentaria con la finalidad de sustituir a los colorantes sintéticos debido a los problemas de salud derivados de su uso, según los estudios toxicológicos (9), esta investigación se trazó como objetivo seleccionar las mejores condiciones para la extracción de los pigmentos tipo betalaínas de las hojas secas de teca para su empleo como colorante en la industria alimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las hojas de teca, después de eliminar las materias extrañas, fueron secadas en estufa a 50 °C hasta alcanzar una humedad inferior a 8 % $\frac{m}{m}$. Posteriormente se trituraron en molino de cuchillas de alta velocidad (15 000 min^{-1} , 15 s) y se pasó por un tamiz de malla 0,5 mm, obteniéndose un polvo fino.

Las extracciones se hicieron en frascos ámbar con tapas y de 150 mL de capacidad, con 2 g de hojas de teca pulverizada y cantidad variable de disolvente colocados en baño de agua con control de temperatura y agitación constante (150 min^{-1}). El tiempo de extracción fue 15 min. Al finalizar la extracción, los extractos fueron centrifugados a 3 000 min^{-1} durante 10 min, recogiendo el sobrenadante para la determinación del contenido de betalaínas.

Se utilizó un diseño factorial tipo Box-Behnken con tres factores (X_1 , X_2 , X_3) y tres niveles (-1, 0, +1), considerando la temperatura (30 a 60 °C), concentración

alcohólica (30 a 90 %) y relación sólido-líquido (1/10 a 1/20) como variables independientes y la masa total de betalaínas extraídas como la variable de respuesta. La Tabla 1 se presenta la codificación de las variables independientes.

Un total de quince ensayos experimentales, incluyendo tres réplicas en el punto central, fueron llevados a cabo de forma aleatoria.

Para la determinación del contenido total de betalaínas se empleó el método espectrofotométrico para la cuantificación (10). Los contenidos de betaxantinas y betacianinas fueron estimados como equivalentes de indicaxantina y betanina respectivamente mediante la siguiente ecuación:

$$B = \frac{A \times FD \times V_e \times MM}{\epsilon \times l \times 1000}$$

Donde B es masa de betaxantinas o betacianinas (mg), A es el valor de la absorbancia a 480 y 536 nm para las betaxantinas y betacianinas, respectivamente; FD el factor de dilución; V_e el volumen del extracto (mL); MM la masa molar (indicaxantina = 308 $\text{g} \times \text{mol}^{-1}$; betanina = 550 $\text{g} \times \text{mol}^{-1}$); ϵ el coeficiente de extinción molar (indicaxantina = 48 000 $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; betanina = 60 000 $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$); l el paso óptico de la cubeta (1 cm).

El contenido total de betalaínas se calculó como la suma de las masas de betaxantinas y betacianinas presentes.

Se usó el paquete estadístico STATISTICA ver. 8.0 (StatSoft, Inc. 2007), para el análisis de los resultados experimentales del diseño Box-Behnken. La adecuación de los resultados al modelo desarrollado fue comprobada por el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) y el test de falta de ajuste. Los datos generados por el modelo se emplearon para el gráfico de las superficies de

Tabla 1. Codificación de las variables independientes y sus niveles en el diseño 33 tipo Box-Behnken

Variable independiente	Factor	Niveles codificados		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	X_1	30	45	60
Etanol (%)	X_2	30	60	90
Relación sólido/líquido	X_3	1/10	1/15	1/20

respuestas y mediante la metodología de función de conveniencia (11) se estimaron las condiciones óptimas para la extracción de los pigmentos. Para verificar la validez del modelo, la masa de pigmentos extraídos bajo las condiciones óptimas fue determinada y se comparó con el valor pronosticado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción sólido-líquido es un proceso de separación que involucra la transferencia de solutos desde una matriz sólida hacia un disolvente. Es muy usada en la obtención de compuestos valiosos y la eficiencia de la misma está influida por múltiples factores como la temperatura, naturaleza química del disolvente, agitación, relación sólido-líquido, tiempo, tamaño de partícula, entre otros, y sus efectos pueden ser independientes o interactivos (12). En este sentido, la aplicación de la metodología de superficie de respuesta como técnica

de modelación empírica utilizada para evaluar la relación entre las variables independientes y los datos experimentales permite estimar las mejores condiciones de un proceso tecnológico en función de la combinación de estas variables (13). En esta investigación, el diseño Box-Behnken fue utilizado para la optimización del proceso de extracción, ya que en la literatura científica consultada no se ha reportado cómo influyen las variables de proceso en la obtención de colorante a partir de hojas de teca.

Los datos de las corridas experimentales de acuerdo con el diseño seleccionado se informan en la Tabla 2.

Un polinomio cuadrático fue la solución matemática que involucra las variables seleccionadas con la masa total de pigmentos extraídos, según el análisis de varianza resumido en la Tabla 3. La prueba de falta de ajuste no resultó significativa, conjuntamente con los coeficientes

Tabla 2. Resultados experimentales de la extracción de acuerdo con el diseño Box-Behnken

Experimento	Temperatura (°C) (X ₁)	Etanol (%) (X ₂)	Sólido/disolvente (X ₃)	Masa total de pigmentos
1	60	30	1:15	68,5
2	45	90	1:20	42,1
3	60	60	1:10	64,3
4	30	90	1:15	47,9
5	45	30	1:20	35,3
6	30	60	1:10	29,0
7 ^a	45	60	1:15	73,3
8	60	60	1:20	44,2
9	45	30	1:10	47,7
10	60	90	1:15	66,6
11	30	60	1:20	25,1
12	45	90	1:10	60,2
13	30	30	1:15	34,8
14 ^a	45	60	1:15	70,5
15 ^a	45	60	1:15	72,6

^a Repeticiones en el punto central para calcular el error experimental.

Tabla 3. Resumen del análisis de varianza del modelo cuadrático de superficie de respuesta para la masa total de pigmentos extraídos

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F
Modelo cuadrático	3879,05	9	431.01	100,133***
Error puro	4,25	2	2.12	
Falta de ajuste	17,23	3	5.74	2,71
Error total	21,48	5	4.30	
R ²	0,9945			
R ² _{aj}	0,9846			

*** significativo para $p < 0,001$, R² coeficiente de determinación; R²_{aj} coeficiente de determinación ajustado.

de determinación superiores a 0,95, permite afirmar que el modelo propuesto ajusta satisfactoriamente los datos experimentales de las extracciones.

La Fig. 1 presenta el diagrama estandarizado de Pareto que completa la información del análisis de varianza, ya que muestra, en orden de importancia decreciente, las variables estudiadas y sus interacciones que fueron estadísticamente significativas.

Se observa que la temperatura y la relación sólido-líquido fueron las variables de mayor influencia en el proceso de extracción de pigmentos a partir de las hojas de tecla y que tanto los términos lineales y cuadráticos, así como las interacciones binarias resultaron significativos, con la excepción de % etanol × relación sólido-líquido.

La ecuación final en función de los factores codificados se presenta a continuación:

$$\text{Masa total de pigmentos} = 72,13 + 13,10X_1 + 3,81X_2 + 6,56X_3 - 3,75X_1X_2 + 3,55X_1X_3 + 1,42X_2X_3 - 11,93X_1^2 - 5,75X_2^2 - 20,05X_3^2.$$

donde X_1 , X_2 y X_3 simbolizan las variables temperatura, % etanol y relación sólido-líquido, respectivamente.

Los gráficos de la superficie de respuesta en 3D generados por el modelo empírico muestran el efecto de dos variables en el proceso de extracción de las betalaínas, mientras la tercera se mantiene constante (Fig. 2).

Se observa en general que el aumento de la temperatura y la concentración alcohólica favorece la extracción de betalaínas, lo cual es evidente en el gráfico A, no así la relación sólido-líquido que exhibe efectos cuadráticos sobre la cantidad de pigmentos extraídos, responsables de las curvaturas observadas en los gráficos B y C. En este caso, el incremento del valor de esta relación, dado por el aumento del volumen de disolvente para una masa constante de hojas en polvo, contribuye a mejorar la eficiencia de la extracción hasta cerca del punto medio (relación 1:15) donde entonces comienza a disminuir la masa total de betalaínas.

La cinética de la extracción implica múltiples pasos, pero generalmente es la transferencia del soluto en el interior de las partículas sólidas hacia el disolvente contenido en los poros del sólido la que controla la velocidad del proceso y que ocurre únicamente por difusión molecular (14), por tanto, la selección adecuada de los factores que influyen en el coeficiente de difusión (D) contribuirán a mejorar los rendimientos de la extracción. Una elevación de la temperatura implica el incremento del coeficiente de difusión o «difusividad» del soluto en el disolvente y de igual modo la tasa de transferencia de masa (15). Por otra parte, la viscosidad del disolvente de extracción es inversamente proporcional a D (16), de ahí que los mejores resultados se obtuvieron con mezclas de etanol y agua, además que las betalaínas son compuestos nitrogenados solubles en disolventes polares como el agua (17). Respecto a la relación sólido-líquido, factor importante en los procesos de extracción ya que determina la cantidad de disolvente a

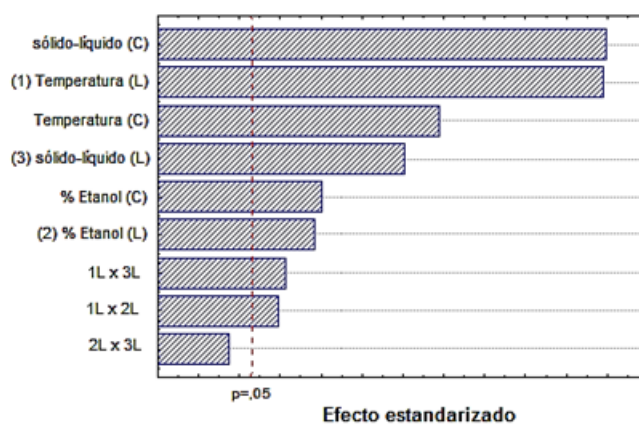


Fig. 1. Diagrama estandarizado de Pareto de los términos con significación estadística en la extracción de los pigmentos de las hojas de tecla. Las letras L y C simbolizan término lineal y término cuadrático, respectivamente.

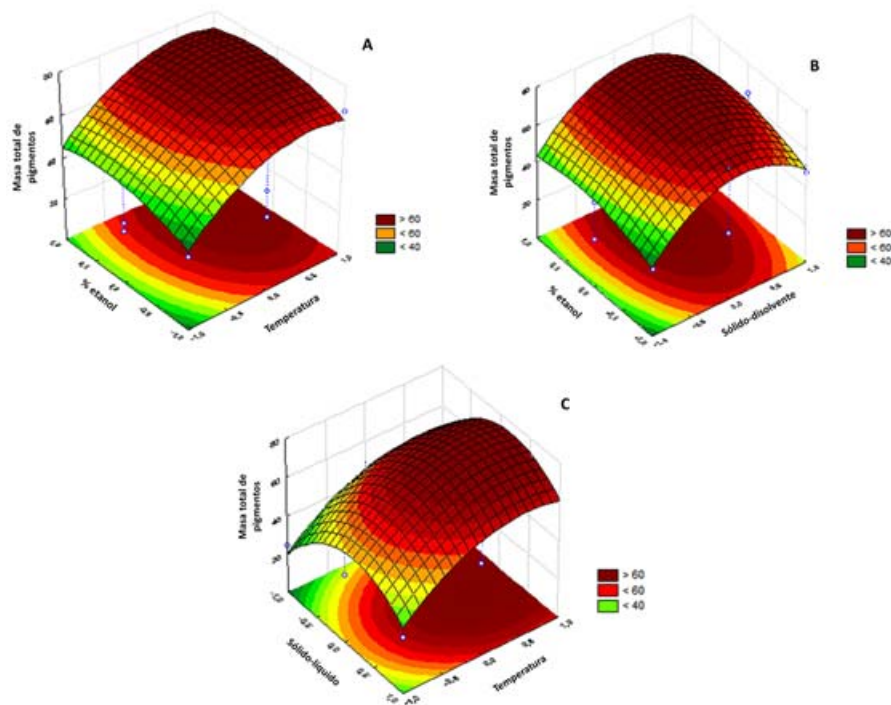


Fig. 2. Superficies de respuesta en 3D mostrando la influencia de las variables temperatura, % etanol y relación sólido-líquido en el proceso de extracción.

emplear, parámetro de importancia económica relacionado con el costo por consumo y también con el costo de su eliminación (etapa de concentración), los resultados de la investigación fueron consistentes con los principios de equilibrio y transferencia de masa, pues el aumento de la cantidad de disolvente hace mayor el gradiente de concentración entre el sólido y la fase líquida, lo que incrementa la fuerza motriz y modifica la condición final del equilibrio (15).

El polinomio cuadrático desarrollado según el diseño Box-Behnken fue usado para establecer las condiciones óptimas de extracción. Para optimizar las

variables independientes seleccionadas se siguió el método de la función de conveniencia de Derringer (11), mediante el cual se busca la combinación de los niveles de estas variables que maximiza la cantidad de betalaínas extraídas.

La Fig. 3 describe el comportamiento de la variable de respuesta entre los niveles seleccionados de cada variable independiente y la región donde la función de conveniencia toma valores cercanos a uno, los que se corresponden con las condiciones de máxima extracción de las betalaínas.

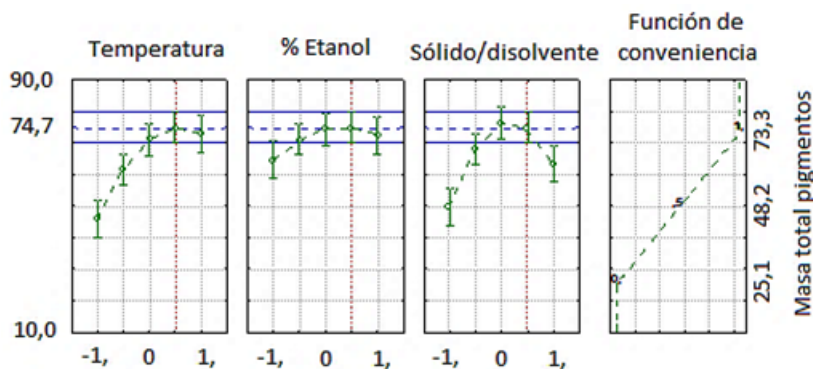


Fig. 3. Perfiles de los valores pronosticados por el modelo empírico de la masa total de betalaínas y los valores de la función de conveniencia.

Se aprecia en los gráficos de temperatura y concentración alcohólica que la extracción es más eficiente a partir de 45 °C y 45 % de etanol, en tanto para la relación sólido-líquido los mayores valores de masa de pigmentos extraídos ocurre en el intervalo de 1/14 y 1/18 m/m.

Las condiciones óptimas propuestas para la extracción fueron: 52 °C de temperatura; 64 % de etanol y relación sólido-líquido igual a 1/16 m/m que se corresponden con un valor pronosticado de 76,1 mg de betalaínas extraídas (función de conveniencia igual a 1,0). Para confirmar la validez de la optimización se realizaron tres extracciones bajo las condiciones antes señaladas, hallando que la cantidad de betalaínas extraídas fue de $75,4 \pm 0,5$ mg, valor experimental razonablemente cercano al valor pronosticado por el modelo cuadrático (diferencia < 1 %) lo que evidencia la validez del modelo predictivo y ratifica las condiciones óptimas señaladas.

REFERENCIAS

1. Majumdar M, Nayeem N, Kamat JV, Asad M. Evaluation of *Tectona grandis* leaves for wound healing activity. Pak J Pharm Sci 2007; 20:120-4.
2. Nidavani RB, Mahalakshmi AM. Teak (*Tectona grandis* Linn.): a renowned timber plant with potential medicinal values. Int J Pharm Sci 2014; 6:48-54.
3. Nayeem N, Karvekar MD. Isolation of phenolic compounds from the methanolic extract of *Tectona grandis*. Res J Pharm Biol Chem Sci 2010; 1:221-5.
4. Krishna MS, Jayakumaran NA. Antibacterial, Cytotoxic and antioxidant potential of different extracts from leaf, bark and wood of *Tectona grandis*. Int J Pharm Sci & Drug Res 2010; 2:155-158.
5. Cheng SS, Huang CG, Chen WJ, Kuo YH, Chang ST. Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. Bioresource Technology 2008; 99:3617-22.
6. Setiawan C, Purnomo H, Kusnadi J. Antioxidant extraction of teak (*Tectona grandis*) leaves using microwave-assisted extraction. Int J Pharm Tech Res 2013; 5:1410-15.
7. Gokhale SB, Tatiya AU, Baliwal SR, Fursule RA. Natural dye yielding plants in India. Natural Product Radiance 2004; 3:228-34.
8. Siva R. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India Current Science 2007; 92:916-25.
9. Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Pigments as Food Colorants. En: Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. Boca Raton, FL: CRC Press LLC; 2003. pp. 31-61.
10. Moßhammer MR, Maier C, Stintzing FC, Carle R. Impact of thermal treatment and storage on color of yellow-orange Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. cv. 'Gialla') juices. J Food Sci 2006; 71:400-06.
11. Derringer G, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. J. Quality Technol 1980; 12:214-9.
12. Cussler EL. Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1997.
13. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments, 5th ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 2009.
14. Ibarz A, Barbosa-Cánovas G. Solid-liquid extraction. En: Unit operations in food engineering, Boca Raton, FL: CRC Press LLC; 2003. pp. 773-821.
15. Cissé M, Bohuon P, Sambe F, Kane C, Sakho M, Dornie M. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. J Food Engineering 2012; 109:16-21.
16. Danesi PR. Solvent extraction kinetics. En: Rydberg, J; Cox, M; Musikas, C; Choppin GR, Eds. Solvent extraction. Principles and practice. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 2004. pp. 209-57.
17. Herbach KM, Stintzing FC, Carlej R. Betalain stability and degradation—Structural and chromatic aspects. J Food Sci 2006; 71:R41-R50.

CONCLUSIONES

En esta investigación, el diseño factorial tipo Box-Behnken fue una herramienta estadística eficiente para establecer las condiciones óptimas de extracción de los pigmentos tipo betalaínas que se encuentran en las hojas de teca. Los resultados indican que todas las variables de proceso ejercen una influencia importante en el proceso de extracción, sobre todo la relación sólido-líquido y la temperatura, mientras que bajo las condiciones óptimas generadas a partir del modelo empírico cuadrático (52 °C; 64 % de etanol y relación sólido-líquido igual a 1/16 m/m). Los valores experimentales concuerdan con los pronosticados por el modelo empírico cuadrático.