UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Efecto de las condiciones de lixiviación en la extracción de antioxidantes de la guayaba *taiwanesa I (Psidium guajava L.)* y guayaba *agria (Psidium friedrichsthalianum)*

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Isaac Israel Talavera Blandón

Br. Kenner Alexander Rugama Alemán

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR

Ing. Juan Alonso Santos

Managua, Nicaragua, noviembre de 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Efecto de las condiciones de lixiviación en la extracción de antioxidantes de la guayaba *taiwanesa I (Psidium guajava L.)* y guayaba *agria (Psidium friedrichsthalianum)*

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Isaac Israel Talavera Blandón

Br. Kenner Alexander Rugama Alemán

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR

Ing. Juan Alonso Santos

Managua, Nicaragua, noviembre de 2023

DEDICATORIA

A mi Familia; Padres y Hermanos
Isaac Talavera

A mi Familia, Padres, Esposa y mi hijo
Kenner Rugama

AGRADECIMIENTOS

Este logro es gracias a Dios, por prestarme la sabiduría e inteligencia. También mi madre, por proveerme todo el apoyo económico y emocional para culminar la carrera.

A mis Hermanos por aconsejarme que estudiara esta maravillosa carrera ¡Gracias!

A la Facultad de Ingeniería Química, en especial a los encargados del Laboratorio de Ingeniería de Procesos, a mi tutor, ¡Gracias Juan!

Gracias a los profesores que aportaron un pequeño conocimiento para que lograra culminar esta carrera, en especial, al profesor Javier Ramírez.

OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

El presente trabajo monográfico titulado: "Efecto de las condiciones de lixiviación en la extracción de antioxidantes de la guayaba taiwanesa I (*Psidium guajava L.*) y guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum*)", presentado por los Bachilleres Isaac Talavera Blandón y Kenner Rugama Alemán, es una investigación novedosa que relaciona la búsqueda de antioxidantes naturales con el aprovechamiento de una fruta muy cultivada en el país.

La guayaba contiene numerosos antioxidantes, macro y micronutrientes esenciales e importantes en la dieta. En nuestro país la guayaba se utiliza únicamente para consumo directo o en la preparación de refrescos. Este estudio surge con el propósito de aprovechar esta materia prima para otros fines como son la extracción de antioxidantes de alta calidad que puedan utilizarse en procesos industriales alimenticios o en complementos nutricionales o medicinales.

En este estudio se planteó estudiar a profundidad el proceso de extracción sólido-líquido de los compuestos de interés a partir de la fruta de guayaba. Para esto se consideraron todos los factores importantes que pudieran afectar el proceso y se llevó a cabo un estudio de cribado. Luego de encontrar las variables más incidentes en el proceso, se realizó un análisis de las condiciones más favorables para obtener los extractos con la mejor eficiencia antioxidante.

Finalmente, se realizó un estudio de la cinética de degradación de estos antioxidantes naturales y se comparó su desempeño con otros antioxidantes tanto naturales como artificiales, obteniéndose resultados que indican que la guayaba es una excelente fuente de antioxidantes que pueden ser usados en diversas aplicaciones, e incluso como sustituto de otros antioxidantes o preservantes artificiales.

Durante el desarrollo de este estudio, pude constatar que los Bachilleres Talavera y Rugama aplicaron habilidades muy importantes en un trabajo de investigación como llevar a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica, análisis de artículos y libros, diseño, aplicación y análisis de dos tipos de diseño experimental, modelación matemática de datos para el estudio cinético, entre otras que son de gran importancia para el Ingeniero Químico.

También demostraron iniciativa para resolver problemas, adquirieron nuevas competencias y destrezas y además aplicaron gran parte de los conocimientos adquiridos en la carrera de Ingeniería Química, destacando que este trabajo consolida varias áreas de formación del Programa como son operaciones de transferencia de masa, cinética y modelación, análisis instrumental e ingeniería de los alimentos, entre otras.

Por lo dicho anteriormente, solicito a los honorables miembros del jurado calificador valorar con la mayor nota posible el presente trabajo que ha sido fruto del arduo esfuerzo, iniciativa y compromiso de los Bachilleres Isaac Talavera y Kenner Rugama y se les otorgue el título de Ingeniero Químico.

Ing. Juan Manuel Alonso Santos

Tutor

RESUMEN

El presente estudio tuvo como propósito evaluar el efecto de los factores y las condiciones de los factores de lixiviación en la eficiencia antioxidante de dos variedades de guayaba cultivadas en el país como son las variedades Taiwanesa 1 (*Psidium guajava L)* y Agria (*Psidium friedrichsthalianum*). Estas fueron seleccionadas debido a que están entre las variedades de mayor consumo en el país.

El estudio comprendió dos etapas principales: en la primera se identificaron los factores con mayor influencia en el proceso de lixiviación mediante un diseño experimental de cribado, los cuales resultaron ser la temperatura y la relación sólido-solvente. Otros parámetros importantes, aunque menos significativos, fueron el tipo de solvente y la variedad de guayaba.

En la segunda etapa, se planteó un diseño experimental factorial mixto para estudiar distintas condiciones o niveles de las variables seleccionadas de la etapa anterior para determinar los mejores valores para estas variables que permitieran conseguir los valores más altos de eficiencia antioxidante (EA), en el proceso de extracción de antioxidantes a partir de la guayaba.

Los resultados obtenidos demostraron que al lixiviar guayaba taiwanesa 1 en forma de puré a temperatura de 55°C, etanol 35% v/v como solvente, 120 rpm de agitación y una relación de al menos 1:5 en proporción másica durante 1 hora, se obtuvo la mejor EA, la cual se estimó en $1.014 \cdot 10^{-5}$ g DPPH$\cdot$mg^{-1} solido$\cdot$min^{-1}.

Para el estudio cinético, se calculó la degradación de DPPH frente a los antioxidantes del extracto de guayaba variedad Taiwanesa 1 y Agria, considerando las mejores condiciones de lixiviación para cada variedad. Los valores de las constantes cinéticas de pseudo primer orden, k_2, para la guayaba taiwanesa 1 y agria fueron de 0.876 y 0.451 (mg. ml^{-1})$^{-1}\cdot$s^{-1} respectivamente.

Estos valores de la constante cinética están por encima de los valores de BHT y BHA (dos antioxidantes sintéticos usados en alimentos) y en el caso de la guayaba taiwanesa un 50% del valor de la constante de la Vitamina E, un antioxidante natural muy importante y eficiente.

Además, se comparó el desempeño antioxidante de los extractos de guayaba con dos antioxidantes de referencia comercial: quercetina y acido tánico. Considerando que el extracto obtenido de ambas variedades de guayaba fue un extracto crudo, sin un proceso adicional de concentración de los antioxidantes y que este fue comparado con antioxidantes en estado puro, la EA fue significativamente alta, de 180 a 480 veces menor que la de la quercetina y ácido tánico, respectivamente.

De los resultados de la presente investigación se concluye que la guayaba es una fuente muy rica en antioxidantes, en especial la variedad Taiwanesa I, y se recomienda esta fruta para su uso en procesos de obtención y purificación de antioxidantes de alta eficiencia, para su aplicación en procesos relacionados con la cadena alimentaria, farmacéutica, nutracéutica y afines.

ÍNDICE

1 Introducción 1
2 Objetivos 2
2.1 Objetivo General 2
2.2 Objetivos Específicos 2
3 Marco Teórico 3
3.1 Guayaba 3
3.1.1 Composición química del fruto de guayaba y valor nutricional 4
3.1.2 Variedades de guayaba 4
3.1.3 Propiedades antioxidantes 5
3.2 Vitamina C 6
3.2.1 Factores que afectan en la degradación de la vitamina C 7
3.3 Antioxidantes 7
3.3.1 Radicales libres 8
3.3.2 Estrés oxidativo 8
3.4 Medición de la actividad antioxidante y eficiencia antioxidante 8
3.4.1 Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 9
3.4.2 Cálculo de la eficiencia antioxidante 10
3.5 Modelos cinéticos 11
3.5.1 Modelo mono exponencial 12
3.5.2 Modelo bi exponencial 12
3.6 Proceso de obtención de antioxidante 13
3.6.1 Extracción solido-liquido (Lixiviación) 13
4 Hipótesis *16*
5 Metodología *17*
5.1 Material Vegetal 17
5.2 Etapas del estudio 17
5.3 Determinación de los Factores que influyen significativamente en el proceso de lixiviación (Método de cribado) 17
5.4 Operaciones del proceso de extracción del extracto de guayaba. 18
5.4.1 Acondicionamiento del vegetal 19
5.4.2 Lixiviación 19
5.4.3 Filtrado 19
5.5 Método para la medición de la eficiencia antioxidante 20
5.6 Determinación de las mejores condiciones que maximizan la extracción de antioxidantes en proceso de lixiviación. 21
5.7 Determinación de la cinética antioxidante 21
5.8 Comparación de la eficiencia antioxidante de la guayaba con antioxidantes de referencia comercial. 24
6 Resultados y Discusión *25*

6.1 Factores que influyen en la Eficiencia Antioxidante durante el proceso de lixiviación 25

6.2 Condiciones de lixiviación que contribuyen a la disminución en las pérdidas de Eficiencia Antioxidante. 27

6.2.1 Comparaciones por parejas de Tukey: Temperatura 32

6.3 Evaluación de la cinética de degradación del DPPH debido a la acción de los antioxidantes del extracto de guayaba para la variedad Taiwanesa 1 y Agria. 33

6.4 Comparación del desempeño antioxidante de los extractos de guayaba con dos antioxidantes referencia: quercetina y ácido tánico 35

7 Conclusiones *37*

8 Recomendaciones *38*

9 Bibliografía *39*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Clasificación Taxonómica de la guayaba "*Psidium guajava* L" y "*Psidium friedrichsthalianum"* (García, 2010) 3

Tabla 3.2 Composición química y valor nutritivo del fruto de guayaba (porción de 100g) (Cabezas Gagñay, 2011, García, 2010). 5

Tabla 3.3 Comparación de métodos para medir la actividad antioxidante (Londoño Londoño, 2012). 9

Tabla 5.1 Diseño Experimental de Cribado propuesto para identificar los factores que influyen significativamente en la lixiviación de antioxidantes de la guayaba. 17

Tabla 5.2 Matriz de Experimento de Cribado para estudiar los factores que influyen en la extracción de antioxidantes de dos variedades de guayaba 18

Tabla 5.3 Ensayos experimentales de la etapa 2 del estudio. 21

Tabla 6.1 Resultados de la Matriz de Experimento de Cribado. 25

Tabla 6.2 Predicción de respuesta múltiple para el diseño de cribado. 27

Tabla 6.3 Resultados de los experimentos del diseño factorial. 28

Tabla 6.4 Análisis de significancias para los efectos principales 32

Tabla 6.5 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la Figura 6.5 (a). 34

Tabla 6.6 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la Figura 6.6 (b). 34

Tabla 6.7 Valores de k_2 de antioxidantes comunes reportados 35

Tabla 6.8 Comparación de la eficiencia antioxidante de extractos de guayaba taiwanesa respecto a quercetina y ácido tánico 36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Corte transversal de la guayaba con sus partes, con algunas adaptaciones. (Marquina *et al.*, 2008).....4

Figura 3.2 Estructura química de la vitamina C tomado de Clara y Anna, (2009). 6

Figura 3.3 Mecanismo de estabilización de radicales libres por vitamina C (Londoño Londoño, 2012).....6

Figura 3.4 Molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (Arias Bravo, 2008). 10

Figura 3.5 Comportamiento cinético de dos patrones (concentración expresada como g de antioxidantes/ Kg DPPH) (a) ácido ascórbico (rápido); (b) vitamina E (intermedio), (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998). 11

Figura 3.6 Proceso de obtención de compuestos antioxidantes.....13

Figura 3.7 Esquema de la extracción solido-liquido; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha).....14

Figura 5.1 Esquema del montaje para el sistema de filtración al vacío.....19

Figura 5.2 Concentración remanente de DPPH frente a diferentes concentraciones de vitamina C, Antioxidante. (Martínez y Talavera, 2018).....20

Figura 5.3 Comportamiento de datos experimentales para la reacción entre la mezcla de antioxidantes contenidos en el extracto de hojas de *Moringa* oleífera frente a DPPH (Martínez y Talavera, 2018).....22

Figura 5.4 Relación de la constante de pseudo primer orden y la concentración inicial del extracto de la hoja de *Moringa* oleífera. (Martínez y Talavera, 2018).....23

Figura 6.1 Resultados del experimento de cribado para identificar factores significativos. 26

Figura 6.2 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para los resultados del diseño experimental de la Tabla 6.3.....29

Figura 6.3 Gráfica de los efectos principales individuales para la EA.....30

Figura 6.4 Interacciones de los factores para medias ajustadas de EA. 31

Figura 6.5 Optimizador de respuesta para los resultados del diseño factorial mixto 32

Figura 6.6 Disminución de la concentración de DPPH versus tiempo, producto de la reacción con sólidos a diferentes concentraciones extraídos de: a) guayaba agria, b) guayaba taiwanesa. 33

Figura 6.7 Relación lineal entre valores de K_{seudo} vers us la concentración inicial de extracto versus K_{seudo} de: a) guayaba agria b) guayaba taiwanesa. 35

1 Introducción

La tendencia del mercado por consumir productos funcionales y optar por alimentos fortificados con aditivos naturales, ha incentivado el desarrollo de investigaciones para lograr extraer compuestos de origen natural que puedan sustituir aditivos sintéticos. Uno de los principales ejes de investigación es la determinación de condiciones y etapas del proceso de extracción, con la finalidad de obtener compuestos deseados con una alta eficiencia.

La guayaba es conocida como una fruta rica en antioxidantes, en latinoamérica se cultivan diferentes variedades de ésta. La mayoría de las variedades de guayaba contienen una cantidad considerable de vitamina C y polifenoles, por tanto, la extracción de estos compuestos ha generado un mayor interés en la industria alimentaria, como alternativa para la conservación de alimentos.

En Costa Rica, se examinaron los efectos terapéuticos potenciales de los extractos de guayaba costarricense (Psidium *friedrichsthalianum*) resultando presencia de antioxidantes, se emplearon diferentes solventes: acetato de etilo, hexano, cloroformo y n b-butanol (Flores *et al.*, 2013).

Flores *et al.* (2015) realizaron estudios en siete variedades de guayaba (*Psidium guajava)* de pulpa blanca y roja, analizando la composición fitoquímica y la actividad antioxidante. Los resultados sugieren que la actividad antioxidante y la composición varía de acuerdo a la especie y al color de la pulpa. En México, Cortes-Penagos *et al.* (2016) realizaron un estudio con 5 especies de guayaba (*Psidium guajava)*, las cuales mostraron tener un alto porcentaje de vitamina C y polifenoles. La actividad antioxidante fue medida utilizando los métodos DPPH y ácido 2,2'–azino–bis–(3–etillbenzotiazolin–6–sulfónico (ABTS), en los cuales el porcentaje de inhibición osciló entre 24.5±0.7% y 48.82±1% para DPPH, y 20.9±0.6% y 49.74±1.4% para ABTS.

En Perú, se realizó un estudio de actividad antioxidante mediante tres métodos: DPPH, ABTS y BCB. En este proyecto Chasipanta Ronquillo y Chicaiza Galarza (2016) extrajeron aceites esenciales de 5 variedades de vegetales y frutas amazónicos, entre las cuales se encuentra guayaba (*Psidium guajava).* En el estudio se observó que la actividad antioxidante del aceite esencial de la guayaba fue bajo, con una media IC_{50} de 0.215 $\mu L \cdot ml^{-1}$.

Los resultados del estudio permiten determinar la EA de ambas variedades de guayaba y su reactividad frente a radicales libres, por lo tanto, permiten establecer el potencial que tiene el extracto de estas guayabas como un sustituto de los aditivos sintéticos para la industria de alimentos.

En el país actualmente las variedades de guayaba con mayor consumo en el mercado, son la guayaba agria y la guayaba Taiwanesa 1, ésta última fue introducida en el país en el año 2007 por la misión taiwanesa, con el objetivo de aumentar el rendimiento y exportación de la fruta del país. Estas dos variedades se pueden encontrar tanto en mercados locales como en supermercados, con un valor entre 10 y 40 córdobas.

En este proyecto se propuso extraer los compuestos antioxidantes de la guayaba Agria y guayaba Taiwanesa 1, ya que estas son las más comunes en el país. También, se busca encontrar las condiciones de los factores de lixiviación que propiciaron un mejor contenido de antioxidante en los extractos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de los factores de lixiviación en la eficiencia antioxidante de las variedades de guayaba Taiwanesa 1 (*Psidium guajava L)* y guayaba Agria (*Psidium friedrichsthalianum*).

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar los factores que influyen en la Eficiencia Antioxidante durante el proceso de lixiviación a escala de laboratorio.

- Determinar las condiciones de los factores de lixiviación que contribuyan a la obtención de una mayor Eficiencia Antioxidante.

- Determinar la cinética de degradación del DPPH debido a la acción de los antioxidantes del extracto de guayaba para la variedad Taiwanesa 1 y Agria.

- Comparar el desempeño antioxidante de los extractos de guayaba con los antioxidantes referencia quercetina y ácido tánico.

3 Marco Teórico

3.1 Guayaba

La guayaba (*Psidium guajava*), es un vegetal nativo de América Tropical, su centro de origen es incierto, lo localizan en Brasil o algún lugar entre México y Perú, según algunos investigadores. Actualmente, esta baya se ha extendido a diversos países del mundo y crece en arbustos que pertenecen a la familia *Myrtaceae.* Además, tiene diversidad de formas, tales como: redondeada, esférica, ovalada o piriforme. El tamaño depende de la variedad de guayaba, y varía entre 5-7 cm de diámetro. El color de su pulpa es variable (blanco, amarillo, rojo, rosado, naranja y salmón). La guayaba madura puede tener un sabor dulce, ligeramente ácido o en ocasiones puede presentar ambos sabores, el aroma distintivo varia de fuerte-penetrante o moderado-agradable (Cruz Pineda, 2017, Calderon Ramos y Moreno Lazo, 2009).

La variedad de guayaba *Psidium Guajava* es una fruta tropical conocida en el mundo a diferencia de la guayaba agria. La guayaba agria (*Psidium Friedrichsthalianum*) tiene ramillas cuadradas, a menudo con cuatro alas, en su estado de madurez es amarilla, su forma es esférica o achatada, su tamaño es de 3-5 cm de diámetro, tiene epicarpio delgado y abundante semillas (Carabalí *et al.*, 1989). En la Tabla 3.1 se presenta la clasificación taxonómica de la *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum,* las cuales se utilizaron en este estudio. También, En la Figura 3.1 se presenta la morfología de ambas variedades de guayaba.

Tabla 3.1 Clasificación Taxonómica de la guayaba "*Psidium guajava* L" y "*Psidium friedrichsthalianum"* (García, 2010)

Clasificación	Variedad	
	Psidium guajava L	*Psidium friedrichsthalianum*
Reino	Vegetal	Vegetal
División	Spermatophyta	Tracheophyta
Subdivisión	Angiosperma	-
Clase	Dicotiledónea	Magnoliopsida
Orden	Mirtales	Mirtales
Suborden	Myrtineae	-
Familia	Myrtaceae	Myrtaceae
Genero	Psidium	Psidium
Especie	guajava L	Psidium friedrichsthalianum (O. Berg) Nied.

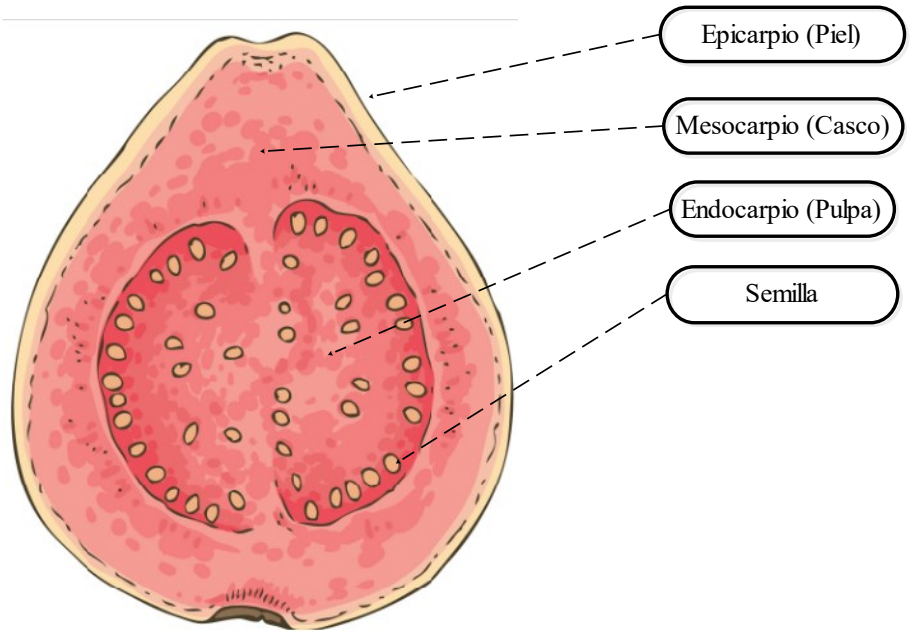

Figura 3.1 Corte transversal de la guayaba con sus partes, con algunas adaptaciones. (Marquina *et al.*, 2008)

3.1.1 Composición química del fruto de guayaba y valor nutricional

En cuanto a valor nutricional, la guayaba aporta nutrientes como agua, carbohidratos, minerales y se estima que contiene 16 vitaminas diferentes. Esta fruta tiene un alto contenido de vitamina C; en ocasiones sobrepasa los 400 mg/100g pulpa, es baja en calorías, contiene mucha fibra, y no contiene colesterol. Además, contiene minerales como calcio, fósforo, hierro, sustancias albuminoides, acido tánico, vitaminas A, B1, B2, B3, entre otras. Cabe destacar que la composición química puede cambiar según la variedad, estado de madurez y región donde se cultiva. (G. Maza, 2000, Hidalgo Filipovich *et al.*, 2015, Jiménez Quevedo, 2015). En la Tabla 3.2 se muestra la composición química y valor nutritivo del fruto de guayaba para una porción de 100g.

3.1.2 Variedades de guayaba

En Nicaragua se cultiva una amplia variedad de guayaba entre las más comunes se encuentran las guayabas pulpa blanca y amarilla, mientras que la guayaba de pulpa roja y rosada provienen de otros países como Estados Unidos (Florida), Cuba y Venezuela, desde hace 25 años (Cruz Pineda, 2017). En Nicaragua la variedad taiwanesa fue introducida en 2007 por la misión técnica China de Taiwán, a través de injertos a plantas de guayaba criolla con estacas de guayaba originaria de Asia, obteniendo una variedad mejorada y de alto rendimiento, por su tamaño, peso y sabor (Chamorro Juárez, 2015). En esta investigación se utilizarán dos variedades de guayaba, las más comunes y de uso comercial, la guayaba Agria o para fresco y la guayaba taiwanesa 1.

Tabla 3.2 Composición química y valor nutritivo del fruto de guayaba (porción de 100g) (Cabezas Gagñay, 2011, García, 2010).

Contenido	Cantidad	Unidad	Contenido	Cantidad	Unidad
Agua	80.8	g	Folato, total	49	µg
Energía	68	Kcal	Folato, comida	49	µg
Proteína	2.55	g	Folato, DFE	49	µg
Lípidos totales (grasas)	0.95	g	Colina total	7.6	mg
Carbohidratos, por diferencia	14.32	g	Vitamina A, RAE	31	µg
Fibra dietética total	5.4	g	Caroteno, beta	374	µg
Azúcares, total incluyendo NLEA	8.92	g	Licopeno	5204	µg
Calcio, Ca	18	mg	Vitamina E (alfa-tocoferol)	0.73	mg
Hierro, Fe	0.26	mg	Vitamina K (filoquinona)	2.6	µg
Magnesio, Mg	22	mg	Ácidos grasos, saturados totales	0.272	g
Fósforo, P	40	mg	Ácidos grasos, monoinsaturados totales	0,087	g
Potasio, K	417	mg	Ácidos grasos, poliinsaturados totales	0,401	g
Sodio, Na	2	mg	18: 2	0.288	g
Zinc, Zn	0.23	mg	18: 3	0.112	g
Cobre, Cu	0.23	mg	Niacina	1.084	mg
Selenio, Se	0.6	µg	Vitamina B-6	0.11	mg
Vitamina C, ácido ascórbico total	228.3	mg			
Tiamina	0.067	mg			
Riboflavina	0.04	mg			

3.1.3 Propiedades antioxidantes

Diversas investigaciones han demostrado que la guayaba es una fuente excelente de vitamina C y posee alto contenido de fenoles totales, siendo significativos en la ingesta de antioxidantes. No obstante, el contenido de vitamina C en los frutos depende fundamentalmente de la variedad, estado de madurez y variedad. También se reporta la presencia de carotenoides y flavonoides en esta fruta (Cortes-Penagos *et al.*, 2016, Mercadante *et al.*, 1999, Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca, 2009).

Como ya se mencionó la *P. guajava L.* posee grandes cantidades de vitaminas y minerales. Comparando la guayaba con la naranja, esta posee cuatro veces más vitamina C, por esta razón, y por el alto contenido de antioxidantes fenólicos, es que en diversas culturas se utiliza como medicina natural y comúnmente se le denomina como "súper fruta" debido a su alto contenido antioxidantes (Flores *et al.*, 2015).

3.2 Vitamina C

La vitamina C o L-ácido ascórbico (AA) es una vitamina hidrosoluble, altamente polar, cuya fórmula y peso molecular son $C_6H_8O_6$ y 176.13 g/mol, respectivamente. Es un nutriente esencial para el ser humano, actúa como agente reductor en las reacciones oxido-reducción. También es uno de los principales antioxidantes junto a la vitamina E y los carotenoides, utilizados para combatir la oxidación en las células causadas por los radicales libres (Clara y Anna, 2009). Es considerado como el agente reductor más reactivo que puede existir de forma natural (Albino y Gimena, 2013).

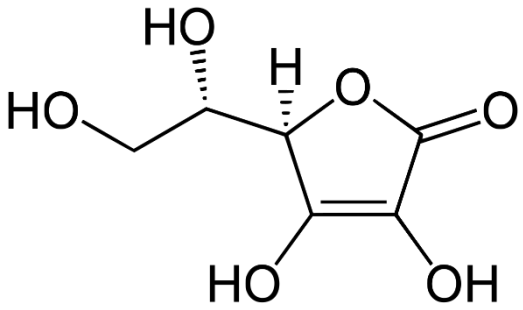

Figura 3.2 Estructura química de la vitamina C tomado de Clara y Anna, (2009).

Se ha demostrado que el ácido ascórbico es un antioxidante eficaz. Esta molécula hidrosoluble, que se presenta fundamentalmente como ascorbato, elimina radicales libres dentro de los compartimientos acuosos de las células y en los líquidos extracelulares (McKee, 2003). En la Figura 3.3 se muestra el mecanismo de estabilización del radical libre peroxilo (ROO^-). La donación de un electrón por parte del ácido ascórbico produce el radical L-ascorbilo, que puede ser nuevamente oxidado para dar ácido deshidro-L-ascórbico. El ácido ascórbico es el único antioxidante endógeno en plasma que puede proteger contra el daño peroxidativo inducido por radicales peroxilo (Londoño Londoño, 2012).

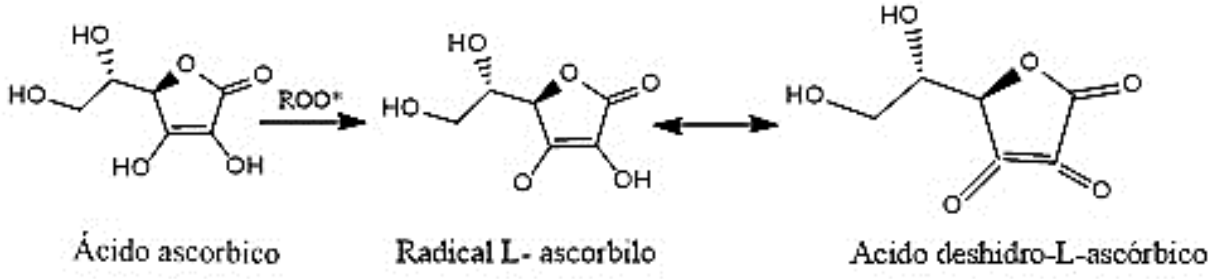

Figura 3.3 Mecanismo de estabilización de radicales libres por vitamina C (Londoño Londoño, 2012).

El ascorbato protege a las membranas mediante dos mecanismos. En el primero, el ascorbato reacciona con los radicales peroxilo que se forman en el citoplasma antes de que puedan alcanzar la membrana. En el segundo, el ascorbato potencia la actividad antioxidante de la vitamina E, luego se regenera el ascorbato (McKee y Mckee, 2003).

3.2.1 Factores que afectan en la degradación de la vitamina C

Durante el procesamiento de las frutas y hortalizas, la vitamina C se altera fácilmente por la acción de la temperatura, la luz, cambios de pH y en presencia de iones metálicos de transición, tales como cobre y hierro (Ordóñez-Santos *et al.*, 2013). Por otro lado, el ácido ascórbico se oxida rápidamente en presencia de oxígeno (Robertson y Samaniego, 1986), y dicha reacción se acelera en medios alcalinos (Palomino Pacheco, 2006).

La vitamina C es reconocida como uno de los mejores antioxidantes, pero, es altamente sensible a los procesos de calentamiento. Esto permite que sea utilizada como marcador de la perdida de otros nutrientes y determinar el contenido nutricional antes y después de que los alimentos sean procesados. Los procesos de cocción conllevan la eliminación de compuestos solubles en agua como las vitaminas hidrosolubles, es decir, existe pérdida de vitaminas solubles en el medio acuoso que rodea el alimento. Actualmente, en el ámbito industrial, la cocción se realiza al vacío y en sistemas cerrados, lo que minimiza el grado de pérdida, que va acorde con la temperatura alcanzada, el tiempo, el pH y el grado de maduración en el caso del vegetal (Ordóñez-Santos *et al.*, 2013, Palomino Pacheco, 2006).

La degradación de la vitamina C también está relacionada con la pérdida del sabor debido a reacciones de oxidación como el pardeamiento enzimático en los alimentos. Existen factores importantes a tomar en cuenta en la degradación del ácido ascórbico tales como etapas del procesamiento, tiempo y la temperatura de almacenamiento (Martínez y Talavera, 2018).

3.3 Antioxidantes

Los antioxidantes se definen como todas aquellas especies química que previenen o inhiben la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de sustratos generalmente biológicos como: lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Estos compuestos se encuentran en bajas proporciones comparado con el sustrato. La oxidación de tales sustratos puede ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres, y aquellas especies que, sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos (Teresa Galván *et al.*, 2008).

Los seres vivos utilizan moléculas antioxidantes para protegerse de los radicales libres y obtienen tocoferol α (vitamina E), caroteno β y ácido ascórbico (vitamina C) de la dieta. Los Antioxidantes se clasifican en tres grupos dependiendo su función: primario, secundario y terciario. El grupo primario (enzimáticos) protege al organismo contra la formación de nuevos radicales libres. En el grupo secundario (No enzimáticos) contiene dos subclases: antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Este grupo es frecuentemente añadido en los alimentos como aditivo. Por último, el grupo terciario está constituido por todas las especies que se encargan de reparar biomoléculas dañadas debido a los radicales libres (Céspedes Cabrera y Sánchez Serrano, 2014, Martínez y Talavera, 2018, McKee y Mckee, 2003).

3.3.1 Radicales libres

Un radical libre es cualquier componente químico que contiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactivo y clave para formar otros radicales libres en cadena. Se liberan durante el metabolismo humano, por contaminaciones ambientales (atmosférica, acuáticas, de suelos) y radiaciones (ultravioleta, gamma). Se pueden relacionar con el consumo o uso de toxinas como el alcohol, tabaco y drogas o debido a una alimentación no adecuada, incluyendo además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico y psíquico (Coronado H *et al.*, 2015).

En los sistemas biológicos, los radicales libre más frecuentes son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo $(OH)^-$ e hidroperóxilo $(OH_2)^-$, radical piróxilo (ROO^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales formados en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Londoño Londoño, 2012).

3.3.2 Estrés oxidativo

En los últimos años se ha prestado mucha atención a los antioxidantes naturales presentes en las frutas y verduras. Esto se debe a que estos componentes pueden reducir el nivel de estrés oxidativo, el cual se define como una alteración en el estado de equilibrio del sistema prooxidantes/oxidante en células intactas, que resultan en daño oxidativo a los lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, lo que contribuye a la distribución patológica en el organismo (Hassimotto *et al.*, 2005).

En condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres con los mecanismos antioxidantes. Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación y el daño celular sea menor. Cuando se rompe el equilibrio, se asocia con un déficit en el sistema antioxidantes o por la proliferación descontrolado de los radicales libres (Coronado H *et al.*, 2015). El estrés oxidativo, además de contribuir en el proceso de envejecimiento, ha sido asociado al menos con 100 enfermedades humanas. Entre ellas cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares como la ateroesclerosis, infarto del miocardio, la hipertensión y las enfermedades neurológicas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer (Clara y Anna, 2009, McKee y Mckee, 2003).

3.4 Medición de la actividad antioxidante y eficiencia antioxidante

Según Londoño Londoño (2012), la actividad antioxidante se define como la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa y brinda información acerca de la duración del efectos antioxidantes, es decir, mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa.

Se han desarrollado una variedad de métodos químicos para evaluar la capacidad antioxidante, en alimentos, frutas, vegetales y también en plantas medicinales (Wu *et al.*, 2004), las cuales pueden clasificarse en función del mecanismo de reacción que utiliza el antioxidante para estabilizar el radical libre. El primero de ellos consiste en la Transferencia de Átomos de Hidrógeno (TAH) y el segundo mecanismo consiste en la trasferencia de electrones (TE). Estos mecanismos pueden ocurrir de forma paralela, y ambos dan como resultado la estabilización del radical libre; sin embargo, el mecanismo que predominará depende de factores tales como: la estructura química del antioxidante, su solubilidad y el entorno del medio reaccionante (Londoño Londoño, 2012).

Algunos de los métodos son: el ensayo de la capacidad secuestrante del radical ABTS (*2,2-azino-bis (3-etilbenzotialin)-6-sulfónico*), capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), *Dicloruro de 4-amino-N, N-dimetilfenilendediamina* (DMPD), poder reductor del ion férrico (FRAP), el DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*), método CARO (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), método PATAR (Parámetro Antioxidante Total de Atrapamiento de Radicales), entre otros.

Sin embargo el método que ha recibido mayor atención es la técnica que utiliza el radical libre *2,2-difenil-1-picrilhidrazilo* cuyas siglas son DPPH (Guija-Poma *et al.*, 2015) pues, el método DPPH es considerado el más económico y simple de todos los métodos mencionados (Martínez y Talavera, 2018, Kuskoski *et al.*, 2005).

En la Tabla 3.3 se muestra la comparación de los diferentes métodos utilizados para determinar la actividad antioxidante.

Tabla 3.3 Comparación de métodos para medir la actividad antioxidante (Londoño Londoño, 2012).

Método	Instrumentación[1]	Mecanismo	Punto final	Cuantificación
CARO	--	TAH	Tiempo	ABC[2]
PATAR	++	TAH	Fase de inducción	CE_{50}, fase de inducción[3]
ABTS	--	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia
DPPH	--	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia CE_{50}[3]

[1]Donde (++) al (--), significa del más al menos especializado.
[2]ABC: área bajo la curva.
[3]CE_{50} significa concentración efectiva 50.

3.4.1 Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo *(DPPH)*

El DPPH es conocido como un radical libre porque en su estructura química presenta la deslocalización de un electrón desapareado, por esta razón la molécula no se dimeriza, como ocurre en gran parte de los radicales libres. El color violeta intenso se debe a la deslocalización del electrón, y puede ser medido en metanol y etanol, a 517 nm. La variación de color se monitorea en un espectrofotómetro, para determinar la eficiencia antioxidante (Martínez y Talavera, 2018, Chasipanta Ronquillo y Chicaiza Galarza, 2016).

El método de DPPH fue desarrollado en el año 1958 por *Blois* con el objetivo de determinar la actividad antioxidante mediante el uso de un radical libre estable *2,2-difenil-1-picrilhidrazilo* (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, M = 394,33 gramos/mol), y es uno de los pocos radicales orgánicos estables (Blois, 1958).

El ensayo se basa en la medición de la reacción del radical libre con los compuestos antioxidantes a través de un proceso químico caracterizado por la cesión de un átomo de hidrogeno a la hidrazina correspondiente por el agente antioxidante (Kedare y Singh, 2011). Entre las ventajas que presenta este método, se encuentra su simplicidad y el bajo requerimiento

instrumental. Los resultados suelen expresarse como EC_{50}, que indica la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar el 50% de la concentración inicial de DPPH. Ulteriormente, Sánchez-Moreno *et al.* (1998) ajustaron la ecuación considerando, además de las concentraciones de antioxidantes, el tiempo necesario de reacción para estabilizarse.

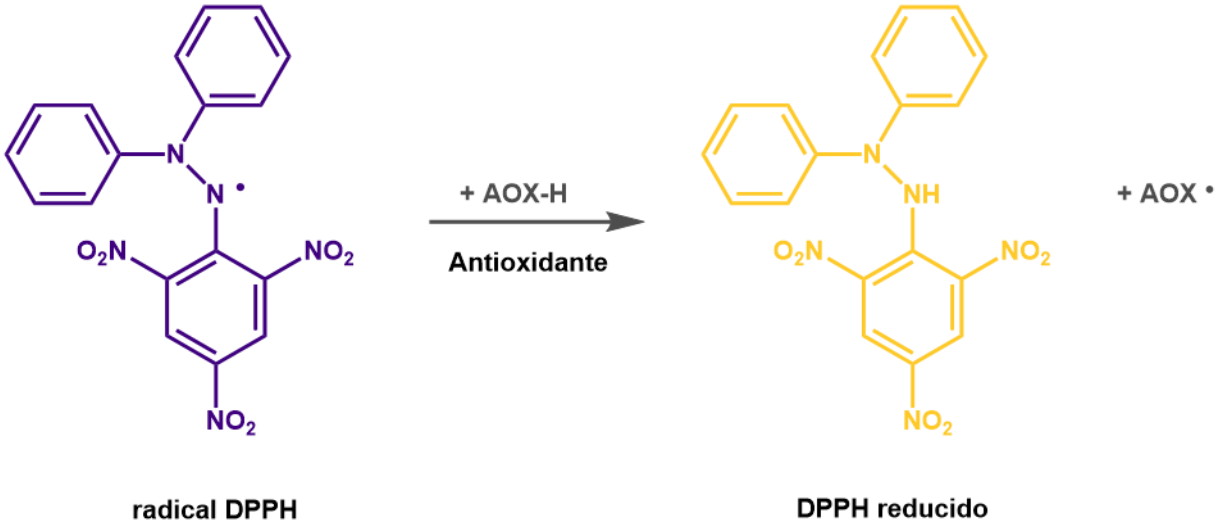

Figura 3.4 Molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (Arias Bravo, 2008).

3.4.2 Cálculo de la eficiencia antioxidante

El cálculo de la capacidad antioxidante por radicales libres anteriormente se calculaba mediante la ecuación siguiente:

$$AC = \frac{1}{EC_{50}} \tag{3.1}$$

Dicha ecuación fue modificada por Sánchez-Moreno *et al.* (1998), quien tomó en cuenta el tiempo necesario para alcanzar la concentración EC_{50}, en reconocimiento del efecto de ambos parámetros sobre la determinación de la capacidad antioxidante. Además, considerando ambos parámetros (EC_{50} y t_{EC50}) se describe mejor las cualidades de un antioxidante. De este modo se definió un nuevo parámetro denominado eficiencia antirradical (AE), que al combinar ambos factores resulta la ecuación 3.2 (Antolovich *et al.*, 2002, Guija-Poma *et al.*, 2015):

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times t_{EC_{50}}} \tag{3.2}$$

La relación que existe entre los parámetros que conforman la ecuación 5.2 (EC_{50} y t_{EC50}) son inversamente proporcional a la AE, quiere decir que, a mayor valor de EC_{50}, mayor cantidad de antioxidante son necesarios para neutralizar los radicales libres, y a mayor tiempo ($t_{EC_{50}}$), más lenta es la cinética de inhibición de los radicales libres y en consecuencia la eficiencia antioxidante será menor, en ambos casos.

En la Figura 3.4, se muestran los resultados obtenidos por Sánchez-Moreno *et al.* (1998) en su investigación, en los cuales se indica el comportamiento de la concentración remanente de DPPH con respecto al tiempo. También, se muestra como el DPPH se degrada en el tiempo hasta llegar al valor EC_{50}, el cual es la medida de la capacidad antioxidante. En este caso se realizan varias pruebas cinéticas a distintas concentraciones del antioxidante, hasta encontrar la concentración efectiva que disminuye la absorbancia inicial del DPPH al 50%.

La determinación del t_{EC50} se realiza una vez se encuentra la curva de EC_{50}. El t_{EC50} será el tiempo en el cual se alcanzó un valor constante en la curva de disminución de la concentración inicial de DPPH al 50%. En la figura siguiente se indica con una línea vertical la identificación gráfica de este tiempo el cual, según estas condiciones experimentales, es aproximadamente de 0.92 y 8.8 minutos para la vitamina C y E, respectivamente.

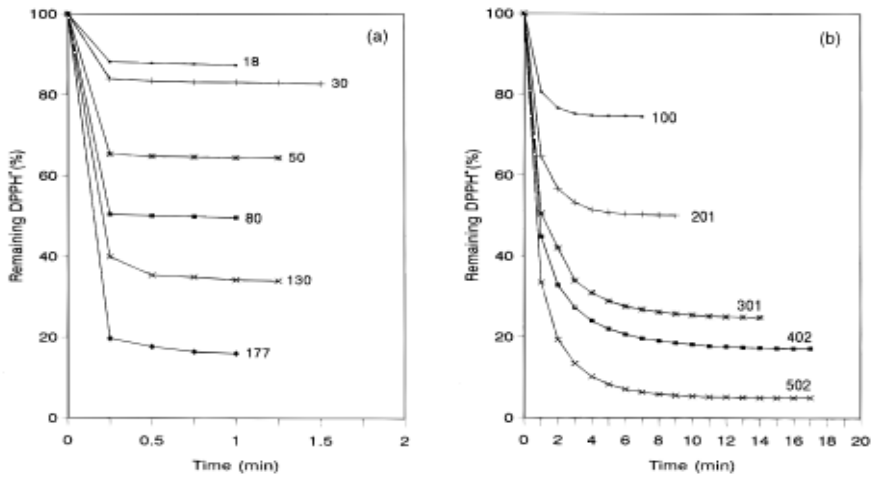

Figura 3.5 Comportamiento cinético de dos patrones (concentración expresada como g de antioxidantes/ Kg DPPH) (a) ácido ascórbico (rápido); (b) vitamina E (intermedio), (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

3.5 Modelos cinéticos

El método DPPH ha sido muy utilizado para determinar la eficiencia antioxidante, el DPPH es susceptible a reaccionar con agentes antioxidantes a través de un proceso que se caracteriza por la cesión de un átomo de hidrogeno (por parte del agente antioxidante) al DPPH. La reacción que ocurre es:

$$[DPPH^*]+[AH]=[DPPH-H]+[A^*]$$

Para determinar la cinética de la reacción, se mide la disminución de la absorbancia en función del tiempo. Esta medición permite observar dos etapas, la primera con una disminución de concentración rápida, y la segunda con una disminución lenta. Esto sucede, a causa de un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a la reacción entre los productos (Brand-Williams *et al.*, 1995, Guija-Poma *et al.*, 2015). El modelo cinético depende del comportamiento de la curva generada, posteriormente se pueden ajustar los datos obtenidos a una función exponencial de uno, dos o tres términos.

3.5.1 Modelo mono exponencial

Estudios anteriores, indican que la reacción que ocurre entre agentes antioxidantes, como los que hacen parte de este estudio, y el radical libre DPPH sigue una cinética de segundo orden a una temperatura determinada (Leal Alturo, 2012a, Mukai *et al.*, 1993, Shi y Niki, 1998). En la ecuación 5.4 se muestra la ley de velocidad de reacción para el DPPH y los compuestos antioxidantes.

$$\frac{-(d[DPPH^*]_t)}{dt} = k_2 * [AH]_t * [DPPH^*]_t \tag{3.3}$$

Donde k_2 corresponde a la constante de velocidad de reacción para una cinética de segundo orden, $[AH]_t$ es la concentración de antioxidante en algún momento t, y $[DPPH^*]_t$ es la concentración del radical libre en algún momento t.

Sin embargo, esta reacción puede ajustarse a una cinética de reacción de pseudo primer orden, considerando que la concentración de antioxidante se encuentra en exceso (Shi y Niki, 1998, Mukai *et al.*, 1993). Si la concentración de antioxidante es mayor que la concentración de DPPH, se permite considerar que la concentración de los antioxidantes no se modifica considerablemente con el paso del tiempo ($[AH]_t = \text{constante}$), y de la ecuación 3.3, obtenemos:

$$[DPPH] = e^{(k_o bs)} * [DPPH]_0 \tag{3.4}$$

Donde [DPPH] corresponde a la concentración en el tiempo de DPPH, $[DPPH]_0$ es la concentración inicial de DPPH en t = 0, y k_{obs} es la constante de pseudo primer orden.

$$\ln|[DPPH]| = \ln\left|e^{(k_o bs)} * [DPPH]_0\right| \tag{3.5}$$

El parámetro k_{obs} es una constante de pseudo primer orden, que es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes, y puede ser obtenida de la pendiente de la ecuación 3.5. Posteriormente, a partir de k_{obs} es posible obtener la constante de velocidad de segundo orden (k_2), la cual se emplea para cuantificar la eficiencia antioxidante de diferentes compuestos (Martínez y Talavera, 2018).

3.5.2 Modelo bi exponencial

El modelo exponencial de dos términos es usado cuando se presenta dificultad para ajustar los datos experimentales a una ecuación de un término (mono exponencial), se conocen tres causas que por las cuales no se logra ajustar: La mezcla de antioxidantes, dimerización o reacción entre productos (Martínez y Talavera, 2018).

El modelo o ecuación general se muestra de la siguiente manera:

$$A_t = \alpha \cdot e^{-\delta_1 t} + \beta \cdot \mathrm{e}^{-\delta_2 t} \tag{3.6}$$

Donde t es equivalente al tiempo, A_t representa la absorbancia en cualquier tiempo, δ_1 y δ_2 son constantes de pseudo primer orden en donde en todos los casos $\delta_1 > \delta_2$, A_0 la absorbancia en tiempo cero, $\alpha + \beta = A_0$.

3.6 Proceso de obtención de antioxidante

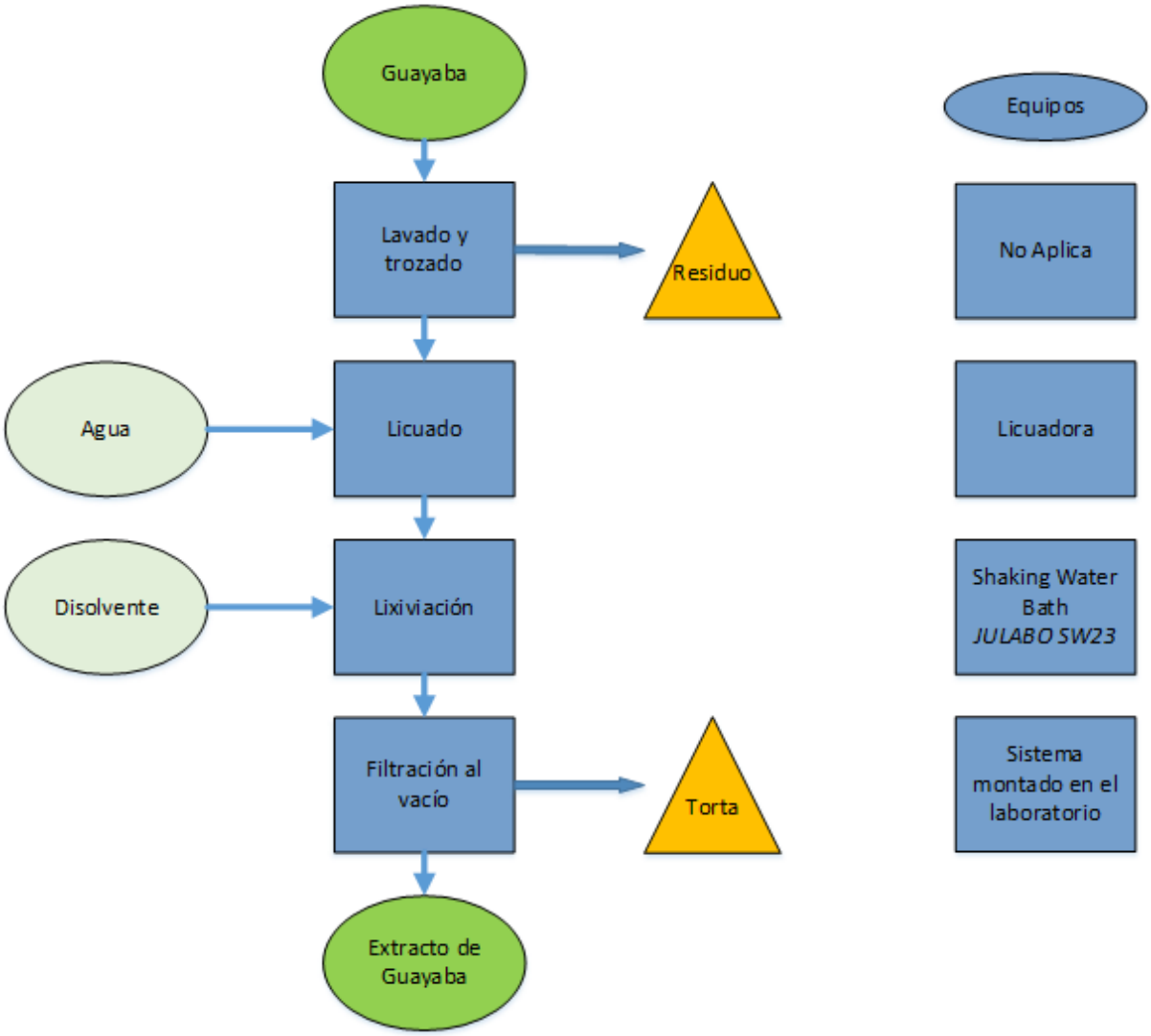

Figura 3.6 Proceso de obtención de compuestos antioxidantes.

3.6.1 Extracción solido-liquido (Lixiviación)

La extracción sólido-líquido es una operación unitaria de la ingeniería química que se usa en numerosos procesos industriales. Técnicamente, es una operación de transferencia de masa o materia, que consiste en la remoción de uno o varios compuestos deseados (el soluto) presente en la fase portadora o matriz sólida utilizando un líquido o una mezcla, el disolvente, que tiene la capacidad de disolver el soluto, los sólidos insolubles se denominan “inerte”. La operación recibe también el nombre de lixiviación (Cesar, 2008).

El proceso implica la agitación del sistema, sin importar de cuantas etapas se diseñe el proceso. En el periodo donde se mezclan el disolvente y el material de extracción ocurren 3 etapas: primero, el ingreso del disolvente a la matriz de extracción (sustrato) y solubilización. Segundo, movimiento de la disolución desde el interior hacia la superficie, por último, la migración de la disolución en la mayoría del disolvente. En la Figura 3.7 se muestra el esquema de extracción sólido-liquido (Quirós Blanco, 2016, Takeuchi *et al.*, 2009).

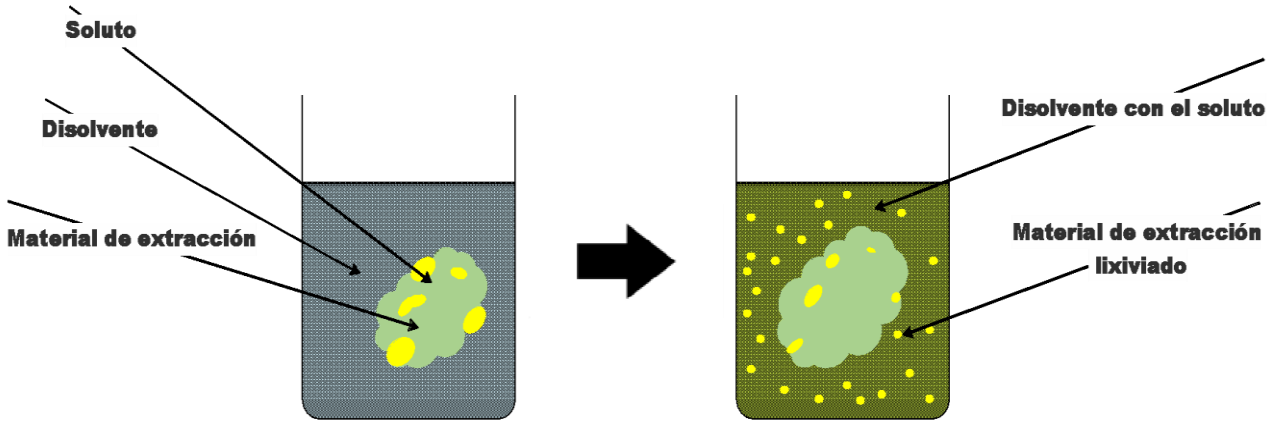

Figura 3.7 Esquema de la extracción solido-liquido; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha).

Los procesos de extracción son el primer paso en la separación de compuestos (antioxidantes, vitaminas, nutrientes, colorantes, etc.). La composición y la naturaleza de la sustancia determina la elección de las condiciones de extracción. Debido a la variedad de compuestos antioxidantes presente en vegetales, resulta difícil desarrollar un proceso capaz de recuperar todos los antioxidantes. Los factores más importantes que influyen en la extracción sólido-líquido son: tipo de disolvente, relación disolvente/sólido, temperatura, área de contacto, tamaño de partícula y pH del medio. (Kong *et al.*, 2010, Takeuchi *et al.*, 2009).

Disolvente

Para la extracción de antioxidantes y nutrientes en la fruta de guayaba, se emplean disolventes orgánicos puros o mezclas tales como: Etanol acuoso, con agua en diversas proporciones (Musa *et al.*, 2011, Verma *et al.*, 2018). También se utiliza metanol acuoso, en algunas ocasiones acidificado (Restrepo-Sánchez *et al.*, 2009). El etanol es uno del disolvente más empleado para la extracción de antioxidantes como flavonoides, ácidos fenólicos; y al compararlo con metanol no hay diferencias significativas (Prasad *et al.*, 2009). Según Verma *et al.* (2018) reportó que el etanol al 50% comparado con metanol y acetona a diferentes concentraciones fue el mejor resultado en la extracción de antioxidantes.

Según la clasificación de solventes orgánicos (FDA, 2017), los solventes clase 3 (Refiere a solventes de baja toxicidad): son etanol, acetona y acetato de etilo, y pueden ser empleados en el procesamiento de alimentos o fármacos cumpliendo la buenas prácticas de manufactura y se conocen como solventes GRAS (Generalmente es reconocido como seguro).

Relación disolvente-soluto

De acuerdo a los Fundamentos de transferencia de masa, la fuerza motriz que produce el movimiento de partículas es el diferencial de concentración del producto de interés que existe entre el sólido y el disolvente, el cual es mayor cuando se utiliza una mayor relación Solvente/Soluto (S/S). Por consiguiente, una mayor relación S/S nos dará mayor extracción. No obstante, considerando que el costo de los solventes repercute en el proceso de extracción y a la vez influye en los costos de concentración y secado (etapas posteriores) se debe analizar y optimizar la relación S/S (Takeuchi *et al.*, 2009, Treybal, 1980).

Temperatura

La temperatura es un factor importante ligado al proceso de extracción que debe ser analizado con precisión y detalle, además está muy relacionado en la efectividad de la extracción y posee un rol crucial en los aspectos económicos del proceso para una aplicación industrial (Quirós Blanco, 2016).

En general se ha reportado que altas temperaturas mejoran la eficiencia de la extracción, debido a que aumenta la solubilidad y la difusión de los compuestos de interés hacia el disolvente. Sin embargo, en la extracción de compuestos antioxidantes y nutrientes es necesario analizar la estabilidad en altas temperaturas. En el caso de las antocianinas y la vitamina C a temperaturas mayores a 50°C, se incrementa el proceso de degradación. Para la extracción de compuestos termosensibles se recomienda el uso de bajas temperaturas y altos tiempos de extracción, por lo tanto, deben ser estudiadas para cada sistema específico de extracción para maximizar los rendimientos y en algunos casos satisfacer los aspectos económicos (Dai *et al.*, 2009).

Tiempo de contacto

El tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento, pero ha sido un parámetro mucho menos estudiado. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 min a 24 horas. Es importante resaltar que a menor tiempo contacto se puede minimizar la degradación del compuesto antioxidante (Pacheco, 2015, Price *et al.*, 2008).

4 Hipótesis

Hipótesis nula 1

H_{o1}: Ninguno de los factores considerados en el proceso de lixiviación afecta significativamente la eficiencia antioxidante de los extractos de guayaba.

Hipótesis alternativa 1

H_{a1}: Al menos uno de los factores afecta significativamente la eficiencia antioxidante de los extractos de guayaba.

Hipótesis nula 2

H_{o2}: No hay un tratamiento (combinación de niveles) en las condiciones de lixiviación que afecte de forma significativa la eficiencia antioxidante en los extractos de guayaba.

Hipótesis alternativa 2

H_{a2}: Al menos uno de los tratamientos en las condiciones de lixiviación afecta significativamente la eficiencia antioxidante en los extractos de guayaba.

Hipótesis nula 3

H_{o3}: La constante cinética de velocidad de los extractos de guayaba está en el rango de las constantes cinéticas de antioxidantes comunes (Vitamina E, BHA, BHT).

$$H_{o3} : k_{2,BHT} \leq k_{2,guayaba} \leq k_{2,VitE}$$

Hipótesis alternativa 3H_{a3}: La constante cinética de velocidad de los extractos de guayaba está fuera del rango de las constantes cinéticas de antioxidantes comunes (Vitamina E, BHA, BHT).

$$H_{a3} : k_{2,guayaba} \leq k_{2,BHT}, k_{2,VitE}$$

5 Metodología

5.1 Material Vegetal

En este estudio se trabajó con dos variedades de guayaba (Taiwanesa I y Agria), se adquirieron en los mercados locales de la ciudad de Managua. Estudios evidenciaron que este vegetal tiene abundantes nutrientes (vitaminas, proteínas, etc.), compuestos antioxidantes, resultando en un alto valor nutricional y, por ende, el vegetal elegido para la presente investigación.

5.2 Etapas del estudio

El presente estudio consta de dos etapas. La primera etapa consistió en la aplicación del método de cribado que tiene como objetivo identificar los factores de lixiviación en la eficiencia antioxidante en los extractos de guayaba Taiwanesa 1 y guayaba Agria.

En la segunda etapa, fueron analizados los resultados correspondientes a la aplicación del método de cribado, donde se obtuvieron los factores que influyeron significativamente en el proceso de lixiviación, con los cuales se hizo un diseño experimental a ANOVA para determinar las condiciones que contribuyeron a la obtención de antioxidantes.

Posteriormente, con los extractos de las dos variedades de guayaba con mayores EA, se determinaron los modelos cinéticos de la degradación del DPPH. Por último, se hizo una comparación de la eficiencia antioxidante de los extractos con dos compuestos antioxidantes de uso comercial.

5.3 Determinación de los Factores que influyen significativamente en el proceso de lixiviación (Método de cribado)

Para cumplir con el primer objetivo específico se llevó a cabo un Diseño Experimental de Cribado. Se identificaron los factores más importantes a estudiar para determinar las mejores condiciones de lixiviación que permitieron obtener los extractos con el mayor contenido de Antioxidante.

En la Tabla 5.1 se detallan los factores identificados de acuerdo con la revisión bibliográfica y los niveles propuestos para crear el diseño experimental:

Tabla 5.1 Diseño Experimental de Cribado propuesto para identificar los factores que influyen significativamente en la lixiviación de antioxidantes de la guayaba.

Factor	Nivel Bajo	Nivel Alto
Temperatura	30 °C	50 °C
Tiempo	1 hora	2 horas
Agitación	60 rpm	120 rpm
Disolvente	Acetona	Etanol
Relación Sólido/Solvente	1:10	1:5
Concentración del Disolvente en Agua	35% v/v	70% v/v
Variedad de Guayaba	Agria	Taiwanesa

Con esta información, se diseñó una matriz de experimento de Cribado usando el software *Minitab® 18*, donde se tuvieron dos alternativas: escoger un diseño Plackett-Burman de resolución III con 12 experimentos o seleccionar un ANOVA Factorial fraccionado $^{1}/_{16}$ de resolución III con 8 experimentos. Se seleccionó el Diseño de Plackett-Burman debido a que al incluir más experimentos reduce el sesgo de atribuir significancia a un factor cuando en realidad no la hay, debido al error aleatorio.

Se obtuvo la Tabla 5.2 con la que se realizaron los experimentos aleatorizados:

Tabla 5.2 Matriz de Experimento de Cribado para estudiar los factores que influyen en la extracción de antioxidantes de dos variedades de guayaba

Orden de Exp.	Temp. (°C)	Tiempo (horas)	Agitación (rpm)	Disolvente	Relación SS	Relación VV	Variedad de Guayaba	Eficiencia Antioxidante (mg de sólidos/g DPPH)
3	30	2	120	Acetona	0.2	35	Taiwanesa	
5	50	2	60	Etanol	0.2	35	Agria	
4	50	1	120	Etanol	0.1	70	Taiwanesa	
9	30	1	60	Etanol	0.2	70	Taiwanesa	
1	50	1	120	Acetona	0.1	35	Agria	
7	30	2	120	Etanol	0.1	70	Agria	
2	50	2	60	Etanol	0.1	35	Taiwanesa	
8	30	1	120	Etanol	0.2	35	Agria	
11	30	2	60	Acetona	0.1	70	Agria	
12	30	1	60	Acetona	0.1	35	Taiwanesa	
10	50	1	60	Acetona	0.2	70	Agria	
6	50	2	120	Acetona	0.2	70	Taiwanesa	

5.4 Operaciones del proceso de extracción del extracto de guayaba

En la Figura 3.6 se representan las etapas del proceso necesarias para la obtención del extracto de guayaba. Los cálculos y valores del extracto se establecieron en base a 20g y 40g de guayaba desde la primera operación unitaria hasta la final. El extracto obtenido se sometió a análisis de DPPH, donde el extracto y DPPH reaccionaron hasta obtener el valor de EC_{50}. El vegetal se procesó hasta obtener un extracto, involucrando las siguientes operaciones: tratamiento del vegetal para obtener un puré acuoso, lixiviación, finalmente filtrado.

5.4.1 Acondicionamiento del vegetal

Lavado y trozado: El vegetal se lavó con agua destilada para remover cualquier tipo de partículas extrañas, además, se descartó toda aquella fruta que presentó daños o deformidad en su piel. Posteriormente se pesó y se almacenó (máximo 1 días) para no comprometer los resultados de la investigación.

Licuado: El vegetal lavado y aceptado se trozó en partes pequeñas y posteriormente fue licuado con la finalidad de obtener un puré acuoso, para facilitar el proceso de lixiviación.

5.4.2 Lixiviación

En la etapa de lixiviación: primeramente, al extracto se le adicionó el solvente (etanol o acetona) y agua destilada según la concentración establecida. Estos parámetros fueron elegidos con base en las investigaciones y criterios de selección explicados en la sección 3.6.1 *Extracción sólido-líquido (Lixiviación)*. Los parámetros de operación de la lixiviación están descritos en la Tabla 7.1 Estos parámetros varían en cada uno de los doces experimentos a realizarse como se describe en la Tabla 5.2.

Se adicionaron 20 o 40 gramos de guayaba (Taiwanesa I o Agria) a una solución acuosa del solvente (etanol o acetona) de concentración (35% o 70% v/v) en una proporción de (1:10 o 1:5 soluto/solvente), los cuales se depositaron en un Erlenmeyer de 500 ml. La mezcla resultante se sometió a un baño térmico durante un máximo de 2 horas y con agitaciones de 60 o 125 rpm. Este proceso se realizó en una plancha térmica con agitación, adaptada como baño maría.

5.4.3 Filtrado

En esta operación la muestra resultante del lixiviado se filtró al vacío separando los sólidos insolubles de la disolución y obteniendo una disolución libre de partículas insolubles y fibras que puedan interferir en los análisis. El sistema fue montado con un matraz Kitasato, una bomba de vacío y papel filtro, como se muestra en la Figura 5.1.

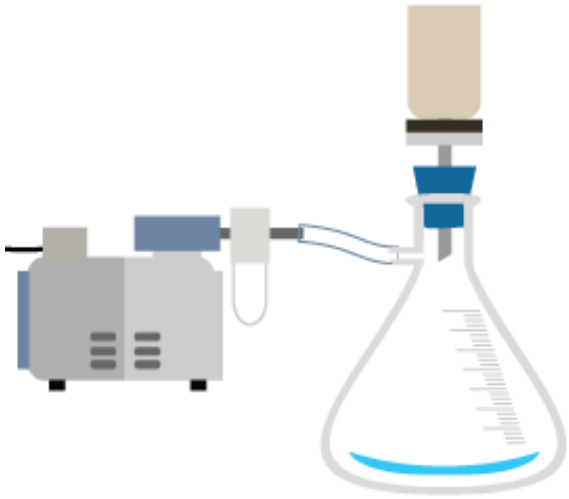

Figura 5.1 Esquema del montaje para el sistema de filtración al vacío

5.5 Método para la medición de la eficiencia antioxidante

Para la determinación de la eficiencia antioxidante, primeramente, se determinó la concentración de sólido presente en el extracto. Esto se realizó colocando 10 ml de extracto en un plato de aluminio. La parte líquida se evaporó a una temperatura de 80ºC en un Horno convectivo. El sólido permaneció adherido en las paredes y base del plato de aluminio. Finalmente, por diferencia de masa se obtuvo la cantidad de sólido, por ende, la concentración del extracto.

A continuación, se preparó 100 ml de una solución madre 0.025 mg/ml de DPPH en alcohol etílico grado analítico. Seguidamente, se preparó una serie de soluciones a diferentes concentraciones a partir de la concentración del extracto inicial, con el objetivo de encontrar la concentración de sólido que reduzca el 50% de la concentración inicial del DPPH EC_{50}.

Los ensayos se realizaron en una cubeta de vidrio de 5 ml, depositando 3 ml de la solución madre de DPPH y 1 ml de cada una de las concentraciones del extracto, en ensayos experimentales separados. La disminución de absorbancia se registró en un espectrofotómetro *Uvikon 810 Kontron*, por un lapso de tiempo de 600 segundos, con mediciones en intervalos de 30 segundos. Cada una de las concentraciones preparadas a partir del extracto inicial se hicieron reaccionar frente a la solución madre de DPPH y se obtuvieron perfiles de absorbancias tal como se muestra en la Figura 5.2.

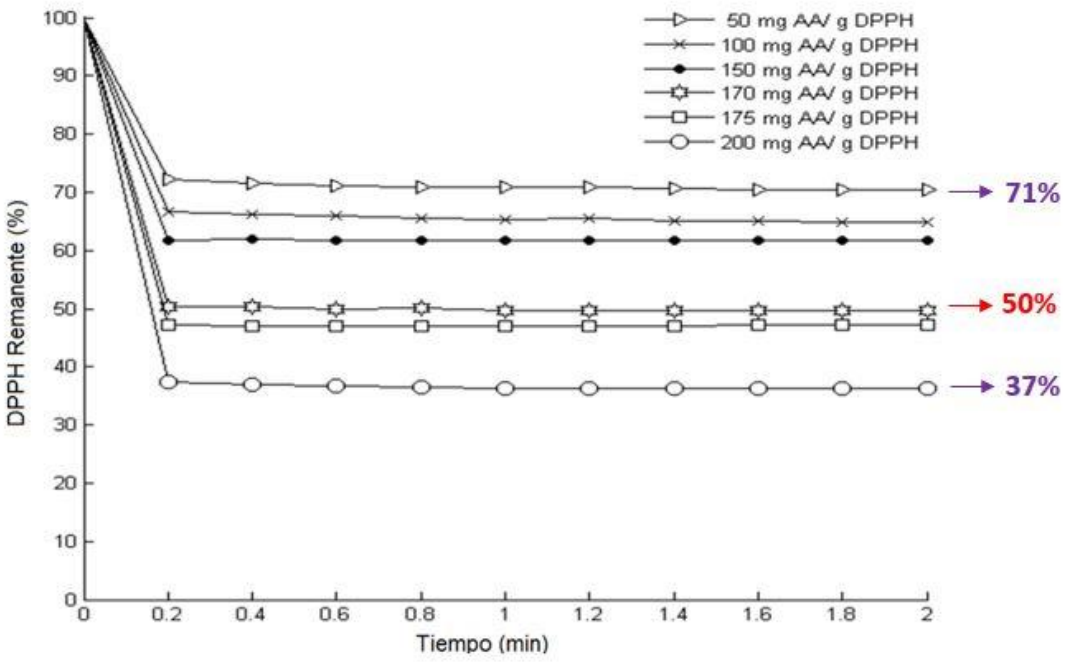

Figura 5.2 Concentración remanente de DPPH frente a diferentes concentraciones de vitamina C, Antioxidante. (Martínez y Talavera, 2018)

En la Figura 5.2 se muestran perfiles de absorbancias resultantes de la reacción entre el DPPH y vitamina C. se puede observar que la curva con 50 mg AA/ mg DPPH solo logró disminuir el 29% de la concentración inicial de DPPH. Por otro lado, se puede observar que la curva con 200 mg AA/ mg DPPH logró disminuir el 63% de la concentración inicial de DPPH. Por último, se observa que la curva 170 mg AA/mg DPPH logró disminuir el 50% de la concentración inicial de DPPH, siendo esta la meta a alcanzar.

5.6 Determinación de las mejores condiciones que maximizan la extracción de antioxidantes en proceso de lixiviación.

Para la segunda etapa del estudio se consideró solamente los factores que influyeron significativamente en la eficiencia antioxidante, resultantes de la aplicación del método de cribado (primera etapa del estudio). Seguidamente, se realizaron nuevos ensayos experimentales obteniendo un extracto lixiviado, el cual se sometió a la determinación de la eficiencia antioxidante a través del método radical libre *2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH),* y por último se realizó un estudio de la cinética para determinar el comportamiento de inhibición del radical DPPH. El método DPPH es empleado comúnmente para la medición de la eficiencia antioxidante en diversas investigaciones (Kedare y Singh, 2011, Martínez y Talavera, 2018, Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

El rango de factores significativos en la etapa de lixiviación, resultante del análisis realizado en la primera etapa del estudio (método de cribado), puede variar en 2-4, en la Tabla 5.3 se muestran los posibles resultados. Estos resultados se utilizaron en la segunda fase.

Tabla 5.3 Ensayos experimentales de la etapa 2 del estudio.

Factor	Niveles	Valores		
Temperatura (°C)	3	40	55	70
Disolvente	2	Etanol		Acetona
Variedad de Guayaba	2	Taiwanesa 1		Agria

En la segunda etapa del estudio se repitió el mismo proceso de la primera etapa (Acondicionamiento del vegetal, lixiviación y filtrado) con la diferencia que se enfocara en los factores que influyen significativamente en la EA. Los experimentos están establecidos en la tabla 5.3.

5.7 Determinación de la cinética antioxidante

El estudio cinético se realizó para observar el comportamiento de la reacción que se da entre los extractos de las especies de guayaba Taiwanesa I y Agria frente al compuesto radical DPPH, para determinar la velocidad con que ambos reaccionan.

Para este análisis se consideró la constante de reacción de segundo orden ya que investigaciones previas han comprobado que la ley de velocidad para la reacción que se da entre un antioxidante frente al DPPH siguen la cinética de reacción de segundo orden a una temperatura dada (Leal Alturo, 2012b, Martínez y Talavera, 2018).

Se preparó una solución madre de DPPH con una concentración 0.025 mg/ml, utilizando alcohol etílico. Posteriormente, del extracto con concentración ya determinada en la sección 5.5 primer párrafo, se prepararon cuatro soluciones a diferentes concentraciones, por el método de dilución.

- La primera solución de antioxidantes se preparó de manera que disminuya entre 10-30% la concentración inicial de DPPH.
- La segunda solución de antioxidantes disminuyó entre 30-50% de la concentración inicial de DPPH.
- La tercera solución de antioxidantes disminuyó entre 50%-70%, de la concentración inicial de DPPH.
- Por último, la cuarta solución disminuyó entre 70-100% de la concentración de DPPH. En la Figura 5.6 se muestra un ejemplo, cabe destacar que estos experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con mediciones de absorbancia cada 30 segundos, por un lapso de tiempo de 600 segundos.

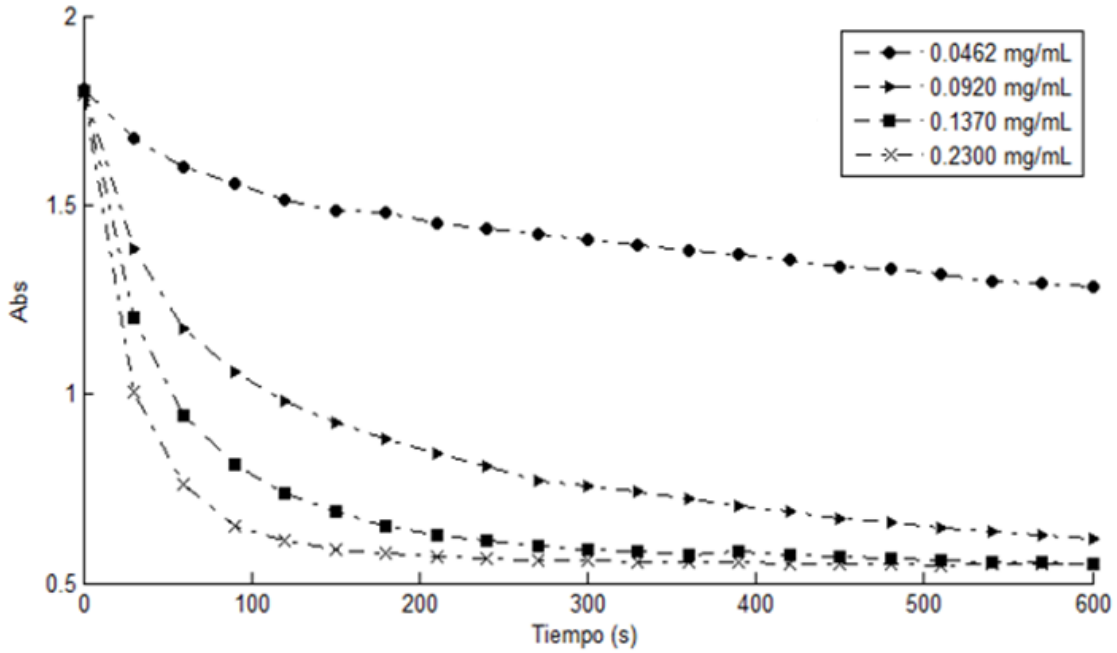

Figura 5.3 Comportamiento de datos experimentales para la reacción entre la mezcla de antioxidantes contenidos en el extracto de hojas de *Moringa* oleífera frente a DPPH (Martínez y Talavera, 2018).

Cada curva que se muestra en la Figura 5.3, se ajustó al modelo bi-exponencial que se muestra en la Ecuación 5.1

$$A = ae^{-k_1 t} + be^{-k_2 t} \tag{5.1}$$

Donde A es la absorbancia, k_1 y k_2 son constantes de velocidad de pseudo primer orden, t es el tiempo, a y b son constantes.

La reacción entre DPPH y antioxidante es representada en la Ecuación 5.2.

$$\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right]+\left[\mathrm{AH}\right]\rightarrow\left[\ \mathrm{DPPH\text{-}H}\right]+\left[\ \mathrm{A}^{\bullet}\ \right] \tag{5.2}$$

La velocidad para la reacción que se muestra en la Ecuación 5.2 es representada por una cinética de segundo orden como se muestra el Ecuación 5.3.

$$\frac{d\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right]}{dt}=-k_2\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right]\left[\mathrm{AH}\right] \tag{5.3}$$

Si consideramos que $\left[\mathrm{AH}\right]_{\circ}\gg\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right]$ por teoría cinética, podemos considerar que la reacción que se muestra en la Ecuación 5.2 sigue una cinética de pseudo primer orden.

En la Ecuación 5.3 se muestra que la disminución de la concentración de $DPPH^{\bullet}$ dependerá de la concentración del radical DPPH y los antioxidantes. Si consideramos que la concentración inicial de antioxidantes es mucho mayor que la concentración inicial del radical DPPH, de manera que $\left[\mathrm{AH}\right]$ no cambia en el tiempo, la Ecuación 5.3 puede ser escrita como:

$$\frac{d\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right]}{dt}=-k_2\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right]\left[\mathrm{AH}\right]=-k_{pseudo}\left[\ \mathrm{DPPH}^{\bullet}\ \right] \tag{5.4}$$

Considerando que $k_{pseudo}=k_1+k_2$ y graficando k_{pseudo} vs $\left[\mathrm{AH}\right]_{o}$, como se muestra en la Figura 5.4 Finalmente, obtenemos una recta en la cual según la Ecuación 7.4, la constante de velocidad k_2 es representada por la pendiente.

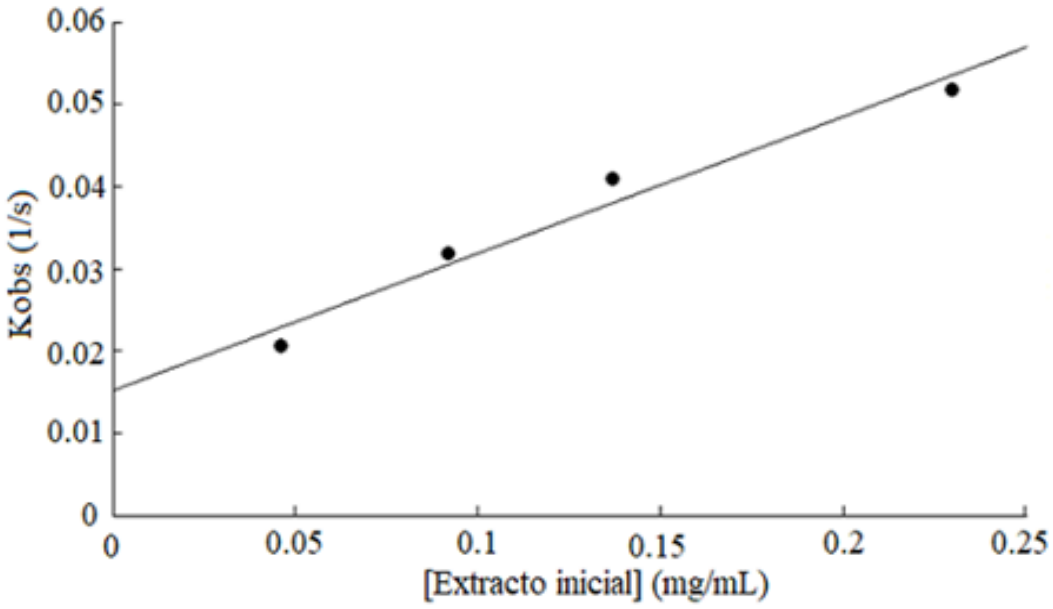

Figura 5.4 Relación de la constante de pseudo primer orden y la concentración inicial del extracto de la hoja de *Moringa* oleífera. (Martínez y Talavera, 2018).

5.8 Comparación de la eficiencia antioxidante de la guayaba con antioxidantes de referencia comercial.

De los resultados obtenidos en los análisis de la eficiencia antioxidante aplicados a la guayaba Taiwanesa y Agria se comparó el mejor resultado obtenido con algunos productos comerciales: quercetina y ácido tánico, con el objetivo de demostrar que el extracto está dentro del rango aceptable como aditivo antioxidante para aplicaciones en alimentos, suplemento, medicina, etc.

Para cumplir con el cuarto objetivo específico, se realizaron ensayos experimentales en el espectrofotómetro vs DPPH con soluciones de quercetina y ácido tánico, respectivamente, para encontrar el valor de EC_{50}, T_{EC50} y el valor de eficiencia antioxidante. Posteriormente, se compararon los resultados, con los valores obtenidos de los extractos de guayaba Agria y guayaba Taiwanesa 1.

6 Resultados y Discusión

En esta sección se evaluó el efecto de los parámetros de lixiviación en la eficiencia antioxidante (EA) de la guayaba variedad taiwanesa 1 y agria. Para tal fin, se establecieron dos etapas en el estudio, primeramente, un cribado fraccionado con siete factores y un posterior estudio con las variables que influyen más en el proceso. Además, se realizó el estudio de la cinética de degradación de la mezcla de antioxidantes obtenidos en los extractos frente al radical libre DPPH. Por último, se realizó una comparación de los mejores extractos que presentaron una alta EA en ambas variedades de guayaba con las EA de dos antioxidantes comerciales (ácido tánico y quercetina).

6.1 Factores que influyen en la Eficiencia Antioxidante durante el proceso de lixiviación

En la Tabla 6.1 se observan las configuraciones de siete factores para 12 corridas experimentales, junto a su respectivo valor de eficiencia antioxidante. Para la construcción de este diseño experimental se utilizó el método de cribado, que consiste en la reducción del número de experimentos respecto al diseño factorial completo, a través de un fraccionamiento de la cantidad de ensayos iniciales.

Tabla 6.1 Resultados de la Matriz de Experimento de Cribado.

Orden de Exp.	Temp. (°C)	Tiempo (horas)	Agitación (rpm)	Disolvente	Relación SS	Relación VV	Variedad de Guayaba	Eficiencia Antioxidante (mg de sólidos/g DPPH) $*10^3$
3	30	2	120	Acetona	0.2	35	Taiwanesa	0. 26778
5	50	2	60	Etanol	0.2	35	Agria	0. 24430
4	50	1	120	Etanol	0.1	70	Taiwanesa	0. 25033
9	30	1	60	Etanol	0.2	70	Taiwanesa	0. 21269
1	50	1	120	Acetona	0.1	35	Agria	0. 24900
7	30	2	120	Etanol	0.1	70	Agria	0. 12850
2	50	2	60	Etanol	0.1	35	Taiwanesa	0. 26940
8	30	1	120	Etanol	0.2	35	Agria	0. 21259
11	30	2	60	Acetona	0.1	70	Agria	0. 14395
12	30	1	60	Acetona	0.1	35	Taiwanesa	0. 23585
10	50	1	60	Acetona	0.2	70	Agria	0. 34477
6	50	2	120	Acetona	0.2	70	Taiwanesa	0. 31313

A partir de las EA proporcionadas en la Tabla 6.1, para cada corrida experimental, se realizó un análisis estadístico para identificar los factores que influyen significativamente en la extracción

de antioxidantes de la guayaba. En la Figura 6.1 se muestra un diagrama de Pareto con efectos estandarizados para los siete factores considerados en el cribado.

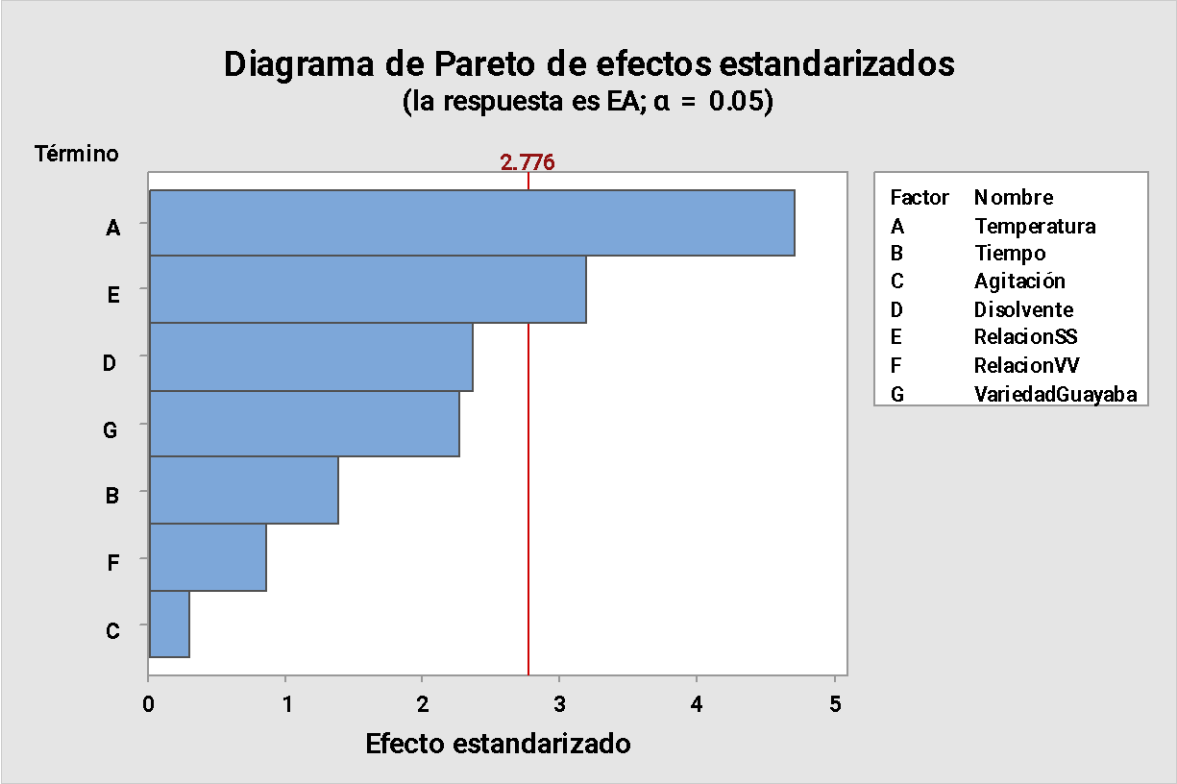

Figura 6.1 Resultados del experimento de cribado para identificar factores significativos.

La Figura 6.1 muestra los siete efectos estandarizados para los siete factores considerados en la Tabla 6.1. Se puede observar que los factores temperatura (A) y relación sólido-solvente (E) se encuentran por encima de la línea de referencia (línea color rojo), por lo tanto, indicando que estos parámetros son estadísticamente significativos en el proceso de lixiviación con un nivel de significancia de 0.05.

Por otro lado, siempre en la Figura 6.1 podemos visualizar que los factores están ubicados de menor a mayor importancia (a mayor tamaño del rectángulo mayor nivel de importancia), y que los factores, disolvente (D) y variedad de guayaba (G), a pesar de no ser tan relevantes como los dos primeros, se encuentran alejados de los factores B, F y C.

Cabe destacar que, aunque el factor sólido-solvente (E) resultó significativo en la extracción de antioxidantes, fue descartado en el posterior análisis, debido a que en este caso es conveniente realizar un estudio de optimización. Por otro lado, en la Tabla 6.2 se observan los valores de los siete factores que arrojaron el mejor resultado de EA, lo que permitió fijar un valor adecuado para cada factor no considerado en los análisis posteriores.

Tabla 6.2 Predicción de respuesta múltiple para el diseño de cribado.

Variable	Valor	Unidades
Temperatura	50	°C
Tiempo	1	H
Agitación	60	Rpm
Disolvente	Etanol	-
Relación SS	0.2	-
Relación VV	35	%
Guayaba	Taiwanesa	Variedad
EA	0.365E-3	mg de sólidos· (g de DPPH · min)$^{-1}$

La Tabla 6.2 muestra los valores de los factores para la mayor EA obtenida del diseño experimental de cribado, siendo estos valores el punto de partida para la segunda etapa del estudio. Los valores óptimos encontrados con el software Minitab fueron: 50°C de temperatura, tiempo y agitación de 1 hora y 60 rpm, etanol como disolvente, guayaba de variedad taiwanesa, relación SS y VV de 0.2 y 35, respectivamente.

Con los resultados obtenidos se establecieron tres factores de estudio para la próxima etapa: diseño factorial con 3 factores: temperatura, disolvente y variedad de guayaba. Se definieron tres niveles para la temperatura (40, 55 y 70°C) ya que al ser la variable más importante se buscaba el valor más adecuado en un mayor rango de temperaturas; dos niveles para disolvente (etanol y acetona) y dos niveles para la variedad de guayaba (taiwanesa 1 y agria). Por lo que al final se obtuvo un diseño factorial mixto.

Los demás parámetros como tiempo, agitación, etc., se fijaron basados en los resultados de la predicción de respuesta múltiple y están indicados en la tabla 6.2. A estos nuevos valores se le aplicaron un análisis estadístico ANOVA para encontrar las mejores condiciones de lixiviación en la extracción de antioxidantes.

6.2 Condiciones de lixiviación que contribuyen a la disminución en las pérdidas de Eficiencia Antioxidante.

En la Tabla 6.3 se muestra el resultado del diseño experimental para estudiar la influencia de la temperatura, tipo de solvente y la variedad de guayaba sobre la EA del extracto de guayaba.

En dicha tabla se observan 36 experimentos producto de la combinación tres temperaturas: 40, 55 y 70°C, dos tipos de solventes: acetona y etanol, y dos variedades de guayaba: taiwanesa y agria. También se puede observar que los experimentos fueron hechos de manera aleatoria, por ejemplo, para los experimentos 6, 18 y 30 se usó la temperatura de 55°C, etanol como solvente y guayaba agria. Es importante resaltar que los experimentos fueron hechos por triplicado.

Tabla 6.3 Resultados de los experimentos del diseño factorial.

Nº de experimento	**Temperatura °C**	**Solvente**	**Variedad de Guayaba**	**Eficiencia Antioxidante (mg de sólidos/g DPPH) *10³**		
				Replica #1	Replica #2	Replica #3
04, 16, 28	40	Acetona	Agria	0.135	0.140	0.137
03, 15, 27	40	Acetona	Taiwanesa1	0.230	0.218	0.213
09, 21, 33	70	Etanol	Taiwanesa1	0.232	0.231	0.228
11, 23, 35	70	Acetona	Taiwanesa1	0.256	0.253	0.255
06, 18, 30	55	Etanol	Agria	0.167	0.163	0.162
10, 22, 34	70	Etanol	Agria	0.194	0.193	0.191
12, 24, 36	70	Acetona	Agria	0.164	0.163	0.162
02, 14, 26	40	Etanol	Agria	0.154	0.148	0.150
01, 13, 25	40	Etanol	Taiwanesa1	0.201	0.205	0.199
07, 19, 31	55	Acetona	Taiwanesa1	0.257	0.253	0.255
05, 17, 29	55	Etanol	Taiwanesa1	0.274	0.281	0.278
08, 20, 32	55	Acetona	Agria	0.149	0.151	0.136

La Figura 6.2 muestra el diagrama de Pareto con los efectos estandarizados de los factores principales, junto con los efectos estandarizados de sus interacciones.

Se puede observar que todos los factores e interacciones resultaron estadísticamente significativos, con un nivel de confianza de 95%, siendo notoriamente dominante la variedad de guayaba (c). El segundo factor más importante fue la temperatura (A) la cual obtuvo importancias aproximadas a las interacciones temperatura-variedad de guayaba (AC) y disolvente-variedad de guayaba (BC). Por último, el factor con menos importancia fue el disolvente (B), junto a su interacción con la temperatura (AB) y la interacción de los tres factores (ABC). En la Figura 6.3 podemos observar la gráfica de cada uno de los efectos principales individuales versus la EA.

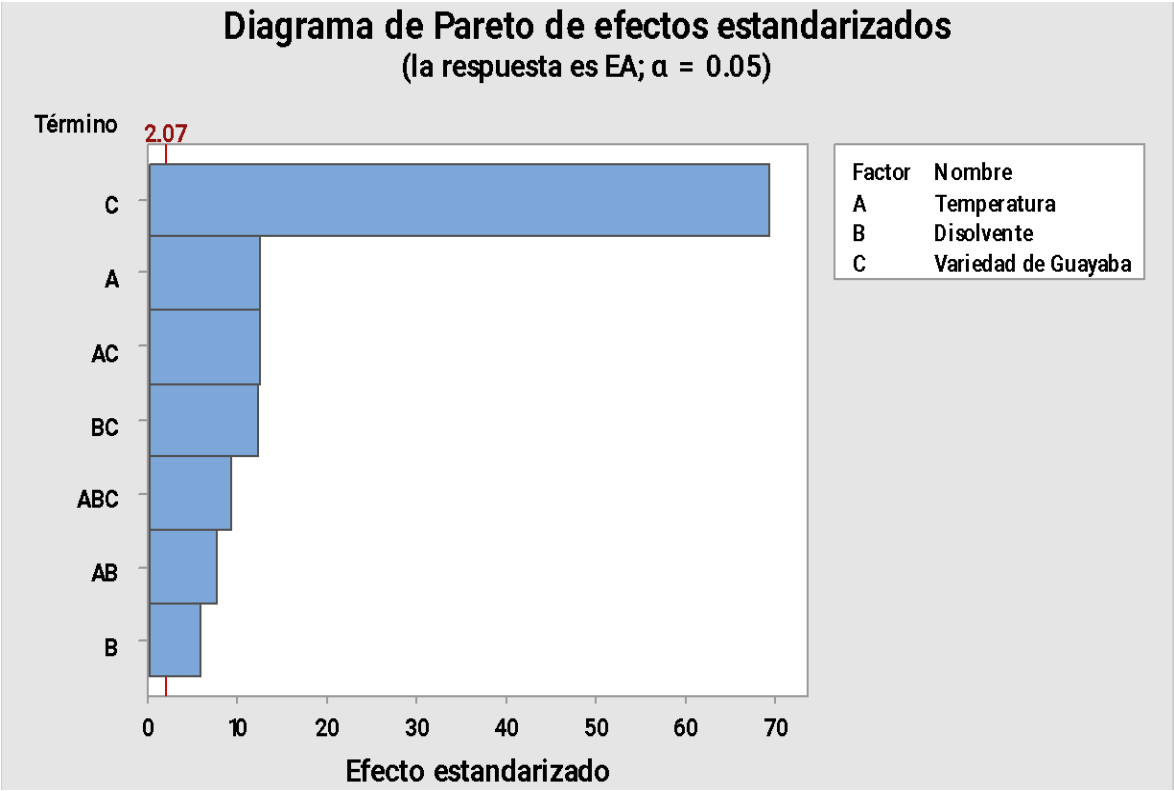

Figura 6.2 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para los resultados del diseño experimental de la Tabla 6.3.

En la Figura 6.3 podemos observar el aumento de la EA con el aumento de la temperatura (parte izquierda de la gráfica), esto debido a que la solubilidad de los antioxidantes aumenta con la temperatura. Además, es importante notar que existe un aumento notable de aproximadamente 16%, cuando la temperatura aumenta de 40 a 55°C, en comparación con el aumento de la EA cuando la temperatura aumenta de 55 a 70°C. Por otro lado, al aumentar la temperatura de 55 a 70°C existe un leve aumento en la EA, lo cual sería resultado de una mayor solubilidad de los antioxidantes, pero también se debe tomar en cuenta que existe una desnaturalización de estos al aumentar la temperatura.

En la parte central de la Figura 6.3 podemos observar que la EA determinada para los extractos utilizando etanol como disolvente es mayor que la EA de los extractos obtenidos utilizando acetona. Sin embargo, dicho aumento no sobrepasa el 10% lo que significa que la elección del solvente podría ser definida por otros aspectos como disponibilidad y costo. Esto convierte al etanol en la mejor opción como solvente, ya que, además de obtener mejor extracción de antioxidantes en la lixiviación también su costo de compra es menor que el costo de la acetona.

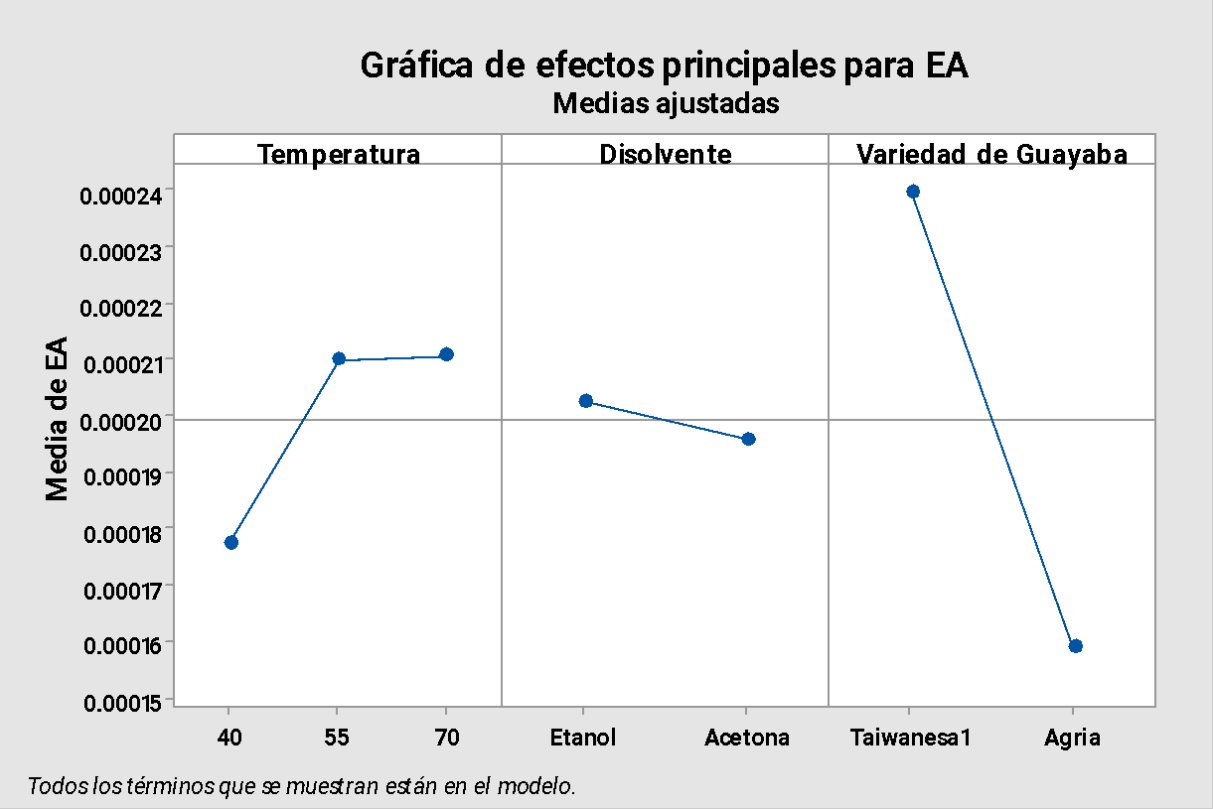

Figura 6.3 Gráfica de los efectos principales individuales para la EA.

Por último, observamos que la EA depende fuertemente de la variedad de guayaba, ya que la EA de la guayaba taiwanesa es aproximadamente un 46% mayor que la EA de la guayaba agria. Esto es congruente con la Figura 6.2 donde el efecto estandarizado de la variedad de la guayaba domina en magnitud sobre los otros efectos.

Debido a que los efectos de las interacciones de los tres factores son significativos es necesario analizar los efectos principales en conjunto. En la Figura 6.4 se muestra un gráfico de interacciones de los factores para la EA.

La Figura 6.4 muestra un análisis de las interacciones de los factores y su relación con la EA. Primeramente, se analizó las interacciones de la temperatura con la variedad de guayaba y el tipo de solvente, ya que según la Figura 6.2 estas interacciones presentan los efectos estandarizados más altos.

En la Figura 6.4 se puede observar que la interacción temperatura-variedad de guayaba (columna 1, fila 3) indica que la relación entre la temperatura y la EA dependen de la variedad de guayaba, ya que, las líneas del gráfico no son paralelas. Por lo tanto, al realizar una lixiviación con temperatura de 55°C y con matriz sólida de guayaba taiwanesa, se obtiene la media de la EA más alta.

Para la interacción temperatura-disolvente (columna 1, fila 2, de la Figura 6.4) se puede concluir que la relación entre la temperatura y la EA depende del tipo del solvente. Por ejemplo, cuando se realiza la lixiviación a 40°C las EA obtenidas para ambos solventes son similares, mientras que cuando la temperatura de lixiviación aumenta a 55°C la mejor EA es obtenida utilizando etanol como solvente.

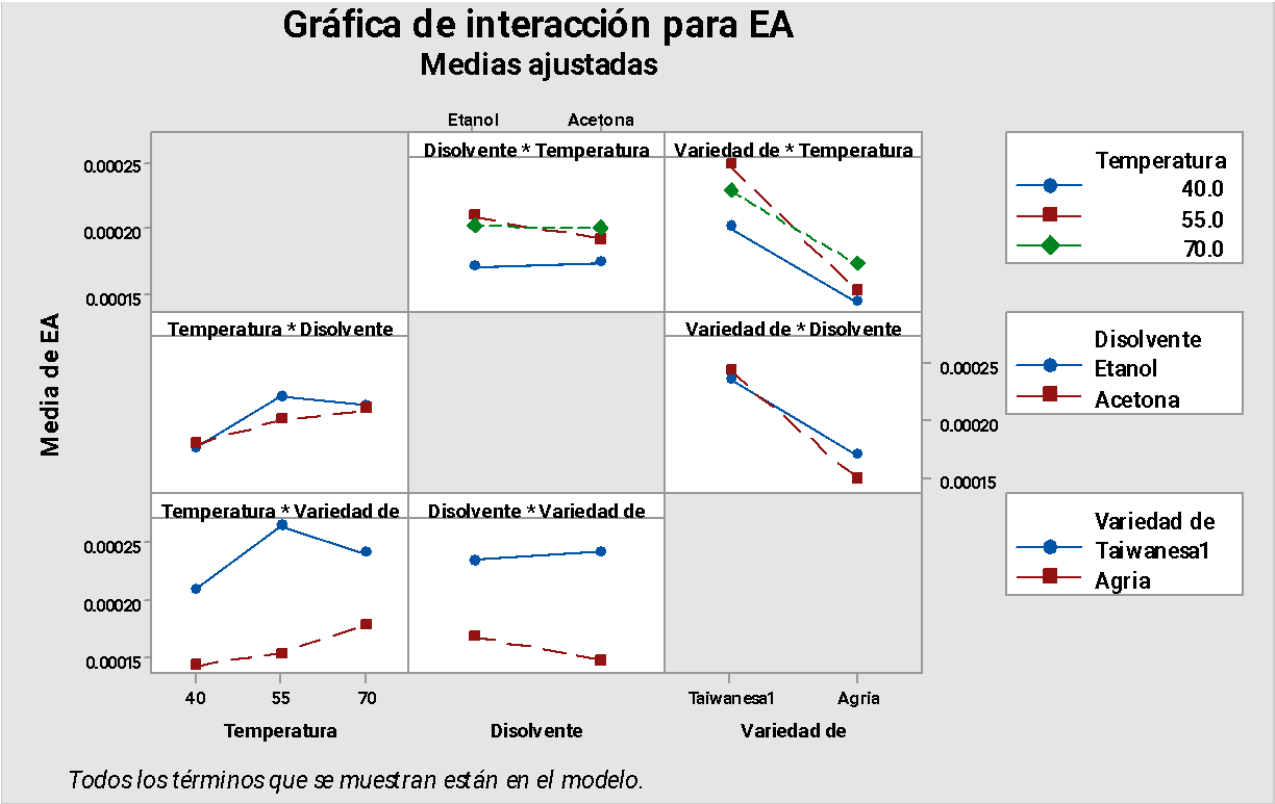

Figura 6.4 Interacciones de los factores para medias ajustadas de EA.

En el caso de la interacción entre el disolvente y la variedad de guayaba (columna 2, fila 3, de la Figura 6.4) es muy claro que la relación entre el tipo de solvente y la EA depende totalmente de la variedad de guayaba. Por tanto, se puede verificar que la EA obtenida del extracto de guayaba taiwanesa es siempre mayor que la EA del extracto de guayaba agria, independientemente del disolvente.

Siempre en la Figura 6.4 podemos observar que entre 55 y 70°C (columna 2, fila 1) no existe una clara dependencia de la temperatura en la relación solvente-EA, mientras que para 40 y 55°C la relación solvente-EA si dependen de la temperatura. Para las demás interacciones de la Figura 6.4 se puede concluir que las dependencias de las relaciones factores-EA no son claras, ya que las rectas tienen pendientes similares.

De todo lo discutido anteriormente podemos concluir que la mejor combinación de niveles en las que se obtiene la mayor EA es a una temperatura de 55 °C, usando etanol al 35% como solvente y con la variedad de guayaba Taiwanesa I. Esto se confirma usando la herramienta de Minitab para encontrar la respuesta que optimiza la EA, la cual se muestra en la figura 6.5

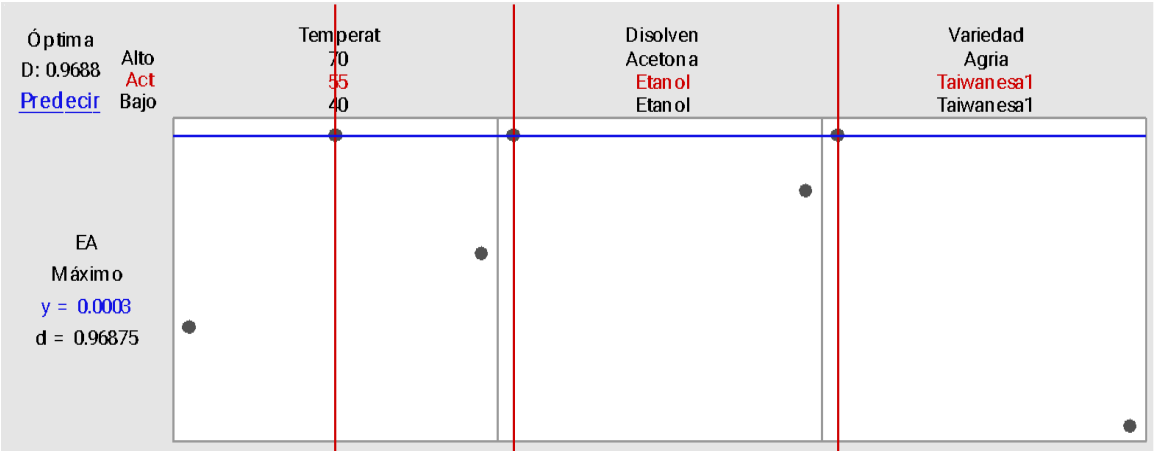

Figura 6.5 Optimizador de respuesta para los resultados del diseño factorial mixto

6.2.1 Comparaciones por parejas de Tukey: Temperatura

En la Tabla 6.4 se muestra el análisis estadístico de Tukey para determinar las diferencias significativas de los niveles de cada factor en relación a los valores de EA.

Tabla 6.4 Análisis de significancias para los efectos principales

Temperatura	**N**	**Media**	**Agrupación[a]**	
70	12	0.0002106	A	
55	12	0.0002099	A	
40	12	0.0001772		B
Disolvente	**N**	**Media**	**Agrupación**	
Etanol	18	0.0002026	A	
Acetona	18	0.0001959	A	
Variedad de Guayaba	**N**	**Media**	**Agrupación**	
Taiwanesa1	18	0.0002398	A	
Agria	18	0.0001588		B

[a] Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En la Tabla 6.4 se puede observar la comparación de los tres efectos principales según sus niveles. Primeramente, podemos verificar que las temperaturas de 70 y 55°C están agrupadas con la letra A, y la temperatura de 40°C agrupada con la letra B, lo que indica que existen diferencias significativas entre el nivel más bajo y los niveles medio y alto de temperatura. Esto nos lleva a concluir que la mejor temperatura de trabajo es 55°C ya que, generaría menos consumo energético que trabajar a 70°C y mejores resultados de extracción que la temperatura de 40°C.

En el caso de la comparación de disolventes, siempre en la Tabla 6.4, se puede verificar que ambos disolventes son agrupados con la letra A, lo que significa que no existe diferencia

significativa entre ambos. Por tanto, la mejor opción es usar etanol, ya que este tiene menor costo en comparación con la acetona, y se obtendrían los mismos resultados de EA.

Por último, con respecto a la variedad de guayaba, podemos observar que ambas variedades fueron agrupadas con diferentes letras, lo que significa que existe diferencia significativa entre ellas. Por tanto, la variedad de guayaba con mayor eficiencia antioxidante en su extracto es la guayaba taiwanesa, según podemos verificar en la Figura 6.3. Estos resultados fueron determinados utilizando el método de Tukey, con intervalo de confianza de 95%.

6.3 Evaluación de la cinética de degradación del DPPH debido a la acción de los antioxidantes del extracto de guayaba para la variedad Taiwanesa 1 y Agria.

En la Figura 6.6 se muestran perfiles de concentración del radical DPPH producto de reacción con mezclas de compuestos antioxidantes a diferentes concentraciones, obtenidos de la guayaba agria y taiwanesa.

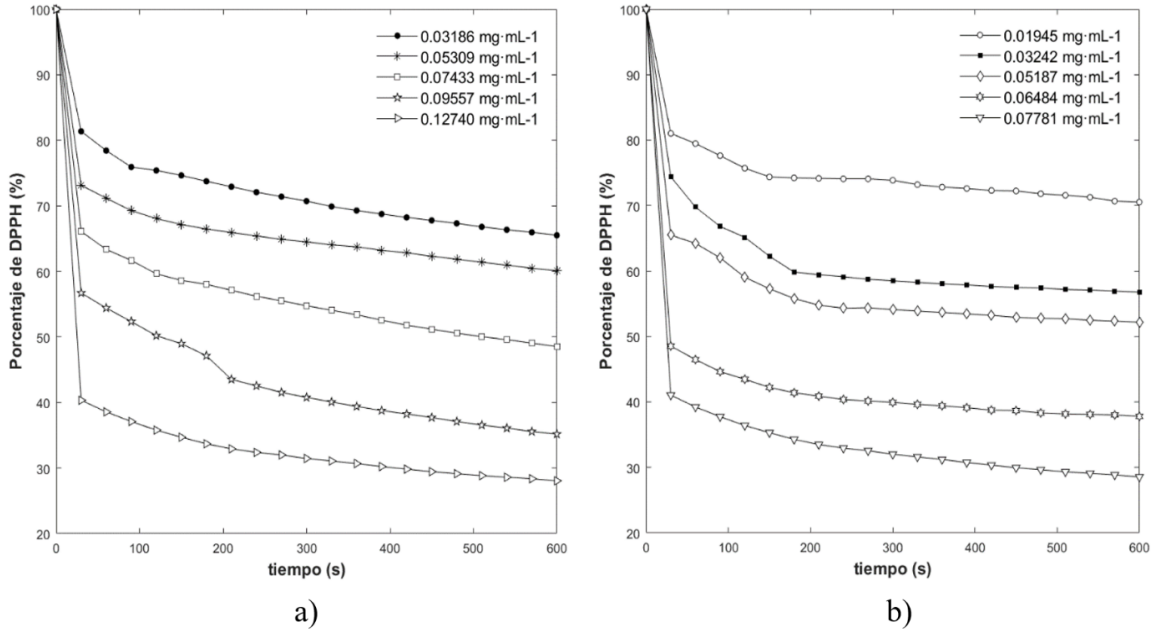

Figura 6.6 Disminución de la concentración de DPPH versus tiempo, producto de la reacción con sólidos a diferentes concentraciones extraídos de: a) guayaba agria, b) guayaba taiwanesa.

En la Figura 6.6 se puede observar que la degradación puede ser representada por curvas que decaen de forma exponencial, primeramente, con un decaimiento brusco en los primeros 40 segundos, seguido de un consumo de DPPH lento. A causa del tipo de decaimiento, los datos de la Figura 6.6 fueron ajustados al modelo bi-exponencial de la ecuación 7.1. Parte de los datos del ajuste se muestran en la Tabla 6.5 y Tabla 6.6.

En estas tablas se observan cinco parámetros importantes para este estudio. Primeramente, es necesario definir a k_{obs1} y k_{obs2} como una cuantificación de la tasa de consumo del radical de DPPH, posteriormente, se puede verificar que en todos los casos se cumple que $k_{obs1} >> k_{obs2}$,

siendo k_{obs1} el parámetro que representa el mayor consumo. Por esta razón, será considerado que $k_{seudo} = k_{obs1}$.

Tabla 6.5 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la Figura 6.5 (a).

Parámetros	Concentraciones ($mg \cdot ml^{-1}$)				
	0.0318	0.0531	0.0743	0.0956	0.1247
k_{obs1}	0.05249	0.06808	0.07474	0.08120	0.09842
k_{obs2}	0.00030	0.00026	0.00046	0.00075	0.00055
R^2	0.99743	0.99690	0.99776	0.99290	0.99803
SSE[a]	0.00052	0.00076	0.00091	0.00473	0.00151
RMSE[b]	0.00555	0.00671	0.00734	0.01653	0.00943

[a] Suma de cuadrado debido al error
[b] Error cuadrático medio

Tabla 6.6 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la Figura 6.6 (b).

Parámetros	Concentraciones ($mg \cdot ml^{-1}$)				
	0.0318	0.0531	0.0743	0.0956	0.1247
k_{obs1}	0.04891	0.05419	0.07952	0.08667	0.09730
k_{obs2}	0.00015	0.00028	0.00016	0.00018	0.00055
R^2	0.98950	0.97907	0.99670	0.99710	0.99790
SSE[a]	0.00155	0.00839	0.00092	0.00097	0.00153
RMSE[b]	0.00950	0.02221	0.00734	0.00755	0.00950

[a] Suma de cuadrado debido al error
[b] Error cuadrático medio

Por otro lado, las Tablas 6.6 y 6.7 también nos proporcionan los coeficientes de determinación (R^2) de los ajustes siendo todos mayores a 0.97907, indicando una buena explicación de la variación de los datos. También, en las mismas tablas se nos proporciona los valores de SSE y RMSE, los cuales indican un buen ajuste de datos, ya que estos son cercanos a cero.

A continuación, en la Figura 6.7 se muestran las gráficas de $[AH]_{inicial}$ versus K_{seudo} para las dos variedades de guayaba, junto a su respectivo ajuste.

En la Figura 6.7 se muestra el ajuste de datos de la relación entre la constante de pseudo primer orden (K_{seudo}) y las concentraciones iniciales, tanto del extracto de guayaba agria (a) como de guayaba taiwanesa (b). El ajuste de datos para las especies de guayaba agria (a) y guayaba taiwanesa (b) proporcionó valores de R^2 de 0.9641 y 0.9741, respectivamente. Esto significa que la recta de ajuste representa muy bien la relación de las variables, por tanto, a través de la ecuación 7.4 podemos obtener k_2.

El valor de k_2 para la guayaba taiwanesa obtenido a partir del ajuste de datos al modelo lineal de la ecuación 7.4, fue de 0.45053 ± 0.01193 $(mg.\ ml^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$, y el valor de k_2 para guayaba agria

fue de 0.87570 ± 0.07018 (mg. $ml^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$. Es importante resaltar que cada experimento fue hecho por triplicado y los datos utilizados pueden ser encontrados en anexos.

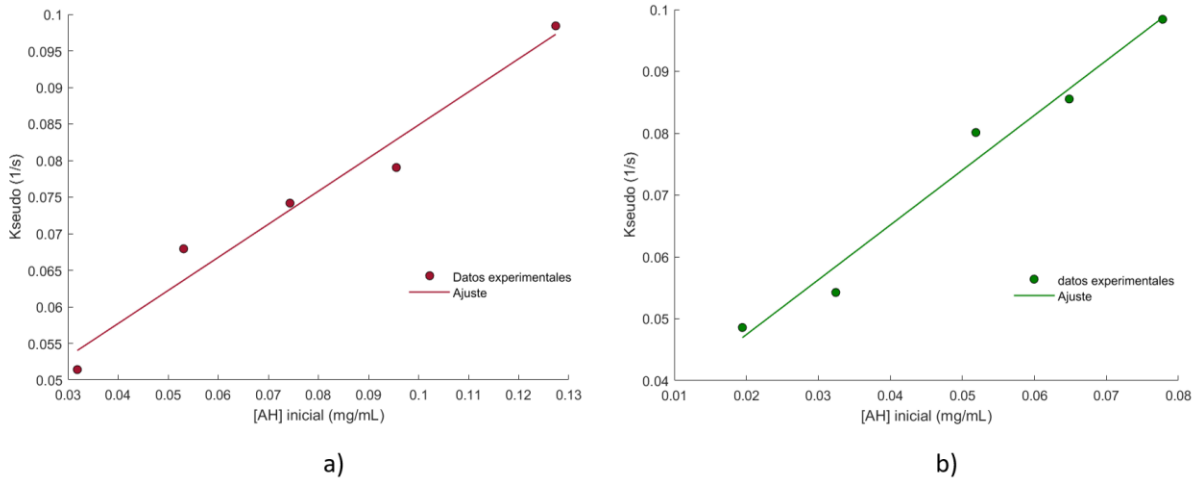

Figura 6.7 Relación lineal entre valores de K_{seudo} vers us la concentración inicial de extracto versus K_{seudo} de: a) guayaba agria b) guayaba taiwanesa.

Podemos observar que el extracto de la guayaba agria posee una constante k_2 mayor que el valor obtenido para la guayaba agria, indicando la presencia de antioxidantes con alta velocidad de reacción, como es la vitamina C (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

En la Tabla 6.7 se muestran valores de k_2 calculados por diversos autores para vitamina E, hidroxibutilanisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), mencionados por Martínez y Talavera (2018).

Tabla 6.7 Valores de k_2 de antioxidantes comunes reportados

Compuesto	Valor	Unidad
Vitamina E	1.87	(mg. $ml^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$
BHA	0.42	(mg. $ml^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$
BHT	0.05	(mg. $ml^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$

En Tabla 6.7 se muestran valores de k_2 para antioxidantes comunes utilizados en la industria. Se puede constatar que la vitamina E posee un poder reductivo 4.45 veces mayor al compuesto BHA, y 37.4 más potente que el BHT. Con respecto a las hipótesis planteadas, al hacer un ordenamiento de las especies y compuestos, incluyendo la guayaba taiwanesa y agria, según sus valores de reactividad, resulta que Vitamina E > guayaba agria > guayaba Taiwanesa 1 > BHA > BHT, por lo tanto, podemos decir que aceptamos la hipótesis nula y concluimos que el valor de k_2 calculado para nuestros extractos se encuentra entre valores de antioxidantes comunes.

6.4 Comparación del desempeño antioxidante de los extractos de guayaba con dos antioxidantes referencia: quercetina y ácido tánico.

En la Tabla 6.8 se muestran los resultados de EA para quercetina, ácido tánico y guayaba taiwanesa.

Tabla 6.8 Comparación de la eficiencia antioxidante de extractos de guayaba taiwanesa respecto a quercetina y ácido tánico

Muestra	EC_{50} (*mg solido g^{-1} DPPH*)	EA (*g $DPPH^{\cdot}$ mg^{-1} solido·min^{-1}*)	Clasificación cinética[b]	EA Clasificación[b]
Quercetina	85	1.961 E-3	Rápido	alto
Ácido Tánico	80	4.878 E-3	Rápido	alto
G. Taiwanessa	2413	1.014 E-5	Intermedio	bajo

En la Tabla 6.8 se muestra un análisis comparativo entre dos antioxidantes comerciales y la guayaba taiwanesa. Se puede observar que la quercetina y el ácido tánico necesitan valores de 85 y 80 mg sólido·g^{-1} DPPH, respectivamente. En cambio, el extracto de guayaba taiwanesa necesita 2413 mg sólido·g^{-1} DPPH, para reducir la concentración de DPPH al 50%. Este valor de EC50 para guayaba taiwanesa, junto con el tiempo de estabilización (t_{EC50}) genera la EA, la cual es 481 veces menor que la EA del ácido tánico y 188 veces menos que la EA de la quercetina.

Por tanto, podemos clasificar la cinética de la guayaba taiwanesa como intermedia, debido a sus tiempos t_{EC50}, y la cinética del ácido tánico y la quercetina como rápida debido a cortos tiempos de estabilización. Por otro lado, se considera que la EA de la quercetina y ácido tánico es alta, debido a que sus valores de EA son considerablemente mayores a las EA de los demás compuestos, los cuales fueron clasificados con EA baja.

7 Conclusiones

El factor más importante a tener en cuenta durante el proceso de lixiviación de antioxidantes de guayaba es la Temperatura, seguido del factor relación Soluto-Solvente. En caso de llevar a cabo este proceso a escala industrial, se propone realizar un estudio que determine la relación óptima de soluto-solvente (que según nuestra investigación es mayor a 1:5), que permita obtener la cantidad máxima de antioxidantes, usando la cantidad suficiente de solvente y de materia prima.

Además de los dos factores principales, otros que se identificaron que se necesitaban estudiar a fondo para conocer las mejores condiciones de lixiviación fueron la variedad de guayaba y el tipo de disolvente. El resto de factores: tiempo de extracción, velocidad de agitación, porcentaje v/v del disolvente no fueron significativos en la eficiencia antioxidante.

Durante la segunda etapa del estudio, se observó que la variedad de guayaba como factor tuvo un papel predominante en la obtención de extractos con mejor Eficiencia Antioxidante (EA), teniendo en promedio la variedad Taiwanesa I un 46% más de EA que la variedad agria.

En esta etapa pudieron determinarse las mejores condiciones de extracción, las cuales fueron: Temperatura de 55°C, Variedad Taiwanesa I, Etanol al 35% como solvente, tiempo de extracción de 1 hora, agitación de 120 rpm y relación soluto-solvente de al menos 1:5 en proporción másica.

Los valores de las constantes cinéticas de pseudo primer orden, k_2, obtenidas del estudio de la cinética de reacción de DPPH con los antioxidantes para la guayaba taiwanesa 1 y agria fueron de 0.876 y 0.451 $(mg.\ ml^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$ respectivamente. Estos valores son superiores a los valores de BHT y BHA (antioxidantes sintéticos usados en alimentos lipídicos) y en el caso de la guayaba taiwanesa un 50% del valor de la constante de la Vitamina E, un antioxidante natural muy importante y eficiente.

En este estudio se ha demostrado la viabilidad de la guayaba como materia prima para la obtención de antioxidantes para aplicaciones en las industrias alimentarias, farmacéuticas, químicas y similares. Los extractos antioxidantes de guayaba tienen una eficiencia antioxidante comparable a la de otros antioxidantes puros como el ácido tánico, y de llevarse a cabo una separación selectiva y concentración de estos antioxidantes, podría incrementarse aún más esta eficiencia.

8 Recomendaciones

Los factores más importantes a tomar en cuenta para un proceso de obtención de antioxidantes de la guayaba mediante lixiviación son la **temperatura** y la **relación sólido-solvente** para optimizar los costos del proceso.

Se recomienda utilizar una temperatura de 55°C para la extracción, tiempos de 1 hora, etanol como solvente al 35% en volumen (no usar metanol ni acetona), una agitación de 60 rpm y una relación sólido-solvente de al menos 1:5 en masa.

Para estudios a mayor escala, se recomienda realizar un análisis de la relación sólido-solvente óptima.

Se sugiere ampliar el presente estudio a otras variedades de guayaba presentes en el país como la variedad pulpa rosada para determinar qué variedad presenta la mayor cantidad de antioxidantes.

9 Bibliografía

Albino, N. y Gimena, J. (2013). Cinética de degradación de la actividad antioxidante por tratamiento térmico en jugos de naranja y mandarina frente al radical DPPH.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., Mcdonald, S. y Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst,* 127, 1, 183-198.

Arias Bravo, A. N. (2008). Cuantificación de la actividad antioxidante de productos naturales por método enzimático. Universidad del Azuay.

Blois, M. S. J. N. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. 181, 4617, 1199-1200.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., Berset, C. J. L.-F. S. y Technology (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. 28, 1, 25-30.

Cabezas Gagñay, A. L. (2011). Elaboración y Evaluación Nutricional de Galletas con Quinua y Guayaba Deshidratada.

Calderon Ramos, A. D. y Moreno Lazo, E. J. (2009). Producción de frutos de guayaba (Psidium guajava L.) variedad taiwan 1, utilizando diferentes programas de fertilización de N-P-K. . Universidad del Salvador.

Carabalí, A., Libreros V, J., Muñoz F, J. E. y De La Cruz A, G. A. (1989). Contribución al estudio de la guayaba coronilla, Psidium friedrichsthalianum Beng-niedenzu. *Acta Agronómica,* 39, 3-4, 172-181.

Cesar, P. M. J. (2008). Diseño, construcción y evaluación de parámetros de operación de un equipo de extracción sólidos-líquido para el laboratorio de procesos unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

Céspedes Cabrera, T. y Sánchez Serrano, D. (2014). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *2014,* 14, 1.

Clara, B. y Anna, A. (2009). Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. *Current Pharmaceutical Design,* 15, 26, 3063-3073.

Coronado H, M., Vega Y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M. y Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición,* 42, 206-212.

Cortes-Penagos, C. J., Cazares-Romero, A., Flores-Álvarez, L. J., Yahuaca-Juárez, B. y Padilla-Ramírez, J. S. (2016). Actividad antioxidante en cinco variades de Psidium guajava L. *Revista agroproductividad.*

Cruz Pineda, J. R. (2017). Diagnóstico del Estado de Aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas en una Unidad de Producción de Guayaba (Psidium guajava L), del Departamento de Granada, Nicaragua. . UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA.

Chamorro Juárez, C. D. C. (2015). Microbiología, rendimiento y análisis económico en el cultivo de guayaba (Psidium guajava L.) utilizando tres dosis de humus de lombriz. Tesis de postgrado, Universidad Nacional Agria, UNA.

Chasipanta Ronquillo, E. C. y Chicaiza Galarza, T. S. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de 5 variedades de aceites esenciales amazónicos (Ocotea quixos; Psidium guajava; Eugenia stipitata; Piper auritum; Piper imperiale).

Dai, J., Gupte, A., Gates, L. y Mumper, R. J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology,* 47, 4, 837-847.

Fda (2017). Q3C — Tables and List Guidance for Industry.

Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.-B., Whalen, K., Dabo, A. J., Reynertson, K. A., Foronjy, R. F., Jeanine, M. y Kennelly, E. J. J. F. C. (2013). Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. 141, 2, 889-895.

Flores, G., Wu, S.-B., Negrin, A. y Kennelly, E. J. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (Psidium guajava) fruits. *Food Chemistry,* 170, 327-335.

G. Maza, P. D. (2000). Alimentos Funcionales Aspectos Bioquímicos y de Procesado.

García, M. A. (2010). Guia Tecnica Del Cultivo De La Guayaba. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J. y Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante %J Horizonte Médico (Lima). 15, 57-60.

Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I. y Lajolo, F. M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 8, 2928-2935.

Hidalgo Filipovich, R., Gómez Ugarte, S., Escalera Cruz, D. Á. y Quisbert Díaz, S. (2015). Beneficios de la guayaba para la salud. *Revista de Investigación e Información en Salud,* 10.

Jiménez Quevedo, G. E. (2015). Extracción supercrítica de antioxidantes lipofilicos en subproductos de guayaba "psidium guajava l". (Trabajo de Titulación de Ingeniero Químico), UTP, Loja, Ecuador.

Kedare, S. B. y Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology,* 48, 4, 412-422.

Kong, K.-W., Ismail, A. R., Tan, S.-T., Nagendra Prasad, K. M. y Ismail, A. (2010). Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. 45, 8, 1739-1745.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos %J Food Science and Technology. 25, 726-732.

Leal Alturo, Á. C. (2012a). Determinación del potencial antioxidante y evaluación del coeficiente de reparto a 25, 00° C de metabolitos secundarios de una especie de liquen colombiano del género Hypotrachyna. Universidad Nacional de Colombia.

Leal Alturo, Á. C. J. D. D. Q. (2012b). Determinación del potencial antioxidante y evaluación del coeficiente de reparto a 25, 00° C de metabolitos secundarios de una especie de liquen colombiano del género Hypotrachyna.

Londoño Londoño, J. 2012. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia.* Corporación Universitaria Lasallista.

Marquina, V., Araujo, L., Ruíz, J., Rodríguez-Malaver, A. y Vit, P. (2008). Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (Psidium guajava L.) %J Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 58, 98-102.

Martínez, K. y Talavera, G. (2018). Influencia de Tres Métodos de Concentración y Secado en el Contenido de Vitamina C y Eficiencia Antioxidante del Extracto de las Hojas de Moringa oleifera. Tesis de grado, Universidad Nacional de Ingeniería.

Mckee, T. y Mckee, J. R. (2003). Bioquímica: la base molecular de la vida, Edición, McGraw-Hill/Interamericana.

Mercadante, A. Z., Steck, A. y Pfander, H. (1999). Carotenoids from Guava (Psidium guajava L.): Isolation and Structure Elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47, 1, 145-151.

Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S. y Nagaoka, S.-I. J. B. E. B. a.-G. S. (1993). Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. 1157, 2, 313-317.

Musa, K. H., Abdullah, A., Jusoh, K. y Subramaniam, V. (2011). Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (Psidium guajava L.): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analytical Methods,* 4, 1, 100-107.

Ordóñez-Santos, L. E., Ospina Portilla, M. A. y Rodríguez Rodríguez, D. X. (2013). Cinética de degradación térmica de vitamina C en frutos de guayaba (Psidium guajava L.). *Revista Lasallista de Investigación,* 10, 2, 44-51.

Pacheco, M. I. (2015). Obtención de ácido ferúlico a partir de un concentrado de la hidrólisis alcalina del maíz.

Palomino Pacheco, M. (2006). Propiedades antioxidantes y prooxidantes de Psidium guajava L.(guayaba).

Prasad, N. K., Yang, B., Zhao, M., Wang, B. S., Chen, F. y Jiang, Y. (2009). Effects of high-pressure treatment on the extraction yield, phenolic content and antioxidant activity of litchi (Litchi chinensis Sonn.) fruit pericarp. 44, 5, 960-966.

Price, R. K., Welch, R. W., Lee-Manion, A. M., Bradbury, I. y Strain, J. J. C. C. (2008). Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. 85, 2, 152-157.

Quirós Blanco, A. M. (2016). Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles apartir de un subproducto del procesamiento industrialde mora. Licenciatura en Ingeniería de Alimentos, Universidad de Costa Rica.

Restrepo-Sánchez, D.-C., Narváez-Cuenca, C.-E. y Restrepo-Sánchez, L.-P. J. Q. N. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. 32, 6, 1517-1522.

Robertson, G. L. y Samaniego, C. M. L. (1986). Effect of Initial Dissolved Oxygen Levels on the Degradation of Ascorbic Acid and the Browning of Lemon Juice during Storage. *Journal of Food Science,* 51, 1, 184-187.

Rojas-Barquera, D. y Narváez-Cuenca, C.-E. (2009). Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (Psidium guajava L.) cultivadas en Colombia %J Química Nova. 32, 2336-2340.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. y Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.,* 76, 270.

Shi, H. y Niki, E. J. L. (1998). Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants. 33, 4, 365.

Takeuchi, T. M., Pereira, C. G., Braga, M., Marostica, M., Leal, P. F. y Meireles, M. a. A. (2009). Low pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants.

Teresa Galván, C., Barrilao, R. G., García, M., Ochoa, J. y Wilhelmi, J. O. J. R. a. D. M. D. D. (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. 1, 2, 61-72.

Treybal, R. E. (1980). Mass-transfer Operations, Edición, McGraw-Hill.

Verma, M., Rai, G. y Kaur, D. J. I. F. R. J. (2018). Effect of extraction solvents on phenolic content and antioxidant activities of Indian gooseberry and guava. 25, 2.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. y Prior, R. L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52, 12, 4026-4037.

ANEXOS

TABLA 1. Datos de absorbancia versus tiempo para la determinación de las mejores condiciones de extracción de antioxidantes de la guayaba.

Tiempo (s)	2910 mg sólidos			3031 mg sólidos			2896 mg sólidos			2698 mg sólidos		
	04	16	28	03	15	27	09	21	33	11	23	35
0	0.345	0.329	0.321	1.000	1.005	0.999	0.984	0.982	1.017	1.000	1.004	1.028
30	0.285	0.274	0.267	0.591	0.574	0.596	0.557	0.541	0.571	0.582	0.580	0.590
60	0.263	0.253	0.247	0.551	0.548	0.569	0.527	0.516	0.551	0.559	0.557	0.567
90	0.276	0.239	0.231	0.537	0.537	0.557	0.518	0.505	0.543	0.550	0.548	0.558
120	0.261	0.227	0.218	0.530	0.530	0.550	0.514	0.500	0.539	0.544	0.547	0.553
150	0.239	0.217	0.208	0.523	0.525	0.546	0.511	0.496	0.536	0.540	0.538	0.549
180	0.229	0.209	0.200	0.522	0.522	0.543	0.507	0.493	0.534	0.535	0.535	0.546
210	0.221	0.203	0.195	0.514	0.518	0.539	0.505	0.490	0.532	0.532	0.533	0.543
240	0.215	0.197	0.191	0.511	0.517	0.539	0.504	0.487	0.531	0.528	0.530	0.541
270	0.209	0.192	0.185	0.509	0.513	0.535	0.507	0.485	0.530	0.525	0.526	0.539
300	0.205	0.187	0.181	0.506	0.511	0.531	0.511	0.484	0.531	0.521	0.524	0.538
330	0.201	0.183	0.177	0.503	0.509	0.530	0.500	0.482	0.528	0.519	0.523	0.537
360	0.196	0.180	0.173	0.499	0.508	0.528	0.499	0.480	0.526	0.518	0.522	0.536
390	0.200	0.175	0.169	0.500	0.506	0.526	0.498	0.481	0.526	0.517	0.520	0.535
420	0.187	0.171	0.166	0.497	0.508	0.525	0.496	0.479	0.525	0.518	0.518	0.535
450	0.184	0.167	0.163	0.517	0.503	0.524	0.495	0.477	0.524	0.515	0.517	0.533
480	0.179	0.166	0.161	0.494	0.502	0.523	0.494	0.476	0.524	0.512	0.517	0.533
510	0.177	0.161	0.157	0.492	0.501	0.522	0.492	0.476	0.523	0.511	0.516	0.532
540	0.175	0.158	0.155	0.490	0.500	0.520	0.491	0.474	0.523	0.510	0.515	0.531
570	0.171	0.156	0.154	0.487	0.499	0.519	0.490	0.473	0.523	0.510	0.515	0.530
600	0.167	0.152	0.153	0.486	0.498	0.518	0.488	0.473	0.522	0.506	0.513	0.530

TABLA 2. Datos de absorbancia versus tiempo para la determinación de las mejores condiciones de extracción de antioxidantes de la guayaba (continuación).

Tiempo (s)	2910 mg extracto / g DPPH			3031 mg sólidos			2896 mg sólidos			2698 mg sólidos		
	06	18	30	10	22	34	12	24	36	02	14	26
0	0.296	0.283	0.275	0.392	0.377	0.410	0.312	0.311	0.297	0.785	0.478	0.457
30	0.257	0.243	0.223	0.337	0.322	0.347	0.264	0.275	0.258	0.579	0.398	0.373
60	0.241	0.228	0.210	0.316	0.299	0.320	0.245	0.253	0.244	0.525	0.368	0.346
90	0.230	0.216	0.197	0.302	0.285	0.305	0.228	0.237	0.233	0.503	0.350	0.328
120	0.223	0.210	0.191	0.292	0.273	0.292	0.218	0.230	0.221	0.486	0.336	0.315
150	0.215	0.200	0.185	0.283	0.264	0.282	0.210	0.224	0.215	0.473	0.326	0.305
180	0.211	0.194	0.180	0.276	0.256	0.274	0.202	0.216	0.206	0.462	0.318	0.297
210	0.205	0.188	0.178	0.270	0.251	0.268	0.196	0.212	0.199	0.452	0.310	0.289
240	0.202	0.181	0.173	0.265	0.245	0.263	0.190	0.203	0.194	0.442	0.304	0.284
270	0.197	0.180	0.170	0.259	0.240	0.256	0.184	0.195	0.190	0.434	0.298	0.277
300	0.194	0.174	0.167	0.255	0.234	0.251	0.181	0.189	0.188	0.425	0.292	0.272
330	0.191	0.169	0.165	0.251	0.230	0.248	0.175	0.185	0.181	0.417	0.286	0.267
360	0.186	0.175	0.161	0.247	0.226	0.243	0.171	0.189	0.179	0.411	0.281	0.262
390	0.187	0.164	0.159	0.243	0.222	0.239	0.168	0.195	0.175	0.404	0.276	0.258
420	0.180	0.165	0.156	0.240	0.219	0.235	0.175	0.195	0.170	0.397	0.272	0.254
450	0.176	0.163	0.153	0.237	0.217	0.231	0.160	0.201	0.168	0.391	0.268	0.250
480	0.175	0.160	0.151	0.234	0.212	0.230	0.157	0.159	0.165	0.386	0.265	0.246
510	0.173	0.153	0.147	0.230	0.209	0.224	0.152	0.150	0.162	0.380	0.260	0.243
540	0.169	0.155	0.147	0.227	0.205	0.222	0.150	0.147	0.159	0.374	0.256	0.239
570	0.169	0.147	0.145	0.225	0.203	0.219	0.149	0.159	0.156	0.369	0.253	0.236
600	0.165	0.147	0.142	0.222	0.199	0.216	0.143	0.140	0.153	0.364	0.248	0.232

TABLA 3. Datos de absorbancia versus tiempo para la determinación de las mejores condiciones de extracción de antioxidantes de la guayaba (continuación).

Tiempo (s)	2910 mg sólidos			2615 mg sólidos			mg sólidos			2698 mg sólidos		
	01	13	25	07	19	31	05	17	29	08	20	32
0	1.033	1.018	1.041	0.991	0.982	0.995	0.910	0.894	0.964	0.282	0.247	0.248
30	0.628	0.630	0.624	0.595	0.541	0.570	0.569	0.556	0.622	0.244	0.225	0.208
60	0.592	0.588	0.587	0.578	0.516	0.534	0.534	0.521	0.588	0.230	0.197	0.193
90	0.576	0.567	0.573	0.550	0.505	0.524	0.515	0.501	0.574	0.219	0.185	0.180
120	0.566	0.553	0.563	0.545	0.500	0.518	0.506	0.487	0.567	0.211	0.177	0.170
150	0.560	0.543	0.557	0.541	0.496	0.514	0.503	0.477	0.560	0.204	0.170	0.163
180	0.555	0.534	0.551	0.538	0.493	0.511	0.495	0.469	0.555	0.199	0.163	0.156
210	0.550	0.527	0.546	0.549	0.490	0.508	0.489	0.463	0.551	0.194	0.159	0.150
240	0.547	0.519	0.540	0.533	0.487	0.504	0.484	0.457	0.548	0.190	0.156	0.149
270	0.543	0.514	0.539	0.524	0.485	0.502	0.481	0.452	0.546	0.185	0.152	0.143
300	0.541	0.512	0.536	0.518	0.484	0.500	0.475	0.448	0.543	0.182	0.148	0.137
330	0.538	0.503	0.532	0.513	0.482	0.499	0.472	0.444	0.542	0.178	0.144	0.134
360	0.536	0.497	0.530	0.509	0.480	0.497	0.468	0.439	0.538	0.176	0.140	0.132
390	0.533	0.494	0.528	0.505	0.481	0.496	0.466	0.435	0.536	0.173	0.136	0.127
420	0.531	0.489	0.526	0.506	0.479	0.494	0.462	0.432	0.535	0.170	0.139	0.128
450	0.529	0.485	0.524	0.495	0.477	0.494	0.460	0.429	0.533	0.168	0.131	0.124
480	0.528	0.481	0.523	0.492	0.476	0.492	0.457	0.427	0.531	0.166	0.129	0.119
510	0.526	0.475	0.521	0.494	0.476	0.490	0.454	0.424	0.529	0.165	0.127	0.115
540	0.524	0.471	0.520	0.488	0.474	0.496	0.453	0.421	0.527	0.161	0.124	0.114
570	0.523	0.468	0.518	0.486	0.473	0.491	0.449	0.418	0.527	0.161	0.122	0.110
600	0.521	0.464	0.517	0.483	0.473	0.488	0.447	0.414	0.525	0.158	0.125	0.111

TABLA 4. Datos cinéticos de la reacción entre DPPH y antioxidantes contenidos en el extracto de guayaba agria para la determinación de la constante de velocidad k_2.

Tiempo (s)	Concentraciones en mg·ml $^{-1}$														
	0.03186			0.05309			0.074333			0.095557			0.12740		
0	1.325	1.327	1.321	1.321	1.322	1.320	1.315	1.316	1.313	1.305	1.306	1.307	1.294	1.295	1.293
30	1.078	1.076	1.079	0.966	0.970	0.963	0.869	0.867	0.866	0.74	0.713	0.715	0.522	0.523	0.520
60	1.039	1.035	1.027	0.940	0.941	0.938	0.833	0.835	0.832	0.71	0.691	0.678	0.499	0.498	0.497
90	1.006	1.002	1.008	0.915	0.911	0.917	0.811	0.807	0.809	0.683	0.654	0.645	0.48	0.482	0.482
120	0.999	1.001	1.003	0.899	0.895	0.900	0.784	0.787	0.782	0.655	0.627	0.640	0.463	0.461	0.462
150	0.989	0.988	0.990	0.887	0.888	0.893	0.771	0.770	0.773	0.639	0.614	0.612	0.449	0.447	0.448
180	0.977	0.973	0.981	0.878	0.876	0.877	0.763	0.759	0.766	0.615	0.607	0.608	0.436	0.434	0.437
210	0.966	0.964	0.970	0.871	0.873	0.865	0.751	0.748	0.754	0.568	0.571	0.57	0.426	0.425	0.425
240	0.955	0.954	0.953	0.864	0.866	0.867	0.739	0.738	0.742	0.555	0.556	0.553	0.419	0.420	0.421
270	0.946	0.950	0.942	0.857	0.853	0.859	0.730	0.728	0.731	0.542	0.539	0.543	0.414	0.413	0.415
300	0.937	0.935	0.936	0.852	0.850	0.855	0.720	0.716	0.719	0.532	0.529	0.533	0.407	0.409	0.408
330	0.926	0.930	0.924	0.846	0.848	0.845	0.711	0.710	0.709	0.523	0.520	0.522	0.402	0.404	0.403
360	0.918	0.916	0.922	0.842	0.840	0.843	0.702	0.698	0.703	0.514	0.513	0.513	0.397	0.396	0.399
390	0.911	0.915	0.910	0.835	0.838	0.832	0.691	0.690	0.688	0.506	0.503	0.505	0.391	0.390	0.392
420	0.904	0.903	0.908	0.830	0.829	0.830	0.681	0.683	0.679	0.499	0.498	0.500	0.386	0.384	0.388
450	0.898	0.900	0.897	0.823	0.822	0.826	0.673	0.671	0.672	0.492	0.491	0.487	0.381	0.382	0.380
480	0.892	0.894	0.896	0.817	0.821	0.814	0.665	0.661	0.666	0.484	0.487	0.485	0.377	0.375	0.375
510	0.885	0.883	0.887	0.811	0.809	0.812	0.658	0.655	0.661	0.477	0.474	0.478	0.373	0.375	0.374
540	0.879	0.875	0.881	0.805	0.804	0.799	0.652	0.656	0.651	0.471	0.473	0.472	0.37	0.369	0.372
570	0.874	0.872	0.870	0.799	0.800	0.795	0.645	0.643	0.647	0.464	0.465	0.470	0.367	0.365	0.368
600	0.868	0.870	0.866	0.794	0.796	0.791	0.638	0.639	0.645	0.459	0.458	0.465	0.363	0.365	0.367

TABLA 5. Datos cinéticos de la reacción entre DPPH y antioxidantes contenidos en el extracto de guayaba Taiwanesa para la determinación de la constante de velocidad k_2.

Tiempo (s)	Concentraciones en mg·ml^{-1}														
	0.001945			0.03242			0.05187			0.06484			0.07781		
0	1.354	1.359	1.355	1.353	1.356	1.350	1.277	1.279	1.278	1.360	1.260	1.257	1.272	1.292	1.295
30	1.097	1.102	1.094	0.886	0.884	0.885	0.950	0.948	0.954	0.660	0.663	0.667	0.522	0.521	0.524
60	1.076	1.071	1.072	0.869	0.872	0.868	0.891	0.893	0.896	0.632	0.636	0.639	0.499	0.498	0.498
90	1.051	1.046	1.055	0.839	0.838	0.842	0.853	0.856	0.860	0.607	0.611	0.615	0.480	0.482	0.479
120	1.025	1.021	1.029	0.799	0.798	0.795	0.832	0.837	0.840	0.591	0.593	0.598	0.463	0.461	0.462
150	1.007	1.006	1.004	0.775	0.778	0.777	0.795	0.798	0.799	0.574	0.576	0.579	0.449	0.447	0.440
180	1.005	1.000	1.001	0.755	0.757	0.754	0.764	0.760	0.765	0.563	0.564	0.567	0.436	0.434	0.437
210	1.004	1.009	1.007	0.741	0.737	0.744	0.759	0.757	0.756	0.556	0.557	0.561	0.426	0.428	0.427
240	1.003	1.000	0.999	0.735	0.734	0.738	0.755	0.751	0.757	0.549	0.551	0.556	0.419	0.421	0.417
270	1.003	1.004	1.002	0.736	0.732	0.737	0.750	0.749	0.752	0.546	0.547	0.549	0.414	0.415	0.415
300	1.000	0.996	1.004	0.732	0.729	0.734	0.747	0.744	0.748	0.543	0.544	0.547	0.407	0.406	0.405
330	0.991	0.995	0.994	0.729	0.727	0.731	0.744	0.745	0.741	0.539	0.541	0.542	0.402	0.400	0.403
360	0.986	0.990	0.989	0.726	0.728	0.723	0.741	0.742	0.740	0.536	0.538	0.537	0.397	0.395	0.396
390	0.983	0.980	0.981	0.723	0.727	0.720	0.739	0.737	0.736	0.532	0.535	0.532	0.391	0.392	0.390
420	0.979	0.984	0.980	0.720	0.724	0.721	0.736	0.732	0.739	0.527	0.529	0.530	0.386	0.388	0.387
450	0.978	0.974	0.981	0.716	0.712	0.719	0.734	0.735	0.732	0.526	0.527	0.525	0.381	0.379	0.382
480	0.972	0.975	0.971	0.714	0.718	0.717	0.733	0.732	0.730	0.521	0.523	0.524	0.377	0.378	0.378

510	0.969	0.964	0.966	0.713	0.717	0.716	0.730	0.727	0.733	0.519	0.521	0.522	0.373	0.375	0.372
540	0.965	0.966	0.962	0.710	0.709	0.707	0.729	0.733	0.728	0.518	0.519	0.520	0.370	0.369	0.371
570	0.957	0.960	0.954	0.708	0.707	0.709	0.727	0.730	0.728	0.517	0.518	0.518	0.367	0.369	0.366
600	0.955	0.954	0.958	0.706	0.703	0.704	0.725	0.728	0.727	0.514	0.516	0.517	0.363	0.362	0.365

TABLA 6. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba agria a una concentración de 0.03186 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.05141	0.05287	0.05319
k_{obs2}	0.0003016	0.0002986	0.0003022
R^2	0.9973	0.9975	0.9975
SSE	0.0005576	0.0005157	0.0004989
RMSE	0.005727	0.005508	0.005417

TABLA 7. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba agria a una concentración de 0.05309 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.06793	0.06371	0.07261
k_{obs2}	0.0002687	0.0002614	0.0002797
R^2	0.997	0.9968	0.9969
SSE	0.0007419	0.0007938	0.0007616
RMSE	0.006606	0.006833	0.006693

TABLA 8. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba agria a una concentración de 0.07433 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.07418	0.07413	0.07593
k_{obs2}	0.0004656	0.000465	0.0004606
R^2	0.9981	0.9975	0.9977
SSE	0.0007818	0.001041	0.0009365
RMSE	0.006781	0.007825	0.007422

TABLA 9. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba agria a una concentración de 0.09557 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.07905	0.08349	0.08108
k_{obs2}	0.0008142	0.0007336	0.0007096
R^2	0.9902	0.9939	0.9946
SSE	0.006619	0.004051	0.003544
RMSE	0.01973	0.01544	0.01444

TABLA 10. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba agria a una concentración de 0.12740 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.09842	0.09703	0.09982
k_{obs2}	0.0005549	0.0005517	0.0005451
R^2	0.9981	0.998	0.998
SSE	0.001484	0.00155	0.00151
RMSE	0.009343	0.009547	0.009425

TABLA 11. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba Taiwanesa a una concentración de 0.01945 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.04858	0.04644	0.05170
k_{obs2}	0.00015	0.00014	0.00016
R^2	0.98950	0.99170	0.98730
SSE	0.00154	0.00124	0.00187
RMSE	0.00950	0.00854	0.01047

TABLA 12. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba Taiwanesa a una concentración de 0.03242 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.05425	0.05489	0.05342
k_{obs2}	0.00028	0.00028	0.00028
R^2	0.97950	0.97790	0.97980
SSE	0.00821	0.00895	0.00802
RMSE	0.02198	0.02294	0.02172

TABLA 13. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba Taiwanesa a una concentración de 0.05187 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.08011	0.07965	0.07880
k_{obs2}	0.00016	0.00015	0.00017
R^2	0.99720	0.99640	0.99650
SSE	0.00077	0.00101	0.00098
RMSE	0.00673	0.00770	0.00758

TABLA 14. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba Taiwanesa a una concentración de 0.06484 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.08553	0.08933	0.08516
k_{obs2}	0.00018	0.00018	0.00018
R^2	0.99750	0.99710	0.99670
SSE	0.00084	0.00097	0.00111
RMSE	0.00702	0.00757	0.00807

TABLA 15. Parámetros de ajuste de los experimentos entre DPPH y el extracto de guayaba Taiwanesa a una concentración de 0.07781 mg·ml^{-1}.

Parámetros	Experimentos		
	1	2	3
k_{obs1}	0.09842	0.09870	0.09478
k_{obs2}	0.00055	0.00055	0.00054
R^2	0.99810	0.99760	0.99800
SSE	0.00148	0.00154	0.00158
RMSE	0.00934	0.00952	0.00963