



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

Extracción e identificación de los compuestos fenólicos con actividad antioxidante en subproductos agroindustriales de guayaba (*Psidium guajava* L.) variedad pera rosada.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Gutiérrez Novillo, María Augusta

DIRECTOR: Meneses Chamba, Miguel Ángel, Dr.

LOJA – ECUADOR
2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Dr.

Miguel Ángel Meneses

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo de titulación: “Extracción e identificación de los compuestos fenólicos con actividad antioxidante en subproductos agroindustriales de guayaba (*Psidium Guajava* L.) variedad pera rosada” realizado por Gutiérrez Novillo María Augusta ha sido orientado y revisado durante la ejecución por de aprueba la presentación del mismo.

Loja, Marzo de 2016

f)

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Gutiérrez Novillo María Augusta declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Extracción e identificación de los compuestos fenólicos con actividad antioxidante en subproductos agroindustriales de guayaba (*Psidium guajava* L.) variedad pera rosada”, de la Titulación Ingeniería en Industrias Agropecuarias, siendo Dr. Miguel Ángel Meneses director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

María Augusta Gutiérrez Novillo

C.I.: 1104261225

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme las oportunidades para desarrollarme como ser humano y profesional.

Con amor, gratitud y respeto a mis padres, por cada una de sus enseñanzas al ser mis primeros maestros, por su inmenso apoyo, por ser el pilar en mi vida e impulsarme con su amor incondicional a cumplir mis metas.

A mi adorado hijo Nicolás, porque con cada abrazo, beso y sonrisa que me regala a diario, se ha convertido en el motor de mi vida, que me incentiva a ser cada día mejor por y para Él.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Miguel Ángel Meneses por brindarme su incondicional guía, apoyo, confianza y paciencia a lo largo de la realización de este trabajo de tesis.

A la Ing. María del Cisne Guamán, por su apoyo incondicional como cotutora, por su confianza, motivación y consejos.

A mis compañeros y amigos, porque con cada una de sus ocurrencias, consejos y cafecitos hicieron que el trabajo de laboratorio sea llevadero en esos días enteros de análisis.

A mi familia hermosa, por creer en mí y apoyarme a diario para cumplir con mis metas, con su cariño y consejos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pag.
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
GLOSARIO.....	xii
RESUMEN.....	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	- 5 -
1.1. Guayaba.....	- 6 -
1.1.1. Origen y clasificación botánica.....	- 6 -
1.1.2. Composición química de la guayaba.	- 8 -
1.2. Producción de guayaba	- 9 -
1.2.1. Producción mundial de guayaba.....	- 9 -
1.2.2. Producción de guayaba en Ecuador.	- 9 -
1.3. Subproductos de la guayaba	- 10 -
1.4. Antioxidantes	- 11 -
1.4.1. Compuestos polifenólicos.....	- 11 -
1.5. Extracción de compuestos fenólicos.....	- 12 -

1.5.1.	Extracción líquido-líquido.....	- 13 -
1.5.2.	Extracción sólido-líquido.....	- 13 -
1.6.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	- 14 -
1.6.1.	Método ABTS.....	- 14 -
1.6.2.	Método DPPH.....	- 14 -
1.6.3.	Método FRAP.....	- 15 -
1.6.4.	Cromatografía líquida de alta resolución.....	- 15 -
2.	OBJETIVOS	- 17 -
2.1.	Propósito u objetivo general de la investigación	- 18 -
2.2.	Componente u objetivo específico de la investigación	- 18 -
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 19 -
3.1.	Reactivos y equipos.....	- 20 -
3.1.1.	Reactivos.....	- 20 -
3.1.2.	Equipos utilizados.....	- 20 -
3.2.	Material.....	- 21 -
3.3.	Obtención de extractos.....	- 21 -
3.3.1.	Maceración dinámica.....	- 22 -
3.3.1.1.	<i>Extracción de fracción lipofílicas</i>	- 22 -
3.3.2.	Extracción por soxhlet.....	- 23 -
3.3.2.1.	<i>Extracción de fracción lipofílica</i>	- 23 -
3.4.	Determinación de actividad antioxidante.....	- 24 -
3.4.1.	Preparación de la curva de calibración de trolox.....	- 24 -
3.4.2.	Método ABTS.....	- 25 -
3.4.3.	Método FRAP.....	- 25 -
3.4.4.	Método DPPH.....	- 26 -

3.5.	Determinación de fenoles totales.....	- 27 -
3.6.	Cuantificación de compuestos fenólicos y carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	- 27 -
3.6.1.	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	- 28 -
3.6.2.	Cuantificación de carotenoides.....	- 29 -
3.7.	Análisis estadístico.....	- 29 -
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 30 -
4.1.	Rendimientos de extracción de subproductos de guayaba	- 31 -
4.2.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	- 32 -
4.2.1.	Método ABTS.....	- 33 -
4.2.2.	Método DPPH.....	- 35 -
4.2.3.	Método FRAP.....	- 36 -
4.3.	Determinación de fenoles totales.....	- 38 -
4.4.	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos.....	- 40 -
4.4.1.	Ácido gálico.....	- 43 -
4.4.2.	Quercetina.....	- 44 -
4.4.3.	Ácido transcinámico.....	- 45 -
4.5.	Identificación y cuantificación de carotenoides	- 47 -
4.5.1.	β -caroteno	- 48 -
	CONCLUSIONES.....	- 50 -
	RECOMENDACIONES.....	- 51 -
	REFERENCIAS	- 52 -
	ANEXOS.....	- 61 -

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1. 1. Clasificación botánica de la guayaba	- 6 -
Tabla 1. 2. Componentes nutricionales de la guayaba rosaba	- 8 -
Tabla 1. 3. Producción de Guayaba en Ecuador	- 10 -

CAPÍTULO 4

Tabla 4. 1. Resumen de actividad antioxidante	- 33 -
Tabla 4. 2. Resumen de cuantificación de compuestos fenólicos.....	- 41 -

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. 1. Árbol de guayaba	- 7 -
Figura 1. 2. Fruto de guayaba	- 7 -
Figura 1. 3. Estructura molecular de los ácidos fenólicos simples y de las distintas familias de flavonoides	- 12 -

CAPÍTULO 3

Figura 3. 1. Maceración dinámica	- 22 -
Figura 3. 2. Extracción mediante soxhlet	- 23 -
Figura 3. 3. Sistema de HPLC Water 2596	- 28 -

CAPÍTULO 4

Figura 4. 1. Rendimientos de extracción de subproductos de guayaba	- 31 -
Figura 4. 2. Actividad antioxidante mediante ABTS.....	- 34 -
Figura 4.3. Actividad antioxidante mediante DPPH.....	- 35 -
Figura 4.4. Actividad antioxidante mediante FRAP	- 37 -
Figura 4.5. Fenoles totales.....	- 39 -

Figura 4.6. Cromatograma de patrones	- 42 -
Figura 4.7. Cromatograma de extractos hidrofílicos	- 42 -
Figura 4.8. Ácido gálico	- 43 -
Figura 4.9. Quercetina	- 45 -
Figura 4.10. Ácido Transcinámico.....	- 46 -
Figura 4.11. β -caroteno.....	- 48 -

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A

Esquemas

Anexo A. 1. Preparación de la materia prima.....	- 62 -
Anexo A. 2. Extracción de la fracción lipofílica por maceración dinámica.....	- 62 -
Anexo A. 3. Extracción de las fracciones hidrofílica por maceración dinámica.....	- 63 -
Anexo A. 4. Extracción de la fracción lipofílica por soxhlet.....	- 64 -
Anexo A. 5 Extracción de las fracciones hidrofílica por soxhlet.....	- 65 -
Anexo A. 6. Preparación de la curva estándar con trolox.....	- 66 -
Anexo A. 7. Esquema de determinación de capacidad antioxidante por ABTS.....	- 66 -
Anexo A. 8. Esquema de determinación de capacidad antioxidante por FRAP.....	- 67 -
Anexo A. 9. Esquema de determinación de capacidad antioxidante por DPPH.....	- 68 -
Anexo A. 10. Esquema de determinación de fenoles totales.....	- 69 -

Anexo B

Anexo B. 1. Curvas de calibración	70
Anexo B. 2. Actividad antioxidante.....	78
Anexo B. 3. Fenoles totales	- 88 -
Anexo B. 4. Cuantificación de compuestos fenólicos	- 90 -
Anexo B. 5. Cuantificación de carotenoides.....	- 93 -

Anexo C

Anova

Anexo C. 1. Rendimiento de extracción	- 94 -
Anexo C. 2. Actividad antioxidante.....	- 95 -
Anexo C. 3. Fenoles totales	- 98 -
Anexo C. 4. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	- 99 -

GLOSARIO

ABTS	: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
mg EAG/100 g	: Miligramos equivalente ácido gálico por 100 gramos
μmol TE/g	: Micromoles equivalente a trolox por gramo
DPPH	: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución
EtOH	: Etanol
FRAP	: Poder reductor férrico antioxidante (Ferric Reducing Ability of Plasma)
MeOH	: Metanol
TPTZ	: 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina
Trolox	: ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
cm	: centímetro
g	: gramo
mg	: miligramo
UI	: Unidades internacionales
Tm	: Toneladas métricas
μM	: Micromol
mM	: Milimol
μm	: Micrómetro
p/v	: Peso/volumen

°C	: Grados celsius
mL	: mililitros
nm	: nanómetros
EAG	: Equivalente acido gálico
BH	: Base húmeda
mg AG/100 g BH	: miligramos de ácido gálico por 100 gramos de base húmeda
mg AT/100 g BH	: miligramos de ácido transcinámico por 100 gramos de base húmeda

RESUMEN

En el presente estudio se analizó la actividad antioxidante de subproductos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Se obtuvieron extractos lipofílicos e hidrofílicos con diferentes solventes (hexano, etanol y metanol) y dos métodos de extracción (soxhlet: 5 horas y maceración dinámica: 3, 6 y 24 horas). Los extractos fueron analizados en cuanto a rendimiento de extracción, actividad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP), contenido de fenoles totales y la cuantificación de compuestos fenólicos y carotenoides mediante HPLC. El mejor rendimiento de extracción fue 13.31% utilizando etanol durante 24 horas. En función a actividad antioxidante los mejores resultados fueron para ABTS: 43.32 $\mu\text{mol TE/g BH}$ con metanol a 6 horas, DPPH y FRAP con metanol y 24 horas: 39.87 y 27.89 $\mu\text{mol TE/g BH}$ respectivamente, para fenoles totales: 273.39 mg EAG/100g BH con etanol a 24 horas. Algunos compuestos fenólicos en la fracción hidrofílica fueron ácido gálico: 112.78 mg AG/100 g BH; quercetina; 26.22 mg quercetina/100 g BH y ácido transcinámico: 5.44 mg AT/100 g BH. En la fracción lipofílica se determinó β -caroteno, con el mejor valor de extracción de 5.21 mg β -caroteno/100g.

Palabras claves: Actividad antioxidante, subproductos de guayaba, compuestos fenólicos

ABSTRACT

In the present study was analyzed the antioxidant activity of byproducts guava (*Psidium guajava* L.). Were obtained lipophilic and hydrophilic extracts with different solvents (hexane, ethanol and methanol) and two methods of extraction (soxhlet: 5 hours and dynamic maceration: 3, 6 and 24 hours). The extracts were analyzed for extraction yield, antioxidant activity (ABTS, DPPH, FRAP), total phenol content and quantitation of phenolic compounds and carotenoids by HPLC. The best yield was 13.31% extraction using ethanol for 24 hours. According to antioxidant activity best results were for ABTS: 43.32 $\mu\text{mol TE/g BH}$ with methanol to 6 hours, DPPH and FRAP with methanol and 24 hours: 39.87 y 27.89 $\mu\text{mol TE/g BH}$ respectively, for total phenols: 273.39 mg EAG/100g BH with ethanol to 24 hours. Some phenolic compounds in the hydrophilic fraction were gallic acid: 112.78 mg AG/100 g BH; quercetin; 26.22 mg quercetin/100 g BH and transcinámico acid: 5.44 mg AT/100 g BH. In the lipophilic fraction β -carotene was determined, with the best value extraction β -carotene 5.21 mg/100g.

Keywords: Antioxidant activity, byproducts of guava, phenolics

INTRODUCCIÓN

La demanda por productos que permitan prevenir y reducir el riesgo de contraer enfermedades crónicas ha conducido a la producción y mercadeo de los denominados alimentos funcionales, aquellos que además de ser fuente de componentes requeridos para la nutrición proveen de componentes con actividad biológica sobre el consumidor para mejorar su salud (PWC, 2009). Los consumidores buscan activamente que los productos alimenticios sean naturales y les de la seguridad de otorgarles bienestar, en lugar de los productos con ingredientes sintéticos; fabricantes de alimentos y bebidas buscan ingredientes bioactivos naturales para incorporar en todos los tipos de productos alimenticios (Pinelo J., 2003). Según el reporte de PricewaterhouseCoopers el mercado de alimentos funcionales en el 2006 se estimó entre 50 y 60 billones de dólares con un crecimiento en el 2009 entre 8.5% y 20% anual y se estima un crecimiento del 1% al 4% por año (PWC, 2009).

Las fracciones de residuos primarios obtenidos en el procesamiento de alimentos, son residuos de cáscara y semillas, las cuales contienen altas cantidades de componentes bioactivos que pueden ser potencialmente explotados como agentes nutracéuticos con capacidad antioxidante (Amin & Mukhrizah, 2006). Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con más de 8000 estructuras polifenólicas conocidas (Haslam, 1998). Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en el color y sabor de los alimentos y bebidas, el consumo regular está asociado con efectos beneficiosos para la salud humana (Ugartondo, 2009), en cuanto a la reducción de la incidencia de enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías (Santacruz C., 2011).

La guayaba es un fruto exótico proveniente de la región tropical y subtropical del mundo (Espinal, 2010). La producción mundial de guayaba estimada para el año 2002 fue de 14.9 millones de toneladas (23% de la producción mundial total de frutas tropicales) (Núñez R, 2005). La industrialización de la guayaba provee una variedad de productos: bebidas, jarabes, helados, mermeladas, jaleas, caramelos, jugos, vinos y productos enlatados (Jiménez-Escrig, Rincón, Pulido, & Saura-Calixto, 2001). La pulpa de guayaba que se exportó en el 2006 fue de aproximadamente 2.4 y de puré 26.7 mil toneladas, mientras que en el 2007 fueron 2.7 mil toneladas de pulpa de guayaba y no se registran datos de puré (Torres, 2010). Durante la

producción de puré de guayaba rosada, los subproductos que se producen representan el 25% del peso total de carga (Kin Weng Kong, Ismail, Tan, & Rajab, 2010), el procesamiento de diferentes frutas, producen cantidades variables de subproductos, muchas veces superiores a las partes comestibles. Algunos ejemplos de productos derivados de frutas exóticas tropicales que han encontrado una oportunidad de éxito en el proceso de la extracción de compuestos bioactivos son la piña, papaya, taro y mango (Ayala-Zavala, Vega-Vega, Rosas-Domínguez, Palafox-Carlos, Villa-Rodríguez, Siddiqui, et al., 2011).

La guayaba es ampliamente conocida por su alta calidad nutricional, contenidos de fibra dietaria, carbohidratos, minerales, vitaminas y por sus diversas propiedades funcionales, entre las que se encuentran su actividad antiinflamatoria asociada a los flavonoides (miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol, apigenina, guaijaverina, leucocianidina) (Espinal, 2010; Lagos-Witte, Germosén-Robineau, & Weniger, 1997; Vargas, 2006), actividad analgésica asociada a los triterpenos (α y β amirina y derivados, lupeol, ácidos: arjunólico, asiático, protobásico, brámico, maslínico, ursólico¹⁸ y oleanólico) (Sanches, García Cortez, Schiavini, Nakamura, & Dias Filho, 2005; Vargas, 2006), actividad antipirética asociada a la pulegona, actividad espasmolítica asociado a los derivados de la L-DOPA (L -3,4 -dihidroxifenilalanina), actividad antibacterial asociada a los taninos y la actividad antioxidante asociada a los compuestos polifenólicos, ácido ascórbico y carotenos (Espinal, 2010).

Esta investigación tiene como fin extraer y cuantificar compuestos polifenólicos presentes en los subproductos de guayaba, realizando la extracción mediante maceración dinámica y soxhlet con diferentes solventes: hexano, etanol y metanol; debido a que cada solvente produce extractos con composiciones específicas por la diferencia en sus polaridades y afinidades. De este modo se buscará obtener fracciones lipofílicas e hidrofílicas que luego servirán para comparar la eficiencia y selectividad de la extracción con fluidos supercríticos.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Guayaba

1.1.1. Origen y clasificación botánica.

Guayaba (*Psidium guajava* L.) es una fruta exótica de la familia Myrtaceae. Su lugar de origen es incierto, en América se extiende desde el sur de México hasta América del Sur (Núñez R, 2005); son diversas las condiciones climáticas para su siembra y cultivo, pero es preferible los climas cálidos y secos (Espinal, 2010). En Ecuador se localiza en todas las zonas tropicales, en la gran mayoría es cultivada sin manejo agronómico y en estado silvestre (Rodríguez, 2002).

La clasificación botánica de la guayaba se muestra continuación en la tabla 1.1:

Tabla 1. 1. Clasificación botánica de la guayaba

Clase	Dicotiledóneas
Familia	Myrtaceae
Género	Psidium
Especie	Guajava L
Nombre científico	<i>Psidium Guajava</i> L
Nombre vulgar	Guayaba

Fuente: Torres (2010)

Elaboración: La autora

El árbol de guayaba que se observa en la figura 1.1, es un arbusto frondoso, que tiene hasta 10 m de altura, el tronco es corto, torcido, de ramificación baja; la corteza es de color café rojizo, tersa, escamosa (Rodríguez, 2002; Torres, 2010).



Figura 1. 1. Árbol de guayaba

Fuente: La Autora

Elaboración: La autora

El fruto de la guayaba que se muestra en la figura 1.2, es una baya de olor fragante, forma redonda, ovoide o con forma de pera, con un diámetro de 5 cm y peso de 50 - 100 g. Está compuesta por un mesocarpio carnoso y un endocarpio con numerosas, pequeñas y duras semillas. El color de la piel varía de amarillo verdoso a amarillo claro en su madurez y la pulpa puede ser blanca, rosada o roja, aunque existen otras variedades (Espinal, 2010; Núñez R, 2005; Rodríguez, 2002; Torres, 2010).



Figura 1. 2. Fruto de guayaba

Fuente: Espinal (2010)

Elaboración: La autora

1.1.2. Composición química de la guayaba.

Tabla 1. 2. Componentes nutricionales de la guayaba rosaba

Nutrientes	Valor por 100 g de fruto	
	Ref. (1)	Ref. (2)
Agua (g)	80.8	84.91
Proteína (g)	2.55	1.12
Total de lípidos (grasa) (g)	0.95	0.21
Carbohidratos (g)	14.32	12.33
Fibra dietaria total (g)	5.4	1.7
Cenizas (g)	--	0.51
Minerales		
Potasio (mg)	417.0	240.4
Fósforo (mg)	11.0	39.34
Calcio (mg)	18.0	25.52
Hierro (mg)	0.26	0.94
Vitaminas		
Vitamina C (mg)	228.3	394.60
Vitamina A (UI)	624.0	<0.01
Tiamina (mg)	0.067	0.046
Riboflavina (mg)	0.040	0.03-0.04
Niacina (mg)	1.084	0.6-1.068

Fuente: (1) USDA (2006); (2) López (2008)

Elaboración: La autora

El fruto de guayaba tiene un gran valor nutricional y funcional gracias a su alta capacidad antioxidante, contenidos de fibra dietaria, carbohidratos, minerales y vitaminas (Espinal, 2010), es rica en ácido ascórbico (vitamina C), con niveles mucho más altos que la mayoría de frutas, su contenido oscila entre 50 - 300 mg/100 g de fruto

esto es de tres a seis veces mayor que el contenido de naranja (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006; Yau, Theng, Tee, & Jhi, 2006).

La fruta, en particular la variedad rosada, tiene una buena cantidad de vitamina A (beta-caroteno), vitamina B como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina y ácido pantoténico. Además, contiene una gran cantidad de fósforo, calcio, hierro, potasio y sodio (Yau, Theng, Tee, & Jhi, 2006). En la tabla 1.2 se detallan los componentes de la guayaba.

Estudios fitoquímicos muestran que las diferentes partes de la planta de guayaba; corteza, fruta, y hojas, poseen actividades fisiológicas como antibacterianas, hipoglucémicas, anti-inflamatorias, analgésicas, antipiréticas, espasmolíticas, y son utilizados en prácticas de medicina ancestral para el tratamiento de heridas, úlceras, afecciones intestinales y cólera (Sanches, García Cortez, Schiavini, Nakamura, & Dias Filho, 2005).

1.2. Producción de guayaba

1.2.1. Producción mundial de guayaba.

Los principales productores de guayaba a nivel mundial son: India y Sudáfrica, en Sudamérica: Brasil, Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela, producen cantidades significativas (Jiménez-Escrig, Rincón, Pulido, & Saura-Calixto, 2001; Mercadante, Steck, & Pfander, 1998; Salgado, Roncari, Michelin, & Moreira, 2006).

1.2.2. Producción de guayaba en Ecuador.

Las estadísticas del Censo Agropecuario del Ecuador del año 2012, señalan que la producción anual de guayaba fue de 1353 Tm, de las cuales 612 Tm fueron comercializadas, siendo la provincia de Pastaza la de mayor producción con 397 Tm y la provincia de Loja en este mismo año fue de 25 Tm, datos que se indican en la tabla 1.3 (INEC, 2012).

Tabla 1. 3. Producción de Guayaba en Ecuador

Provincia	Producción (Tm)
Pastaza	397
Morona Santiago	381
Tungurahua	221
Manabí	120
Guayas	49
Cotopaxi	43
Loja	25
Zamora Chinchipe	22
Imbabura	20
Resto de provincias	75

Fuente: INEC (2012)

Elaboración: La autora

1.3. Subproductos de la guayaba

En la industria de obtención de puré de guayaba se genera gran cantidad de subproductos que representan aproximadamente el 25% del peso total de la fruta fresca. Tres tipos de subproductos se obtienen en las diferentes etapas de refinado (12%), tamizado (8%) y triturado (5%) (K. W. Kong & Ismail, 2011). La primera fracción de subproducto, refinado de guayaba, es de color verde-marrón, y se compone de cáscara y semilla. Mientras que las fracciones de triturado y tamizado consisten mayormente de pulpas de color levemente rojo (K.-W. Kong, Ismail, Tan, Nagendra Prasad, & Ismail, 2010).

Los subproductos de guayaba se muestran como una fuente atractiva de compuestos con capacidad antioxidante (Amin & Mukhrizah, 2006); entre polifenoles, flavonoides, carotenoides principalmente licopeno (K.-W. Kong, Ismail, Tan, Nagendra Prasad, & Ismail, 2010; K. W. Kong & Ismail, 2011; Kin Weng Kong, Ismail, Tan, & Rajab, 2010), los cuales pueden ser recuperados.

Marquina et al (2008) encontraron que la piel presenta el mayor contenido de polifenoles y capacidad antioxidante determinada mediante ABTS, aproximadamente el doble del contenido

en la pulpa de guayaba con un valor de 10.36 g GAE/100 g, 377.80 y μM TE y 6.73 g GAE/100 g, 165.31 μM de equivalente de Trolox respectivamente.

1.4. Antioxidantes

Gutteridge y Halliwell (2000) definen a un antioxidante como: "cualquier sustancia que presente en concentraciones bajas con respecto a un sustrato oxidable, retrasaría o evitaría significativamente la oxidación de dicho sustrato" (Benzie & Strain, 1996; Ugartondo, 2009).

Los radicales libres son entidades químicas que tienen un electrón desapareado o no compartido, por lo que son algo inestables, es decir, son de vida corta y son altamente reactivos y para conseguir su estabilidad, tratan de perder o ganar un electrón (Arranz Martínez, 2010). Los antioxidantes evitan que los radicales libres dañen los tejidos del huésped, al reaccionar cediendo un electrón, que oxida y transforma al radical libre en un radical más débil no tóxico y por lo tanto se cree que reduce el riesgo de ciertas enfermedades degenerativas como el cáncer o los trastornos cardiovasculares (Arranz Martínez, 2010; Núñez R, 2005).

Actualmente se conocen aproximadamente 10000 compuestos distintos con capacidad antioxidante localizados principalmente en hortalizas y verduras, semillas y aceites de semillas, frutas y bebidas como el vino y cerveza (Navarro-Marfil, 2008).

1.4.1. Compuestos polifenólicos.

Son uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes en el reino vegetal, considerados metabolitos secundarios de las plantas y con diferente estructura y actividad, aproximadamente 8000 estructuras identificadas. Su distribución en los diferentes tejidos y células vegetales, puede variar de acuerdo al tipo de compuesto, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez Valverde, Periago, & Ros, 2000). Estos compuestos tienen actividad biológica entre las que destacan su actividad antioxidante, antiinflamatoria, como antiagregantes plaquetarios, antimicrobiana y antitumoral (Córdova Izquierdo, Córdova Jiménez, Ruiz Lang, Córdova Jiménez, Guerra Liera, Rodríguez Denis, et al., 2009).

Existen diferentes estructuras de polifenoles que son definidas en función del número de anillos fenólicos que posee y se clasifican en: flavonoides, ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico), estilbenos, alcoholes fenólicos y lignanos (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012). La estructura molecular de los ácidos fenólicos simples y de las distintas familias de flavonoides se indica en la figura 1.3.

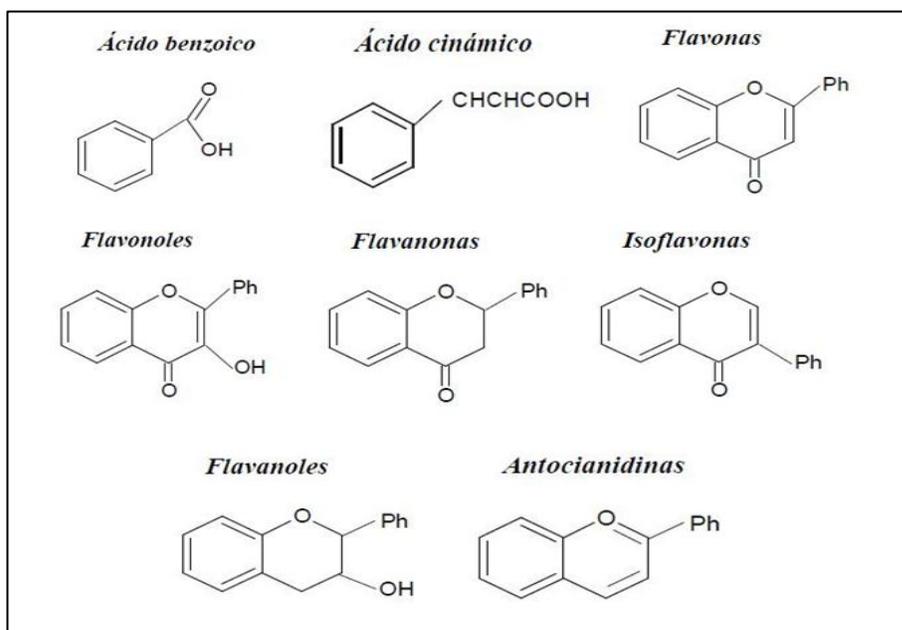


Figura 1. 3. Estructura molecular de los ácidos fenólicos simples y de las distintas familias de flavonoides

Fuente: Conde (2009)

1.5. Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos polifenólicos presentes en alimentos depende de la naturaleza química y del grado de polimerización de los compuestos, método de extracción, tamaño de partícula de la muestra, polaridad de los solventes, de la matriz vegetal (grasa, carbohidratos, clorofilas). El tiempo de extracción es también determinante al momento de obtener un mayor rendimiento. Las condiciones de extracción y la selección de los disolventes dependerán del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos que se desea extraer. Independientemente de las condiciones de extracción utilizadas, la extracción siempre es incompleta y una cantidad de compuestos polifenólicos puede quedar en los residuos de la extracción. (Arranz Martínez, 2010).

El proceso de extracción por lo general siempre se realiza una primera extracción con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, dimetilformamida, acetato de etilo) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos (Antolovich, Prenzler, Robards, & Ryan, 2000).

1.5.1. Extracción líquido-líquido.

Se denomina extracción líquido-líquido a la extracción con disolventes de los componentes de una solución líquida por contacto con otro líquido insoluble. Si las sustancias que componen la solución original se distribuyen de manera distinta entre las dos fases líquidas, se puede lograr cierto grado de separación, que puede incrementarse mediante el uso de contactos múltiples o su equivalente en la forma de la absorción de gases y la destilación (Treybal, 1999).

1.5.2. Extracción sólido-líquido

1.5.2.1. Lixiviación.

Es un método muy utilizado en la separación de compuestos antioxidantes (Conde, 2009), se basa en la disolución de uno o más compuestos de interés de una mezcla sólida por medio del contacto con un solvente líquido (Treybal, 1999).

Algunos compuestos orgánicos son separados mediante lixiviación; en el caso de aceites vegetales son recuperados a partir de semillas, como en el caso del algodón con disolventes orgánicos (Marroquín, 2008). Para la extracción de los compuestos de interés se requiere la utilización de disolventes convencionales y posterior eliminación para obtener un extracto concentrado. Los disolventes más utilizados son agua acidificada, etanol y metanol (Conde, 2009).

1.5.2.2. Extracción en soxhlet.

Este método de extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas ha sido aplicado durante décadas, es una técnica estándar y utilizada como referencia para evaluación de los resultados de métodos de extracción sólido-líquido. Es una técnica general y bien establecida que supera los resultados de otras técnicas convencionales,

aunque tiene un campo limitado en la extracción de compuestos termolábiles. La utilización de distintos disolventes da lugar a diferentes extractos y con diferente composición (Conde, 2009).

1.6. Determinación de la capacidad antioxidante

Es necesario utilizar varios métodos de medida de actividad antioxidante para obtener un valor representativo de capacidad antioxidante de la muestra, donde cada método es sensible a las distintas características redox del compuesto polifenólico ya que la capacidad antioxidante se debe a la acción conjunta de antioxidantes de muy variada reactividad (Espinal, 2010; Santacruz C., 2011). Diferentes métodos espectrofotométricos basados en diferentes principios químicos son usados para la cuantificación de fenoles totales, entre los que se encuentran Folin-Ciocalteu; ABTS, DPPH, FRAP, entre otros.

1.6.1. Método ABTS.

La generación del catión radical ABTS constituye la base de este método espectrofotométrico. El ensayo ABTS^{•+} [2,2'azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] aplicado a la medición de la capacidad antioxidante total de soluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas está basado en la generación de ABTS^{•+} cromóforo azul/verde ABTS^{•+} a través de la reacción de ABTS y persulfato de potasio. La adición de antioxidantes al catión radical preformado lo reduce a ABTS, en una medida y escala dependiendo de la actividad antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción. Así, el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del catión radical ABTS^{•+} es determinado como una función de la concentración y el tiempo y calculado relativamente para la actividad equivalente del trolox como un estándar, en las mismas condiciones. El método es aplicable al estudio de antioxidantes hidro y lipo solubles, compuestos puros y extractos de alimentos (Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, & Rice-Evans, 1999).

1.6.2. Método DPPH.

Se basa en la reducción del radical DPPH[•] por los antioxidantes de una solución (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). El radical es estable y tiene una coloración púrpura

que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a una longitud de onda de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos compuestos diferentes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH (Santacruz C., 2011).

1.6.3. Método FRAP.

Este método permite medir la capacidad de transferencia de electrones y la capacidad de reducción férrica que tienen los compuestos antioxidantes hidrofílicos. En el método FRAP se cuantifica la aparición del complejo $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{+2}$ que es un cromóforo que tiene su máxima absorción a 593 nm. El mecanismo que se mide en el método de FRAP es la capacidad que tiene un determinado compuesto antioxidante de transferir un electrón al Fe^{+3} y reducirlo a la especie Fe^{+2} , ocasionando la aparición de la quinona. Debido a que el complejo $[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ tiene un potencial de reducción muy bajo, el método FRAP es un método de muy baja especificidad (el complejo puede ser reducido por una gran variedad de compuestos antioxidantes) y por consiguiente es por este método por donde se encuentran las mayores actividades antioxidantes, esto ocasiona que el método FRAP sea muy sensible y reproducible, siendo el mejor método para cuantificar la actividad antioxidante de especies que sean pobres en concentración de antioxidantes (Espinal, 2010).

1.6.4. Cromatografía líquida de alta resolución.

En los últimos años la mayoría de los estudios sobre identificación de polifenoles se basan en la utilización de métodos cromatográficos: cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) o electroforesis capilar (EC), acoplados muchas veces a espectrometría de masas (MS) (Arranz Martínez, 2010).

High performance liquid chromatography, más conocida por HPLC denominada así por sus siglas en inglés, es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, ya

que permite separar, identificar y cuantificar un gran número de compuestos en alimentos, debido a su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y sobre todo, por su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria (Skoog, James, & Nieman, 2001; Torregrosa, 2005).

Se han identificado algunos compuestos bioactivos mediante HPLC en el fruto de guayaba, como: ácido ascórbico, ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico, miricetina, apigenina, kaempferol, quercetina, catequina, epicatequina y licopeno (Kondo, Kittikorn, & Kanlayanarat, 2005; Miean & Mohamed, 2001; Misra & Seshadri, 1968).

2. OBJETIVOS

2.1. Propósito u objetivo general de la investigación

✓ Cuantificar el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos en subproductos de guayaba.

2.2. Componente u objetivo específico de la investigación

✓ Obtener fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos de guayaba mediante extracción por maceración dinámica y soxhlet.

✓ Medir la actividad antioxidante y contenido de compuestos polifenólicos presentes en las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos de guayaba.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y equipos

3.1.1. Reactivos.

Los solventes utilizados en la extracción fueron de grado analítico: hexano al 96% (Merck), etanol y metanol 99.5% (Panreac Química S.A.)

En análisis de actividad antioxidante:

Método ABTS: 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma), persulfato de potasio (Sigma-Aldrich), ácido 6-hidroxi-(2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), trolox (Aldrich Chemistry).

Método DPPH: 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (Sigma), ácido 6-hidroxi-(2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), trolox (Aldrich Chemistry).

Método FRAP: 2, 4, 6-tri-(2piridil-s-triazina) (TPTZ) (Sigma), acetato de sodio trihidratado, cloruro de hierro hexahidratado (Merck), ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial (Merck), ácido 6-hidroxi-(2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), trolox (Aldrich).

Método Fenoles totales: Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich), carbonato de sodio anhidro p.a. (Merck), ácido gálico monohidratado (Sigma).

En la cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC: Ácido acético glacial (Merck), acetonitrilo (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), quercetina (Sigma), ácido gálico (Sigma), ácido transcinámico (Aldrich).

Cuantificación de carotenoides por HPLC: Acetato de etilo (Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), acetonitrilo (Sigma-Aldrich), β -caroteno (Sigma).

3.1.2. Equipos utilizados.

- Secador de bandejas, Ecuapack.
- Molino vibratorio de discos, RETSCH
- Juego de tamices, FRITSCH GMBH
- Balanza analítica, Ohaus

- Refractómetro, Mettler Toledo
- pH-metro digital, Mettler Toledo
- Agitador magnético
- Rotavapor, Buchi
- Espectrofotómetro visible, Jenway
- Micropipetas, Boeco
- Sistema de HPLC, Water 2596.

3.2. Material

Los subproductos de guayaba (*Psidium Guajava* L.) variedad pera rosada, que comprenden piel, pulpa y semilla, fueron obtenidos en tres momentos distintos de un lote de producción de la empresa AGROFICIAL S.A. de la ciudad de Guayaquil, dedicada al procesamiento de purés y concentrados de frutas. Las muestras fueron transportadas a baja temperatura hasta la ciudad de Loja para su posterior tratamiento.

La muestra fue sometida a deshidratación en un secador de bandejas a una temperatura de 50°C, en tratamientos a mayor temperatura se ha observado degradación química de los compuestos fenólicos (K.-W. Kong, Ismail, Tan, Nagendra Prasad, & Ismail, 2010). La deshidratación se realizó por un tiempo de 36 horas hasta llegar a una humedad menor al 10%, para asegurar la reducción de la actividad de agua ($a_w < 0.6$) de la muestra e inhibir el crecimiento microbiano y la actividad enzimática (Hernández R. & Sastre G., 1999).

Las muestras deshidratadas fueron reducidas de tamaño por molienda en un molino vibratorio de discos. Luego se realizó el tamizado de la muestra utilizando tamices metálicos, obteniendo la fracción de tamaño de partícula entre 125 a 250 μm , para luego ser almacenados en bolsas plásticas a -20°C cubiertas de la luz hasta su respectivo análisis. El esquema descrito de este procedimiento se muestra en el Anexo A.1.

3.3. Obtención de extractos.

En el presente trabajo se obtuvieron las fracciones lipofílicas e hidrofílicas, empleando las técnicas de: maceración dinámica y soxhlet, como se muestran en las figuras 3.1 y 3.2.

3.3.1. Maceración dinámica.



Figura 3. 1. Maceración dinámica

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

3.3.1.1. Extracción de fracción lipofílicas

Se pesaron 10 g de muestra, los cuales fueron transferidos en un frasco de vidrio, cubierto con papel aluminio, se agregó hexano en una relación 1:10 (peso/volumen). Se agitó por tiempos de 3, 6 y 24 horas utilizando un plato de agitación magnética a temperatura ambiente. Luego de lo cual, se separó por filtración el solvente del sólido. El solvente fue almacenado, mientras que el sólido se sometió a dos extracciones sucesivas iguales a la anterior, los tres sobrenadantes se mezclaron y se evaporaron en rotaevaporador a 40°C, luego fueron almacenados en refrigeración (4°C) hasta su posterior uso.

La muestra sólida agotada de la fracción lipofílica fue secada y almacenada para las extracciones sucesivas.

El rendimiento de extracción se determinó mediante la ecuación 1 y se expresó en porcentaje respecto al peso del material seco.

$$\% \text{ de extracción} = \frac{\text{g.de extracto seco}}{\text{g.de muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.2.

3.3.1.2. Extracción de fracciones hidrofílicas.

La muestra agotada de la fracción lipofílica, se sometió a la extracción de la fracción hidrofílica con dos solventes de diferente polaridad y poder de solvatación en el siguiente orden: etanol y metanol, en relación 1:10 (p/v). Se agitó por tiempos de 3, 6 y 24 horas utilizando un plato de agitación magnética a temperatura ambiente. El tratamiento posterior fue similar al explicado anteriormente. La muestra sólida agotada fue secada y almacenada para futuras extracciones. El rendimiento de extracción se expresó en porcentaje respecto al peso del material seco, como se mostró en la Ec. 1. Las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar.

El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.3.

3.3.2. Extracción por soxhlet.



Figura 3. 2. Extracción mediante soxhlet

Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

3.3.2.1. Extracción de fracción lipofílica.

Se pesaron 5 g de muestra, en cartuchos para colocarlos en el equipo Soxhlet, la extracción se realizó con 320 mL de hexano y se dejó sifonear por un período de 5 horas a temperaturas de ebullición del solvente (hexano: 69°C). La muestra sólida agotada de

la fracción lipofílica fue secada y almacenada para futuras extracciones. Una vez extraída la fracción lipofílica en el solvente, este se concentró en rotaevaporador a 40-50°C, obteniéndose el extracto seco y almacenándolo a 4°C en viales ámbar hasta su posterior uso. El rendimiento de extracción se expresó en porcentaje respecto al peso del material seco (Ec. 1).

Las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.4.

3.3.2.2. Extracción de fracciones hidrofílicas.

La muestra agotada de la fracción lipofílica, se sometió a la extracción de la fracción hidrofílica, con dos solventes de diferente polaridad y poder de solvatación en el siguiente orden: etanol y metanol, la extracción se realizó con 320 mL de solvente y se dejó sifonear por un período de 5 horas, a temperaturas de evaporación de los solventes (etanol: 78.4°C; metanol: 64.7°C).

La muestra sólida agotada fue secada y almacenada para futuras extracciones. Una vez extraída la fracción hidrofílica en el solvente, este se concentró en rotaevaporador a 40-50°C, obteniéndose el extracto seco y almacenándolo a 4°C en viales ámbar hasta su posterior uso. El rendimiento de extracción se expresó en porcentaje respecto al peso del material seco (Ec. 1).

Las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. El esquema descrito de este procedimiento se muestra en el Anexo A.5.

3.4. Determinación de actividad antioxidante

3.4.1. Preparación de la curva de calibración de trolox.

Se pesó 0.025 g del reactivo y se aforó a 100 mL con metanol, luego se tomaron alícuotas de 0.6, 3.8, 7.5, 11.3, 15 y 20 mL y se aforó a 25 mL con metanol, para obtener concentraciones entre 25 a 800 μ Mol trolox.

El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.6.

3.4.2. Método ABTS.

Se utilizó el método descrito por Arnao, Cano, and Acosta (2001) con modificaciones descritas por Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006). Se preparó la solución patrón de ABTS mezclando dos soluciones, preparadas como se indica a continuación: Solución (A).- ABTS 7.4 mM: Se pesaron 101.5 mg de ABTS y fue aforado a 25 mL con agua destilada. Solución (B).- Persulfato de potasio 2.6 mM: Se pesaron 17.57 mg de $K_2S_2O_8$ y fue aforado a 25 mL con agua destilada. La solución se dejó reaccionar durante 12 h a temperatura ambiente, a la oscuridad.

La solución de trabajo se preparó mezclando 1 mL de solución patrón con 60 mL de metanol hasta alcanzar una absorbancia de 1.1 ± 0.02 unidades medidas a 734 nm usando el espectrofotómetro. Para ajustar el espectrofotómetro a cero, se utilizó metanol.

De cada una de las soluciones preparadas, tanto de la curva de calibración como de los extractos se tomaron 150 μ L, se adicionaron 2850 μ L de la solución de trabajo de ABTS⁺, se dejó reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, y luego se midió la absorbancia a 734 nm.

Los resultados se expresaron en μ Mol TE/g de muestra seca. El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.7.

3.4.3. Método FRAP.

Se utilizó el método de Benzie and Strain (1996) con modificaciones descritas por Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006). Para la preparación de la solución patrón se emplearon tres soluciones. Solución (A).- de buffer acetato 300 mM/L: se pesaron 4.8437 g de acetato de sodio y se diluyó en 25 mL de ácido acético glacial (10 mM), con un pH de 3.6. Solución (B).- 2,4,6-tripiridin-s-triazina: se pesaron 0.0312 g de TPTZ diluido en 10 mL de HCl (40 mM). Solución (C).- 0.054 g de cloruro férrico hexahidratado diluido en 10 mL de metanol.

La solución de trabajo fue preparada mezclando las tres soluciones en las siguientes cantidades: 25 mL de buffer acetato, 2.5 mL de la solución de TPTZ y 2.5 mL de la solución de cloruro férrico hexahidratado y después se calentó a 37 °C, antes de usar.

De cada una de las soluciones preparadas, tanto de la curva de calibración como de los extractos se tomaron 150 µL, se adicionaron 2850 µL de la solución de trabajo FRAP, se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y luego se midió la absorbancia a 593 nm.

Los resultados se expresaron en µMol TE/g de muestra seca. El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.8.

3.4.4. Método DPPH.

Se utilizó el método de Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) con modificaciones de Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006). Para la preparación de la solución patrón de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), se pesaron 24 mg y se disolvieron en 100 mL de metanol, la misma que fue almacenada en refrigeración a 4°C y cubierto de la luz hasta su posterior uso.

Para la preparación de la solución de trabajo se mezclaron 10 mL de la solución patrón con 45 mL de metanol, hasta obtener una absorbancia de 1.1 ± 0.02 unidades medida a una longitud de onda de 515 nm usando el espectrofotómetro. Para ajustar el espectrofotómetro a cero, se utilizó metanol.

De cada una de las soluciones preparadas, tanto de la curva de calibración como de los extractos se tomaron 150 µL, se adicionaron 2850 µL de la solución de trabajo DPPH, se dejó reaccionar por 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, y luego se midió la absorbancia a 515 nm.

Los resultados se expresaron en µMol TE/g de muestra seca. El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.9.

3.5. Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006). Para la preparación de la solución de Folin-Ciocalteu a 0.25 N se mezclaron 1.25 mL de Folin-Ciocalteu 2N con 10 mL de agua destilada; y en la preparación de la solución de carbonato de sodio 1N se pesaron 2.64 g y se disolvió en 25 mL de agua destilada.

Para la realización de la curva de calibración se preparó una solución de referencia de ácido gálico, para lo cual se pesaron 50 mg y se llevó a un aforo de 25 mL con metanol, luego se tomaron alícuotas de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mL y se aforaron a 10 mL con metanol para obtener concentraciones de 0.02 a 0.1 mg/mL.

De cada una de las soluciones preparadas, tanto de la curva de calibración como de los extractos se tomaron 150 μ L, se mezclaron con 2400 μ L de agua destilada y 150 μ L de Folin-Ciocalteu 0.25N, se agitó durante 2 minutos, se dejó reaccionar por 3 minutos, por último se adicionaron 300 μ L de carbonato de sodio 1N, se agitó por 2 minutos y se dejó reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad, posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 725 nm.

Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra seca (mg eq. GAE/100g MS). El esquema del procedimiento descrito se muestra en el Anexo A.10.

3.6. Cuantificación de compuestos fenólicos y carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un sistema HPLC Water 2596 como el que se observa en la figura 3.3, con un sistema de bombas cuaternario, detector de arreglo de diodos Water 996 dotado con un termostato y un detector de UV. Se empleó una columna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm i.d. ,5 μ m, Supelco. USA).



Figura 3. 3. Sistema de HPLC Water 2596

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

3.6.1. Cuantificación de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos a partir de subproductos de guayaba se identificaron utilizando el método descrito por Wu, Hsieh, Wang, and Chen (2009) con modificaciones descritas por Nantitanon, Yotsawimonwat, and Okonogi (2010). En la elución de componentes se utilizaron dos solventes: solución A: ácido acético – agua (2:98, v/v) y ácido acético – agua (0.5:95.5, v/v) con acetonitrilo (50:50, v/v) como solvente B.

El programa de gradiente de elución con una relación de B en A fue el siguiente: de 0 a 1 min (0:100 a 5:95, v/v), de 1 a 15 min (5:95 a 10:90, v/v), de 15 a 30 min (10:90 a 45:55, v/v), de 30 a 40 min (45:55 y 40:60, v/v), de 40 a 55 min (40:60 a 55:45, v/v), de 55 a 65 min (55:45 a 80:20, v/v), con un flujo de 1 mL/min y 20 μ L de muestra inyectada. Las muestras y las fases móviles se filtraron previamente a través de un filtro Milipore de 0.45 μ m los compuestos fueron identificados a longitud de onda de 280 nm. Cada muestra se analizó por triplicado.

Los compuestos fenólicos identificados fueron cuantificados sobre la base del área del pico y por comparación con las curvas de calibración (Ácido gálico: 1-30 μ g/mL; quercetina: 0.4-30 μ g/mL; ácido transcinámico; 0.2-1 μ g/mL), los resultados fueron expresados en mg de compuesto/g de extracto.

3.6.2. Cuantificación de carotenoides.

La cuantificación de carotenoides se realizó utilizando el método descrito por Tee y Lim (1991) con algunas modificaciones. El volumen de inyección de muestras fue de 60 μ l. La fase móvil isocrática utilizada fue: acetonitrilo-metanol-acetato de etilo, (88:10:2, v/v) a un flujo de 1.0 mL/min con una temperatura de la columna de 21 °C con una longitud de onda de 436 nm. Cada muestra se analizó por triplicado. El contenido de carotenoides se determinaron sobre la base de la curva de calibración preparada utilizando estándar (β -caroteno: 4-30 μ g/mL), los resultados fueron expresados en mg de compuesto/g de extracto.

3.7. Análisis estadístico.

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas entre los tratamientos de extracción con maceración dinámica, para el porcentaje de rendimiento, actividad antioxidante (ABTS, FRAP y DPPH), fenoles totales y cuantificación de fenoles y carotenoides mediante HPLC con un nivel de significancia de 95% ($P < 0.05$). Se utilizó el software MINITAB 17.

Se utilizó el programa Microsoft Excel 2010 para obtener las curvas de calibración, y determinando que su coeficiente de correlación sea de $r^2 > 0.99$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Rendimientos de extracción de subproductos de guayaba

El ANOVA para maceración dinámica (Anexo C.1) mostró que las variables: tiempo, solvente e interacción de tiempo-solvente, afectan significativamente en el rendimiento de extracción ($p < 0.05$).

La figura 4.1. muestra el rendimiento de extracción de las fracciones lipofílica e hidrofílica, como resultado el solvente con mayor porcentaje de extracción mediante maceración dinámica corresponde a etanol en un tiempo de 24 h, con un valor de 13.31%, sin embargo con la extracción control (soxhlet-etanol) se obtuvo un mejor resultado del 17.21%, lo cual se debe a que el solvente de extracción al ser sometido a una temperatura superior a la del ambiente; produce una mayor solubilidad del soluto en la solución y, en consecuencia, concentraciones finales mayores (Treybal, 1999).

Se consideró al método soxhlet como extracción control para este estudio, ya que es un método tradicional de extracción de muestras sólidas y es utilizado hasta la actualidad como método de referencia (Castro-Vargas, Rodríguez-Varela, Ferreira, & Parada-Alfonso, 2010; Conde, 2009) .

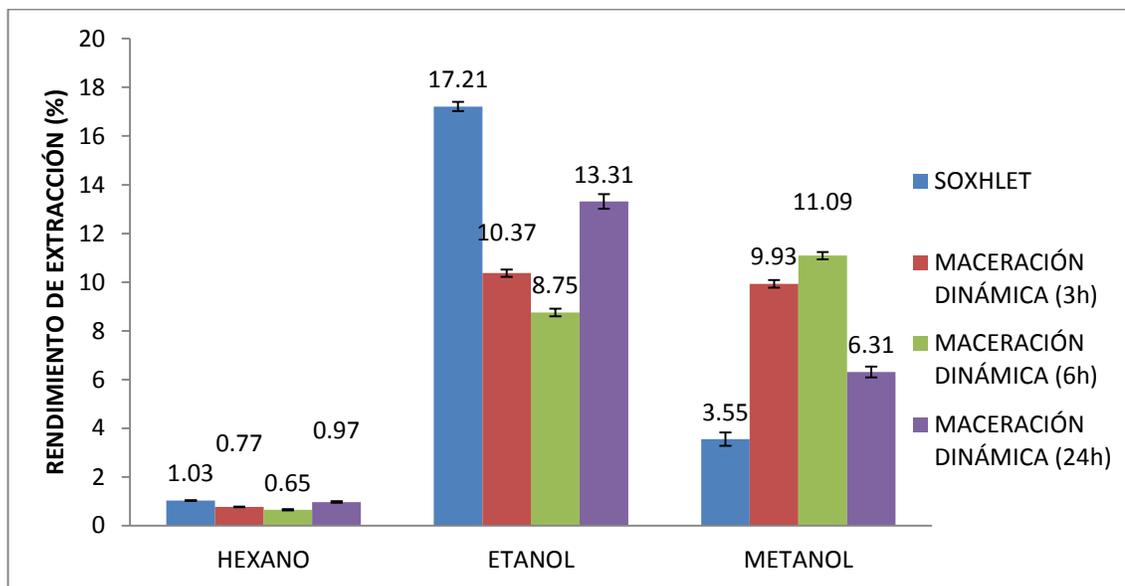


Figura 4. 1. Rendimientos de extracción de subproductos de guayaba

Fuente: Anexo B.1.1; B.1.2.

Elaboración: La Autora

Realizar una comparación entre las fracciones lipofílica e hidrofílica resulta difícil debido a la composición química de la fruta. El rendimiento para la fracción lipofílica extraída mediante maceración dinámica, mostró el mayor valor para un tiempo de 24 h ($0.97\% \pm 0.03$), aproximado a la extracción con soxhlet ($1.03\% \pm 0.01$).

En la extracción de los compuestos hidrofílicos de la fracción metanólica se obtuvo el residuo de los compuestos que en la fracción etanólica no fue posible extraer. El mayor porcentaje de extracción para la fracción metanólica se obtuvo con un tiempo de 6 h con un valor de $11.09\% \pm 0.15$, que en comparación con soxhlet ($3.55\% \pm 0.27$) es mayor.

Apolo Aguilar (2013) reportó un rendimiento de extracción del 18% para subproductos de guayaba usando etanol al 57% en una relación (p:v) 1:50. Por otra parte según Figueroa H., Armijos P., and Pérez C. (2012) un rendimiento de extracción con EtOH al 57% de $46.4\% \pm 5.9$. En estudios similares, Castro-Vargas, Rodríguez-Varela, Ferreira, and Parada-Alfonso (2010) determinaron un rendimiento de extracción con soxhlet en semillas de guayaba con acetato de etilo y etanol de $4.603\% \pm 0.90$ y $10.74\% \pm 0.90$ respectivamente. Debido a las condiciones usadas por los autores, los resultados no son comparables con el presente estudio, ya que la muestra es diferente, las técnicas de extracción, tiempos, solvente y concentraciones de solventes no son las semejantes.

4.2. Determinación de la capacidad antioxidante

La medida de la capacidad antioxidante por varios métodos permite establecer la contribución relativa de los diferentes mecanismos de actividad antioxidante que tienen los compuestos extraídos de la guayaba (Núñez R, 2005).

La tabla 4.1 muestra un resumen de los resultados de actividad antioxidante de los subproductos de guayaba obtenida a partir de los métodos espectrofotométricos: ABTS, DPPH y FRAP.

Tabla 4. 1. Resumen de actividad antioxidante

	Tiempo (h)	Método	Solvente		
			Hexano	Etanol	Metanol
ABTS (μmol TE/g BH)	5	Soxhlet	3.17 ± 0.09	50.39 ± 1.61	22.07 ± 0.36
	3	Maceración dinámica	3.01 ± 0.06	28.29 ± 2.28	40.92 ± 2.22
	6		2.53 ± 0.16	10.23 ± 1.77	43.32 ± 2.32
	24		4.46 ± 0.17	20.49 ± 3.41	29.91 ± 0.94
DPPH (μmol TE/g BH)	5	Soxhlet	1.21 ± 0.04	26.96 ± 0.11	14.91 ± 0.45
	3	Maceración dinámica	1.48 ± 0.21	11.26 ± 2.13	22.25 ± 3.38
	6		1.30 ± 0.18	10.84 ± 1.69	22.95 ± 2.72
	24		2.25 ± 0.02	14.13 ± 1.46	39.87 ± 0.02
FRAP (μmol TE/g BH)	5	Soxhlet	1.15 ± 0.08	16.04 ± 0.3	12.41 ± 1.01
	3	Maceración dinámica	1.08 ± 0.08	4.90 ± 0.80	14.28 ± 1.59
	6		1.06 ± 0.01	4.66 ± 0.83	13.33 ± 0.61
	24		1.45 ± 0.16	7.40 ± 1.27	27.89 ± 0.28

Fuente: Anexo B.3.1.1; B.3.1.2; B.3.2.1; B.3.2.2; B.3.3.1; B.3.3.2

Elaboración: La autora

4.2.1. Método ABTS.

El ANOVA (Anexo C.2.1) mostró que el valor de $p < 0.05$ para las variables: tiempo, solvente y para la interacción de las mismas, lo cual indica que existe efecto significativo de las variables sobre la capacidad antioxidante mediante ABTS.

Podemos observar que existe un aumento de la capacidad antioxidante mediante ABTS con la variación de los solvente en el siguiente orden hexano < etanol < metanol, pero al variar el tiempo de extracción observamos que para hexano etanol y metanol no existe tendencia determinando el valor más alto a 3h.

Los valores obtenidos de capacidad antioxidante en las fracciones lipofílicas e hidrofílicas, se observan en la figura 4.2; que determino el mejor resultado con la extracción de metanol en un tiempo de 6 h mediante maceración dinámica, con un resultado de $43.32 \mu\text{mol TE/g BH}$, siendo este menor cuando se compara con la

extracción mediante soxhlet con un valor para etanol de 50.39 $\mu\text{mol TE/g BH}$. En maceración dinámica, se evidencia que los mejores resultados con ABTS para metanol como solvente de extracción.

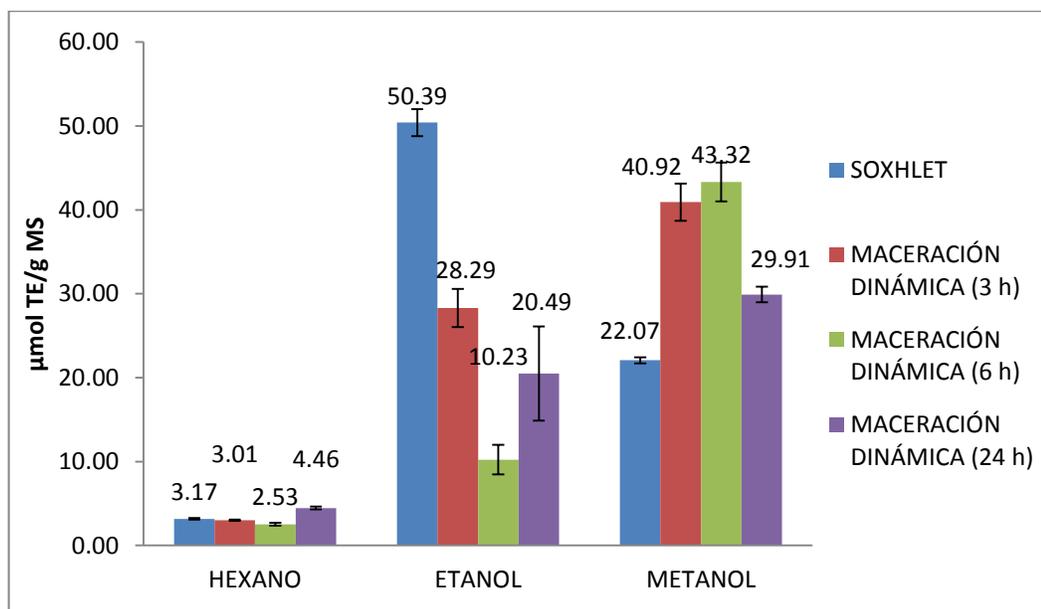


Figura 4. 2. Actividad antioxidante mediante ABTS

Fuente: Anexo B.3.1.1; B.3.1.2

Elaboración: La autora

En investigaciones realizadas en subproductos de guayaba se pudo evidenciar los siguientes resultados para actividad antioxidante determinada mediante ABTS: Apolo Aguilar (2013) reportó 43.82 $\mu\text{M TE/g BH}$ usando etanol al 57%, valor similar al obtenido en el presente estudio (43.32 $\mu\text{M TE/g BH}$); mientras que Figueroa H., Armijos P., and Pérez C. (2012) y Martínez, Torres, Meneses, Figueroa, Pérez-Álvarez, and Viuda-Martos (2012) en extracto de fibra de guayaba reportaron valores inferiores 15.2 ± 1.9 y 1.9 ± 0.05 $\mu\text{M TE/g BH}$ con etanol al 57% y una mezcla de metanol-agua-HCl (50:50 v/v, pH 2) respectivamente.

Por otra parte, Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006) reportaron valores entre 22.3-37.9 $\mu\text{M TE/g BH}$ en diferentes variedades de fruto de

guayaba en extractos metanólicos, los cuales son inferiores comparados con el presente estudio.

4.2.2. Método DPPH.

El ANOVA (Anexo B.2.3) mostró que el valor de $p < 0,05$ para las variables: tiempo, variable y su interacción, lo que indica que tienen efecto significativo en la capacidad antioxidante mediante DPPH.

Se puede observar que para maceración dinámica, que en los tiempos de extracción de 3 y 6 horas no existe variación en el resultado, pero si al aumentar el tiempo a 24 horas obteniendo un resultado mayor que con los tiempos anteriores, de la misma manera al realizar la comparación entre los solventes la respuesta capacidad antioxidante mediante DPPH aumenta el resultado al incrementar la polaridad de los solventes.

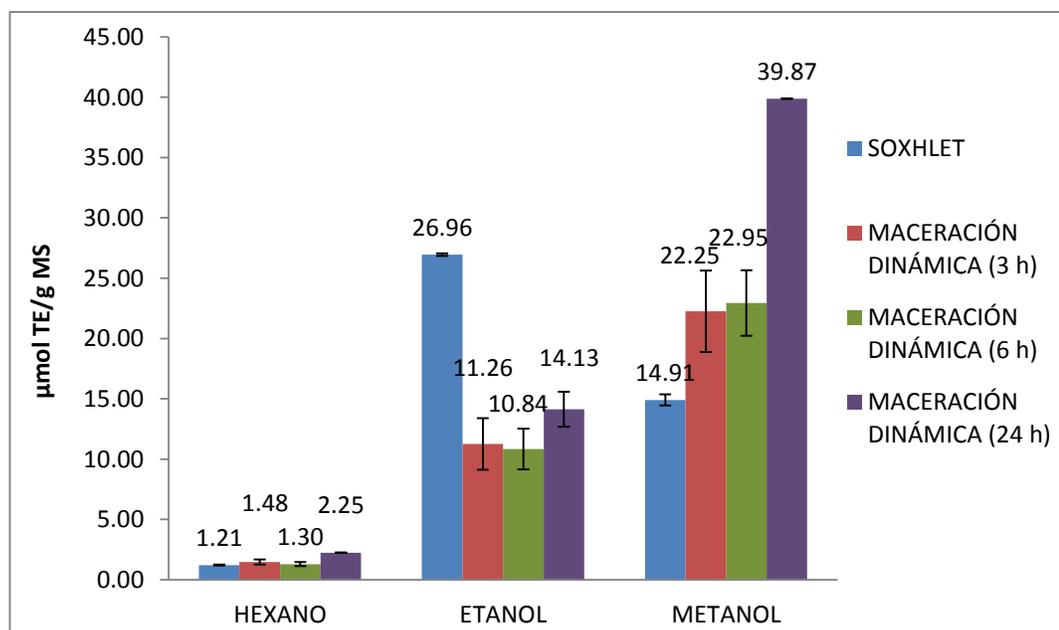


Figura 4.3. Actividad antioxidante mediante DPPH

Fuente: Anexo B.3.3.1; B.3.3.2

Elaboración: La autora

En la figura 4.3, se observa los valores obtenidos de capacidad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas, mostrando que se obtuvo mayor resultado con la

extracción de metanol en un tiempo de 24 h mediante maceración dinámica, con un resultado de 39.87 $\mu\text{mol TE/g BH}$, mientras que con la extracción mediante soxhlet, se obtuvo un valor inferior con etanol que es de 26.96 $\mu\text{mol TE/g BH}$.

En estudios realizados en subproductos de guayaba para la determinación de capacidad antioxidante mediante DPPH los valores reportados por Apolo Aguilar (2013) fueron similares al presente estudio 41.71 $\mu\text{M TE/g BH}$ con etanol al 57%, por otra parte Figueroa H., Armijos P., and Pérez C. (2012) establecieron valores superiores; 86.5 $\mu\text{M TE/g BH}$ con etanol 57%, mientras que en la investigación realizada en extractos de fibra de guayaba por Martínez, Torres, Meneses, Figueroa, Pérez-Álvarez, and Viuda-Martos (2012) reportó un resultado menor de 3.3 $\mu\text{M TE/g BH}$ con una mezcla de metanol-agua-HCL (50/50).

Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006) Obtuvieron resultados para las diferentes variedades de guayaba con valores entre 16.2 - 32.0 $\mu\text{M TE/g BH}$ en extractos metanólicos, los cuales se encuentran dentro del rango de los determinados en el presente estudio de subproductos.

4.2.3. Método FRAP.

El ANOVA (Anexo C.2.2) muestra que el valor de $p > 0,05$ para las variables: tiempo y la interacción de las variables tiempo y solvente, lo que indica que no existe diferencia significativa; mientras que por otro lado se ha obtenido un valor de $p < 0,05$ para el solvente, determinando así que influye significativamente en los resultados.

Observamos la misma tendencia de los resultados en el efecto del tiempo-solvente que en el método DPPH.

En la figura 4.4, se observa los valores obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas, mostrando que se obtuvo mayor resultado con la extracción de metanol en un tiempo de 24 h mediante maceración dinámica, con un resultado de 27.89 $\mu\text{mol TE/g BH}$, en comparación con la extracción mediante soxhlet, se obtuvo un valor superior con respecto a etanol que es de 16.04 $\mu\text{mol TE/g BH}$.

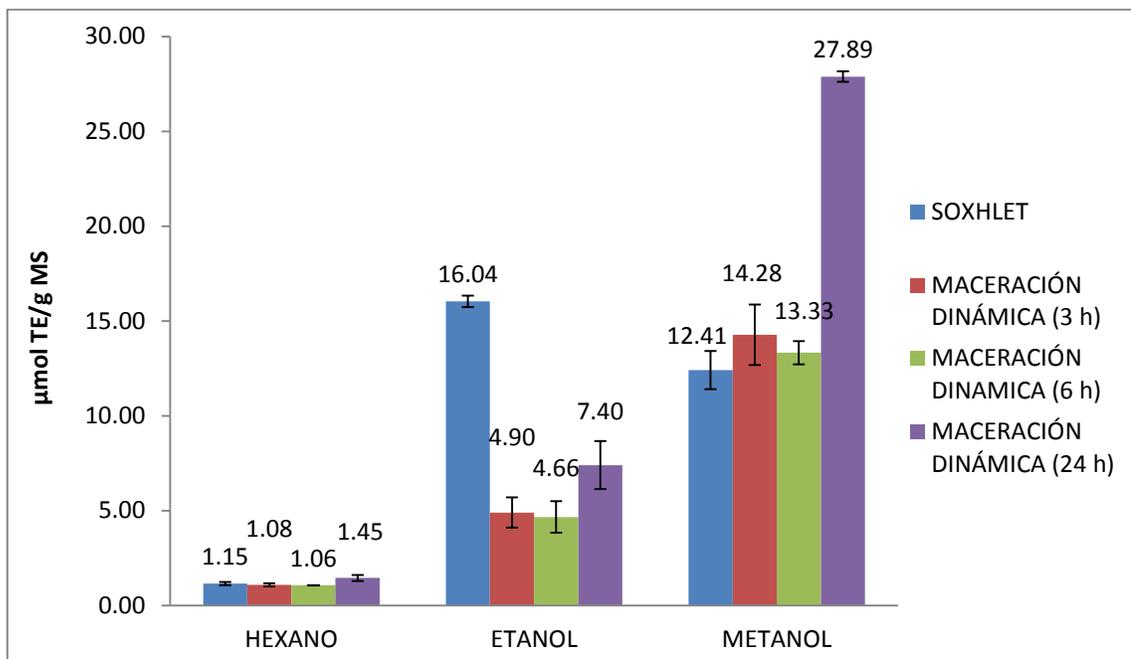


Figura 4.4. Actividad antioxidante mediante FRAP

Fuente: Anexo B.3.3.1; B.3.3.2

Elaboración: La Autora

Al comparar los estudios realizados en los subproductos de guayaba para la determinación de actividad antioxidante mediante FRAP con el presente estudio, encontramos que: Apolo Aguilar (2013), obtuvo un resultado de 26.8 $\mu\text{M TE/g BH}$ con etanol al 57% que es similar, mientras que Figueroa H., Armijos P., and Pérez C. (2012) con un valor de 36.6 $\mu\text{M TE/g BH}$ con etanol al 57% siendo superior y Martínez, Torres, Meneses, Figueroa, Pérez-Álvarez, and Viuda-Martos (2012) reportaron un valor de 6.0 $\mu\text{M TE/g BH}$ con una mezcla de metanol-agua-HCL (50:50 v/v, pH 2), siendo inferior.

En las diferentes variedades de guayaba Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006) obtuvieron valores para extractos metanólicos de diferentes variedades de guayaba de 15.5-33.3 $\mu\text{M TE/g BH}$ en extractos metanólicos, los cuales están dentro de los valores determinados e incluso superiores a los encontrados en este estudio.

Al comparar los resultados de los diferentes métodos de actividad antioxidante estudiados, podemos constatar que los mejores resultados en DPPH y FRAP se obtuvieron en la extracción

con metanol a 24 h, mientras que para ABTS con metanol a 6 h, lo que sugiere que la actividad antioxidante de los subproductos de guayaba son de carácter hidrofílico principalmente.

Comparar las actividades antioxidantes de este estudio y otros datos publicados se evidenciaron la diferencia en los valores encontrados, debido a que el contenido de compuestos antioxidantes puede ser influenciada por disolvente de extracción usado, la variedad y la procedencia de la materia prima, las diferentes condiciones de extracción (Musa, Abdullah, Jusoh, & Subramaniam, 2011), además, otros factores, tales como el tiempo de contacto y la temperatura, número de ciclos de extracción, disolvente relación de material, y la técnica de extracción, influyen significativamente en la eficacia de extracción de los compuestos de interés (Dorta, Lobo, & González, 2012).

4.3. Determinación de fenoles totales

El ANOVA (Anexo C.2.3) muestra que el valor de $p > 0.05$ para la variable tiempo, lo que indica que no existe diferencia significativa; mientras que por otro lado se ha obtenido un valor de $p < 0.05$ para el solvente y la interacción entre tiempo y solvente, determinando así que dichos efectos influyen significativamente en los resultados.

Para maceración dinámica, observamos para hexano y metanol no existe tendencia de los resultados, pero si para la extracción con etanol, ya que los resultados crecen al incrementar el tiempo de extracción.

En la figura 4.5, se observa los valores obtenidos de la determinación de fenoles totales en las fracciones lipofílicas e hidrofílica, indicando que se obtuvo mayor resultado con la extracción de etanol en un tiempo de 24 h mediante maceración dinámica, con un resultado de 273.39 mg EAG/100g BH, que fue menor en comparación con la extracción mediante soxhlet, se determinó un valor para etanol de 396.66 mg EAG/100g BH.

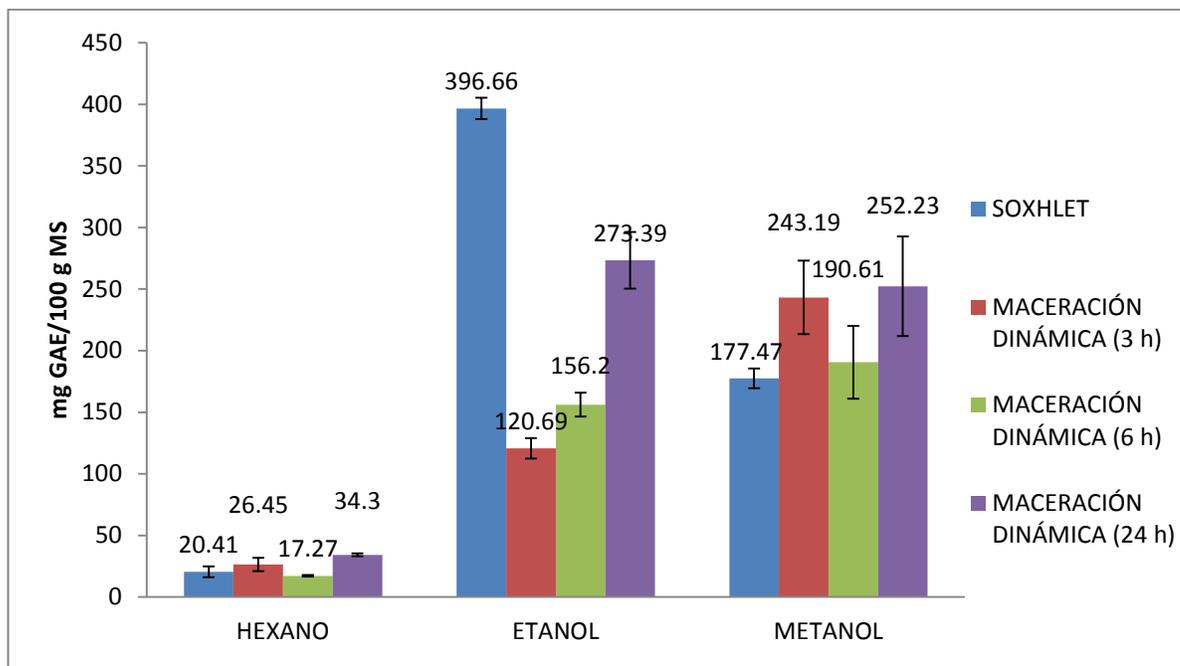


Figura 4.5. Fenoles totales

Fuente: Anexo B.4.1; B.4.2

Elaboración: La Autora

Estudios realizados del contenido de fenoles totales en subproductos de guayaba nos muestran los siguientes resultados: Apolo Aguilar (2013) reportó un valor de 310.69 mg EAG/100g BH con etanol al 57% y Figueroa H., Armijos P., and Pérez C. (2012) determinaron 557 mg EAG/100g BH con etanol al 57%. Estos resultados son mayores a los determinados en el presente estudio.

Por otra parte para el fruto de guayaba diferentes autores reportaron los siguientes valores: Restrepo-Sánchez, Narváez-Cuenca, and Restrepo-Sánchez (2009) obtuvo 286±12 mg EAG/100g BH con metanol:agua (50:50, v/v), Mahattanatawee, Manthey, Luzio, Talcott, Goodner, and Baldwin (2006) 231.61 mg EAG/100g BH con metanol, Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, and Byrne (2006) determinaron valores de 174.2-396.7 mg EAG/100 g para extractos metanólicos, Yau, Theng, Tee, and Jhi (2006) reportaron 138 mg EAG/100g con etanol al 57%; mientras que K.-W. Kong, Ismail, Tan, Nagendra Prasad, and Ismail (2010) determinaron un valor de 265.00 mg EAG/100 g con etanol al 80% con un pH de 2.48 en refinada de guayaba.

Los datos del contenido de fenoles totales en los diferentes estudios de las diferentes partes de guayaba, no pudieron ser comparados con el presente estudio debido a que las condiciones a las cuales se extrajo los compuestos fenólicos no son iguales y puede depender de algunos factores que afectan la composición de la fruta y por ende de sus subproductos como: variedad de fruta, estado de madurez y época de cosecha, factores ambientales como tipo de suelo y clima, factores genéticos, además a el tratamiento de la muestra.

4.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

Para realizar la identificación preliminar de los compuestos polifenólicos, se realizó una corrida cromatográfica de una mezcla mix de 6 patrones. En la figura 4.6 se observa el cromatograma de los compuestos patrones utilizados en el presente estudio donde el pico 1 corresponde a ácido gálico (5.33 min), el pico 2 a ácido vanílico (20.87 min), el pico 3 a ácido caféico (21.32 min), el pico 4 a coumarina (31.05 min), el pico 5 a quercetina (38.20 min) y por último el ácido transcinámico (42.00 min). Al realizar una comparación de los cromatogramas obtenidos de los estándares y de la muestra, se identificaron en los extractos de subproducto de guayaba tres compuestos: ácido gálico, quercetina y ácido transcinámico como se observa en el cromatograma de la figura 4.7, a cada uno de los compuesto se efectuó una comprobación, comparando los espectros UV del estándar, la muestra y bibliografía (Ariza Cubillos, 2012; Im, Suh, Lee, Kozukue, Ohnisi-Kameyama, Levin, et al., 2008; Sun, Liang, Bin, Li, & Duan, 2007), presentando los picos característicos en las longitudes de onda de cada compuesto. También se pudo observar la presencia de un compuesto polifenólico no identificado siendo posiblemente este el compuesto mayoritario de los extractos de subproductos de guayaba. Además se observó una variación del tiempo de retención en los compuestos de los cromatogramas, esto puede deberse a la naturaleza de los mismos ya que son diferentes, en el cromatograma de patrones son compuestos puros y en las muestras se encuentran glicosidados como se reporta en literatura. La solubilidad de los compuestos fenólicos se rige por el tipo de disolvente (polaridad) utilizado, el grado de polimerización de los compuestos fenólicos, así como la interacción de los compuestos fenólicos con otros constituyentes de los alimentos y la formación de complejos insolubles (Naczek & Shahidi, 2004).

Para la cuantificación de cada uno de los compuestos polifenólicos identificados en la guayaba, se establecieron curvas de calibración con los estándares de cada compuesto en un rango de concentración de 1 – 30 µg/mL, a diferencia de la curva para ácido transcinámico que fue de un rango de 0.2 – 1 µg/mL debido a el contenido del compuesto en la muestra se encontraba fuera de rango de la curva del mix preparado (Anexo B.2.5).

La tabla 4.2 muestra un resumen de los resultados obtenidos de la cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC de los subproductos de guayaba.

Tabla 4. 2. Resumen de cuantificación de compuestos fenólicos

	Tiempo (h)	Método	Solvente	
			Etanol	Metanol
Ácido gálico (mg AG/100 g BH)	5	Soxhlet	32.93 ± 7.46	12.41 ± 1.84
	3	Maceración dinámica	82.96 ± 1.69	40.74 ± 2.29
	6		68.89 ± 3.09	66.02 ± 4.89
	24		112.78 ± 8.57	21.47 ± 2.04
Quercetina (mg quercetina/100 g BH)	5	Soxhlet	19.90 ± 16.94	0.80 ± 0.06
	3	Maceración dinámica	26.22 ± 10.26	11.72 ± 2.73
	6		11.73 ± 4.09	10.00 ± 0.21
	24		24.7 ± 9.19	6.31 ± 0.96
Ácido transcinámico (mg AT/100 g BH)	5	Soxhlet	6.33 ± 4.55	0.06 ± 0.14
	3	Maceración dinámica	4.58 ± 1.75	0.36 ± 0.53
	6		5.44 ± 1.3	0.89 ± 0.03
	24		5.24 ± 0.33	1.15 ± 0.13

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

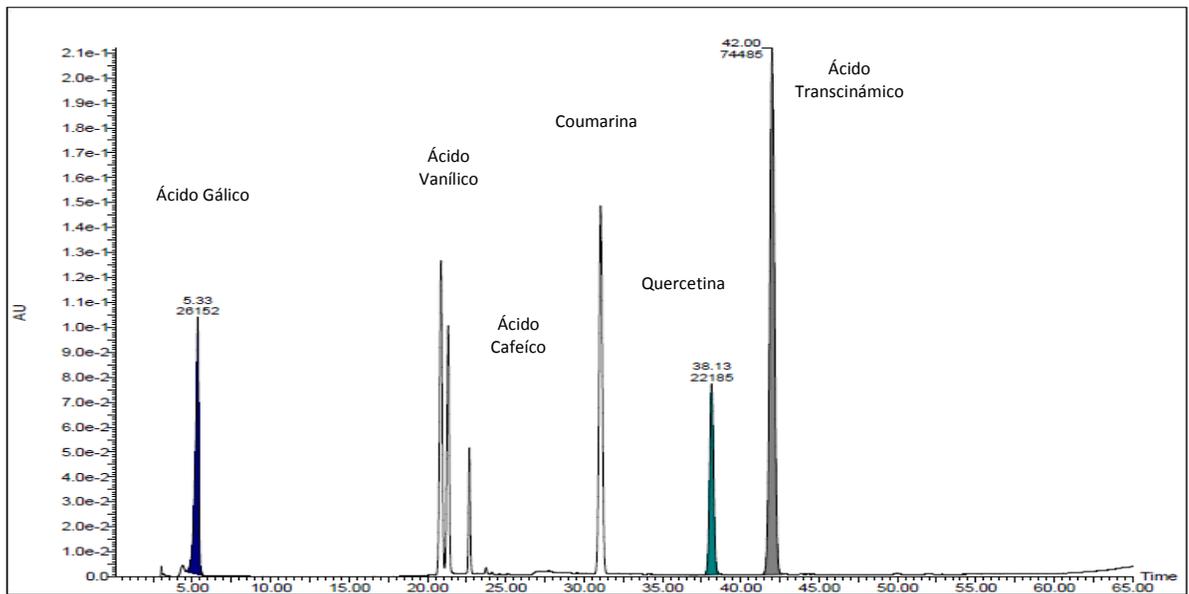


Figura 4.6. Cromatograma de patrones

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

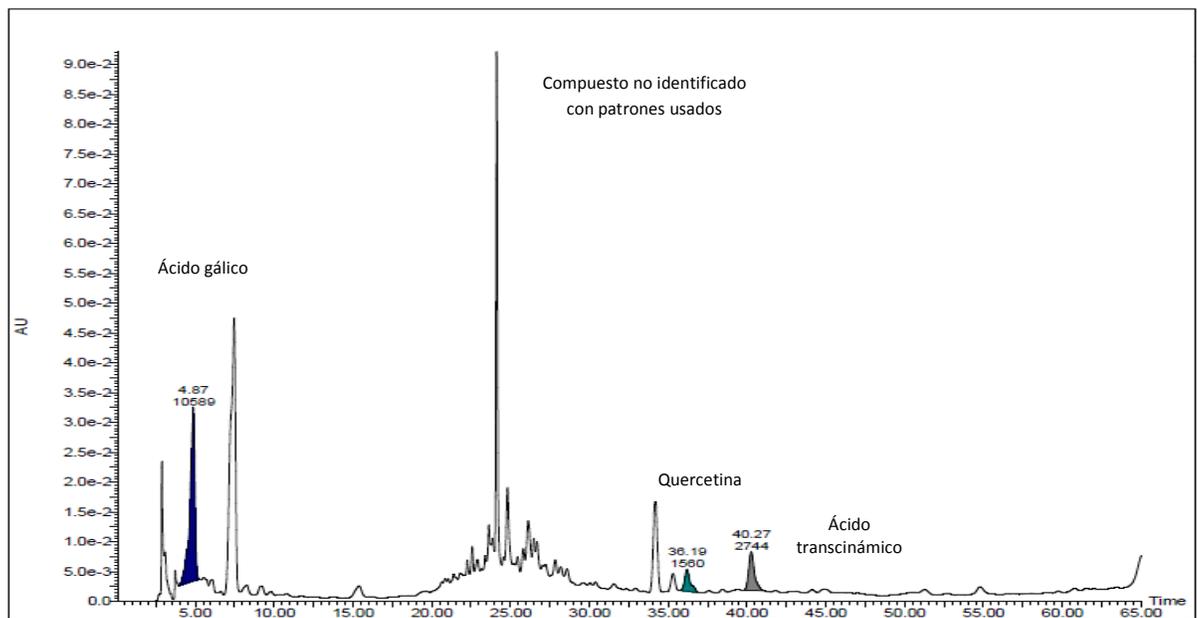


Figura 4.7. Cromatograma de extractos hidrofílicos

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

4.4.1. Ácido gálico.

En la figura 4.8, observamos los valores promedio de la cuantificación de ácido gálico de las muestras analizadas, donde se muestra el mayor resultado con la extracción de etanol en un tiempo de 24 h mediante maceración dinámica, con un resultado de 112.78 mg AG/Kg BH, en comparación con la extracción mediante soxhlet, se obtuvo un valor inferior con respecto a etanol 32.93 mg AG /Kg BH.

Observamos que para la extracción con etanol, al aumentar el tiempo de extracción aumenta la cantidad de ácido gálico, a diferencia de la extracción con metanol de que no presenta la misma tendencia ya que aumenta hasta las 6 horas de extracción pero disminuye a las 24 horas.

El ANOVA (Anexo 3.2.4) muestra que el valor de $p > 0.05$ para la variable de tiempo, lo que indica que no existe diferencia significativa; mientras que por otro lado se ha obtenido un valor de $p < 0.05$ para el solvente y la interacción entre tiempo y solvente, determinando así que dichos efectos influyen significativamente en los resultados.

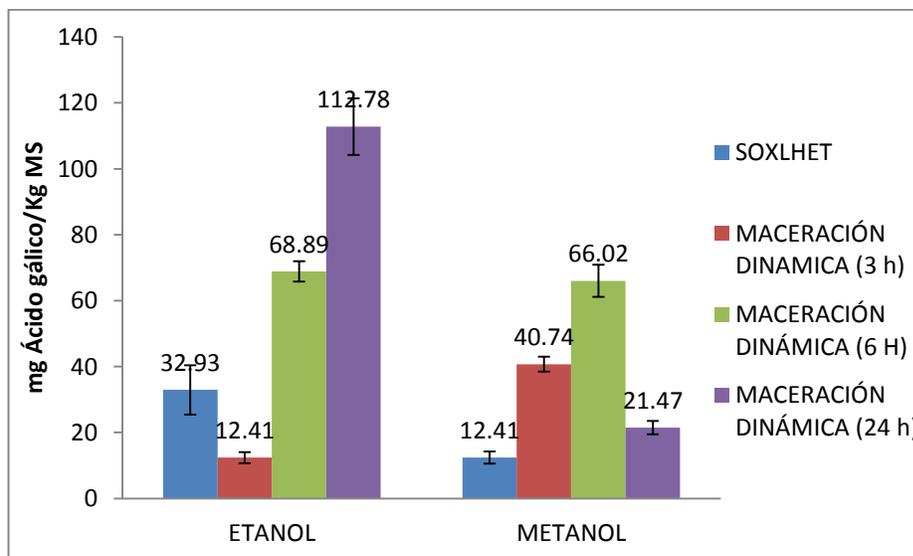


Figura 4.8. Ácido gálico

Fuente: Anexo B.5.1.1; B.5.1.2

Elaboración: La Autora

Para el subproducto de guayaba no se encontraron investigaciones realizadas que confirmen la presencia de ácido gálico.

Rincón, Tapia, and Padilla (2003) reportaron para la fracción de piel de la guayaba rosada un valor 13540 mg AG/kg, mientras que Wu, Hsieh, Wang, and Chen (2009) y Espinal (2010) reportaron resultados de 5400 mg AG/kg y 3225 mg AG/Kg de fruta seca de guayaba, siendo estos valores mayores a los encontrados en el presente estudio esto se puede deber a los diferentes tratamientos que se dio a la muestra, los métodos de extracción de compuestos fenólicos, al estado de maduración de la fruta y finalmente Chen and Yen (2007) determinó un valor de 2.66 mg AG/Kg en fruta de guayaba demostrando ser menor al valor obtenido en este estudio.

4.4.2. Quercetina.

El ANOVA (Anexo C.2.3) muestra que el valor de $p > 0.05$ para las variables de tiempo y la interacción entre tiempo y solvente, lo que indica que no existe diferencia significativa; mientras que por otro lado se ha obtenido un valor de $p < 0.05$ para el solvente, determinando así que dichos efectos influyen significativamente en los resultados.

Para la cuantificación de quercetina podemos observar que en la extracción realizada con etanol en los tiempos de 3 y 24 horas se obtuvieron resultados similares, para la extracción realizada con metanol podemos observar que los resultados disminuyen al aumentar el tiempo de extracción.

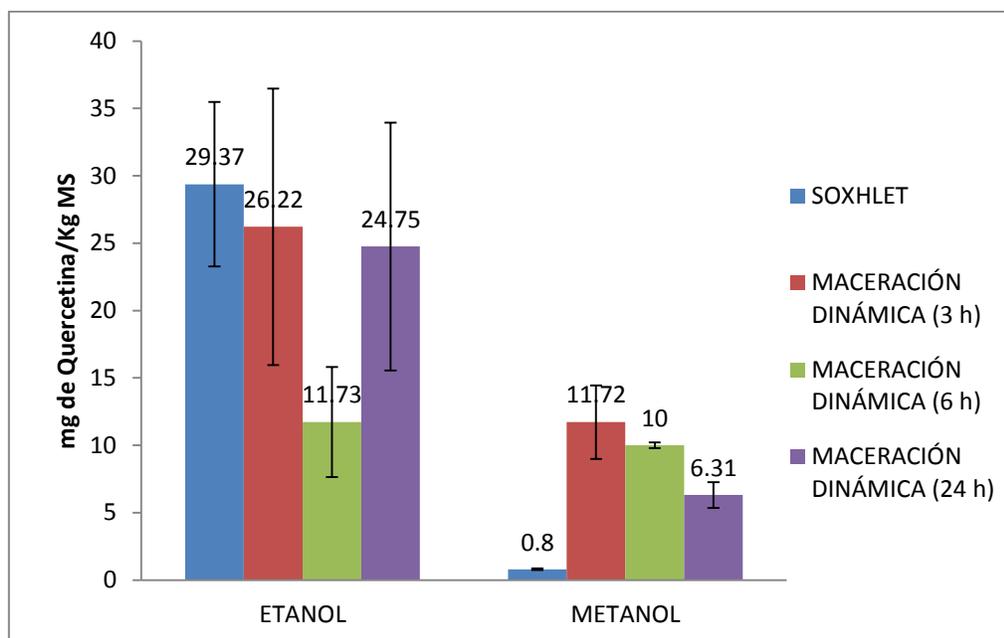


Figura 4.9. Quercetina

Fuente: Anexo B.5.2.1; B.5.2.2

Elaboración: La autora

En la figura 4.9, se observa los valores obtenidos de la cuantificación de quercetina en las fracciones hidrofílicas, mostrando que se obtuvo mayor resultado con la extracción de etanol en un tiempo de 3 h mediante maceración dinámica, con un resultado de 26.03 mg quercetina/Kg, en comparación con la extracción mediante soxhlet, se obtuvo un valor superior con respecto a etanol de 29.37 mg quercetina/Kg BH; lo cual determina que es inferior a los obtenidos en fruta de guayaba por Espinal (2010) y Vargas (2006), con valores de 282.3 mg quercetina/Kg y 126 mg quercetina/Kg, respectivamente, por otra parte Wu, Hsieh, Wang, and Chen (2009) y Nantitanon, Yotsawimonwat, and Okonogi (2010) determinaron en hojas de guayaba una cantidad de quercetina de 1600 mg quercetina/Kg y 2612 mg quercetina /Kg respectivamente.

4.4.3. Ácido transcinámico.

El ANOVA (Anexo C.2.3) muestra que el valor de $p > 0.05$ para las variables de tiempo y la interacción entre tiempo y solvente, lo que indica que no existe diferencia significativa;

mientras que por otro lado se ha obtenido un valor de $p < 0.05$ para el solvente, determinando así que dichos efectos influyen significativamente en los resultados.

En cuanto a la determinación de ácido transcinámico podemos observar para etanol un aumento en el contenido hasta las 6 h manteniéndose para 24 horas, para la extracción realizada con metanol podemos observar que los resultados crecen al incrementar el tiempo de extracción.

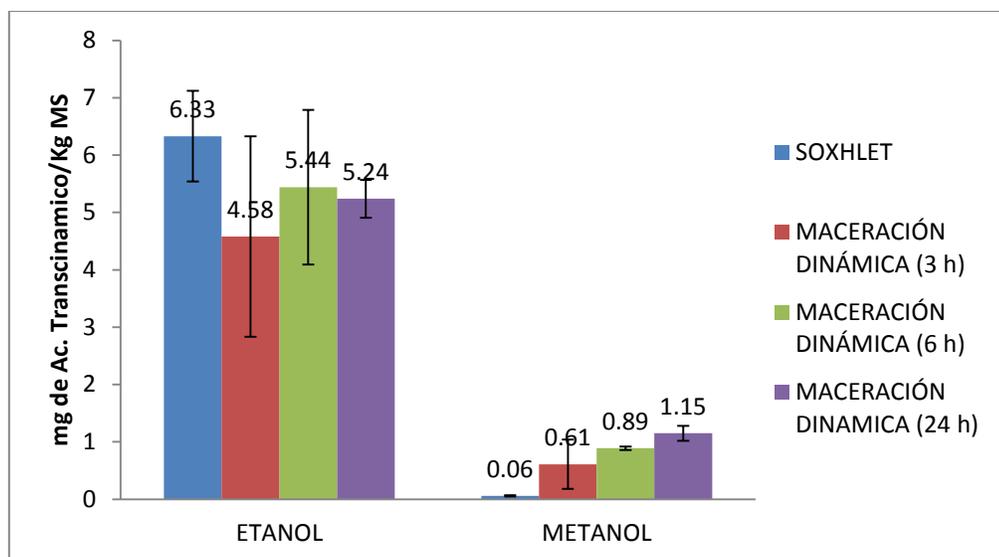


Figura 4.10. Ácido Transcinámico

Fuente: Anexo B.5.3.1; B.5.3.2

Elaboración: La Autora

En la figura 4.10, se observa los valores obtenidos de cuantificación de ácido transcinámico en las fracciones hidrofílicas, mostrando que se obtuvo mayor resultado con la extracción de metanol en un tiempo de 6 h mediante maceración dinámica, con un resultado de 5.44 mg AT/100 g BH, en comparación con la extracción mediante soxhlet, se obtuvo un valor superior con respecto a etanol 6,33 mg AT/100 g BH.

Para el subproducto de guayaba no se encontraron investigaciones realizadas que confirmen la presencia de ácido transcinámico.

En el estudio de Zabidah, Kong, and Ismail (2011) sobre las propiedades antioxidantes de los zumos tropicales (Cacao, guayaba y Bambang) determinaron ácido

transcinámico en jugo de guayaba con un valor de 0.23 mg/100 mL, resulta difícil comparar con los resultados del presente estudio debido a que las unidades expresadas son diferentes, pero podemos evidenciar la presencia de este compuesto en los productos procesados de guayaba.

La amplia desviación estándar entre los datos en la determinación de quercetina y ácido transcinámico, pudo deberse a la presencia de ruido instrumental. Así pues, el efecto del ruido en el error relativo de una medida aumenta a medida que disminuye el valor de la cantidad medida. Muchas de las medidas en un laboratorio solo precisan un esfuerzo mínimo para mantener la relación señal/ruido en un nivel aceptable. Cuando aumentan las exigencias de sensibilidad y exactitud, la relación señal/ruido es, a menudo, un factor limitante en la precisión de una medida (Skoog, James, & Nieman, 2001). Otra razón pudo deberse a la falta de purificación del extracto analizado, ya que los extractos presentan azúcares, compuestos fenólicos que también pueden existir como complejos con hidratos de carbono, proteínas y otros componentes de la planta (Nacz & Shahidi, 2004) y al estar presentes en la muestra en forma de complejo pueden variar la cuantificación final de dichos compuestos.

El contenido de cada uno de los compuestos encontrados mediante HPLC en subproductos de guayaba se relacionan con los resultados obtenidos en el contenido de fenoles totales ya que mejor resultado para maceración dinámica (273.39 mg EAG/100 g BH), se obtuvo en un tiempo de 24 horas y con etanol como solvente de extracción, se observa la misma tendencia con el mayor resultado para ácido gálico, y también podríamos considerar esta misma tendencia para quercetina y ácido transcinámico, ya que al no existir diferencia significativa entre los tiempos de extracción podríamos considerar que el resultado mayor resultados se obtuvo a 24 horas.

4.5. Identificación y cuantificación de carotenoides

Los responsables de la actividad antioxidante lipofílica del fruto de guayaba son los carotenoides

La identificación de licopeno en los subproductos de guayaba no se pudo realizar debido a que se verificó el deterioro del compuesto patrón, pero en los resultados de los cromatogramas obtenidos se pudo evidenciar la presencia de este compuesto en las muestras analizadas sin llegar a cuantificarlo.

4.5.1. β -caroteno

El ANOVA (Anexo C.2.3) muestra que el valor de $p > 0.05$ para la variable de tiempo, lo que indica que no existe diferencia significativa.

Podemos observar que en los resultados para β -caroteno, al variar el tiempo de extracción, para 3 y 6 horas se mantienen y aumenta para 24 horas.

En la figura 4.11, se observa los valores obtenidos de la cuantificación de β -caroteno de la fracción lipofílica, mostrando que los resultados variaron de 3.3 a 5.21 mg β -caroteno/100g, obteniendo el mayor resultado en un tiempo de 24 h mediante maceración dinámica, con un resultado de, en comparación con la extracción mediante soxhlet, se obtuvo un valor superior de 7.37 mg β -caroteno/100g.

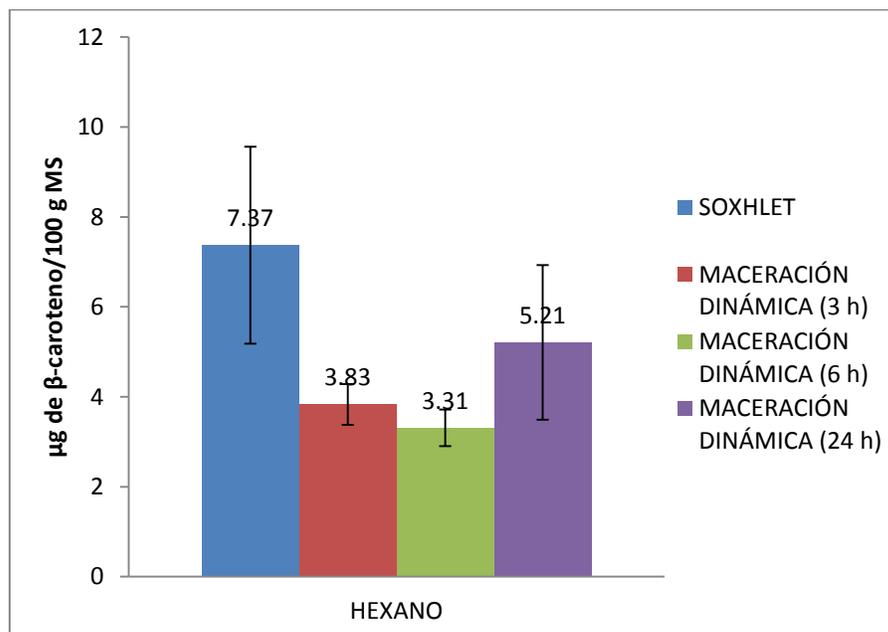


Figura 4.11. β -caroteno

Elaboración: La autora

El contenido de β -caroteno del presente estudio, es similar al obtenido por Yano, Kato, Ikoma, Kawasaki, Fukazawa, Sugiura, et al. (2005) con un valor de 5.027 mg β -caroteno/100 g en su estudio en fruto de guayaba, por otro lado en algunos estudios se encontraron resultados inferiores de valores informados por otros autores como Wilberg

and Rodriguez-Amaya (1995) de 0.584 mg β -caroteno/100g, Espinal (2010) de 0.12 mg β -caroteno/100g, Oliveira, Lobato, Ribeiro, Santana, Chaves, and Pinheiro-Sant'Ana (2010) de 0.828 mg β -caroteno/100g en fruta fresca de guayaba. Es difícil comparar estos datos con el presente estudio debido a que las condiciones de cultivo, época de cosecha, factores ambientales en los que se desarrolló la fruta son diferentes y afectan a la composición de la misma y por otro lado a los distintos métodos y condiciones de extracción de compuestos.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo el mejor rendimiento de extracción en maceración dinámica, con etanol como solvente en un tiempo de 24 horas, con un valor de 13.31% (p/p).
- Se determinó el aporte de la actividad antioxidante de los subproductos de guayaba, los mejores resultados de las fracciones lipofílica e hidrofílicas para los diferentes métodos aplicados se obtuvieron con metanol como solvente con los siguientes valores: ABTS 43.32 $\mu\text{mol TE/g BH}$ con un tiempo de extracción de 6 horas, DPPH 39.87 $\mu\text{mol TE/g BH}$ con un tiempo de extracción de 24 horas, FRAP 27.89 $\mu\text{mol TE/g BH}$ con un tiempo de extracción de 24 horas.
- En cuanto a la cuantificación de fenoles totales el mejor resultado obtenido fue 273.39 mg AG/100 g BH determinado con etanol como solvente y un tiempo de extracción de 24 horas
- Se pudo cuantificar ácido gálico, quercetina y ácido transcinámico en los subproductos de guayaba, la concentración de ácido gálico estuvo comprendida entre 12.41 y 112.78 mg AG/100 g BH, quercetina entre 0.80 y 26.22 mg quercetina/100 g BH y ácido transcinámico hasta 5.44 mg AT/100 g BH.
- La mayor concentración para ácido gálico fue 112.78 mg AG/100 g BH con etanol como solvente en un tiempo de 24 horas, para quercetina 26.22 mg quercetina/100 g BH con etanol como solvente en un tiempo de 3 horas y para ácido transcinámico 5.44 mg AT/100 g BH con metanol como solvente en un tiempo de 6 horas.
- Se cuantificó β -caroteno en la fracción lipofílica, la mayor concentración fue 5.21 $\mu\text{g } \beta$ -caroteno/100 g MS con un tiempo de extracción de 24 horas.
- El método de extracción más óptimo para la extracción de compuestos fenólicos fue: con etanol como solvente en un tiempo de 24 horas, evaluados mediante fenoles totales y cuantificación de compuestos fenólicos.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio para aumentar la eficiencia de recuperación de los compuestos con actividad antioxidante, ya sea utilizando mezcla de solventes o utilizando otros métodos de extracción como la extracción con fluidos supercríticos.
- Se recomienda realizar un estudio más profundo para la cuantificación mediante HPLC, tomando en cuenta los parámetros de calidad de un método analítico como son linealidad, precisión y exactitud y de esta manera mejorar los resultados de cuantificación de los componentes a estudiar.
- Realizar una purificación previa de los extractos a estudiar y así poder evitar las posibles interferencias existentes.
- Realizar un estudio con la aplicación de los subproductos de guayaba en la elaboración de alimentos como ingrediente funcional, por su alto contenido en compuestos fenólicos, ya sea como complemento de la harina de trigo en la panificación, o como saborizante en productos tales como el yogur firme.

REFERENCIAS

- Amin, I., & Mukhrizah, O. (2006). Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(5), 778-784.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989-1009.
- Apolo Aguilar, D. M. (2013). *Efecto de la hidrólisis ácida en la extracción de antioxidantes y antiinflamatorios en subproductos de guayaba y mango*.
- Ariza Cubillos, E. A. (2012). *Determinación del perfil de compuestos fenólicos en arazá (eugenia stipitata)/Determination of profile of phenolic compounds in araz (eugenia stipitata)*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Arranz Martínez, S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J. E., & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Castro-Vargas, H. I., Rodríguez-Varela, L. I., Ferreira, S. R. S., & Parada-Alfonso, F. (2010). Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51(3), 319-324.
- Chen, H.-Y., & Yen, G.-C. (2007). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*, 101(2), 686-694.
- Conde, E. (2009). Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. *Ourense. Universidad de Vigo*, 3-118.
- Córdova Izquierdo, A., Córdova Jiménez, M. S., Ruiz Lang, C. G., Córdova Jiménez, C. A., Guerra Liera, J. E., Rodríguez Denis, B. E., & Arancibia Salinas, K. (2009). *Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática* (Vol. 3).
- Dorta, E., Lobo, M. G., & González, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of food science*, 77(1), C80-C88.
- Espinal, M. (2010). *Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira ICA I* (*Psidium guajava*) Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Figuroa H., J. G., Armijos P., M. A., & Pérez C., E. L. (2012). Efecto del tamaño de partícula sobre la capacidad antioxidante de un subproducto de guayaba (*Psidium Guajava* L.). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(2), 202-209.
- Gutteridge, J., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147.

- Haslam, E. (1998). *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*: Cambridge University Press.
- Hernández R., M., & Sastre G., A. (1999). *Tratado de Nutrición*. Madrid.
- Im, H. W., Suh, B.-S., Lee, S.-U., Kozukue, N., Ohnisi-Kameyama, M., Levin, C. E., & Friedman, M. (2008). Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry in potato plant flowers, leaves, stems, and tubers and in home-processed potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3341-3349.
- INEC. (2012). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC). In *Dirección de Estudios Económicos, Unidad de Estadísticas Agropecuarias*).
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.
- Kondo, S., Kittikorn, M., & Kanlayanarat, S. (2005). Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. *Postharvest Biology and Technology*, 36(3), 309-318.
- Kong, K.-W., Ismail, A. R., Tan, S.-T., Nagendra Prasad, K. M., & Ismail, A. (2010). Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(8), 1739-1745.
- Kong, K. W., & Ismail, A. (2011). Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. *Food and Bioproducts Processing*, 89(1), 53-61.

- Kong, K. W., Ismail, A., Tan, C. P., & Rajab, N. F. (2010). Optimization of oven drying conditions for lycopene content and lipophilic antioxidant capacity in a by-product of the pink guava puree industry using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 729-735.
- Lagos-Witte, S., Germosén-Robineau, L., & Weniger, B. (1997). Rol actual de la fitomedicina en el caribe. presentacion de la farmacopea vegetal Caribeña (TRAMIL). In *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 4: Industrial Processing, Standards & Regulations, Quality, Marketing*, 503, (pp. 75-86).
- López, B. (2008). *Caracterización de las variedades de la guayaba (Psidium guajava) cultivadas en El Ecuador*. Tesis de grado. Escuela de Ingeniería en Industrialización de Alimentos. UTE. Quito, Ecuador.
- Mahattanatawee, K., Manthey, J. A., Luzio, G., Talcott, S. T., Goodner, K., & Baldwin, E. A. (2006). Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7355-7363.
- Marquina, V., Araujo, L., Rodriguez-Malaver, A., & Vit, P. (2008). Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(1), 98-102.
- Marroquín, A. (2008). Obtención de extracto tánico por maceración dinámica de la corteza de arboles jóvenes de cuatro especies forestales, a nivel laboratorio. *Trabajo de graduación de Ing. Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3), 1520-1526.

- Martínez Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta; Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet. *Arch. Latinoam. Nutr*, 50(1), 5-18.
- Mercadante, A. Z., Steck, A., & Pfander, H. (1998). Carotenoids from Guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and Structure Elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 145-151.
- Miean, K. H. F. A. U. M., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem.*, 49(6), 3106-3112.
- Misra, K., & Seshadri, T. (1968). Chemical components of the fruits of *Psidium guava*. *Phytochemistry*, 7(4), 641-645.
- Musa, K., Abdullah, A., Jusoh, K., & 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.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111.
- Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., & Okonogi, S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1095-1103.
- Navarro-Marfil, R. (2008). *Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (Argania spinosa)*. Tesis doctoral]. España: Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

- Núñez R, F. M. (2005). *Guava (Psidium guajava L.) fruit phytochemicals, antioxidant properties and overall quality as influenced by postharvest treatments*. Universidad de Florida, Florida.
- Oliveira, D. D. S., Lobato, A. L., Ribeiro, S. n. M. R., Santana, A. n. M. C., Chaves, J. B. c. P., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2010). Carotenoids and vitamin C during handling and distribution of guava (*Psidium guajava* L.), mango (*Mangifera indica* L.), and papaya (*Carica papaya* L.) at commercial restaurants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6166-6172.
- Pinelo J., M. (2003). *Antioxidante a partir de residuos de uva. Influencia del modo de operación y de las variables de proceso*. Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- PWC. (2009). Leveraging growth in the emerging functional food industry: Trends and market opportunities. In *PricewaterhouseCoopers*, (pp. 24).
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.
- Restrepo-Sánchez, D.-C., Narváez-Cuenca, C.-E., & Restrepo-Sánchez, L.-P. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*, 32, 1517-1522.
- Rincón, A. M., Tapia, M. S., & Padilla, F. C. (2003). Evaluación de fitoquímicos en el exocarpio (cáscara) de algunas frutas cultivadas en Venezuela. *Revista Facultad de Farmacia*, 66(2), 73-78.

- Rodríguez, M. (2002). *Desarrollo de una alternativa tecnológica para la obtención de cremogenados de chirimoya (Annona cherimola Mill), guayaba (Psidium guajava L) y mango (Mangifera indica)*. . Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
- Salgado, H. R. N., Roncari, A. F. F., Michelin, C. D., & Moreira, R. R. D. (2006). Evaluation of antidiarrhoeal effects of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) aqueous leaf extract in mice. . *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 27(1), 89-92.
- Sanches, N. R., García Cortez, D. A., Schiavini, M. S., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2005). An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 429-436.
- Santacruz C., L. A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Skoog, D., James, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental*. Madrid.
- Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P., & Duan, C. (2007). Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, 12(3), 679-693.
- Tee, E. S., & Lim, C.-L. (1991). Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. *Food Chemistry*, 41(3), 309-339.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis : an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 19(6-7), 669-675.

- Torregrosa, F. (2005). *Determinación de vitamina C y carotenoides en zumos de frutas y hortalizas frescos, tratados por calor o por pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI)*. Universitat de València, Facultat de Farmàcia, Valencia.
- Torres, V. (2010). *Determinación del potencial nutritivo y funcional de guayaba (Psidium guajava L.), cocona (Solanum sessiliflorum Dunal) y camu camu (Myrciaria dubia Vaugh)*. Escuela Politecnica Nacional, Quito.
- Treybal, R. (1999). Operaciones de Transferencia de Masa. Segunda edición, México. *Edit McGraw Hill*.
- Ugartondo, V. (2009). *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en moléculas celulares*. Universidad, Barcelona, Madrid.
- USDA. (2006). National Nutrient Database for Standard Reference. In).
- Vargas, D. S., H.; González, V.; Engleman, M.; Martínez, A. (2006). Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium Guajava L.*). *Agrociencia*, 40(1), 109-115.
- Wilberg, V. C., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1995). HPLC Quantitation of Major Carotenoids of Fresh and Processed Guava, Mango and Papaya. *LWT - Food Science and Technology*, 28(5), 474-480.
- Wu, J.-W., Hsieh, C.-L., Wang, H.-Y., & Chen, H.-Y. (2009). Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava L.*) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chemistry*, 113(1), 78-84.
- Yano, M., Kato, M., Ikoma, Y., Kawasaki, A., Fukazawa, Y., Sugiura, M., Matsumoto, H., Oohara, Y., Nagao, A., & Ogawa, K. (2005). Quantitation of carotenoids in raw and processed fruits in Japan. *Food Science and Technology Research*, 11(1), 13-18.

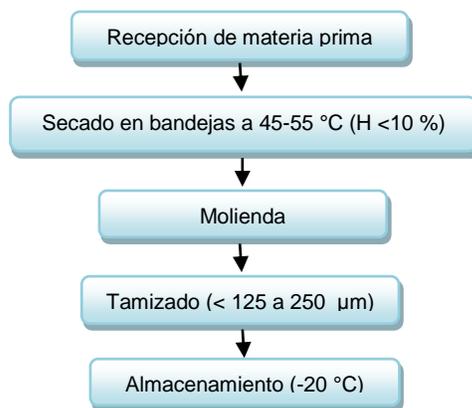
Yau, L. I. M., Theng, L. I. M., Tee, T., & Jhi, J. (2006). *Antioxidant properties of guava fruit: Comparison with some local fruits.*

Zabidah, A., Kong, K., & Ismail, A. (2011). Antioxidant properties of tropical juices and their effects on in vitro hemoglobin and low density lipoprotein (LDL) oxidations. *International Food Research Journal*, 18(2), 549-556.

ANEXOS

Anexo A. Esquemas.

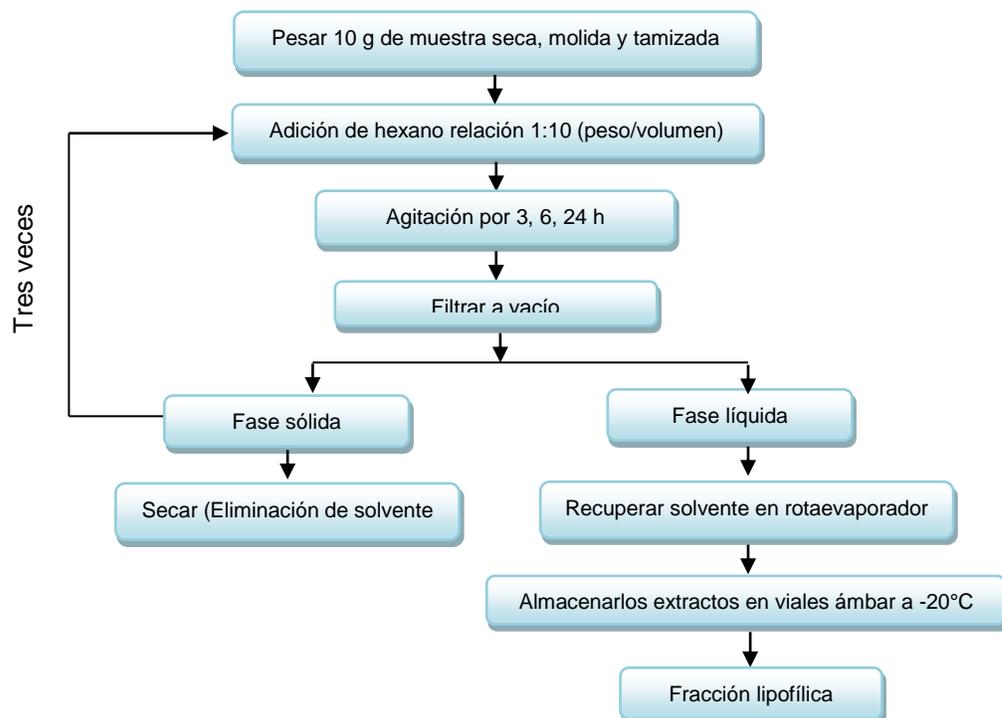
Anexo A. 1. Preparación de la materia prima



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

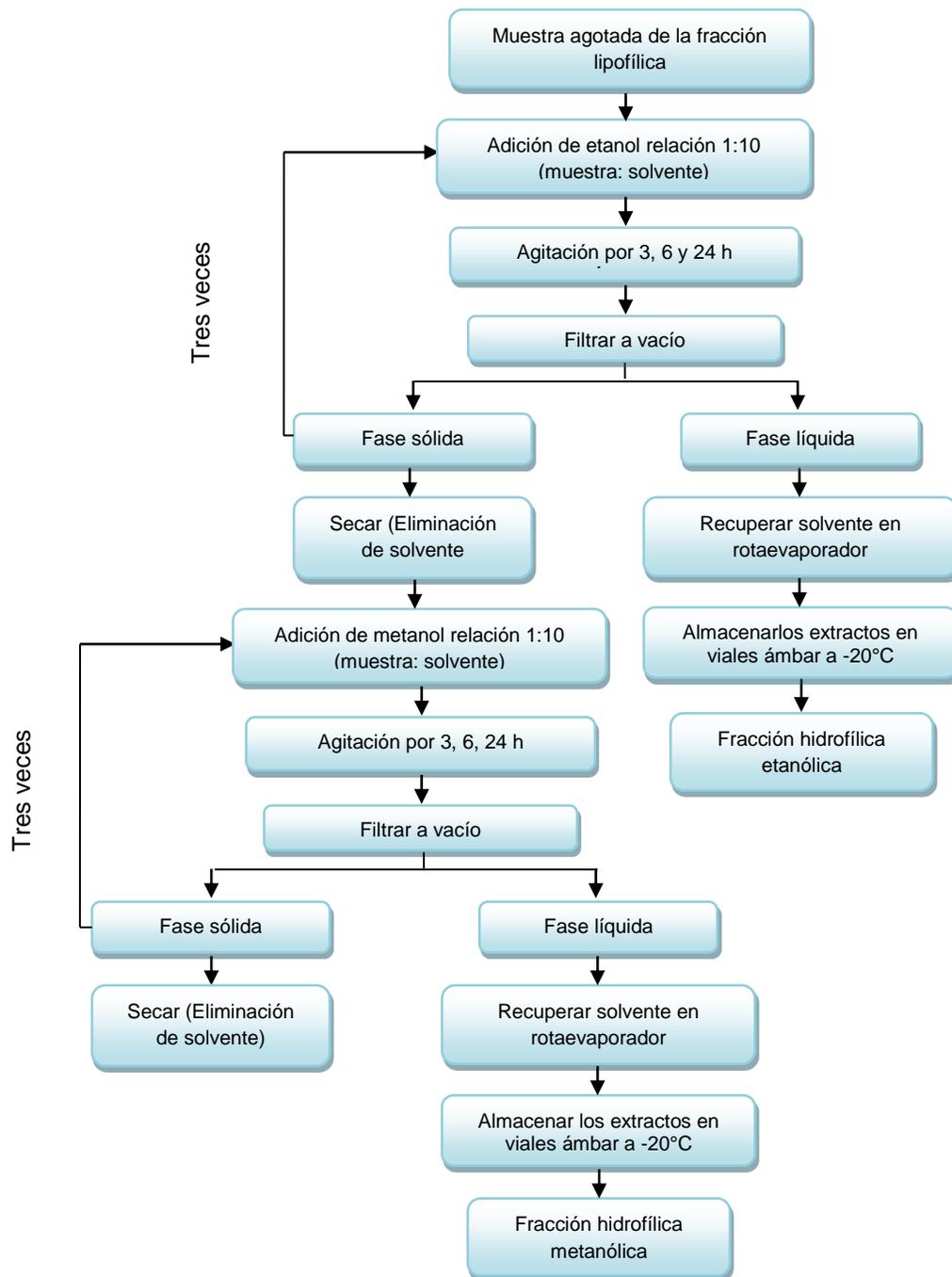
Anexo A. 2. Extracción de la fracción lipofílica por maceración dinámica



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora.

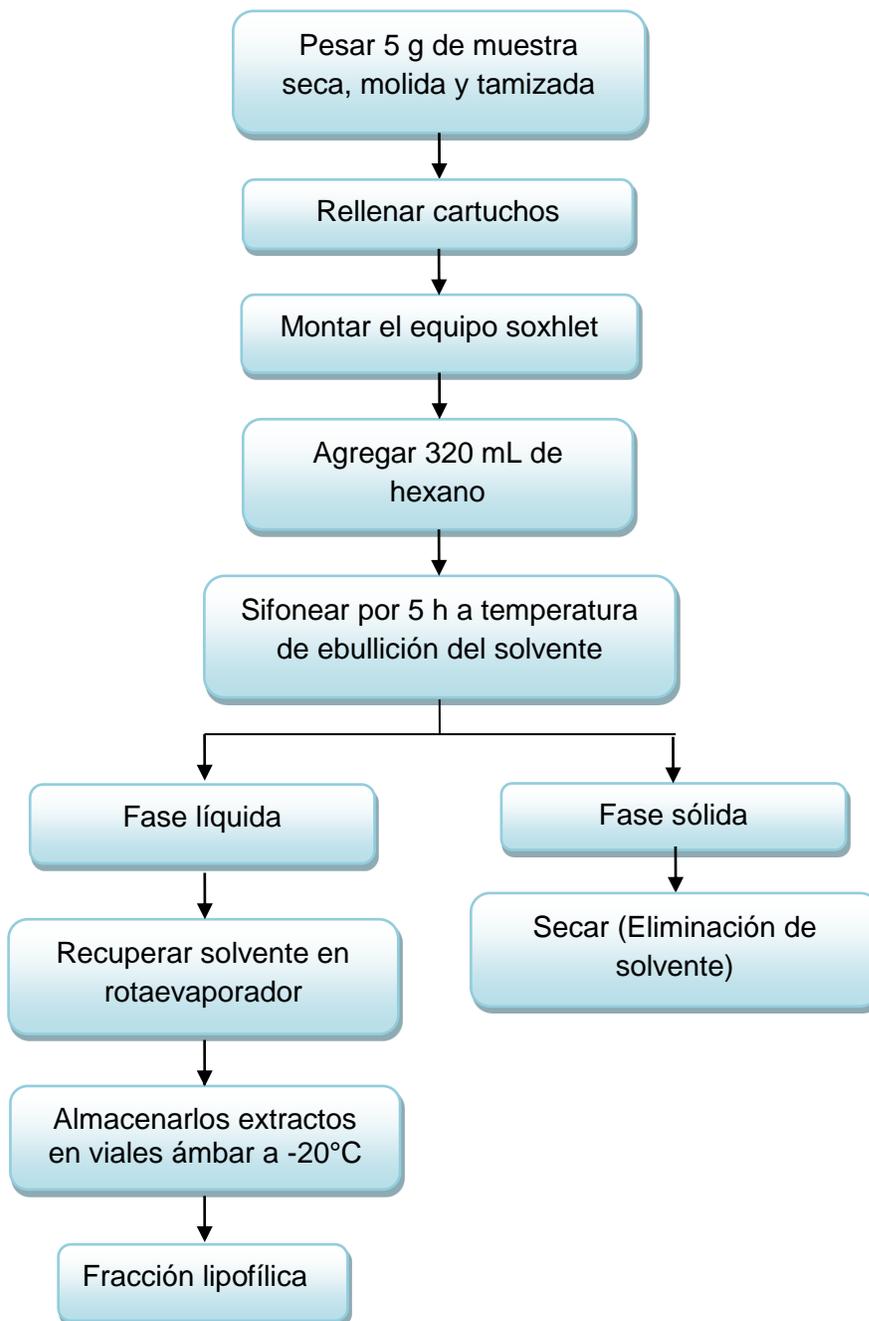
Anexo A. 3. Extracción de las fracciones hidrofílica por maceración dinámica.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

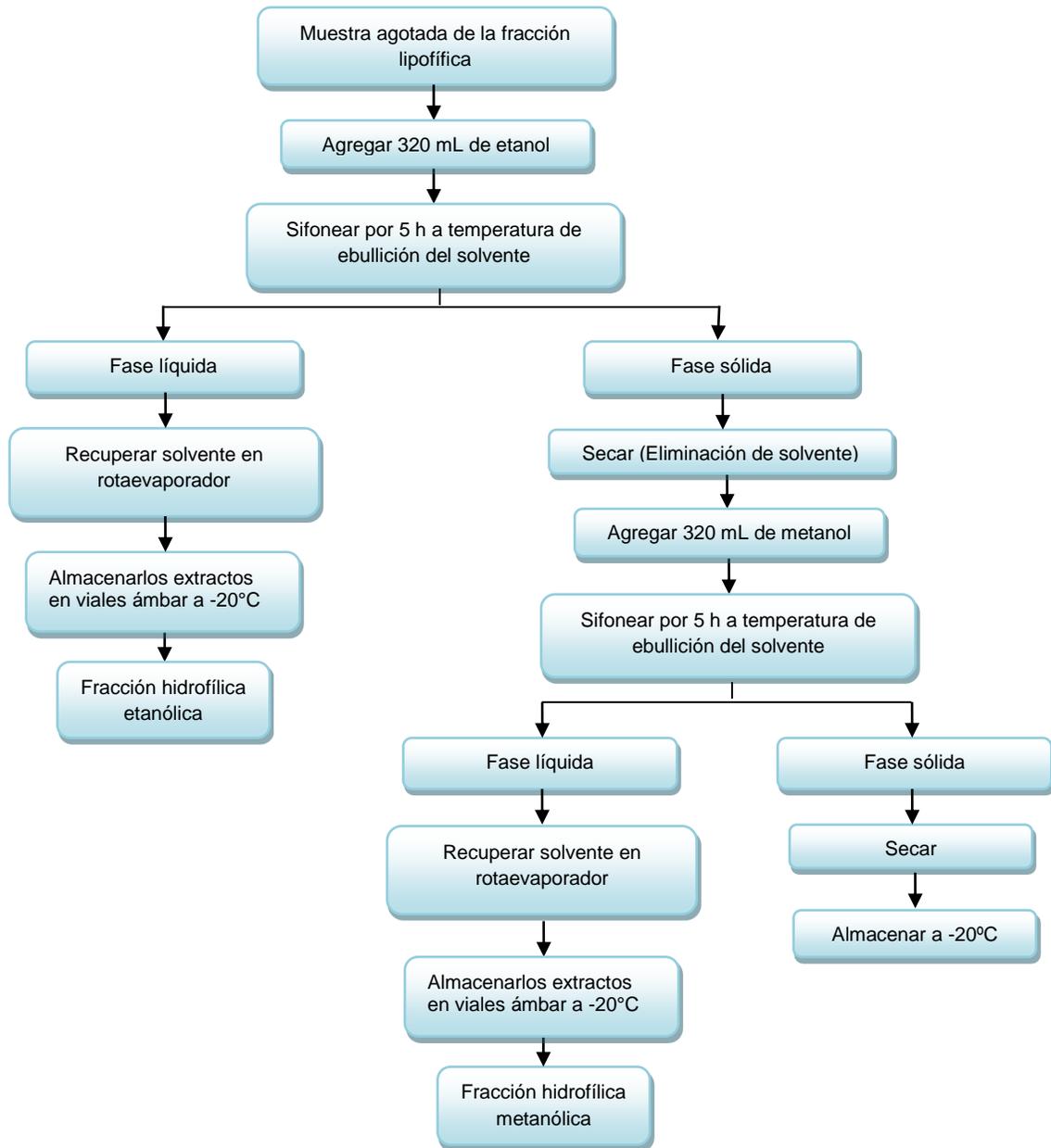
Anexo A. 4. Extracción de la fracción lipofílica por soxhlet.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

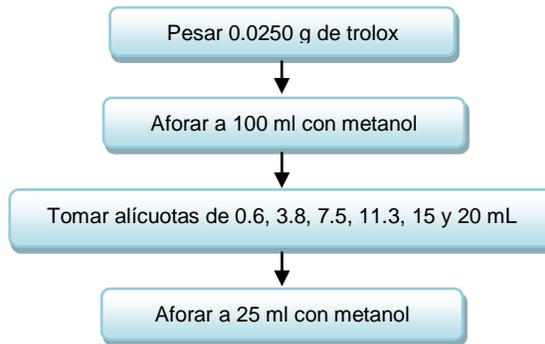
Anexo A. 5 Extracción de las fracciones hidrofílica por soxhlet.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La autora

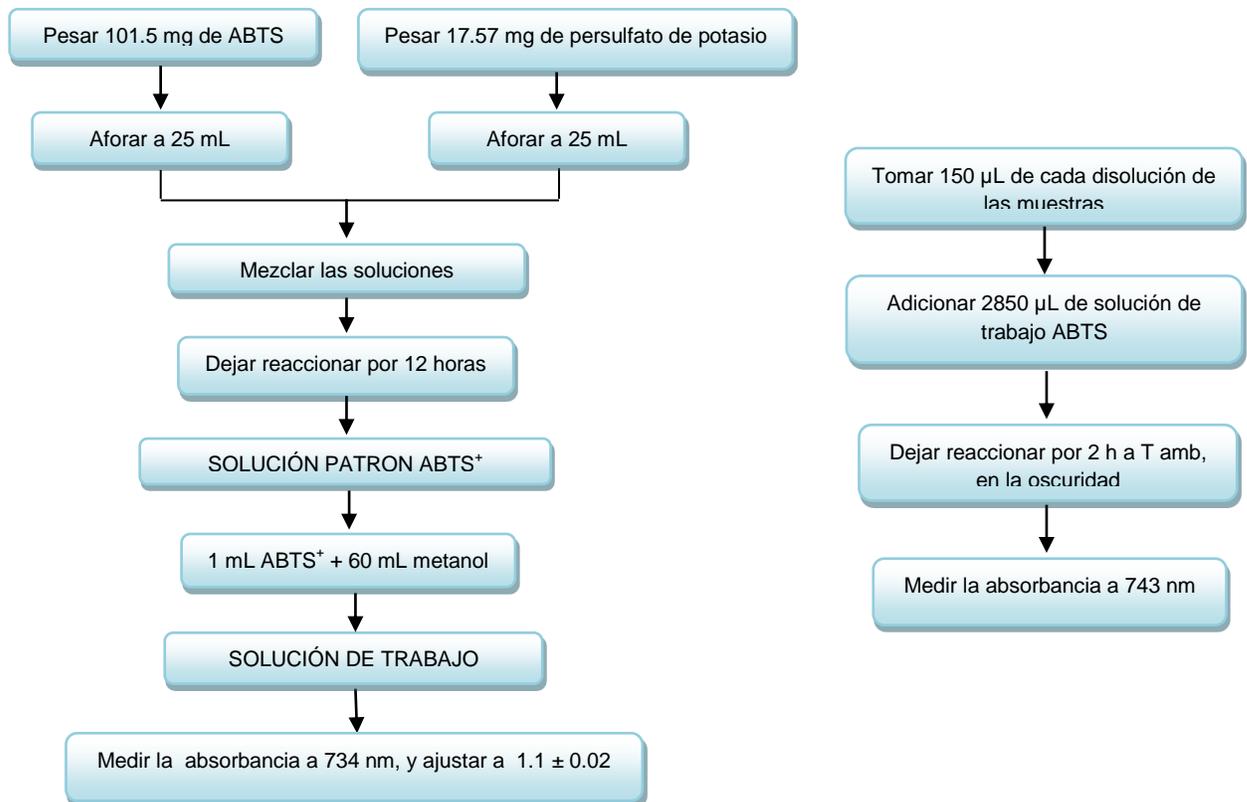
Anexo A. 6. Preparación de la curva estándar con trolox



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

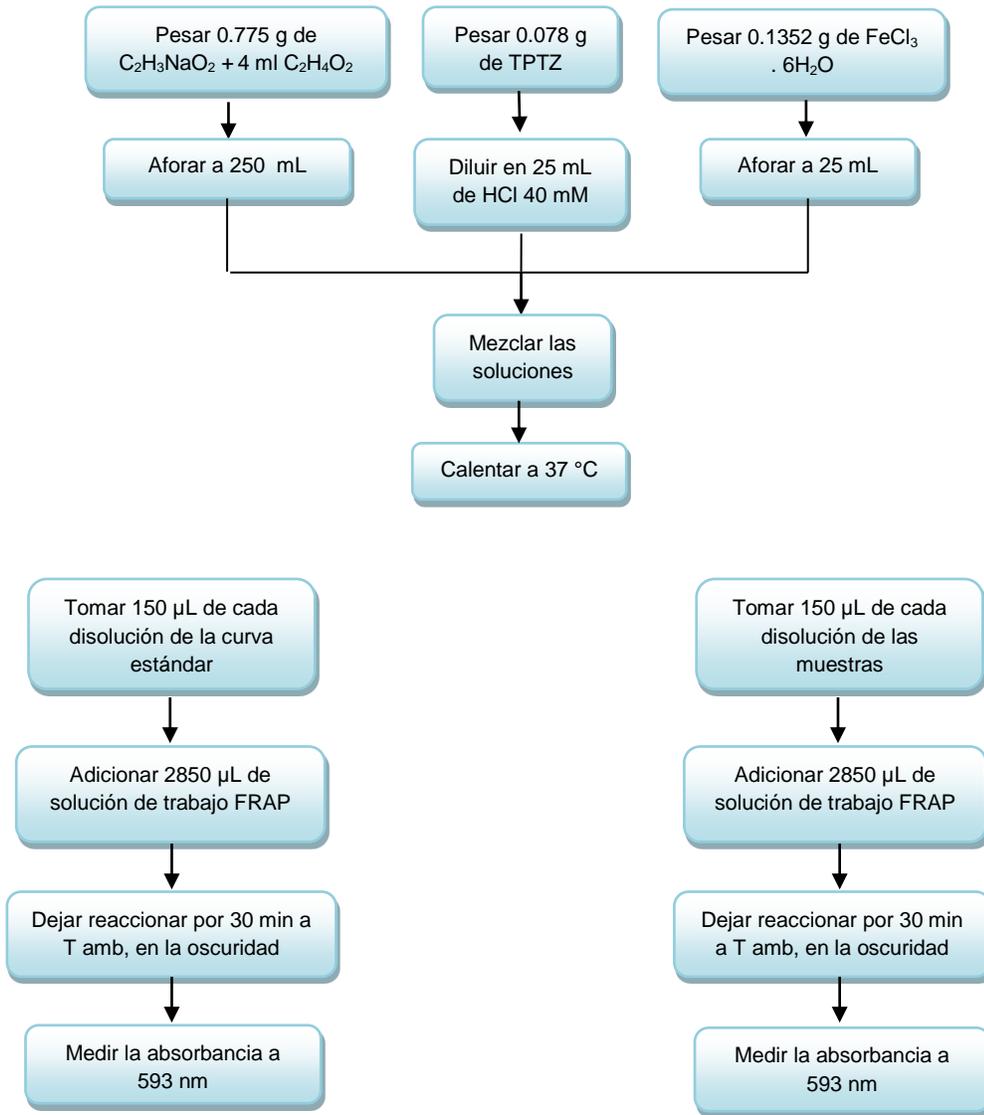
Anexo A. 7. Esquema de determinación de capacidad antioxidante por ABTS.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

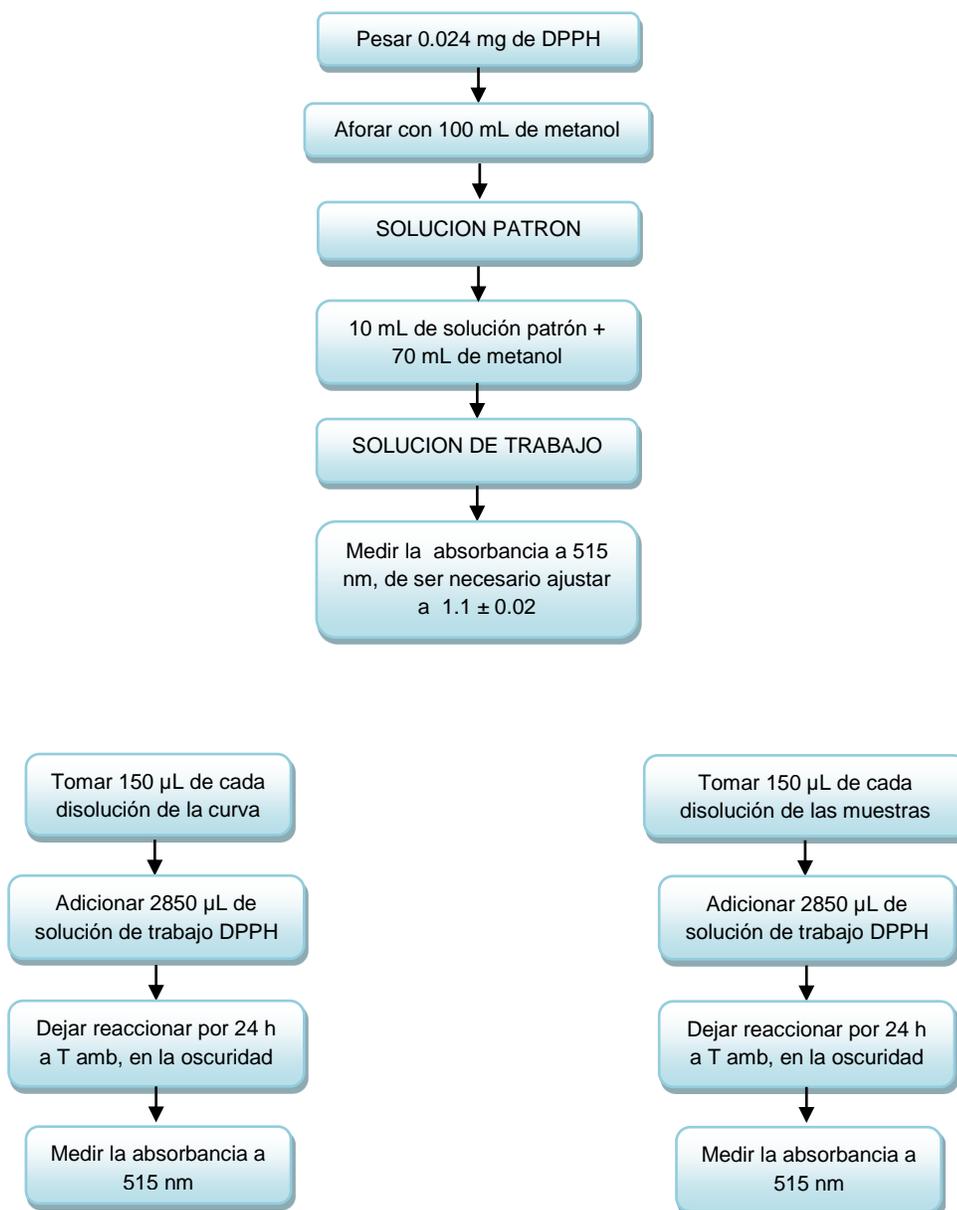
Anexo A. 8. Esquema de determinación de capacidad antioxidante por FRAP.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

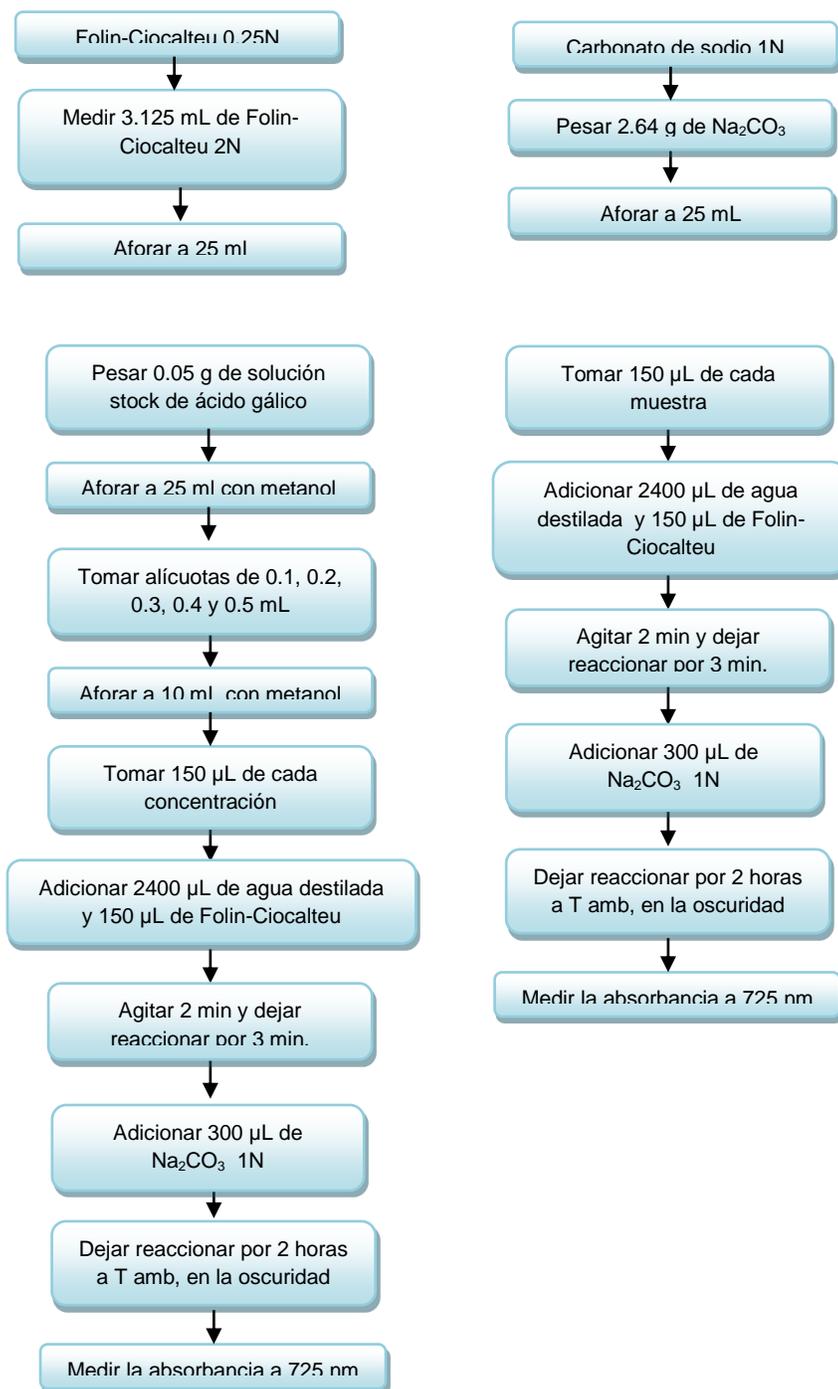
Anexo A. 9. Esquema de determinación de capacidad antioxidante por DPPH.



Fuente: La experimentación.

Elaboración: La Autora.

Anexo A. 10. Esquema de determinación de fenoles totales.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.

Resultados

Anexo B. 1. Curvas de calibración

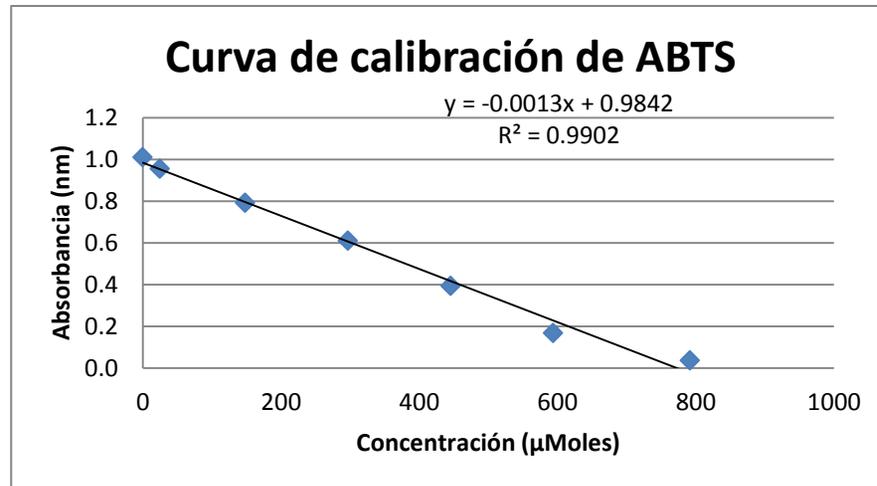
Anexo B.1.1 Curva de calibración ABTS

Datos de curva de calibración ABTS

Concentración (μmol)	Absorbancia (nm)	Promedio
24.81	0.953	0.955
	0.954	
	0.958	
148.34	0.791	0.792
	0.791	
	0.793	
296.69	0.609	0.609
	0.610	
	0.609	
445.54	0.392	0.392
	0.391	
	0.394	
593.88	0.167	0.167
	0.166	
	0.168	
791.84	0.036	0.035
	0.036	
	0.035	

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora



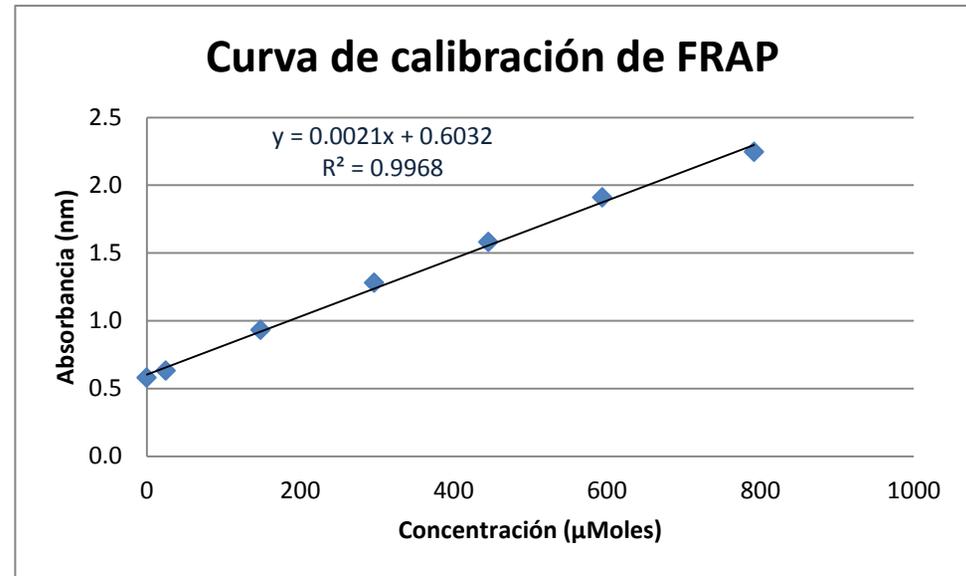
Anexo B.1.2 Curva de calibración FRAP

Datos de curva de calibración FRAP

Concentración (μmol)	Absorbancia (nm)	Promedio
24.81	0.624	0.629
	0.631	
	0.633	
148.34	0.929	0.932
	0.931	
	0.935	
296.69	1.276	1.278
	1.277	
	1.281	
445.54	1.577	1.580
	1.581	
	1.582	
593.88	1.907	1.908
	1.909	
	1.909	
791.84	2.242	2.243
	2.245	
	2.243	

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora



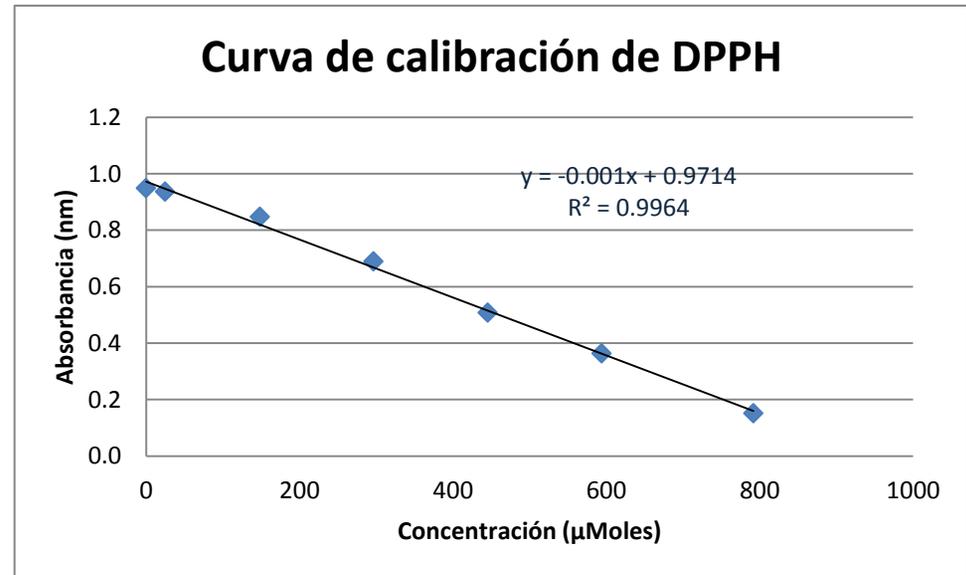
Anexo B.1.3 Curva de calibración DPPH

Datos de curva de calibración DPPH

Concentración (μmol)	Absorbancia (nm)	Promedio
24.81	0.934	0.936
	0.935	
	0.938	
148.34	0.846	0.847
	0.846	
	0.848	
296.69	0.690	0.690
	0.690	
	0.689	
445.54	0.507	0.508
	0.509	
	0.508	
593.88	0.355	0.357
	0.357	
	0.360	
791.84	0.151	0.151
	0.150	
	0.151	

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora



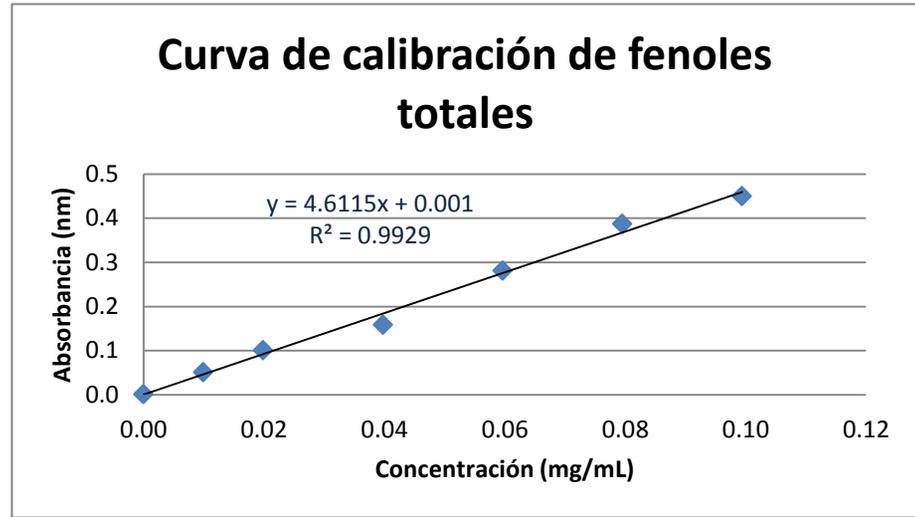
Anexo B.1.4 Curva de calibración de fenoles totales

Datos de curva de calibración de fenoles totales

Concentración (mg/mL)	Absorbancia (nm)	Promedio
0.01	0.052	0.051
	0.051	
	0.050	
0.02	0.100	0.100
	0.101	
	0.100	
0.04	0.156	0.158
	0.159	
	0.159	
0.06	0.283	0.281
	0.280	
	0.280	
0.08	0.386	0.387
	0.387	
	0.387	
0.10	0.451	0.450
	0.449	
	0.449	

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora



Anexo B.1.5 Curva de calibración de cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC.

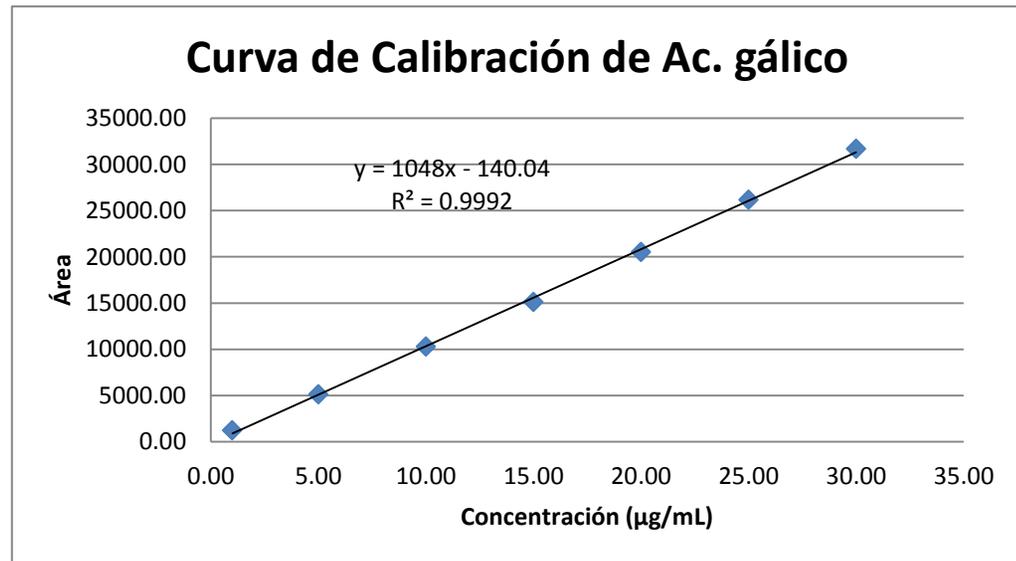
Anexo B.1.5.1 Ácido gálico

Datos de curva de calibración de ácido gálico

Concentración (µg/mL)	Área
1	1249.73
5	15130.22
10	10300.21
15	15098.77
20	20504.51
25	26152.31
30	31667.55

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora



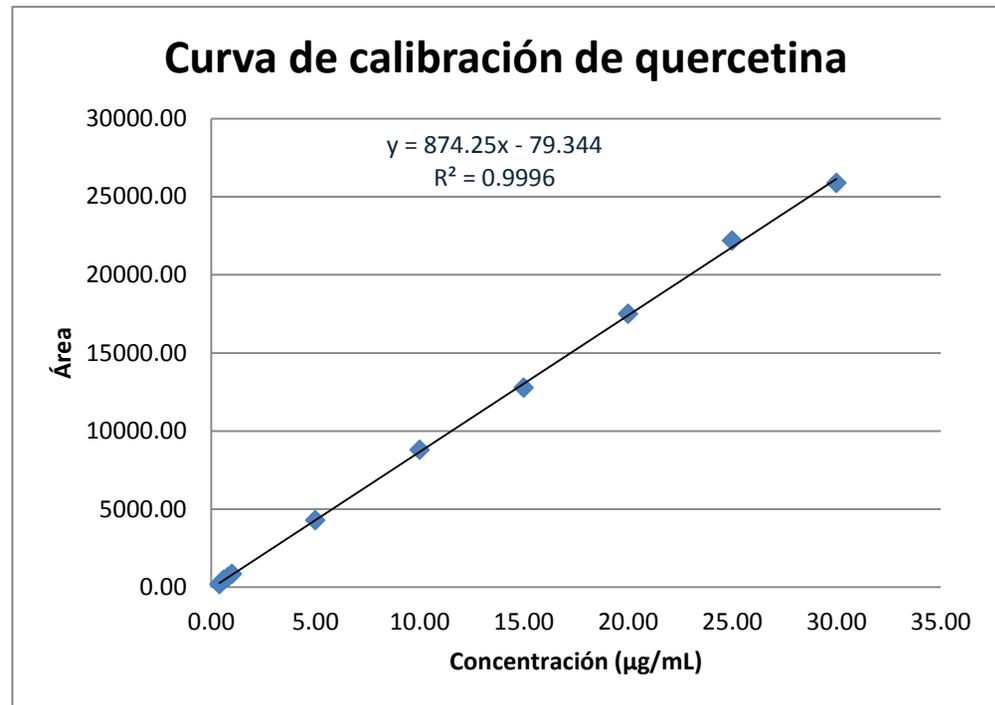
Anexo B.1.5.2 Quercetina

Datos de curva de calibración de quercetina

Concentración (µg/mL)	Área
0.4	182.01
0.6	457.63
0.8	636.10
1	843.65
5	4273.48
10	8776.02
15	12754.00
20	17479.40
25	22184.96
30	25863.50

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora



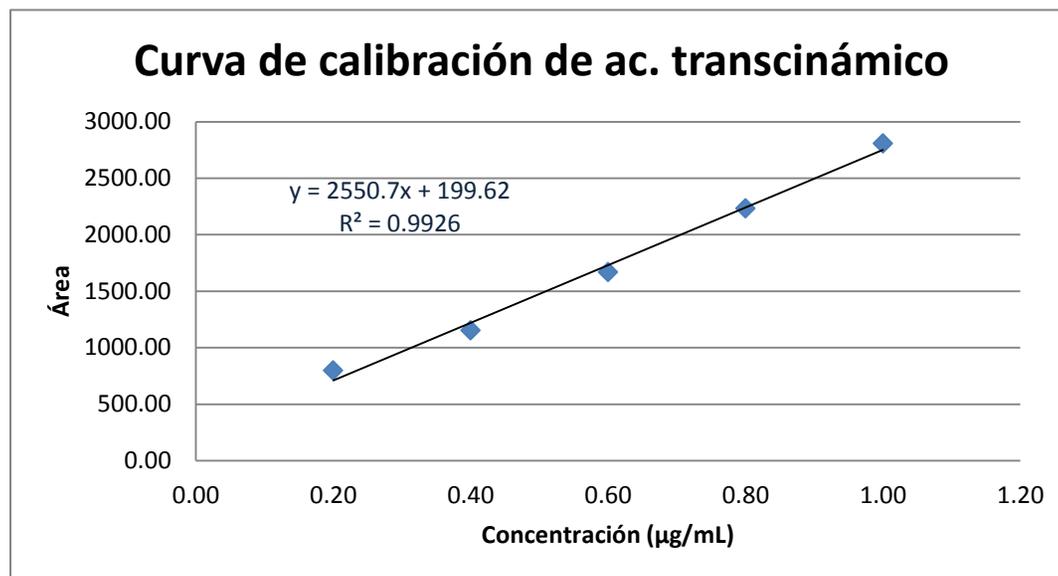
Anexo B.1.5.3 Ácido transcinámico

Datos de curva de calibración de ácido transcinámico

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área
0.20	795.70
0.40	1150.48
0.60	1667.47
0.80	2230.07
1.00	2806.65

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

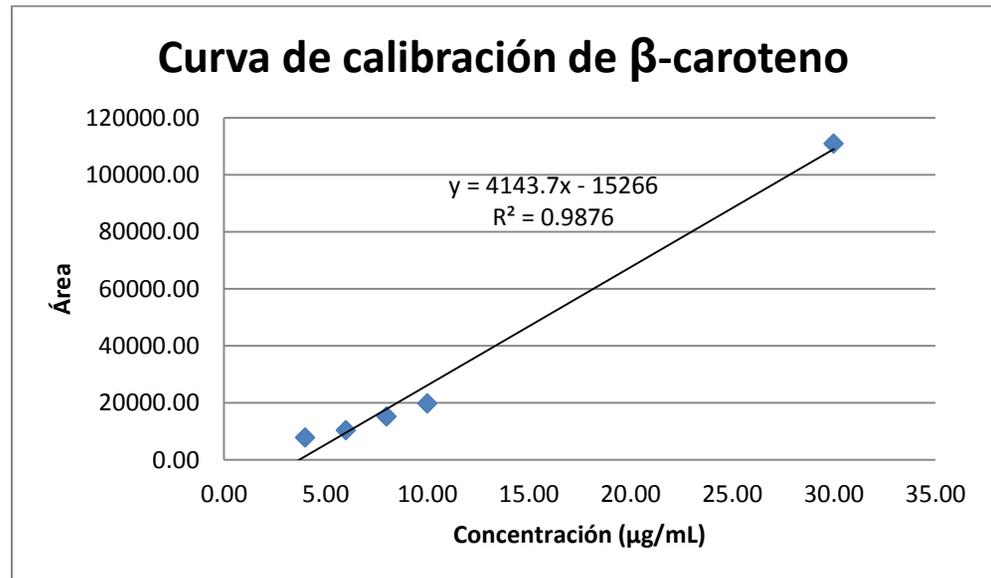


Anexo B.1.6 Curva de calibración de cuantificación de carotenoides mediante HPLC.

Anexo B.1.6.1 β -caroteno

Datos de curva de calibración de β -caroteno

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área
4	7842.22
6	10372.11
8	15205.82
10	19692.27
30	110893.00



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B. 2. Actividad antioxidante

Anexo B.2.1 ABTS

Anexo B.2.1.1 Soxhlet

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (μMoles)	X prom. (μMoles)	Conc. (μMoles Trolox/ g BH)
S-H-M1	0.674	214.05	276.04	3.17
S-H-M2	0.558	310.05		
S-H-M3	0.565	304.01		
S-E-M1	0.568	301.53	316.95	50.39
S-E-M2	0.591	282.74		
S-E-M3	0.490	366.58		
S-M-M1	0.114	677.26	662.80	22.07
S-M-M2	0.095	692.98		
S-M-M3	0.186	618.17		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.2.1.2 Maceración dinámica

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (μ Moles)	X prom. (μ Moles)	Conc. (μ Moles Trolox/ g BH)
3 HORAS				
MD-H-M1	0.459	391.99	391.24	3.01
MD-H-M2	0.462	389.75		
MD-H-M3	0.459	391.99		
MD-E-M1	0.589	284.15	248.65	28.29
MD-E-M2	0.690	200.81		
MD-E-M3	0.617	260.98		
MD-M-M1	0.413	430.06	414.06	40.92
MD-M-M2	0.457	393.39		
MD-M-M3	0.427	418.72		
6 HORAS				
MD-H-M1	0.479	375.19	377.75	2.53
MD-H-M2	0.480	374.61		
MD-H-M3	0.469	383.46		
MD-E-M1	0.867	92.08	117.12	10.22
MD-E-M2	0.823	126.88		
MD-E-M3	0.816	132.38		
MD-M-M1	0.298	525.48	433.72	43.32
MD-M-M2	0.480	374.61		
MD-M-M3	0.448	401.09		
24 HORAS				
MD-H-M1	0.365	469.78	461.39	4.46
MD-H-M2	0.359	474.99		
MD-H-M3	0.402	439.41		
MD-E-M1	0.788	154.14	153.62	20.49
MD-E-M2	0.761	175.59		
MD-E-M3	0.817	131.13		
MD-M-M1	0.392	465.23	421.58	29.91
MD-M-M2	0.562	331.92		
MD-M-M3	0.389	467.59		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.2.2 DPPH

Anexo B.2.2.1 Soxhlet

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (μMoles)	X prom. (μMoles)	Conc. (μMoles Trolox/ g BH)
S-H-M1	0.854	114.60	117.63	1.21
S-H-M2	0.853	115.87		
S-H-M3	0.846	122.41		
S-E-M1	0.809	158.23	176.55	26.96
S-E-M2	0.813	154.33		
S-E-M3	0.749	217.09		
S-M-M1	0.518	442.56	483.78	14.91
S-M-M2	0.565	396.68		
S-M-M3	0.344	612.10		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.2.2.2 Maceración dinámica

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (μ Moles)	X prom. (μ Moles)	Conc. (μ Moles Trolox/ g BH)
3 HORAS				
MD-H-M1	0.752	214.16	191.91	1.48
MD-H-M2	0.771	195.91		
MD-H-M3	0.802	165.65		
MD-E-M1	0.844	124.07	108.55	11.26
MD-E-M2	0.883	86.00		
MD-E-M3	0.853	115.58		
MD-M-M1	0.708	257.11	224.99	22.24
MD-M-M2	0.776	191.03		
MD-M-M3	0.739	226.85		
6 HORAS				
MD-H-M1	0.775	191.71	167.96	1.30
MD-H-M2	0.812	155.30		
MD-H-M3	0.811	156.86		
MD-E-M1	0.885	84.64	104.74	10.84
MD-E-M2	0.852	116.26		
MD-E-M3	0.855	113.33		
MD-M-M1	0.701	263.65	232.38	22.95
MD-M-M2	0.739	227.14		
MD-M-M3	0.760	206.35		
24 HORAS				
MD-H-M1	0.670	294.49	292.34	2.25
MD-H-M2	0.641	322.21		
MD-H-M3	0.705	260.33		
MD-E-M1	0.841	127.29	136.30	14.13
MD-E-M2	0.815	152.67		
MD-E-M3	0.839	128.95		
MD-M-M1	0.557	404.49	365.35	39.87
MD-M-M2	0.552	409.08		
MD-M-M3	0.682	282.48		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.2.3 FRAP

Anexo B.2.3.1 Soxhlet

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (μMoles)	X prom. (μMoles)	Conc. (μMoles Trolox/ g BH)
S-H-M1	0.842	111.56	112.02	1.15
S-H-M2	0.824	103.15		
S-H-M3	0.863	121.37		
S-E-M1	0.807	95.34	110.76	16.04
S-E-M2	0.797	90.67		
S-E-M3	0.916	146.27		
S-M-M1	1.366	356.24	350.48	12.41
S-M-M2	1.268	310.46		
S-M-M3	1.427	384.75		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.2.3.2 Maceración dinámica

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (μMoles)	X prom. (μMoles)	Conc. (μMoles Trolox/ g BH)
3 HORAS				
MD-H-M1	0.914	145.20	140.63	1,08
MD-H-M2	0.917	146.60		
MD-H-M3	0.882	130.11		
MD-E-M1	0.714	51.89	42.72	4.90
MD-E-M2	0.676	33.86		
MD-E-M3	0.694	42.41		
MD-M-M1	0.940	157.49	144.40	14.28
MD-M-M2	0,877	128.05		
MD-M-M3	0,919	147.67		
6 HORAS				
MD-H-M1	0.888	133.05	137.81	1.06
MD-H-M2	0.902	139.73		
MD-H-M3	0.904	140.66		
MD-E-M1	0.679	35.26	45.06	4.66
MD-E-M2	0.708	49.09		
MD-E-M3	0.712	50.82		
MD-M-M1	1.297	324.01	197.88	13.33
MD-M-M2	0.905	141.13		
MD-M-M3	0.878	128.52		
24 HORAS				
MD-H-M1	1.047	207.20	188.51	1.45
MD-H-M2	0.969	170.75		
MD-H-M3	1.005	187.57		
MD-E-M1	0.762	74.32	71.31	7.40
MD-E-M2	0.777	81.19		
MD-E-M3	0.728	58.43		
MD-M-M1	1.205	281.00	257.75	27.89
MD-M-M2	1.220	288.03		
MD-M-M3	1.040	204.21		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B. 3. Fenoles totales

Anexo B.3.1 Soxhlet

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (mg/mL)	X prom. (mg/mL)	Conc. (mg EAG/100g BH)
S-H-M1	0.070	88.45	116.54	20.41
S-H-M2	0.097	122.93		
S-H-M3	0.109	138.24		
S-E-M1	0.110	138.66	153.40	396.66
S-E-M2	0.104	131.86		
S-E-M3	0.150	189.68		
S-M-M1	0.241	306.61	357.92	177.47
S-M-M2	0.221	280.68		
S-M-M3	0.382	486.47		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.3.2 Maceración dinámica.

MUESTRA	ABSORBANCIA	X (mg/mL)	X prom. (mg/mL)	Conc. (mg EAG/100g BH)
3 HORAS				
MD-H-M1	0.134	169.70	165.73	21.71
MD-H-M2	0.184	233.05		
MD-H-M3	0.075	94,40		
MD-E-M1	0.051	64.21	74.84	120.69
MD-E-M2	0.057	71.86		
MD-E-M3	0.070	88.45		
MD-M-M1	0.129	163.71	144.06	243.19
MD-M-M2	0.102	128.50		
MD-M-M3	0.111	139.98		
6 HORAS				
MD-H-M1	0.125	168.03	156.03	17.27
MD-H-M2	0.107	144.17		
MD-H-M3	0.116	155.90		
MD-E-M1	0.073	98.33	105.07	156.20
MD-E-M2	0.083	111.81		
MD-E-M3	0.078	105.07		
MD-M-M1	0.016	91.38	123.61	190.61
MD-M-M2	0.125	168.44		
MD-M-M3	0.019	111.02		
24 HORAS				
MD-H-M1	0.156	210.64	208.84	34.30
MD-H-M2	0.158	213.33		
MD-H-M3	0.150	202.55		
MD-E-M1	0.192	259.17	166.91	273.39
MD-E-M2	0.093	125.30		
MD-E-M3	0.086	116.26		
MD-M-M1	0.195	262.81	195.67	252.23
MD-M-M2	0.091	123.00		
MD-M-M3	0.149	201.20		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B. 4. Cuantificación de compuestos fenólicos

Anexo B.4.1 Ácido gálico

Anexo B.5.1.1 Soxhlet

MUESTRA	Área	X (µg/mL)	X prom. (µg/mL)	Concentración (µg Ác. gálico/100 g BH)
S-E-M1	2202.950	2.24	1.62	43.06
S-E-M2	908.450	1.00		
S-E-M3	1554.000	1.62		
S-M-M1	3133.842	3.12	3.48	12.41
S-M-M2	3599.634	3.57		
S-M-M3	3786.833	3.75		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.4.1.2 Maceración dinámica

MUESTRA	Área	X (µg/mL)	X prom. (µg/mL)	Concentración(µg Ác. gálico/100g BH)
3 HORAS				
MD-E-M1	8238.918	8.00	7.94	82.35
MD-E-M2	8071.616	7.84		
MD-E-M3	8240.917	8.00		
MD-M-M1	3911.367	3.87	4.08	40.49
MD-M-M2	4134.951	4.08		
MD-M-M3	4363.940	4.28		
6 HORAS				
MD-E-M1	10589.184	10.24	8.71	76.25
MD-E-M2	7813300	7.59		
MD-E-M3	8554.033	8.30		
MD-M-M1	5716.976	5.59	5.95	66.02
MD-M-M2	6096.118	5.95		
MD-M-M3	6480.833	6.32		
24 HORAS				
MD-E-M1	8387.484	8.14	8.49	112.78
MD-E-M2	8131.482	7.89		
MD-E-M3	9742.768	9.43		
MD-M-M1	3803.301	3.76	3.40	21.47
MD-M-M2	3228.150	3.21		
MD-M-M3	3250.582	3.24		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.4.2 Quercetina

Anexo B.4.2.1 Soxhlet

MUESTRA	Área	X (µg/mL)	X prom. (µg/mL)	Conc. (µg quercetina/100 g BH)
S-E-M2	1637.167	1.93	1.73	29.36
S-E-M3	1226.734	1.49		
S-M-M1	152.400	0.27	0.23	0.80
S-M-M2	148.467	0.26		
S-M-M3	138.850	0.25		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.4.2.2 Maceración dinámica

MUESTRA	Área	X (µg/mL)	X prom. (µg/mL)	Conc. (µg quercetina/100g BH)
3 HORAS				
MD-E-M1	2725.566	3.21	2.15	26.03
MD-E-M2	1548.408	1.86		
MD-E-M3	1211.334	1.48		
MD-M-M1	1191.216	1.45	1.23	11.72
MD-M-M2	1054.716	1.30		
MD-M-M3	746.160	0.94		
6 HORAS				
MD-E-M1	1560300	1.88	1.37	11.73
MD-E-M2	819.467	1.03		
MD-E-M3	972.000	1.20		
MD-M-M1	762.599	0.96	0.93	10.00
MD-M-M2	715.834	0.91		
MD-M-M3	732.166	0.93		
24 HORAS				
MD-E-M1	1450.475	1.75	1.90	24.75
MD-E-M2	1017.283	1.25		
MD-E-M3	2280.293	2.70		
MD-M-M1	919.666	1.14	1.03	6.31
MD-M-M2	695.083	0.89		
MD-M-M3	848.134	1.06		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.4.3 Ácido transcinámico

Anexo B.4.3.1 Soxhlet

MUESTRA	Área	X (µg/mL)	X prom. (µg/mL)	Conc. (µg Ac. transcinámico/100 g BH)
S-E-M2	1637.167	0.56	0.60	4.06
S-E-M3	1840.817	0.64		
S-M-M1	755.450	0.22	0.19	-0.02
S-M-M2	556.942	0.14		
S-M-M3	734.683	0.21		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B.4.3.2 Maceración dinámica

MUESTRA	Área	X (µg/mL)	X prom. (µg/mL)	Conc. (µg Ac. transcinámico/100g BH)
3 HORAS				
MD-E-M1	2268.483	0.81	0.68	4.58
MD-E-M2	1889.934	0.66		
MD-E-M3	1626.003	0.56		
MD-M-M1	653.583	0.18	0.23	0.36
MD-M-M2	780.967	0.23		
MD-M-M3	949.850	0.30		
6 HORAS				
MD-E-M1	2743.817	1.00	0.80	5.44
MD-E-M2	1803.367	0.63		
MD-E-M3	2184.351	0.78		
MD-M-M1	933.067	0.29	0.28	0.89
MD-M-M2	911.983	0.28		
MD-M-M3	921.150	0.28		
24 HORAS				
MD-E-M1	1764.933	0.61	0.57	5.24
MD-E-M2	1286.275	0.43		
MD-E-M3	1891.851	0.66		
MD-M-M1	1258.717	0.42	0.37	1.15
MD-M-M2	1187.942	0.39		
MD-M-M3	981.433	0.31		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo B. 5. Cuantificación de carotenoides

Anexo B.5.1 Soxhlet y maceración dinámica

MUESTRA	Área	X ($\mu\text{g/mL}$)	X prom. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. ($\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/100g BH}$)
SOXHLET				
S-H-M2	16969.459	7.77	6.23	7.37
S-H-M3	4169.150	4.69		
3 HORAS				
MD-H-M1	16556.336	7.68	6.95	3.83
MD-H-M2	10868.551	6.31		
MD-H-M3	13143.051	6.86		
6 HORAS				
MD-H-M1	15082.441	7.32	7.09	3.31
MD-H-M2	16041.000	7.56		
MD-H-M3	11231.902	6.40		
24 HORAS				
MD-H-M1	16104.844	7.57	6.62	5.21
MD-H-M2	8961.851	5.85		
MD-H-M3	11453.684	6.45		

Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C. Anova

Anexo C. 1. Rendimiento de extracción

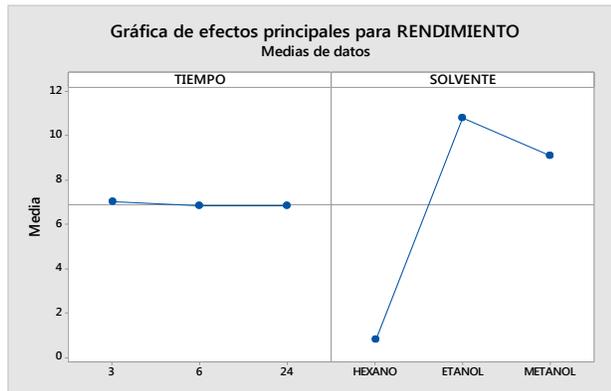
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	586.087	73.261	2803.87	0.000
Lineal	4	516.789	129.197	4944.70	0.000
TIEMPO	2	0.196	0.098	3.75	0.044
SOLVENTE	2	516.593	258.297	9885.65	0.000
Interacciones de 2 términos	4	69.297	17.324	663.04	0.000
TIEMPO*SOLVENTE	4	69.297	17.324	663.04	0.000
Error	18	0.470	0.026		
Total	26	586.557			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.161643	99.92%	99.88%	99.82%

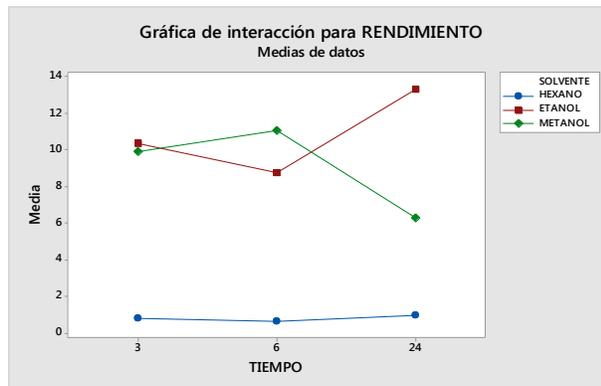
Gráfica de efectos principales del rendimiento de extracción.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción del rendimiento de extracción



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C. 2. Actividad antioxidante

Anexo C.2.1 ABTS

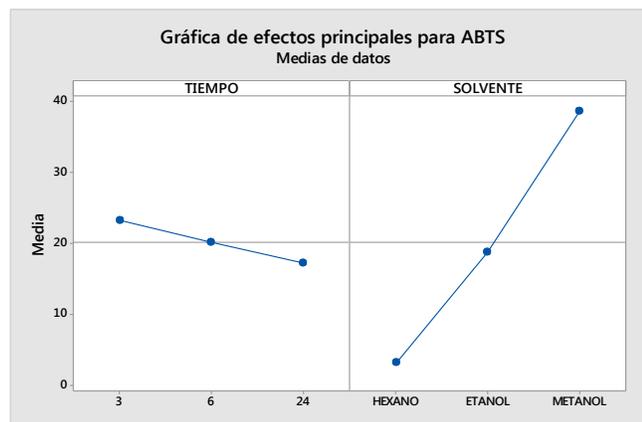
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	6726.5	840.81	53.70	0.000
Lineal	4	5801.3	1450.33	92.62	0.000
TIEMPO	2	167.5	83.74	5.35	0.015
SOLVENTE	2	5633.8	2816.91	179.90	0.000
Interacciones de 2 términos	4	925.2	231.29	14.77	0.000
TIEMPO*SOLVENTE	4	925.2	231.29	14.77	0.000
Error	18	281.8	15.66		
Total	26	7008.3			

Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.95704	95.98%	94.19%

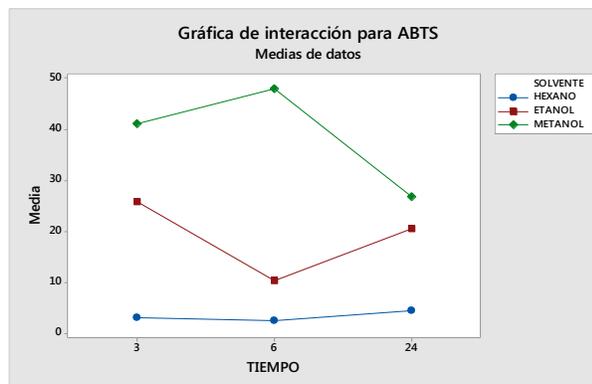
Gráfica de efectos principales para ABTS.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para ABTS.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C.2.2 DPPH

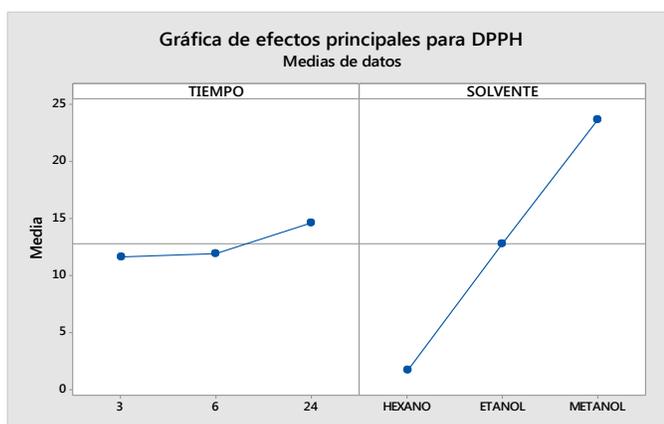
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	2312.00	289.00	56.33	0.000
Lineal	4	2201.69	550.42	107.28	0.000
TIEMPO	2	47.48	23.74	4.63	0.024
SOLVENTE	2	2154.21	1077.11	209.93	0.000
Interacciones de 2 términos	4	110.31	27.58	5.37	0.005
TIEMPO*SOLVENTE	4	110.31	27.58	5.37	0.005
Error	18	92.35	5.13		
Total	26	2404.35			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.26511	96.16%	94.45%	91.36%

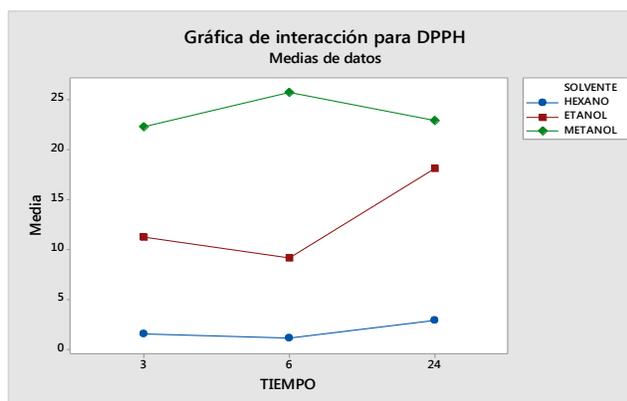
Gráfica de efectos principales para DPPH.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para DPPH.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C.2.3 FRAP

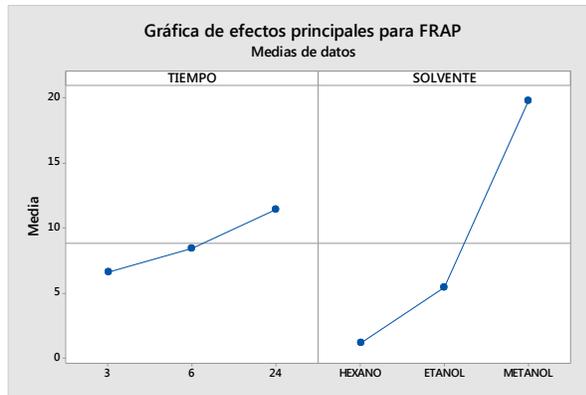
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	1918.19	239.77	15.64	0.000
Lineal	4	1820.92	455.23	29.70	0.000
TIEMPO	2	107.89	53.94	3.52	0.051
SOLVENTE	2	1713.03	856.52	55.88	0.000
Interacciones de 2 términos	4	97.27	24.32	1.59	0.221
TIEMPO*SOLVENTE	4	97.27	24.32	1.59	0.221
Error	18	275.92	15.33		
Total	26	2194.11			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.91520	87.42%	81.84%	71.71%

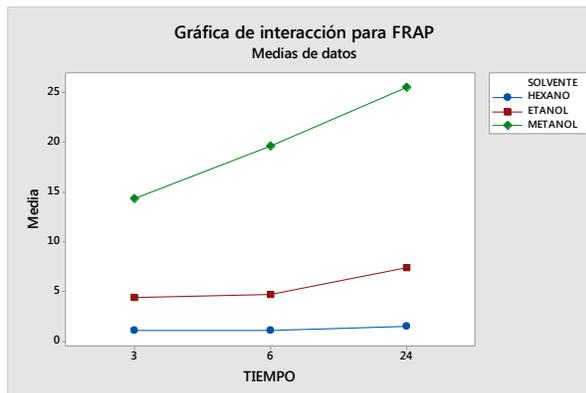
Gráfica de efectos principales para FRAP.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para FRAP.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C. 3. Fenoles totales

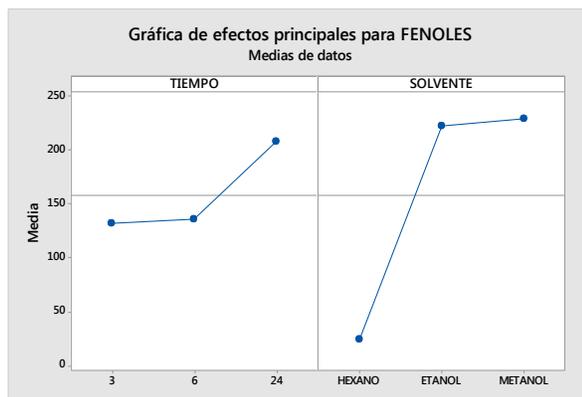
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	355005	44376	8.64	0.000
Lineal	4	275305	68826	13.39	0.000
TIEMPO	2	32673	16337	3.18	0.066
SOLVENTE	2	242632	121316	23.61	0.000
Interacciones de 2 términos	4	79699	19925	3.88	0.019
TIEMPO*SOLVENTE	4	79699	19925	3.88	0.019
Error	18	92493	5139		
Total	26	447498			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
71.6834	79.33%	70.14%	53.49%

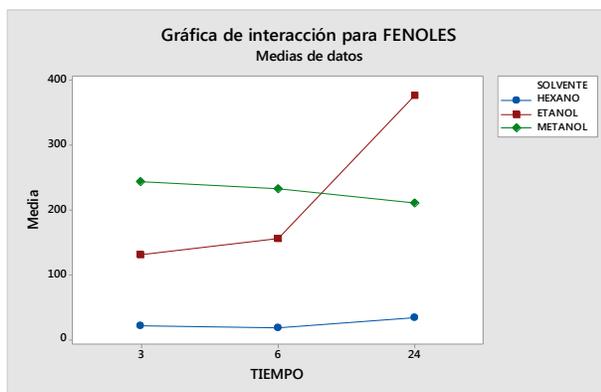
Gráfica de efectos principales para fenoles totales.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para fenoles totales



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C. 4. Cuantificación de compuestos fenólicos.

Anexo 4.1 Ácido gálico.

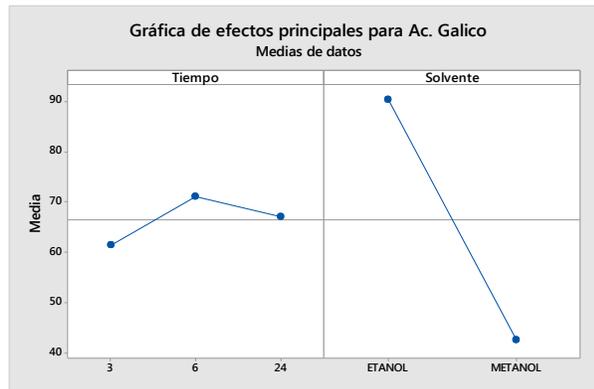
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	15567.2	3113.4	67.12	0.000
Lineal	3	10555.6	3518.5	75.86	0.000
Tiempo	2	284.3	142.1	3.06	0.084
Solvente	1	10271.3	10271.3	221.44	0.000
Interacciones de 2 términos	2	5011.6	2505.8	54.02	0.000
Tiempo*Solvente	2	5011.6	2505.8	54.02	0.000
Error	12	556.6	46.4		
Total	17	16123.8			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6.81054	96.55%	95.11%	92.23%

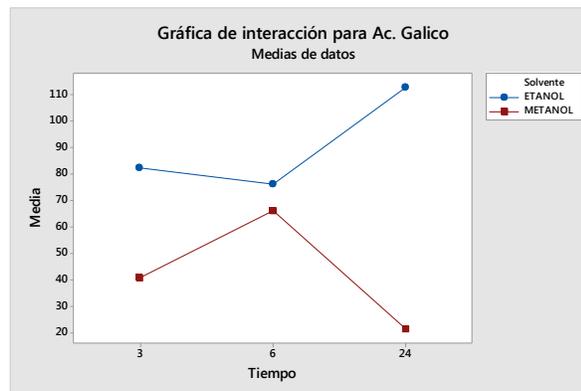
Gráfica de efectos principales para ácido gálico.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para ácido gálico



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C.4.2 Quercetina

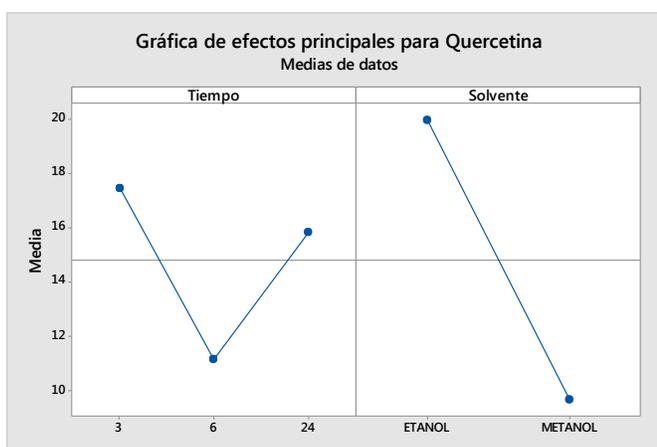
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	818.7	163.74	4.82	0.012
Lineal	3	602.0	200.66	5.91	0.010
Tiempo	2	127.7	63.84	1.88	0.195
Solvente	1	474.3	474.32	13.97	0.003
Interacciones de 2 términos	2	216.7	108.35	3.19	0.077
Tiempo*Solvente	2	216.7	108.35	3.19	0.077
Error	12	407.4	33.95		
Total	17	1226.1			

Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5.82650	66.77%	52.93%

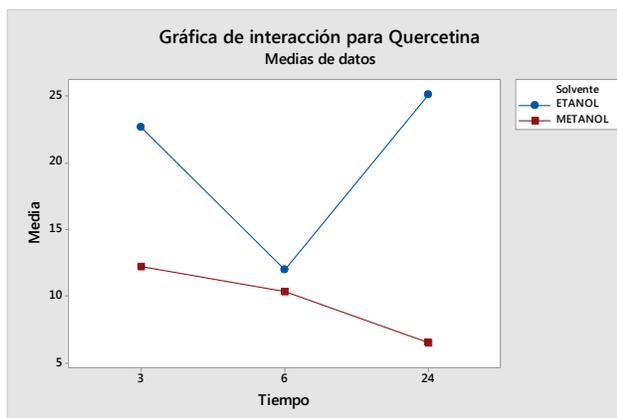
Gráfica de efectos principales para quercetina.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para quercetina.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C.4.3 Ácido transcinámico.

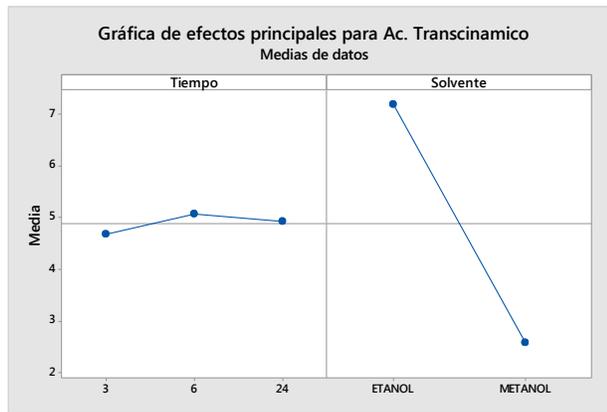
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	97.152	19.4304	15.20	0.000
Lineal	3	95.801	31.9336	24.97	0.000
Tiempo	2	0.489	0.2444	0.19	0.829
Solvente	1	95.312	95.3120	74.54	0.000
Interacciones de 2 términos	2	1.351	0.6756	0.53	0.603
Tiempo*Solvente	2	1.351	0.6756	0.53	0.603
Error	12	15.344	1.2787		
Total	17	112.496			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.13078	86.36%	80.68%	69.31%

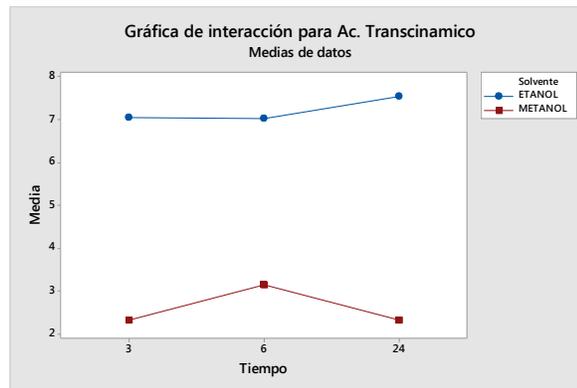
Gráfica de efectos principales para ácido transcinámico.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Gráfica de interacción para ácido transcinámico.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora

Anexo C.5. Cuantificación de carotenoides

Anexo 5.1 β -caroteno

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	2	23054	11527	0.65	0.554
Error	6	106073	17679		
Total	8	129127			

Resumen del modelo

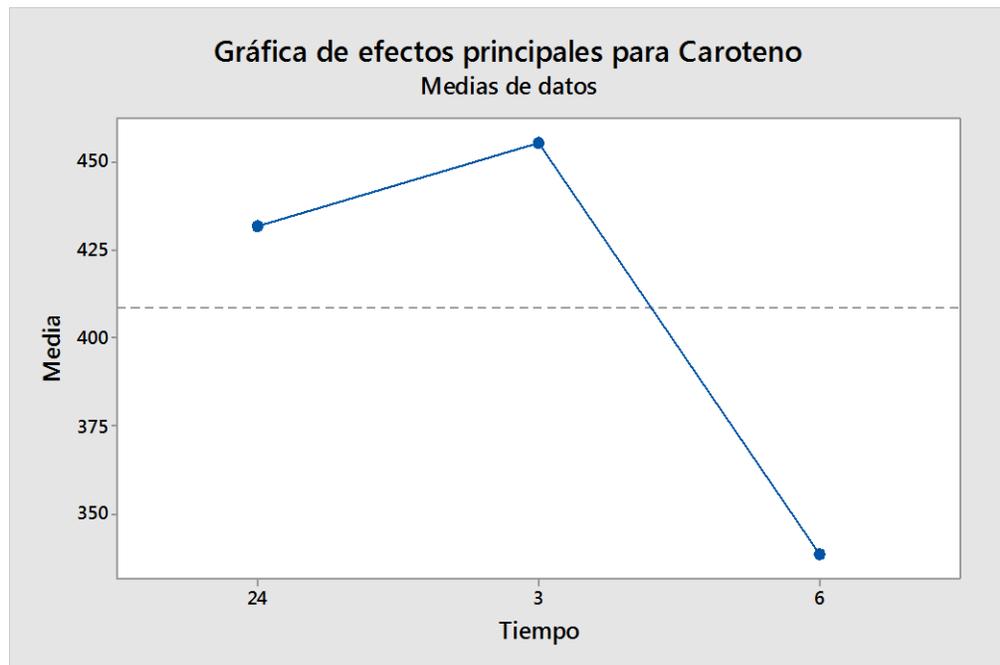
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
132.962	17.85%	0.00%	0.00%

Medias

Tiempo	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
24	3	432	201	(244, 620)
3	3	455.5	99.0	(267.6, 643.3)
6	3	338.3	55.0	(150.5, 526.2)

Desv.Est. agrupada = 132.962

Gráfica de efectos principales para β -caroteno.



Fuente: La experimentación

Elaboración: La Autora