



---

# **Efecto del ultrasonido en residuos agroindustriales de guayaba (*Psidium guajava* L.) para la producción de compuestos fenólicos y pectinas**

---

Presenta:

**Ing. Monserrat Velázquez Rodríguez**

En opción al grado de:

**Maestría en Ciencias Ambientales**

Asesor

**Dra. Gabriela Roa Morales**

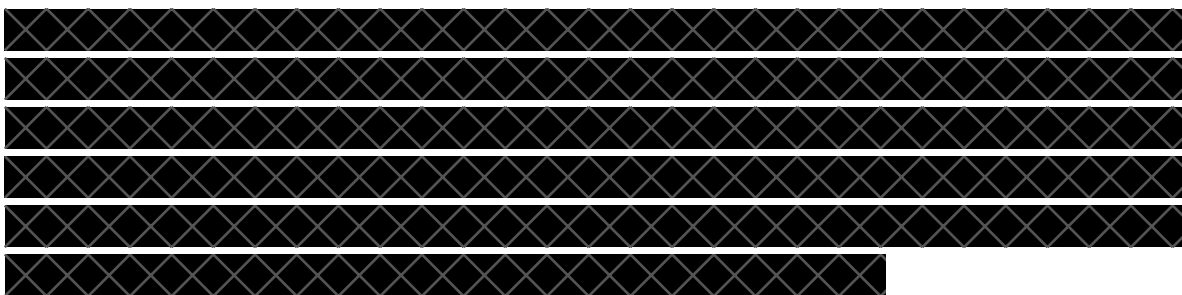
Asesores adjuntos

**M. Christian Hernández Guzmán**

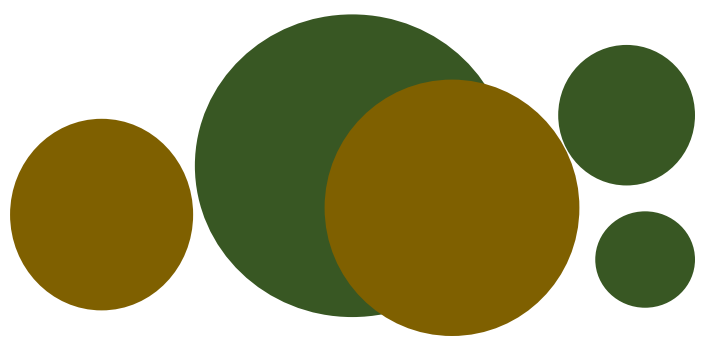
Toluca, estado de México, octubre 2020



## Dedicatoria

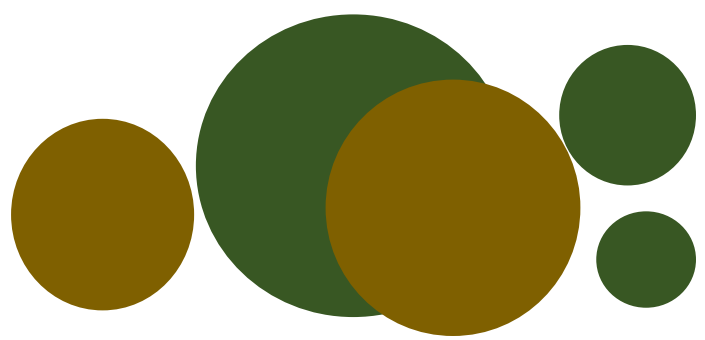


## Agradecimientos



## Contenido

Resumen.....	7
Abstract .....	8
<u>1.</u> Introducción .....	9
1.1 Marco teórico.....	11
Contaminación por residuos agroindustriales .....	11
Guayaba (Phisidium guajava L.) .....	12
Compuestos fenólicos .....	12
Clasificación de compuestos fenólicos.....	13
Extracción de compuestos fenólicos.....	14
Extracción convencional de compuestos fenólicos.....	15
Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos.....	15
Antecedentes de métodos de extracción de compuestos fenólicos .....	16
1.2 Objetivo general.....	18
1.3 Objetivos particulares .....	18
1.4 Hipótesis.....	18
<u>2.</u> Materiales y métodos .....	19
2.1 Ubicación del experimento .....	19
2.2 Obtención de residuos de guayaba.....	19
2.3. Tratamiento de residuos de guayaba.....	19
2.4. Extracción convencional de compuestos fenólicos.....	20
2.5. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos.....	21
2.6. Determinación de fenoles totales .....	22
2.7 Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método del DPPH .....	22
2.8 Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método de ABTS + .....	23
2.9 Diseños experimentales .....	23
Diseño Factorial Box Hunter & Hunter.....	23
Diseño compuestos centrales (DCC) .....	27
Metodología de superficie de respuesta .....	30



Resultados y discusiones.....	31
3.1. Factores significativos en la extracción de CF.....	31
3.2. Optimización de Factores significativos de extracción de CF .....	36
3.4 Actividad antioxidante .....	42
Conclusiones .....	48
<b>Extracción asistida por ultrasonido de pectinas de residuos agroindustriales de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.).....</b>	<b>49</b>
Introducción.....	49
Materiales y métodos .....	50
<b>Anexos.....</b>	<b>53</b>
Diseño de experimentos .....	53
<b>Referencias.....</b>	<b>55</b>

## Índice de tablas y figuras

Tabla 1 Métodos de extracción y rendimientos de compuestos fenólicos presentes en guayaba ...	16
Tabla 2 Factores evaluados en el método de Extracción Convencional de compuestos fenólicos a partir de cáscara de guayaba .....	24
Tabla 3. Factores a evaluados en el método de Extracción asistida por Ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáscara de guayaba.....	24
Tabla 4. Diseño factorial, Box Hunter & Hunter para extracción convencional de compuestos fenólicos .....	25
Tabla 5. Diseño factorial, Box Hunter & Hunter para extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos.....	26
Tabla 6. . Factores evaluados en el DCC para la extracción de CF por el método convencional .....	27
Tabla 7. Factores evaluados en el DCC para la extracción de CF por el método de EAU .....	27
Tabla 8. Matriz de DCC para la extracción de CF por el método de extracción convencional.....	28
Tabla 9. Matriz de DCC para la extracción de CF por el método de EAU.....	29
Tabla 10. Rendimiento de fenoles en matriz de diseño Box hunter & hunter de extracción convencional .....	32
Tabla 11. Diseño factorial Box Hunter & Hunter de la extracción asistida por ultrasonido con rendimiento de fenoles.....	33
Tabla 12. DCC para la extracción convencional de CF.....	37
Tabla 13. DCC para la extracción asistida por ultrasonido de CF.....	38

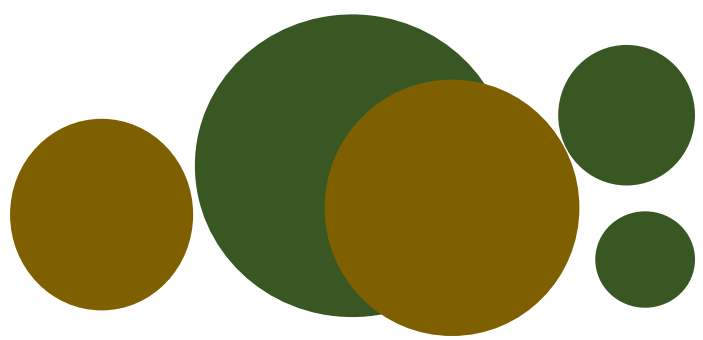


Tabla 14. Coeficiente de regresión, error estándar, y los resultados de la prueba t de Student-de superficie de respuesta para la extracción convencional de CF (mgEAG/gms) .....	39
Tabla 15. Coeficiente de regresión, error estándar, y los resultados de la prueba t de Student-de superficie de respuesta para la EAU de CF (mgEAG/gms) .....	39
Tabla 16. Actividad antioxidante por el método de DPPH de los tratamientos optimizados de la extracción convencional.....	43
Tabla 17. Actividad antioxidante por el método de DPPH de los tratamientos optimizados de la extracción asistida por ultrasonido.....	44
Tabla 18. Actividad antioxidante por el método de ABTS+ de los tratamientos optimizados de la extracción convencional.....	46
Tabla 19. Actividad antioxidante por el método de ABTS+ de los tratamientos optimizados de la extracción asistida por ultrasonido.....	47
Figura 1. Diagrama de extracción convencional de compuestos fenólicos de residuos de guayaba	20
Figura 2. Diagrama de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de residuos de guayaba .....	21
Figura 3. Descripción de las ventajas del modelo de superficie de respuesta .....	30
Figura 4. Diagrama de Pareto que describe el efecto estimado estandarizado de la extracción convencional .....	35
Figura 5. Diagrama de Pareto que describe el efecto estimado estandarizado de la extracción asistida por ultrasonido.....	35
Figura 6. Modelo de superficie de respuesta que muestra el efecto de solvente y tiempo en la extracción convencional de CF.....	40
Figura 7. Modelo polinomial desarrollado para extracción de CF por EAU.....	41
Figura 1. Presencia de pectinas en muestras de la extracción asistida por ultrasonido en residuos de guayaba .....	51
Figura 2. Espectro IR de pectinas en muestras de la extracción asistida por ultrasonido en residuos de guayaba .....	51
Figura 8. Categoría de los diseños de experimento para su estudio .....	54

## Resumen

La producción de materia orgánica que genera el proceso de elaboración de concentrado de guayaba (semilla y piel) se transforma en residuos no comestibles que se convierten en una fuente de contaminación ambiental debido a que en la actualidad existen pocas alternativas para el aprovechamiento de estos residuos, el presente trabajo tiene como alternativa el uso de estos residuos para la recuperación de compuestos fenólicos (CF) compuestos que son de intereses nutricionales por los propiedades biológicas que estos presentan, la extracción de CF fue evaluada bajo condiciones optimizadas en comparación de dos extracciones. La extracción convencional (EC) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Se utilizaron residuos de guayaba (deshidratada, pulverizados y tamizados) para evaluar el efecto sobre la liberación de compuestos fenólicos (CF) expresado como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de cáscara seca (mgEAG/gms) sobre un diseño factorial Box Hunter & hunter. Para (EC) concentración de solvente (etanol), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo (min). Para la (EAU) tiempo (min), concentración del solvente (etanol) y amplitud de

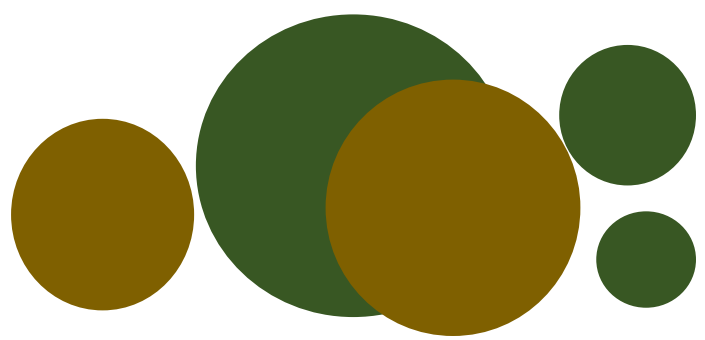
onda. Todos los factores que se evaluaron mostraron dos niveles (-1 y 1). Una vez seleccionados los factores con más influencia sobre la extracción de CF, se utilizó un diseño de compuestos centrales (DCC) para maximizar la recuperación de CF. A partir del análisis de datos, se obtuvo un segundo modelo para estimar la máxima extracción de CF para ambos métodos de extracción. Las mejores condiciones de EC fueron: etanol 20 %, temperatura  $50^{\circ}\text{C}$  durante 60 min, lo que permitió una extracción de 23.88 mgEAG/gms. En el caso de la EAU las mejores condiciones fueron las siguientes: etanol 25 %, durante 3.45 min, con una amplitud de onda de  $60\text{ m}^{-1}$  donde se alcanzó una extracción de CF de 101.78 mgEAG/gms. Las condiciones obtenidas por los modelos fueron utilizados en una prueba experimental para validarlos, los resultados obtenidos indicaron un buen ajuste de los modelos para la extracción de CF a partir de residuos de guayaba. El uso de EAU permitió aumentar el rendimiento 76.62 % veces más que la EC con una reducción en el tiempo de extracción de 94.33 %.

## Abstract

Production organic matter generated by the process of making guava concentrate (seed and skin) is transformed into non-edible residues that become a source of environmental pollution because there are currently few alternatives for the use of this waste, the present work has as alternative the use of these residues for the recovery of phenolic compounds (PC) compounds that are of nutritional interest due to their biological properties, PC extraction was evaluated under optimized conditions compared to two extractions. Conventional extraction (CE) and ultrasound assisted extraction (UAE). Guava residues (dehydrated, pulverised and sieved) were used to assess the effect on the release of phenolic compounds (PC) expressed as mg Gallic acid equivalents per gram of dry shell mgGAE/ gds on a Box Hunter & hunter factorial design. For (CE) solvent concentration (ethanol), temperature (°C) and time (min). For the (UAE)

time (min), solvent concentration (ethanol) and wave amplitude. All factors that were evaluated showed two levels (-1 and 1). Once selected the factors with the most influence on the extraction PC. Starting of data analysis, a second model was obtained to estimate the maximum PC extraction for both extraction methods. The best EC conditions were 20% ethanol, temperature 50 °C for 60 min, which allowed an extraction of 23.88 mgGAE/ gds. In the case of the UAE the best conditions were the following: 25 % ethanol, during 3.45 min, with a wavelength of 60 m-1 where a CF extraction of 101.78 mgGAE/ gds was achieved. The conditions obtained by the models were used in an experimental test to validate them, the results obtained indicated a good fit of the models for the extraction of PC from guava residues. The use of EAU allowed to increase the performance 76.62% more than the CE with a reduction in extraction time of 94.33%.



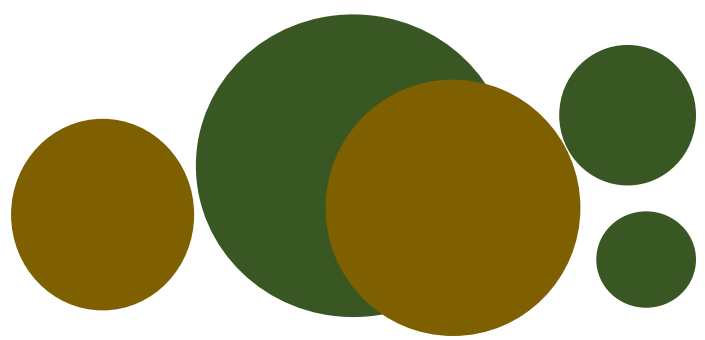


# 1

«A lo largo de la historia, las tecnologías de una generación crearon problemas para la siguiente. Tenemos que encontrar una forma de manejar esto.» Steve Rayner.

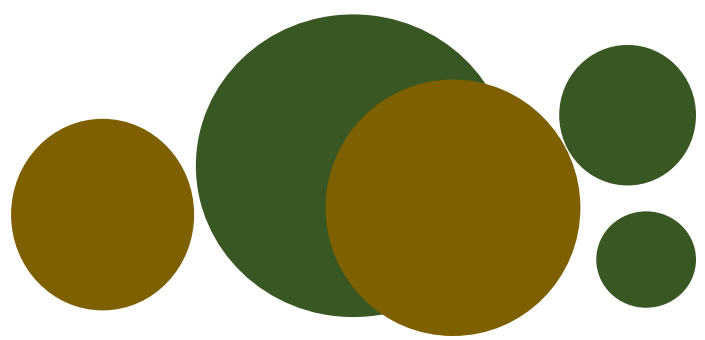
## Introducción

En México la producción de guayaba es de 101, 300 toneladas anualmente (SIAP, 2018). La guayaba se consume en fresco y se utiliza en el procesamiento agroindustrial para la obtención de concentrado, jugo o mermeladas, lo cual genera residuos, que consisten en la piel, semilla y pulpa correspondientes al 25 % del peso total del fruto. En los últimos años, el sector agroindustrial de México ha enfrentado diversos problemas ambientales y tecnológicos debido a que no existe un adecuado manejo de estos residuos orgánicos. La guayaba es considerada una fruta de valor agregado debido a su composición química, se le confieren propiedades medicinales ya que es ampliamente recomendada para el manejo de enfermedades hepáticas, respiratorias e hipertensivas. Estos efectos benéficos sobre la salud son asociados a la cantidad de compuestos fenólicos (Roy *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos exhiben propiedades fisiológicas tales como antialérgicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, son cardioprotectores y con efecto vasodilatador (Manach *et al.*, 2005). Dichas actividades derivan de la capacidad que presentan estos compuestos para estabilizar a los radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos que funcionan como agentes quelantes (García Salas *et al.*, 2010). Por ello se les reconoce como moléculas capaces de disminuir las enfermedades crónicas (enfermedades del corazón, infartos, cáncer, enfermedades respiratorias, diabetes) y enfermedades degenerativas (osteoartritis, enfermedades neurodegenerativas) provocadas por la edad (Oboh *et al.*, 2007). La concentración de compuestos fenólicos en los extractos de guayaba es de 265 mg EAG/ gms (Ayub *et al.*, 2010). La extracción de compuestos fenólicos presentes en los residuos de guayaba



presenta una alternativa para el manejo de residuos agroindustriales de guayaba , debido a la amplia gama de propiedades biológicas que estos presentan, la generación de residuos orgánicos a nivel mundial es una problemática que engloba a muchos sectores principalmente al medio ambiente y a la sociedad, estos residuos son depositados en tiraderos al aire libre, generando compuestos tóxicos principalmente el metano que es un gas de efecto invernadero y mico toxinas que son sustancias producidas por microorganismos, causantes de muchas enfermedades degenerativas al estar en contacto con dichas sustancias.

En la actualidad, existe una tendencia hacia el desarrollo y mejora de procesos químicos en armonía con el ambiente para la extracción de compuestos fenólicos. Tradicionalmente, los métodos convencionales de extracción aplicados al zumo o residuos de la guayaba mantienen el uso de solventes orgánicos como el metanol, etanol, acetato de etilo y acetona de los cuales se reporta que el metanol es el solvente más efectivo para este tipo de procesos (Fraga, 2010) pero dicha extracción requiere de tiempos muy largos de extracción. En los últimos años han surgido metodologías que permiten hacer más eficientes los procesos, tomando en cuenta las propiedades físicas o químicas de las distintas moléculas en estudio. Como es la extracción con fluidos supercríticos (EFS), la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Que, respecto a los métodos convencionales, estas tecnologías presentan ventajas como tiempos cortos, uso de poco solvente, alta velocidad y cinética de extracción (Balcinde *et al.*, 2003). Se ha reportado el uso de la EAU para la obtención de antioxidantes a partir de cáscaras de cítricos (Ya-Qin Ma *et al.*, 2009), de compuestos aromáticos a partir de ajo (Jiménez *et al.* 2003) o de aceites y polifenoles a partir de semillas de uva (Da Porto *et al.*, 2012). En el presente trabajo se propone establecer las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos utilizando como técnicas de extracción de compuestos fenólicos, EAU en comparación de una extracción convencional.



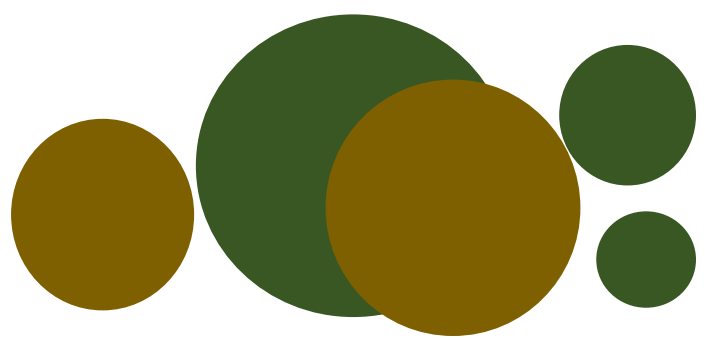
## I.1 Marco teórico

### Contaminación por residuos agroindustriales

11

La agroindustria es una actividad económica que integra la producción agrícola, pecuaria o forestal, así como la comercialización de los productos para obtener alimentos o materias primas semi elaborados destinados al mercado (Saval *et al.*, 2012). Entre los productos que se industrializan están: frutas, verduras, raíces, semillas, hojas, tubérculos y vainas; algunos se comercializan en fresco y otros son transformados en néctares, jugos, mermeladas, ensaladas, harinas, aceites, vinos, concentrados en polvo y conservas (Hashimoto *et al.*, 2007).

Los residuos que son generados a partir de esta actividad económica (residuos agroindustriales) son un gran problema ambiental ya que representan una cantidad importante de desecho. Generalmente, estos residuos son vertidos al ambiente, generando focos de contaminación ambiental, principalmente de los cuerpos de agua, suelos y aire (Aceves *et al.*, 2012), así mismos daños en la salud humana debido a la producción de micotoxinas que se generan por el crecimiento de microorganismos a la descomposición de estos residuos (FAO, 2000). Un uso muy común que existe a este tipo de residuos es utilizarlos como alimento para ganado. Sin embargo, esta técnica resuelve de manera parcial el problema puesto que el volumen de desechos que son generados es mayor que el de su demanda como alimento. En los últimos años, el sector agroindustrial en México ha generado diversos problemas ambientales, debido a que no existe un adecuado manejo de los residuos que produce. Un ejemplo de ello es el procesamiento de concentrado de guayaba (*Phisidium guajava* L.) que genera el 25% de residuos. La guayaba está clasificada como uno de los frutos más conocidos y estimados en México, alcanzando una producción anual de 101, 300 toneladas (SIAP, 2018). Estimando que de esta producción se genera el



25 % de residuos al ser procesada se generaría una cantidad 25,325 toneladas anuales de residuos.

## Guayaba (*Phisidium guajava* L.)

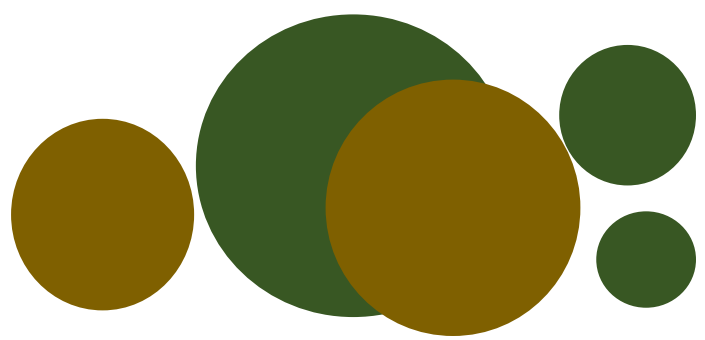
Es una fruta tropical que ocupa en cuarto lugar agrícola en México es consumida tanto fresca como procesada en forma de pulpa, jugos, mermeladas y jaleas. Es una fruta con alto valor nutricional, Olaya en el 2009 reporta que posee un alto contenido de antioxidantes (2,62 - 7,79%), como vitamina C, vitamina E, fenoles y carotenoides, sustancias encargadas de eliminar los radicales libres y prevenir el estrés oxidativo y los desórdenes metabólicos, además Jiménez et al en el 2001 mencionan que posee un alto porcentaje de fibra dietaría (5,76%). Los extractos de este fruto y de sus hojas han sido tradicionalmente utilizados en medicina popular en todo el mundo, las hojas de este fruto a portan una cantidad de 265 miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de materia seca (mgEAG/ gms) (Ayub et al., 2010). Además, se han usado ampliamente como agente hipoglucemiante para la diabetes, debido a su alta concentración de compuestos fenólicos (Gutiérrez *et al.*, 2008).

12

## Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) son sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos) (Valverde et al., 2000). Son metabolitos secundarios de origen vegetal, tienen una participación importante en el color, en las cualidades sensoriales y nutricionales, así como en las propiedades antioxidantes de los alimentos (Martínez *et al.*, 2000) como es la guayaba.

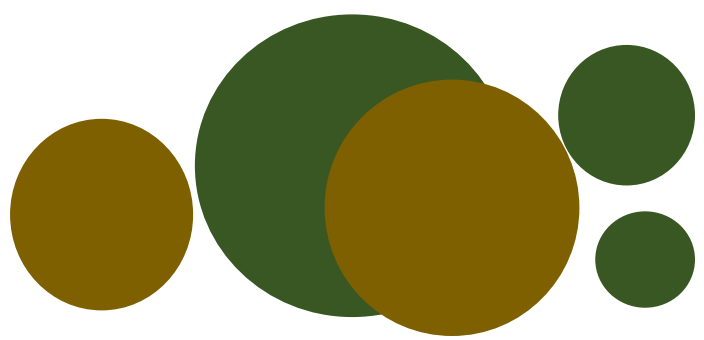
La identificación, cuantificación y extracción de los CF ha tenido un gran interés, debido a las diversas actividades biológicas como anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales,



antialérgicas y antioxidantes ya que retardan los cambios oxidativos en los alimentos, mejorando así la calidad y el valor nutricional de estos. Todos estos efectos en la salud atraen la atención de incorporar éstos compuestos a los productos alimenticios (Kang *et al.*, 2006). Cabe mencionar que Martínez *et al.*, en el 2000 reportan que la capacidad antioxidante descrita para distintos fenoles se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial. El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Ávalos *et al.*, 2009).

## Clasificación de compuestos fenólicos

- ❖ Fenoles simples: Son poco frecuentes y se encuentran en las plantas en forma de heterósidos (St-Onge *et al.*, 2005).
- ❖ Ácidos fenólicos: Se pueden encontrar libres o unidos a azúcares (heterósidos), pueden formar ésteres al unirse tanto con el ácido químico como con otro ácido fenólico (Mora, 2011).
- ❖ Taninos: Poseen un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica y que se encuentran de dos clases: Flavotaninos y pirogalotaninos (García *et al.*, 2010).
- ❖ Cumarinas: Son derivados de la venzo  $\alpha$  pirona, muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos.
- ❖ Lignanos: Son compuestos que poseen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano (Martínez-Valverde, 2000).
- ❖ Quinonas: Son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles.

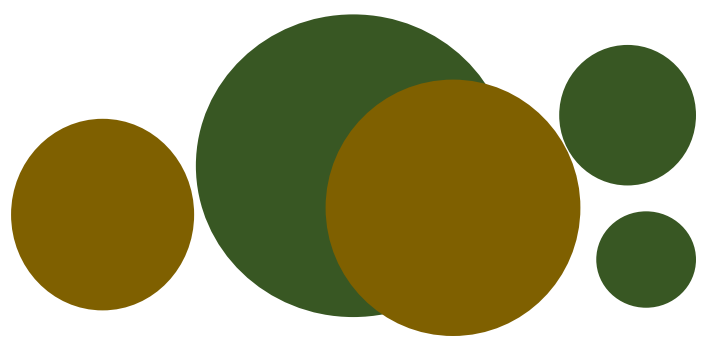


- ❖ **Flavonoides:** Constituyen un grupo amplio de fenoles naturales, se encuentran tanto como agliconas libres o en forma de heterósidos. En la actualidad se conocen más de 2000 de estos compuestos, de los cuales unos 500 se encuentran en estado libre (Evans, 2011). Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores, frutos.
- ❖ **Ácido clorogénico:** Es un éster entre el ácido químicico y el ácido caféico y es uno de los componentes poli fenólicos mayoritarios presentes en plantas, frutas y vegetales. Se encuentra mayoritariamente en las semillas de café y en las hojas de tabaco (Naso et al., 2010). El ácido clorogénico y sus beneficios. Al igual que otros polifenoles dietarios el ácido clorogénico presenta propiedades antioxidantes y también presenta actividad anti-VIH, anticancerígena, antialérgica, entre otras. Los estudios in vitro sugieren que este compuesto elimina radicales generados en fase acuosa, aumenta la resistencia de las LDL a la peroxidación lipídica e inhibe el daño al ADN.

Al poseer esta gran variedad de beneficios de los compuestos fenólicos es muy importante su extracción.

## Extracción de compuestos fenólicos

La importancia de la extracción de los compuestos fenólicos (CF) es mayor en los últimos años debido a las propiedades que se han explicado con anterioridad. Se han desarrollado diversas metodologías para la extracción de CF dentro de las cuales se encuentran extracciones convencionales con solventes orgánicos y también aquellos métodos basados en las propiedades de los fluidos como lo son los métodos de solventes presurizados o extracción con fluidos supercríticos (EFS) misma como la extracción subcrítica con agua (ESA) y métodos selectivos aplicados a muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Así mismo, el



papel de miniaturización y fases ortivas (desorción subsecuente) o bien la participación en fase líquida (sacudida mecánica, ultrasonido y extracción asistida por microondas) (Rayne, 2004).

## Extracción convencional de compuestos fenólicos

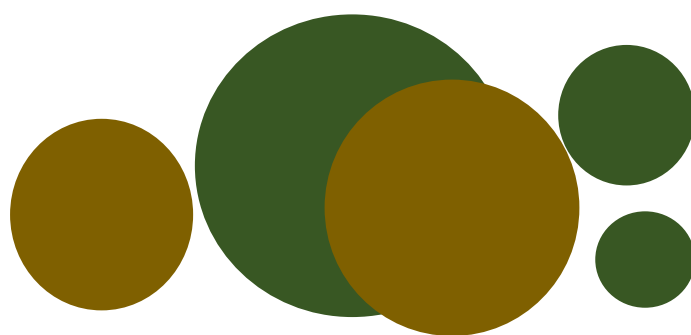
15

La extracción convencional a diferencia de la extracción asistida por ultrasonido es una extracción sencilla que basa en la transferencia selectiva del compuesto de interés desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial (Felizon et al., 2000).

## Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos

De los métodos de extracción de compuestos fenólicos la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es una técnica basada en la incidencia de ondas acústicas inaudibles a una frecuencia superior a 20 kHz sobre un medio físico. Concretamente, los ultrasonidos de potencia, también llamado de baja frecuencia y elevada energía, se utilizan en la ingeniería de alimentos con el fin de acelerar los fenómenos de transferencia de materia y calor (Espert, 2008). Se ha reportado el uso de la EAU con el fin de aumentar la cinética de extracción de compuestos bioactivos a partir de material vegetal, así como rendimiento, mediante la aplicación de ultrasonidos se produce una mayor penetración del disolvente en la matriz celular, una alteración de la estructura y por tanto una mejora en la transferencia de materia (Balcide, 2003). Este hecho es consecuencia del calentamiento producido por la absorción de energía acústica en las interfaces, de los fenómenos de “efecto esponja” (ciclos de compresión- expansión rápidos y sucesivos) y de “cavitación” (por formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas de aire como consecuencia de los cambios de





presión) que se producen en el interior del producto, así como de la generación de un régimen turbulento en el medio líquido (Albu, 2004). Algunos procesos en los que se ha aplicado con éxito serían la extracción de compuestos antioxidantes a partir de cáscaras de cítricos (Ya-Qin Ma, 2009), de compuestos aromáticos en ajo (Jiménez, 2003) o de aceites y polifenoles en semillas de uva (Da Porto, 2012).

## Antecedentes de métodos de extracción de compuestos fenólicos

Se han reportado rendimientos de CF a través de diversas metodologías a partir de la guayaba (tabla 1.) Los rendimientos obtenidos por la extracción asistida por ultrasonido son mayores (45%) a diferencia de los rendimientos obtenidos por extracciones convencionales.

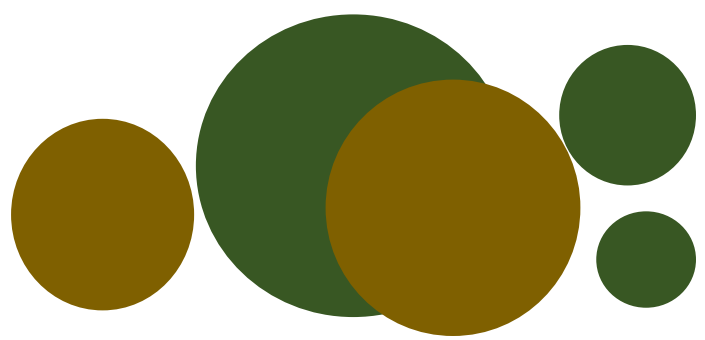
**Tabla 1** Métodos de extracción y rendimientos de compuestos fenólicos presentes en guayaba

Método de extracción	Condiciones experimentales	Solvente de extracción	Rendimiento (mg/gms) a
HPLC	m/v: 1:20, 15 min, 40° C	Acetato de etilo	87.62 <b>b</b>
Dióxido de carbono supercrítico y co-disolventes	10MPa 60°C	Etanol-CO <sub>2</sub>	140/100 <b>c</b>
Ultrasonido	55°C, 30 min, 240 W	H <sub>2</sub> O	97.23 <b>d</b>

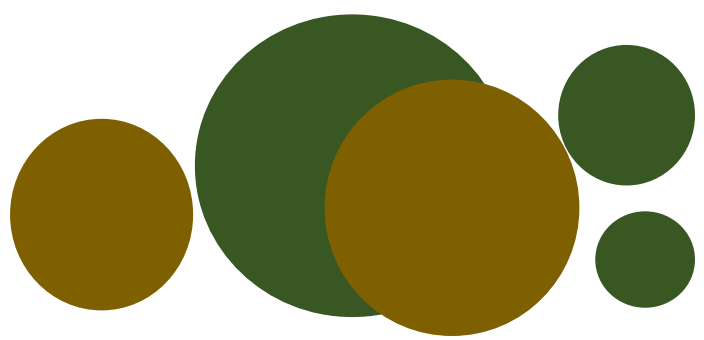
**a:** unidades en miligramos de equivalente de ácido gálico (EAG) por gramo de materia seca. **b:** Flores et al., 2013; **c:** Vargas et al., 2010; **d:** kong et al., 2015.

Se obtuvo un diagrama de Pareto con la finalidad de identificar los factores con influencia sobre la extracción de CF, como se muestra en la Figura 5. Los factores que superan la línea





de significancia, en la extracción de CF por el método convencional fueron el solvente y tiempo cuales mostraron una influencia significativa en dicha extracción ( $\alpha = 0,05$ ). El solvente muestra que tienen una correlación negativa, lo que indico que a medida que los niveles disminuyen en este factor la respuesta también aumentaba es decir que entre más polar era el solvente mayor era el rendimiento de CF. Por otro lado, el tiempo mostro una correlación positiva lo que nos dice que, si aumentaban los niveles del tiempo, la variable de respuesta ayudaría que el rendimiento de compuestos fenólicos de la extracción aumenté. Se tomó en cuenta no considerar las combinaciones de los factores debido a que la significancia de estos por separado podía aumentar la variable de respuesta.



## 1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto del ultrasonido en la obtención de compuestos fenólicos para la valorización de residuos agroindustriales de guayaba

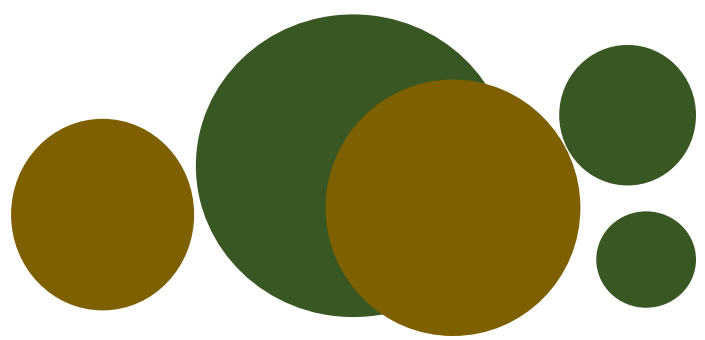
18

## 1.3 Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos por medio de extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido
- Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los residuos de guayaba por medio de extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido
- Optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos y pectinas

## 1.4 Hipótesis

El uso del ultrasonido para la extracción de compuestos fenólicos en residuos agroindustriales de guayaba podría sustituir procesos convencionales que tienen efectos nocivos al medio ambiente y así mismo ser una alternativa para el control de contaminación de estos residuos.



# 2 Materiales y métodos

## 2.1 Ubicación del experimento

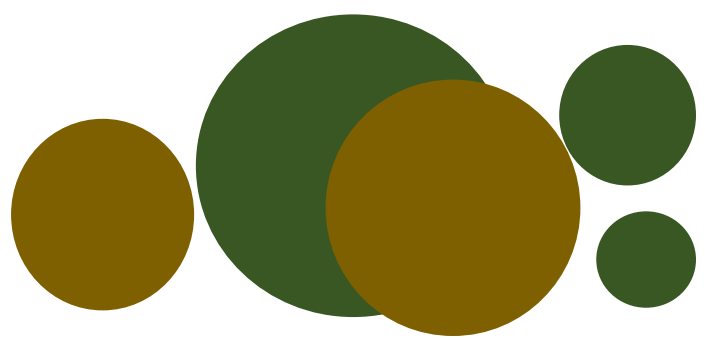
El estudio se realizó en las instalaciones del Centro de investigación en Química Sustentable en cooperación con la Facultad de química de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en Toluca, estado de México y la planta piloto 4 de fermentación en medio sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, ubicada en la Ciudad de México.

## 2.2 Obtención de residuos de guayaba

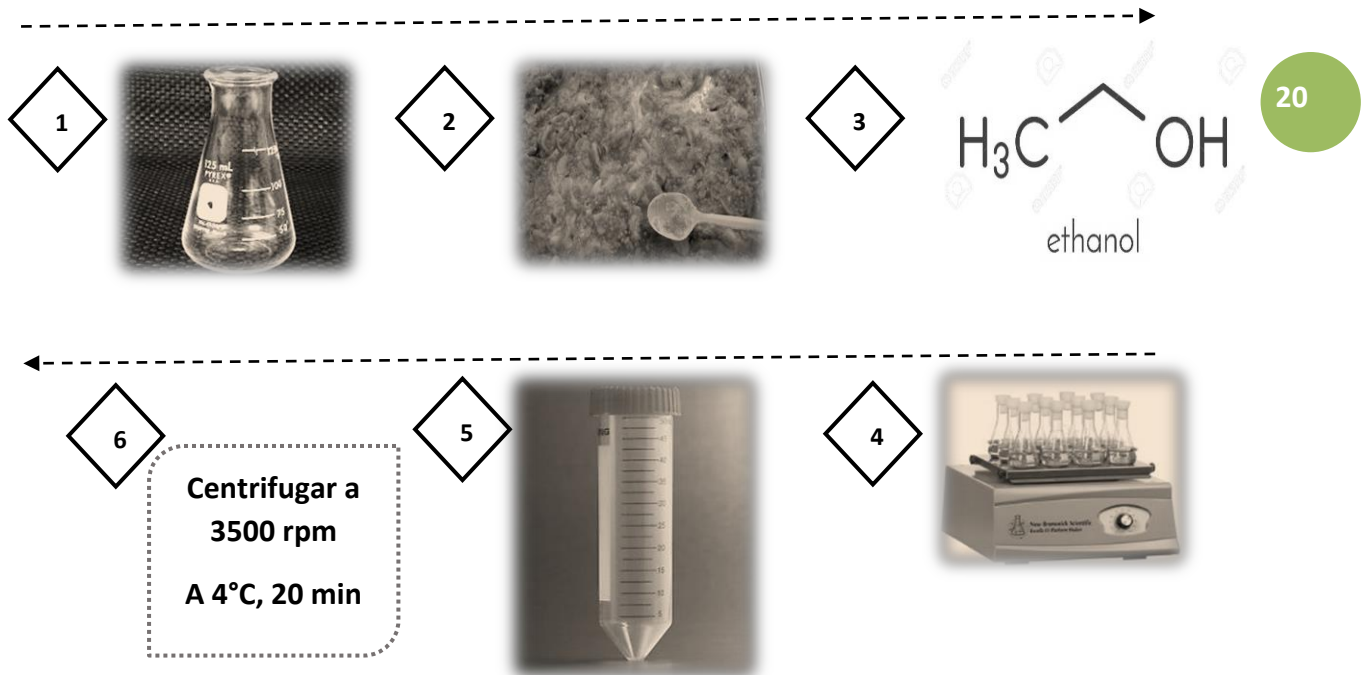
Los residuos de guayaba se obtuvieron como producto residual del proceso de industrialización de concentrado de guayaba elaborado en las instalaciones del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

## 2.3. Tratamiento de residuos de guayaba

Los residuos de guayaba se secaron a temperatura ambiente bajo la sombra, posteriormente se deshidrataron en un horno de secado a 60 °C durante 12 horas, finalmente se sometió a una reducción de tamaño en un molino y se tamizo para obtener diferentes tamaños de partículas. Los tamaños de las partículas fueron polvo (0.074- 0.149 mm) y gránulos (2-4 mm).



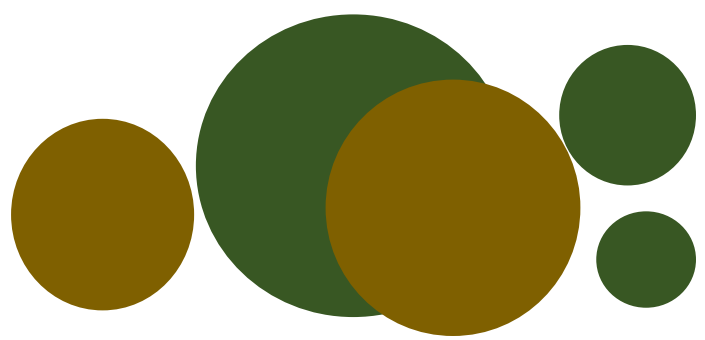
## 2.4. Extracción convencional de compuestos fenólicos



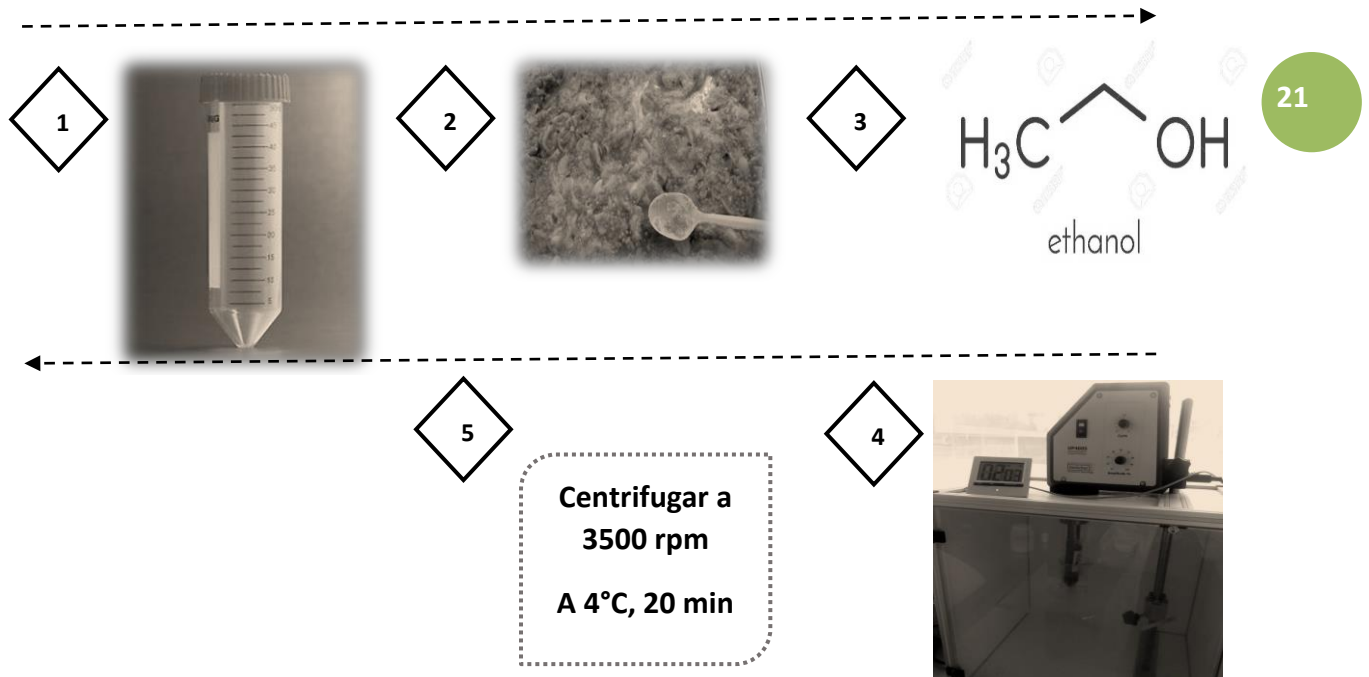
**Figura 1. Diagrama de extracción convencional de compuestos fenólicos de residuos de guayaba**

El procedimiento de la extracción convencional se describe en la figura 1. Explica que en 16 matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregó la muestra de residuos de guayaba previamente molida y tamizada en una relación masa/volumen de 1:20. En un volumen final de 50 mL de etanol (70 %, 30 %). La mezcla se mantuvo en agitación constante de 250 rpm, manteniendo la temperatura (30° C, 50° C) y tiempo de contacto solido-líquido (45 min, 60 min). Finalizando el tiempo de extracción.

Las muestras homogéneas, se vaciaron a tubos de 50 mL para centrifugar a 3500 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y almaceno en frascos, hasta su análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

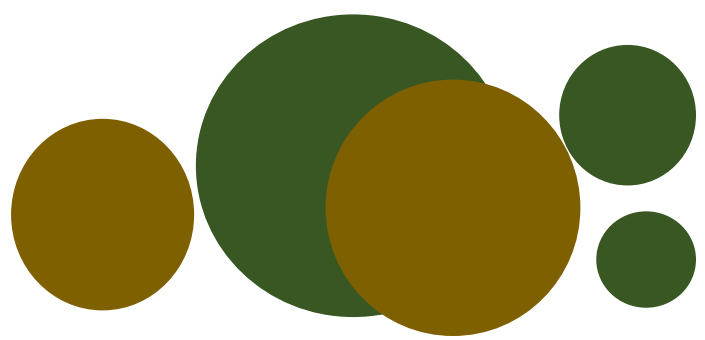


## 2.5. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos



**Figura 2** Diagrama de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de residuos de guayaba

En 16 tubos de centrifuga de 50 mL, se agregó la muestra de residuos de guayaba previamente molida y tamizada en una relación masa/volumen de 1/20, en un volumen final de 50 mL de etanol (70 %, 30 %), la mezcla se sometió a sonicación (UP400S Hielscher) en un ciclo continuo de sonicación, con amplitud de onda 30 y  $80 \text{ cm}^{-1}$  manteniendo la temperatura constante con un baño de hielo como se muestra en la figura 2. Pasando el tiempo de extracción (3 min, 5 min) las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almaceno en frascos, hasta su análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante



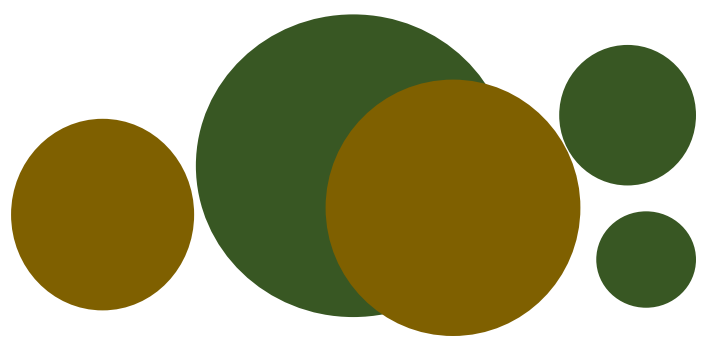
## 2.6. Determinación de fenoles totales

Para la cuantificación de los fenoles totales presentes en las muestras, se realizó el ensayo Folin-ciocalteu de acuerdo a lo reportado (Moure *et al.*, 2001). A 800  $\mu\text{L}$  de muestra, se le adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogenizó la mezcla se dejó reposar durante 5 minutos y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 0.01 M, la mezcla se homogenizo y se dejó reposar 5 minutos. Pasado el tiempo se añadieron 5 mL de agua y se registró la absorbancia de las muestras a 730 nm en un espectrofotómetro (Zhimadzu UV-1800) empleando como blanco agua destilada. Se preparó una curva patrón de ácido gálico (200 mg/L) como estándar. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG/gms).

22

## 2.7 Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método del DPPH

Se empleó el método de Brand-Williams *et al.*, 1995 con modificaciones de Zapata *et al.*, 2013, 10  $\mu\text{L}$  de muestra fueron adicionados a 990  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de DPPH, y se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 30 min de reacción a una longitud de onda de 517 nm, y se comparo el valor con la curva de referencia construida con Acido galico como patrón primario, los resultados fueron expresados como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG/gms).



## 2.8 Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método de ABTS +

23

La actividad inhibidora del radical catión ABTS<sup>+</sup> sobre los extractos en estudio se midió de acuerdo al método descrito por Re et al., (1999) y Mathew et al., (2005), A 50  $\mu$ L de muestra se adiciono 1450  $\mu$ L de la solución de ABTS<sup>+</sup> se Homogenizo y se dejó reaccionar durante 30 minutos en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 732 nm.

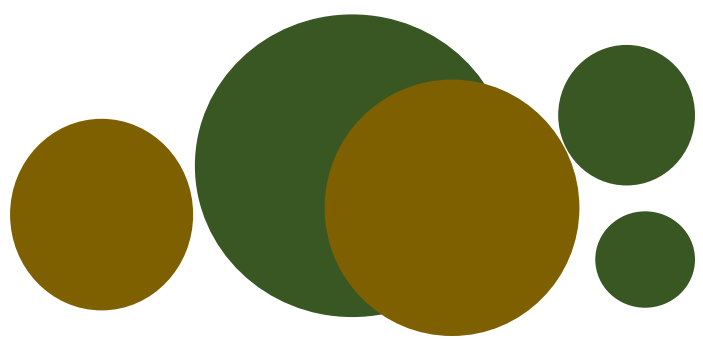
## 2.9 Diseños experimentales

Con la finalidad de optimizar la extracción de los CF y pectinas a partir de los residuos de guayaba se realizó inicialmente un diseño factorial completo de tres factores por dos niveles posteriormente un Diseño de Compuestos Centrales y se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta.

### Diseño Factorial Box Hunter & Hunter

El diseño factorial Box Hunter & Hunter consiste en un conjunto de experimentos en los cuales cada factor se coloca a 2 niveles. Las variables pueden ser de tipo cualitativa o cuantitativa. Los niveles se denotan como -1 y +1; pudiendo escribirse en forma simple como (-) y (+). Este diseño fue utilizado para encontrar las variables que denotan relevancia para la extracción de compuestos fenólicos y pectinas.

Para evaluar la Extracción convencional de compuestos fenólicos se evaluaron tres factores (Solvente, temperatura, tiempo) con dos niveles cada uno tal como se muestra en la tabla 2.



**Tabla 2 Factores evaluados en el método de Extracción Convencional de compuestos fenólicos a partir de cáscara de guayaba**

Factores		-1	1
A	Solvente	EtOH 30%	EtOH 70%
B	Tiempo	45 min	60 min
C	Temperatura	30 °C	50 °C

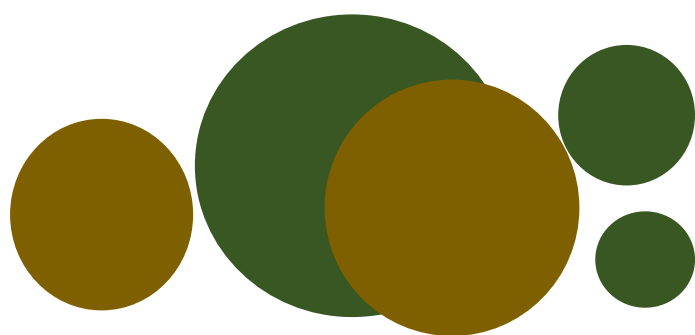
Para evaluar la Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos se evaluaron tres factores (Solvente, magnitud de onda, tiempo) con dos niveles cada uno tal como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Factores a evaluados en el método de Extracción asistida por Ultrasonido de compuestos fenólicos a partir de cáscara de guayaba.**

Factores		-1	1
A	Solvente	EtOH 30%	EtOH 70%
B	Onda	40	60
C	Tiempo	3 min	5 min

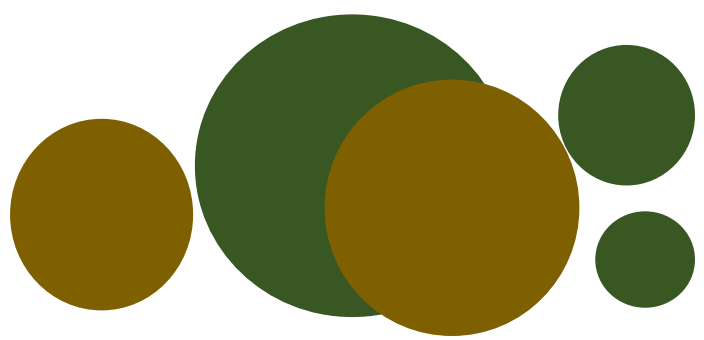
A partir del diseño establecido, con ayuda del paquete estadístico STATISTICA 7.0 se obtuvo una matriz de ocho tratamientos para evaluar el efecto de estos tres factores evaluados sobre la obtención de CF empleando la extracción convencional (tabla 4) y la EAU (tabla 5).





**Tabla 4. Diseño factorial, Box Hunter & Hunter para extracción convencional de compuestos fenólicos**

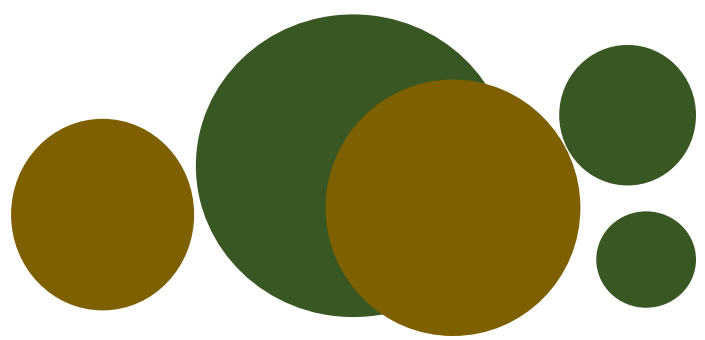
Tratamiento	Tiempo	Solvente	Temperatura
1	45 min	30 %	30° C
2	60 min	30 %	30° C
3	45 min	70 %	30° C
4	60 min	70 %	30° C
5	45min	30 %	50° C
6	60 min	30 %	50° C
7	45min	70 %	50° C
8	60 min	70 %	50° C



**Tabla 5. Diseño factorial, Box Hunter & Hunter para extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos**

Tratamiento	Tiempo	Solvente	Onda
1	3 min	30%	40 cm <sup>-1</sup>
2	5 min	30%	40 cm <sup>-1</sup>
3	3 min	70%	40 cm <sup>-1</sup>
4	5 min	70%	40 cm <sup>-1</sup>
5	3 min	30%	60 cm <sup>-1</sup>
6	5 min	30%	60 cm <sup>-1</sup>
7	3 min	70%	60 cm <sup>-1</sup>
8	5 min	70%	60 cm <sup>-1</sup>

Una vez seleccionados los factores que más influyen sobre la respuesta, se procedió a maximizar la respuesta mediante el uso de un diseño de compuestos centrales.



## Diseño compuestos centrales (DCC)

Este diseño experimental consiste en un diseño factorial o factorial fraccionada con puntos centrales y axiales (llamados puntos estrella) que permiten estimar la curvatura en la variable de respuesta con respecto al factor evaluado, manteniendo el resto de factores a un nivel fijo (Jiménez, 2015). El uso del DCC permite estimar de manera eficiente los términos de primer y segundo orden, además de poder modelar una variable de respuesta con curvatura debido a los puntos estrella agregados en el diseño factorial.

Los Factores significativos (solvente y tiempo) en la extracción convencional de CF y los factores significativos de EAU (solvente y tiempo) fueron colocados a puntos centrales y axiales para estimar la variable de respuesta de acuerdo a la tabla 6 y 7.

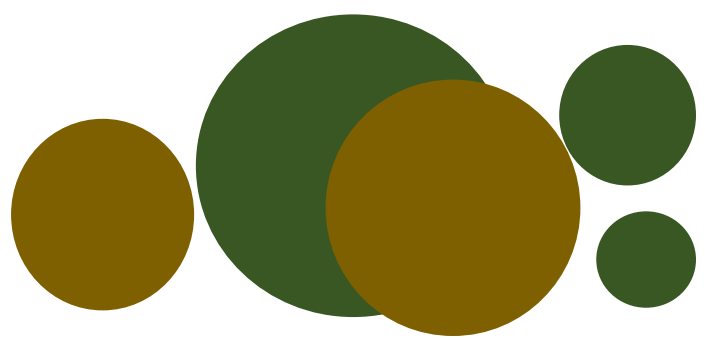
**Tabla 6. . Factores evaluados en el DCC para la extracción de CF por el método convencional**

Factores	NIVELES				
	-1.68	-1	0	1	1.68
solvente	18	20	25	30	32
tiempo	58	60	65	70	72

**Tabla 7. Factores evaluados en el DCC para la extracción de CF por el método de EAU**

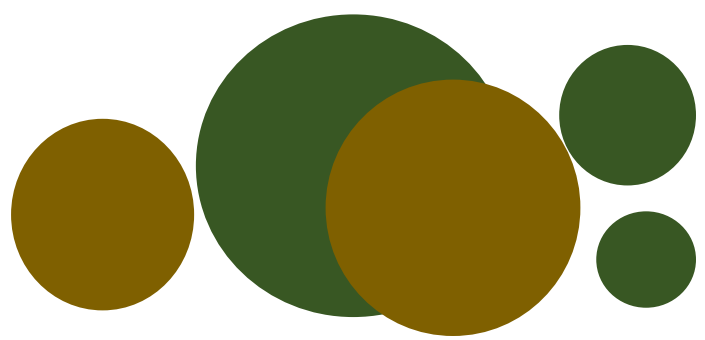
Factores	NIVELES				
	-1.68	-1	0	1	1.68
solvente	18	20	25	30	32
tiempo	0.59	1	2	3	3.41

Mediante el uso del paquete estadístico STATISTICA 7.0 se obtuvo una matriz de 10 tratamientos para evaluar el efecto de los factores significativos colocados a puntos centrales y axiales para maximizar la extracción de CF por la extracción convencional (tabla 8) y la EAU (tabla 9).



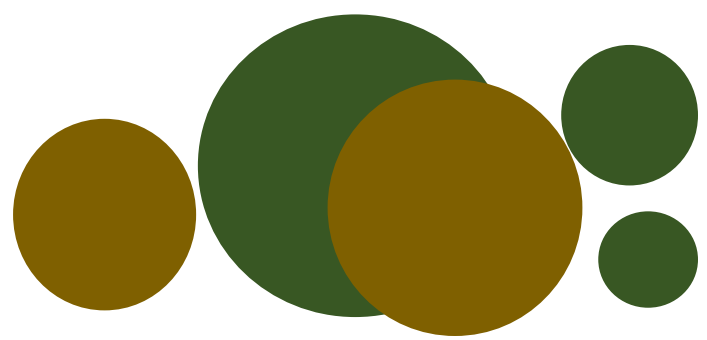
**Tabla 8. Matriz de DCC para la extracción de CF por el método de extracción convencional**

Tratamiento	Solvente	Tiempo
1	20	60
2	20	70
3	30	60
4	30	70
5	18	65
6	32	65
7	25	58
8	25	72
9	25	65
10	25	65



**Tabla 9. Matriz de DCC para la extracción de CF por el método de EAU.**

Tratamiento	solvente	tiempo
1	20	1
2	20	3
3	30	1
4	30	3
5	18	2
6	32	2
7	25	0.59
8	25	3.4
9	25	2
10	25	2



## Metodología de superficie de respuesta

Metodología de superficie de respuesta Esta estrategia fue empleada para el ajuste de los datos experimentales a una ecuación polinómica, la cual fue capaz de describir el comportamiento de los datos y hacer previsión estadística de acuerdo a las ventajas que ese modelo presenta como lo describe la figura 3.

30

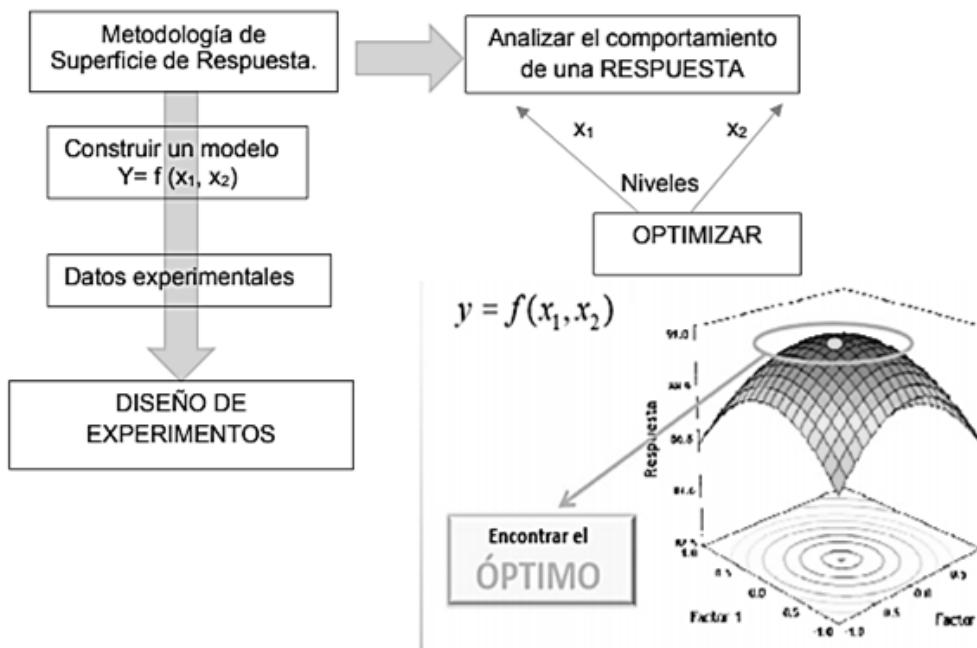
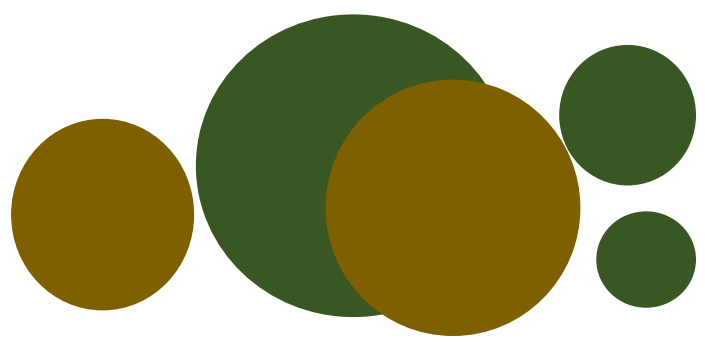


Figura 3. Descripción de las ventajas del modelo de superficie de respuesta

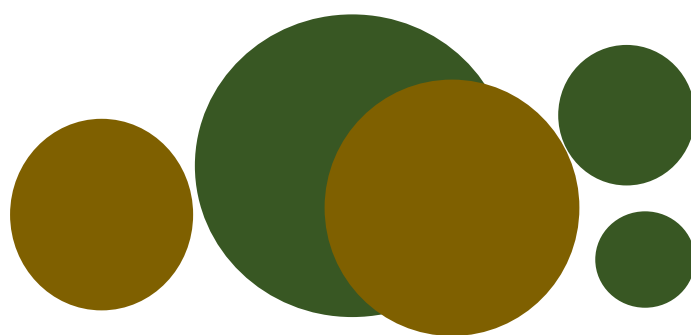


# 3 Resultados y discusiones

## 3.1. Factores significativos en la extracción de CF

A partir de los residuos de guayaba se obtuvieron los siguientes resultados en las extracciones convencional y asistida por ultrasonido en apoyo del uso de diseños experimentales.

Un diseño de experimentos según George *et al.*, 2005 es una de las mejores herramientas utilizadas para la reducción de experimentos que permite conocer parámetros óptimos en los cuales debe operar el proceso, e identificar aquellos factores que producen un gran impacto en la variable de respuesta, así como aquellos que no son tan significativos, sin embargo, si se conocen y se mejoran es posible brindar mayor rendimiento al proceso. El efecto evaluado de tres factores en el diseño experimental Box Hunter & Hunter en la extracción convencional (solvente, temperatura y tiempo) y en la extracción asistida por ultrasonido (solvente, magnitud de onda y tiempo), para la extracción convencional de compuestos fenólicos se alcanzó un máximo rendimiento en los tratamientos 1, 2 y 5, de 14.40, 12.36 y 15.64 mg EAG/gms mientras que en el tratamiento tres se alcanzó un rendimiento menor de 9.53 mg EAG/gms como se muestra en la tabla 10.

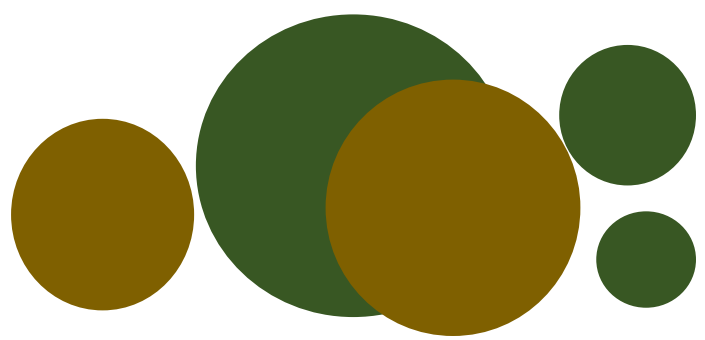


**Tabla 10. Rendimiento de fenoles en matriz de diseño Box hunter & hunter de extracción convencional**

Tratamiento	Tiempo	Solvente	Temperatura	Fenoles mgEAG/gms
1	45 min	30 %	30° C	14.40±0.006
2	60 min	30 %	30° C	16.36±0.03
3	45 min	70 %	30° C	9.53±0.01
4	60 min	70 %	30° C	10.72±0.074
5	45min	30 %	50° C	15.64±0.023
6	60 min	30 %	50° C	14.23±0.011
7	45min	70 %	50° C	10.28±0.011
8	60 min	70 %	50° C	11.02±0.011

Para la EAU se observó un máximo rendimiento de CF en los tratamientos 1, 2 y 5, de 80.77, 84.45 y 97.87 mg EAG/gms mientras que en el tratamiento 1 se alcanzó un rendimiento menor de 60.32 mg EAG/gms como se muestra en la tabla 11.

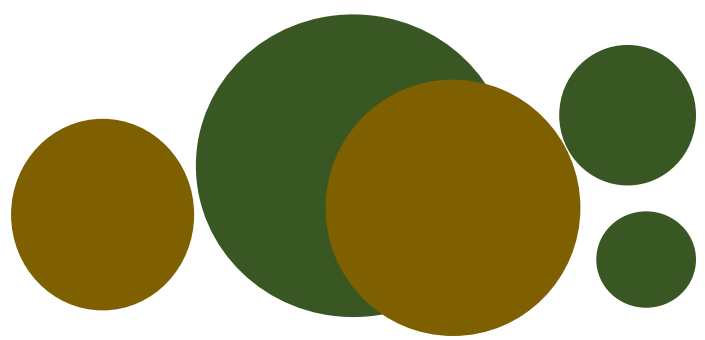




**Tabla 11. Diseño factorial Box Hunter & Hunter de la extracción asistida por ultrasonido con rendimiento de fenoles**

Tratamiento	Tiempo	Solvente	Onda	Fenoles mgEAG/mgs
1	3 min	30%	40 cm <sup>-1</sup>	80.77±0.449
2	5 min	30%	40 cm <sup>-1</sup>	84.45±0.705
3	3 min	70%	40 cm <sup>-1</sup>	62.03±0.506
4	5 min	70%	40 cm <sup>-1</sup>	61.10±0.551
5	3 min	30%	60 cm <sup>-1</sup>	97.87±0.756
6	5 min	30%	60 cm <sup>-1</sup>	60.32±0.148
7	3 min	70%	60 cm <sup>-1</sup>	64.01±0.148
8	5 min	70%	60 cm <sup>-1</sup>	79.36±0.159

Analizando los resultados obtenidos en la matriz experimental Box Hunter & Hunter con el paquete estadístico, se obtuvo un diagrama de Pareto con la finalidad de identificar los factores que presentaban efecto sobre la extracción de CF, como se muestra en la Figura 4 y 5. Cabe mencionar que el diagrama de Pareto puede explicar los efectos y las frecuencias de cada factor (Minitab, 2019), Los factores que superan el índice de confiabilidad ( $\alpha = 0.05$ ) en la extracción de CF por el método convencional fueron el solvente y tiempo al igual que



para la extracción asistida por ultrasonido de acuerdo a los valores de cada factor (-1, 1) evaluados en cada extracción. se muestra que la probabilidad de que la variable de respuesta aumente en la extracción convencional es disminuyendo el porcentaje de pureza del etanol es decir disminuyendo el valor del factor solvente, por otro lado, el factor tiempo indicaba que al aumentar sus niveles el rendimiento de compuestos fenólicos se vería en aumento, en el diagrama se puede observar que la combinación del factor tiempo con el factor temperatura presentaban mayor efecto en la variable de respuesta esta combinación no fue considerada pues el factor temperatura sin combinación no presentaba ningún efecto.

Para la extracción asistida por ultrasonido la interpretación en el diagrama de Pareto nos dice que al usar etanol de bajo porcentaje es decir disminuyendo el valor del factor solvente la probabilidad de aumentar la variable de respuesta es mayor al 50% por otro lado, el factor tiempo indicaba que al disminuir los niveles de este factor el rendimiento de compuestos fenólicos se vería en aumento, puesto que Azuola y Vargas (2007) mencionan que esta tecnología es eficaz puesto que el tiempo de extracción es reducido debido a la transferencia de calor entre moléculas, en el diagrama se puede observar que la combinación del factor tiempo con el factor solvente presentaban mayor efecto en la variable de respuesta esta combinación no fue considerada pues solo en combinación estas presentaban efecto.

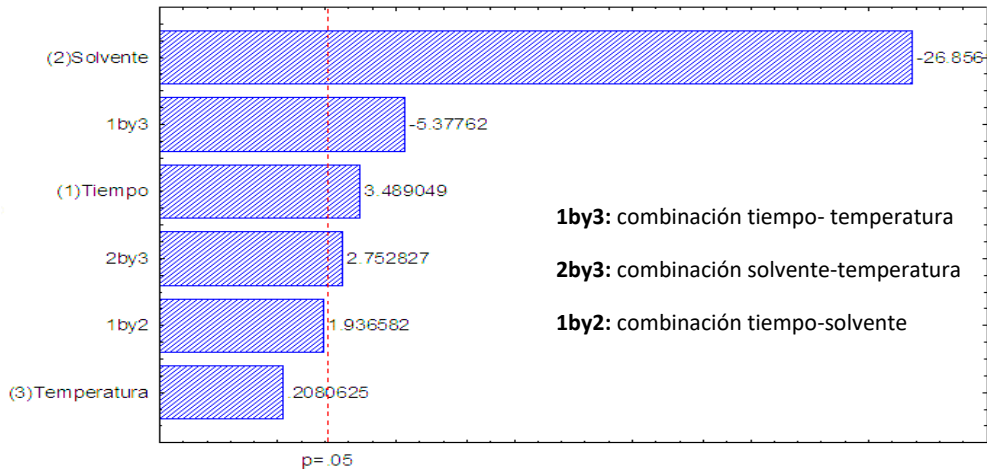
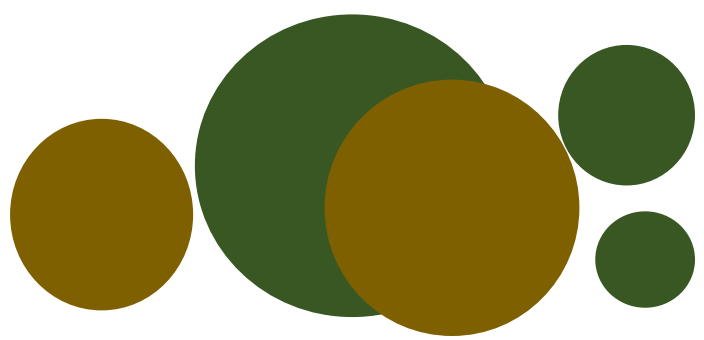


Figura 4. Diagrama de Pareto que describe el efecto estimado estandarizado de la extracción convencional

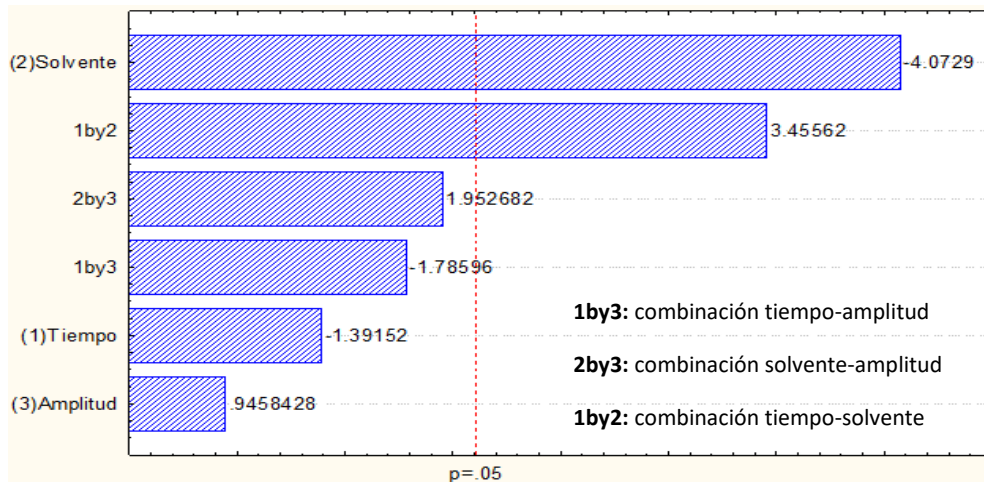
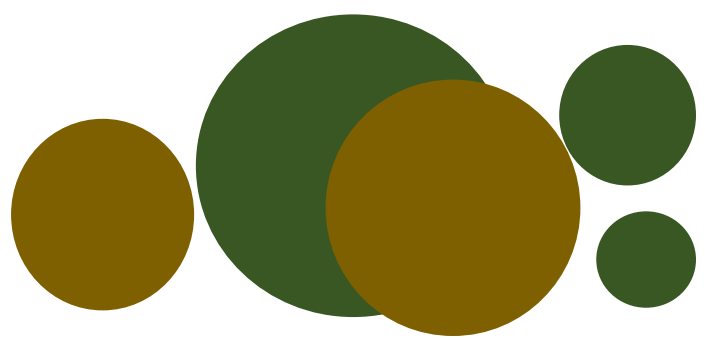


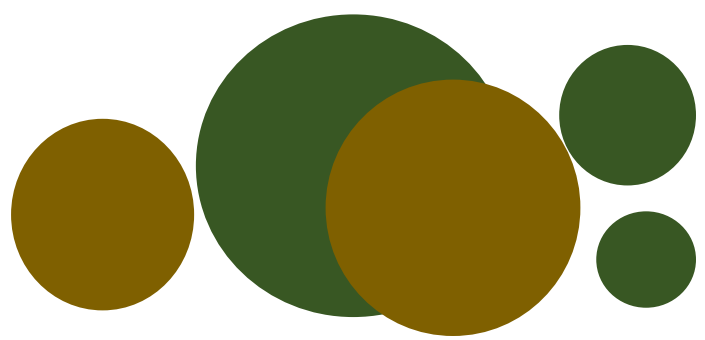
Figura 5. Diagrama de Pareto que describe el efecto estimado estandarizado de la extracción asistida por ultrasonido



### 3.2. Optimización de Factores significativos de extracción de CF

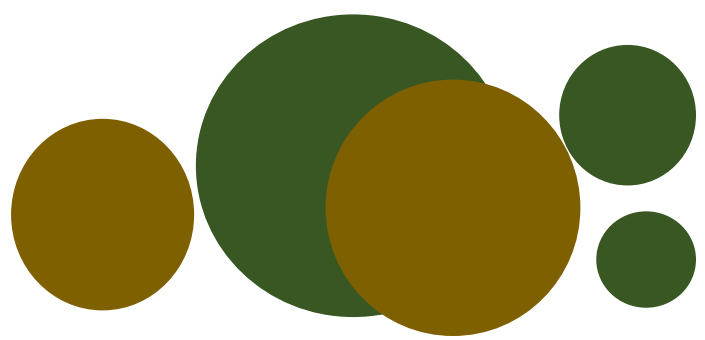
Con el propósito de maximizar la respuesta y encontrar los valores óptimos de los factores con efecto en la extracción de CF por el método convencional y la EAU estos fueron colocados a niveles laterales quedando como valor central el nivel del efecto que nos indicaba el Pareto para ello se realizó una matriz de Diseño de compuestos centrales como se explica con anterioridad en la metodología el rendimiento de CF que se obtuvieron experimentalmente fueron los siguientes que se muestran en la tabla 12 y 13.

El rendimiento máximo de CF en la extracción convencional se logró en los tratamientos 1, 9 y 10, de 23.88, 33.32 y 25.45 mgEAG/gms, respectivamente; mientras que la producción mínima de CF se alcanzó en el tratamiento 3 (19.99 mgGAE/gms). Para la extracción de CF en la EAU el rendimiento máximo se alcanzó en los tratamientos 1, 8 y 9, con valores de 100.85, 100.97 y 101.78 mgEAG/gms, respectivamente; mientras que la producción mínima de CF se logró en el tratamiento 5 con 96.11 mgGAE/gms.



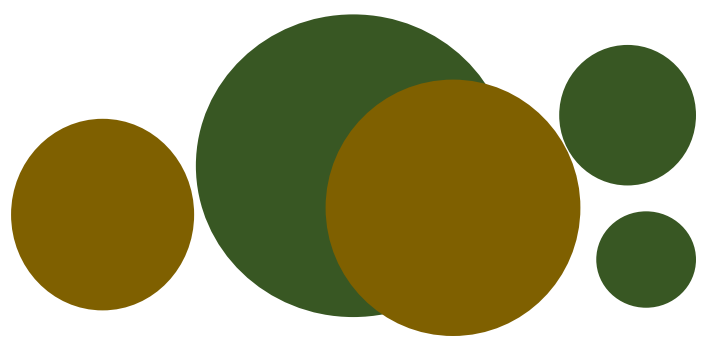
**Tabla 12. DCC para la extracción convencional de CF**

Tratamiento	Solvente	Tiempo	Fenoles mgEAG/gms
1	20	60	23.88±0.136
2	20	70	20.44±0.188
3	30	60	19.99±0.125
4	30	70	20.51±0.108
5	18	65	20.20±0.159
6	32	65	20.31±0.068
7	25	58	21.49±0.114
8	25	72	20.27±0.398
9	25	65	33.32±0.114
10	25	65	25.45±0.074



**Tabla 13. DCC para la extracción asistida por ultrasonido de CF**

Tratamiento	solvente	tiempo	Fenoles mgEAG/gms
1	20	1	100.85±0.051
2	20	3	99.19±0.017
3	30	1	96.26±0.011
4	30	3	99.11±0.034
5	18	2	96.11±0.045
6	32	2	99.33±0.011
7	25	0.59	99.61±0.006
8	25	3.4	100.97±0.034
9	25	2	101.78±0.045
10	25	2	100.47±0.040



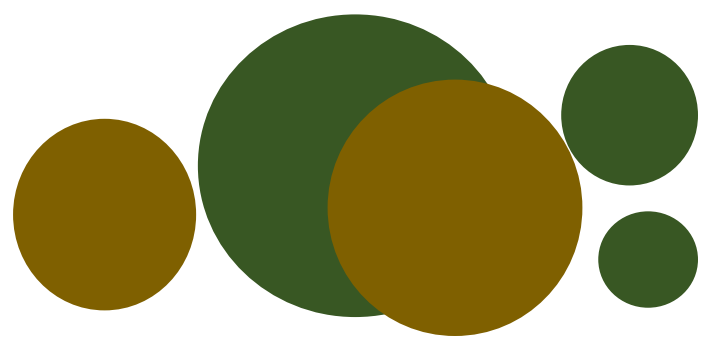
Los coeficientes de regresión de los términos de intercepción, lineal, cuadrático y de interacción del modelo se calcularon utilizando la técnica de mínimos cuadrados y se muestran en las tablas 14 y 15.

**Tabla 14. Coeficiente de regresión, error estándar, y los resultados de la prueba t de Student-de superficie de respuesta para la extracción convencional de CF (mgEAG/gms)**

Parámetro	Estimación	Error estándar	t	Prob t
Intercepto	29.38352	0.842978	34.85682	0.000000
(1) Solvente (Lineal)	-0.91839	0.842978	-1.08946	0.286772
Solvente (Cuadrático)	-8.81108	1.115155	-7.90122	0.000000
(2) Tiempo (Lineal)	-1.16000	0.842978	-1.37608	0.181504
Tiempo (Cuadrático)	-8.18608	1.115155	-7.34076	0.000000
1L by 2L	1.97727	1.192151	1.65858	0.110215

**Tabla 15. Coeficiente de regresión, error estándar, y los resultados de la prueba t de Student-de superficie de respuesta para la EAU de CF (mgEAG/gms)**

Parámetro	Estimación	Error estándar	t	Prob t
Intercepto	101.1278	0.442072	228.7590	0.000000
(1) Solvente (Lineal)	-0.2729	0.442072	-0.6172	0.542904
Solvente (Cuadrático)	-3.1229	0.584806	-5.3400	0.000018
(2) Tiempo (Lineal)	0.4972	0.442072	1.1246	0.271866
Tiempo (Cuadrático)	-1.3018	0.584806	-2.2261	0.035653
1L by 2L	2.2557	0.625184	3.6080	0.001409



Se construyó un modelo de superficie de respuesta para cada una de los métodos de extracción como se muestran en la figura 7 y 8 de acuerdo con el modelo polinomial (Ec. 1 y 2). En la figura 6 se muestra el efecto del tiempo y solvente en la extracción convencional donde se observó que el mayor rendimiento de CF se encontraba a 65 minutos con un solvente de extracción de etanol de 25 % para la EAU el rendimiento óptimo se daba sobre el efecto del solvente a 30 % etanol y a un tiempo máximo de 3 minutos como se muestra en la figura 7.

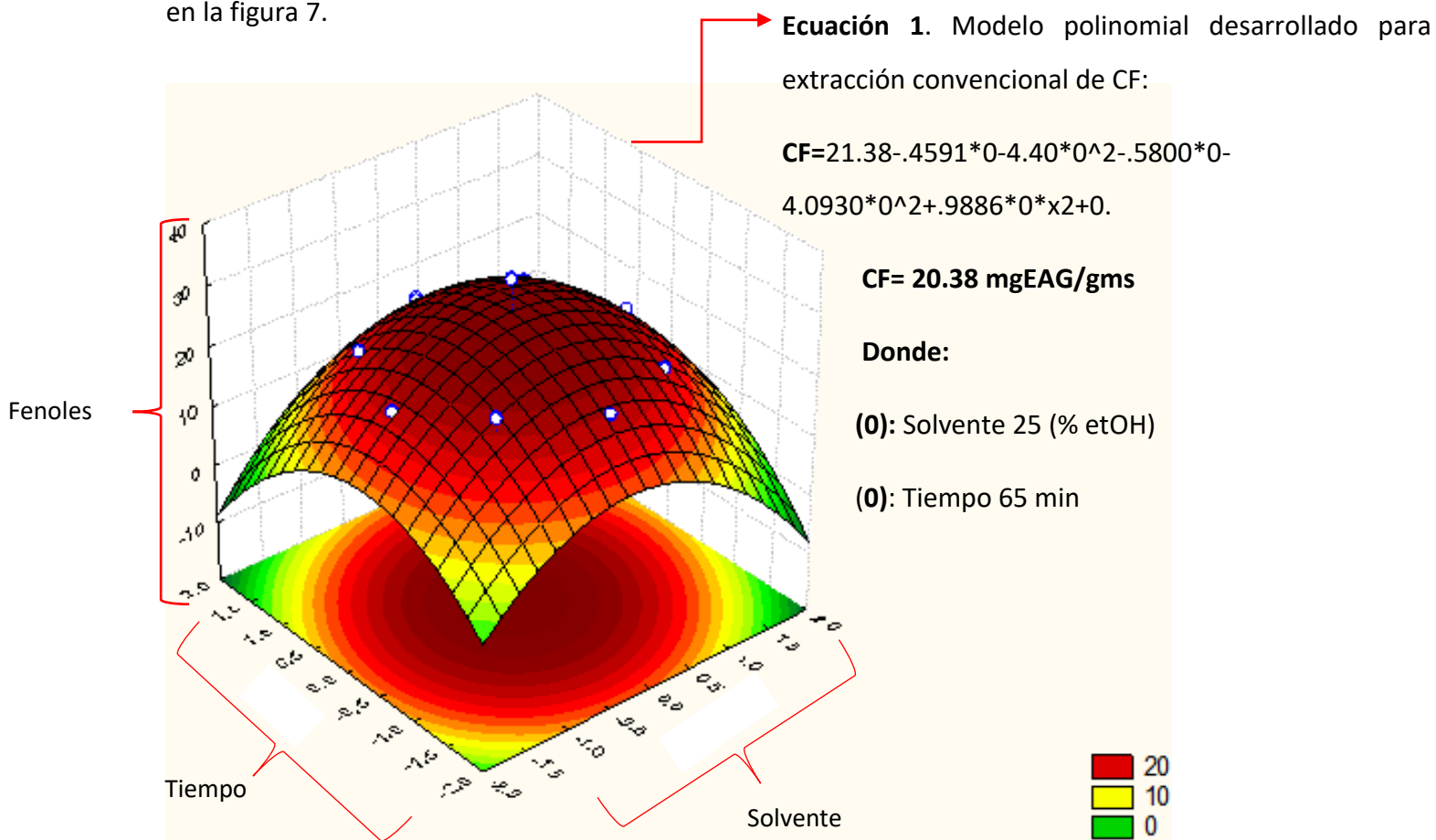
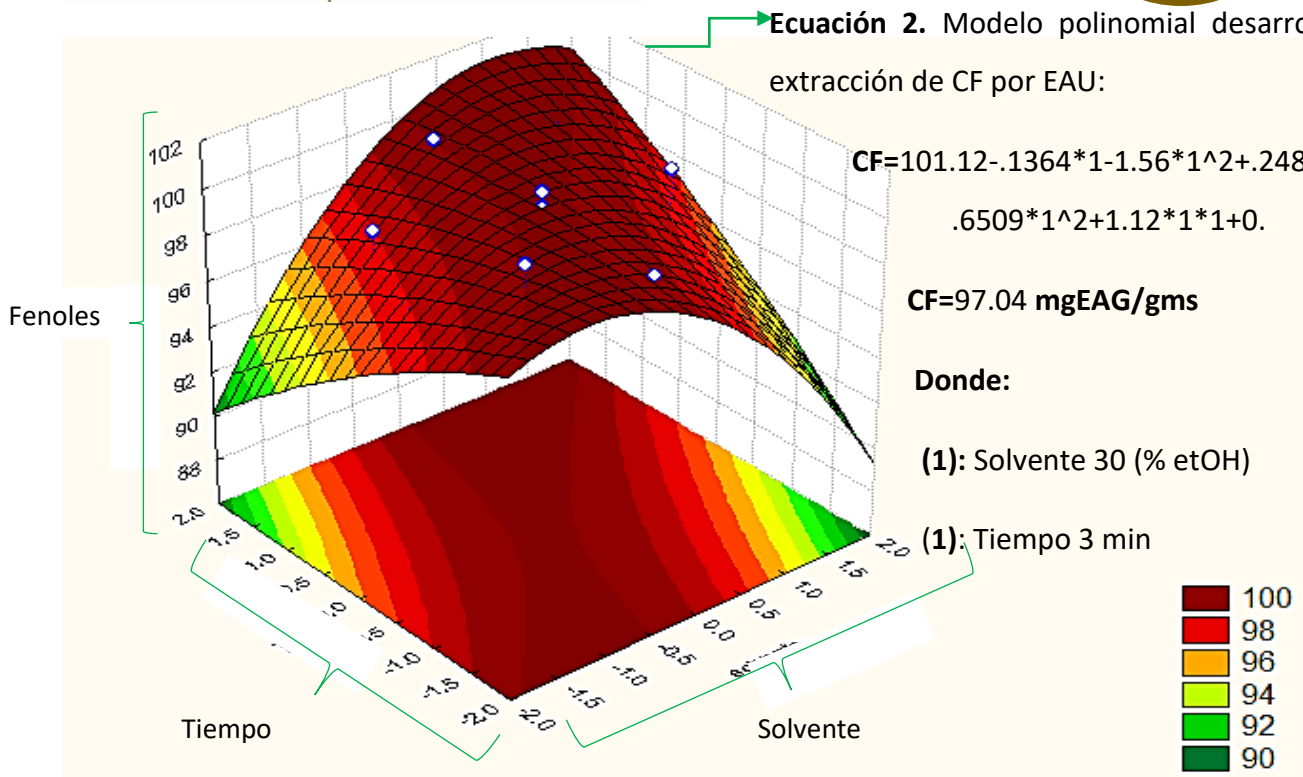
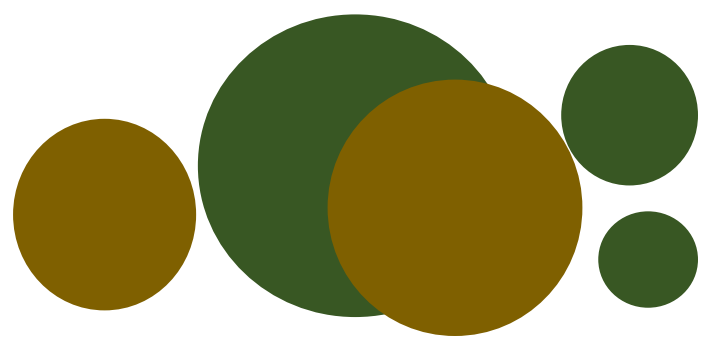


Figura 6. Modelo de superficie de respuesta que muestra el efecto de solvente y tiempo en la extracción convencional de CF

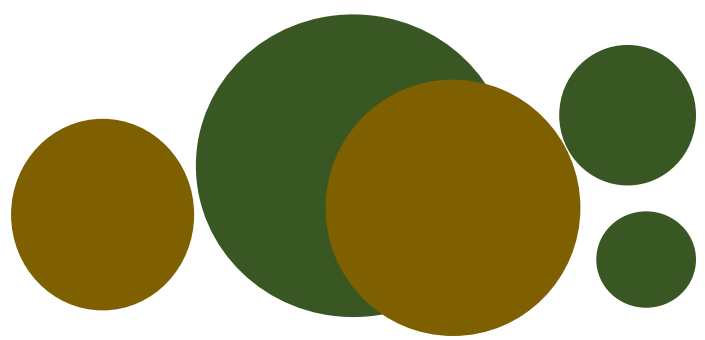




**Figura 7. Modelo polinomial desarrollado para extracción de CF por EAU**

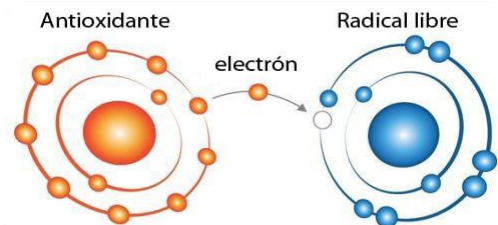
En condiciones óptimas en el modelo predijo un rendimiento máximo de CF para la extracción convencional = **20.38 mgEAG/gms** y para la EAU el rendimiento máximo de CF fue = **97.04 mgEAG/gms**.

Con la finalidad de validar el modelo, se realizó una extracción bajo las condiciones optimizadas del modelo. Los valores experimentales obtenidos fueron de  $34.32 \pm 0.14$  mgEAG/gms para la extracción convencional y  $99.78 \pm 0.33$  para la extracción asistida por ultrasonido, respectivamente. Se pudo observar que los valores experimentales fueron muy similares a los predichos por los modelos. Lo anterior indica que el modelo explica adecuadamente las condiciones extracción de CF por el método convencional y EAU, ambos métodos proponen el uso de etanol con un porcentaje menos del 50% como solvente de extracción, valorando ser métodos altamente sustentables. Algunas de las ventajas que se



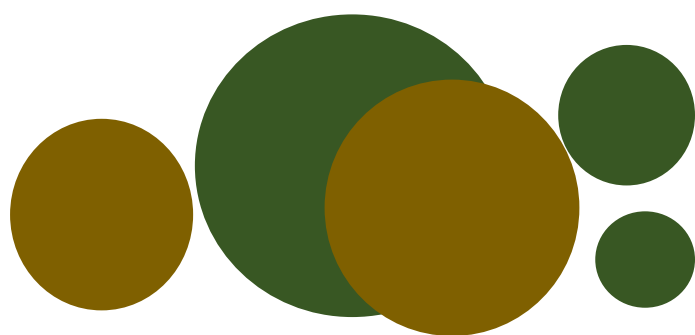
obtienen al utilizar el ultrasonido son: un mezclado más eficaz debido que existe una micro-mezcla, la energía es más rápida en la transferencia de masa , se reducen los gradientes térmicos y de concentración, hay reducción en la temperatura, la extracción es selectiva, la reducción de equipos es significativa, se tiene una respuesta más rápida al control del proceso de la extracción de compuestos en general, es más 64 rápida la puesta en marcha, se aumenta la producción, hay eliminación de etapas de proceso, y se aumenta la eficiencia y eficacia en los procesos alimentarios; buena parte de estas ventajas del ultrasonido se deben al aprovechamiento de una de sus principales propiedades conocida con el nombre de cavitación, de allí la mejora sustancial en la transferencia de masa (Chemat *et al.*, 2011) por esta razón se puede discutir que el efecto del ultrasonido favoreció en la extracción de compuestos fenólicos así teniendo un mayor rendimiento de ellos.

### 3.4 Actividad antioxidante



Los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocidas por su capacidad para neutralizar los efectos negativos de los radicales libres y el estrés oxidativo (Pinchuk *et al.*, 2012). Entre los compuestos que presentan dicha actividad se encuentran los compuestos fenólicos Contreras *et al.*, 2010, Para demostrar que los fenoles obtenidos en los métodos de extracción convencional y asistido por ultrasonido se realizaron los ensayos descritos en la metodología donde los resultados obtenidos se muestran a continuación para

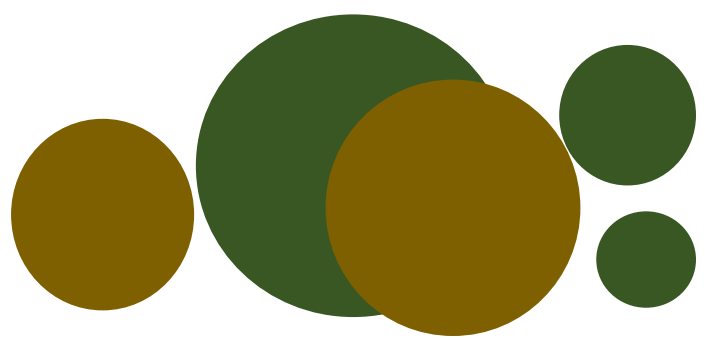
La actividad antioxidante por el método de DPPH dicha actividad es dependiente de la concentración del extracto, teniendo en cuenta que el solvente aplicado, fue de 50 ml en una relación masa volumen de 1:20, los fenoles extraídos de la cascara de guayaba



presentaron inhibición del radicales libres por encima del 90% como se muestra en la tablas 16 y 17.

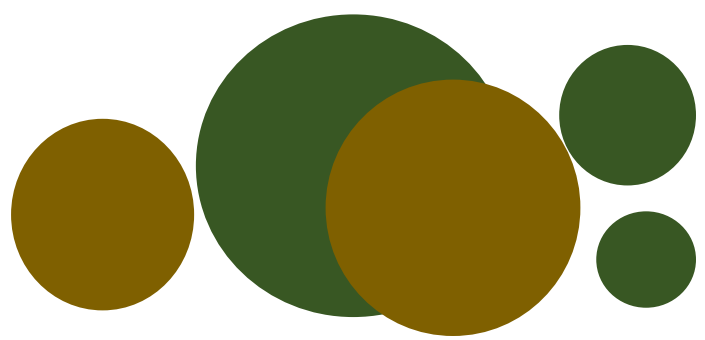
**Tabla 16. Actividad antioxidante por el método de DPPH de los tratamientos optimizados de la extracción convencional**

Tratamiento	Solvente	Tiempo	% inhibición
1	20	60	96.27
2	20	70	95.81
3	30	60	90.41
4	30	70	90.63
5	18	65	96.73
6	32	65	91.14
7	25	58	93.60
8	25	72	93.46
9	25	65	90.44
10	25	65	90.77

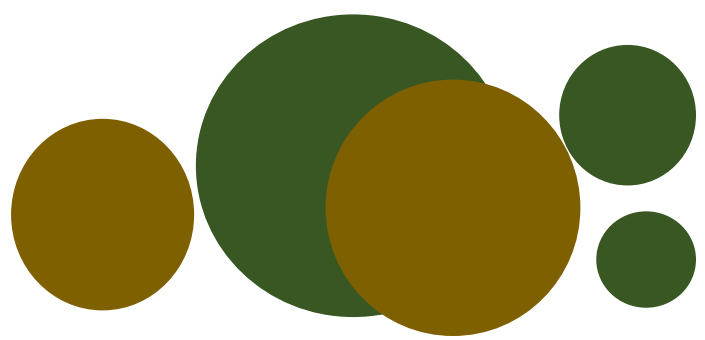


**Tabla 17. Actividad antioxidante por el método de DPPH de los tratamientos optimizados de la extracción asistida por ultrasonido**

Tratamiento	solvente	tiempo	% inhibición
1	20	1	
			96.79
2	20	3	
			97.10
3	30	1	
			90.47
4	30	3	
			90.66
5	18	2	
			96.39
6	32	2	
			96.05
7	25	0.59	
			93.28
8	25	3.4	
			94.34
9	25	2	
			95.97
10	25	2	
			93.29

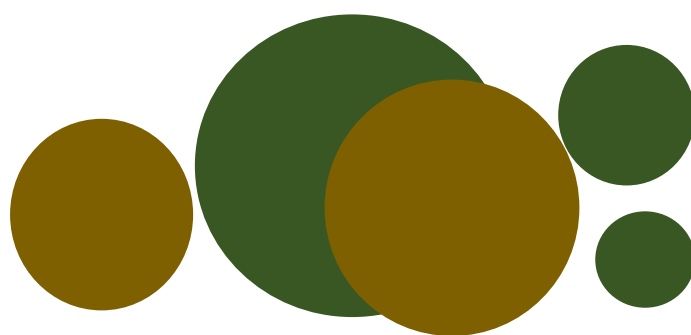


El radical ABTS•+ es uno de los más aplicados, para la determinación de actividad antioxidante puesto que se considera un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable (ARNAO, 2000) a pesar de esto los valores actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. La absorbancia medida por el método ABTS se determinada a los 1 y 7 minutos; los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical ABTS•+ no se completa hasta pasado 1 minuto, y según contreras en el 2010 el tiempo de 4 minutos es el más apropiado. No obstante, Lako en el 2010 sugieren tiempos de medida de 6 minutos para los patrones de referencia y de 7 minutos para los compuestos puros, extractos de plantas o de alimentos. El tiempo requerido para determinar la actividad antioxidante en este trabajo de investigación fue de 5 minutos obteniendo resultados de inhibición del radical libre por el radical ABTS+ en un porcentaje mayor del 90% como se muestra en la tabla 18 y 19.



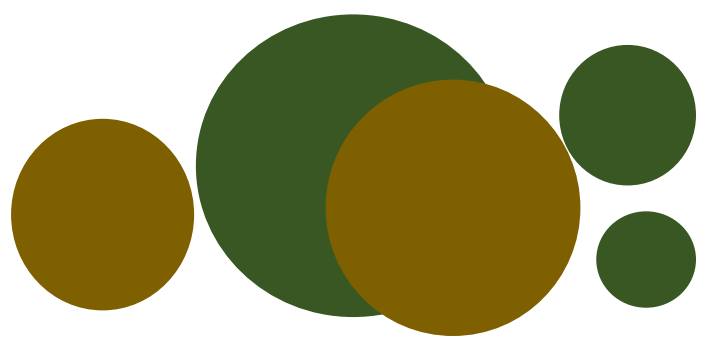
**Tabla 18. Actividad antioxidante por el método de ABTS+ de los tratamientos optimizados de la extracción convencional**

Tratamiento	Solvente	Tiempo	% inhibición
1	20	60	96.27
2	20	70	95.81
3	30	60	90.41
4	30	70	90.63
5	18	65	96.73
6	32	65	91.14
7	25	58	93.60
8	25	72	93.46
9	25	65	90.44
10	25	65	90.77



**Tabla 19. Actividad antioxidante por el método de ABTS+ de los tratamientos optimizados de la extracción asistida por ultrasonido**

Tratamiento	solvente	tiempo	% inhibición
1	20	1	96.79
2	20	3	97.10
3	30	1	90.47
4	30	3	90.66
5	18	2	96.39
6	32	2	96.05
7	25	0.59	93.28
8	25	3.4	94.34
9	25	2	95.97
10	25	2	93.29



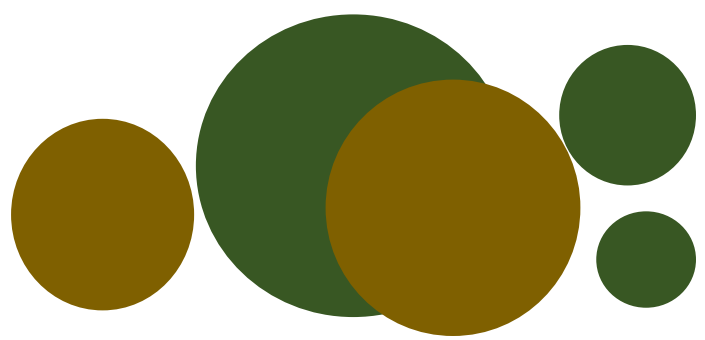
# 4

## Conclusiones

48

La alternativa del uso de residuos de guayaba para la recuperación de residuos de interés comercial como los compuestos fenólicos resulta ser efectiva, para ambas extracciones el rendimiento de CF obtenido entra en el rango a lo reportado por otros métodos de extracción. En comparación con la extracción convencional, el uso de EAU permite aumentar el rendimiento 76.62 % veces más que la EC con una reducción en el tiempo de extracción de 94.33 %. En México la producción de guayaba es de 101.300 toneladas anualmente (SIAP, 2018). La industrialización de la guayaba genera residuos que consisten en la piel, semilla y pulpa que corresponde al 25 % del peso total del fruto. Lo que anualmente se generarían 25.325 toneladas de residuos, que son desechados a tiraderos libres, generando focos de contaminación ambiental. Si el uso de restos de residuos se aprovecha para la extracción de compuestos fenólicos, el impacto ambiental por la contaminación de estos residuos disminuiría y así mismo se favorecería dando como resultado un producto de uso comercial para la industria farmacéutica y de alimentos. Estos compuestos fenólicos también reportaron una actividad antioxidante alta. Por lo que después de la extracción puede ser utilizado como alimento para ganado sin causar daños secundarios, de esta manera desapareciendo los residuos sobrantes.





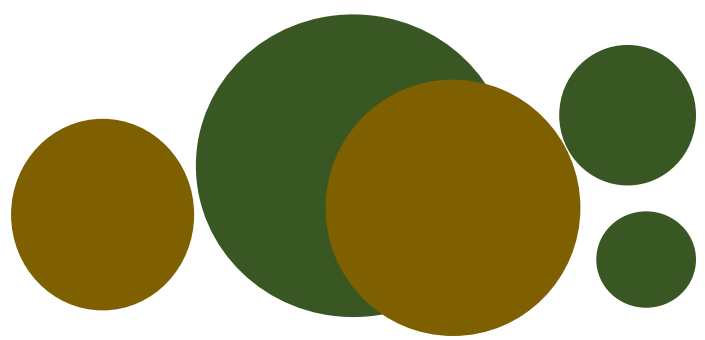
# 5

## Extracción asistida por ultrasonido de pectinas de residuos agroindustriales de guayaba (*Psidium guajava* L.)

Debido a la pandemia mundial que se presentó en este año el estudio de la extracción de pectinas en residuos agroindustriales de guayaba fue un trabajo sin concluir pero con resultados alentadores.

### Introducción

Las pectinas son carbohidratos complejos, son unos de los principales componentes de la pared celular en los tejidos vegetales principalmente de frutas y verduras (Xuewu et al., 2008). Tienen un amplio uso en la industria alimenticia, se ha utilizado como espesante, texturizante, emulsionante y estabilizante también, como agente gelificante en mermeladas y jaleas (Liu et al., 2016). Otras aplicaciones incluyen productos farmacéuticos y biomédicos, por el atractivo de la pectina como un biopolímero no tóxico, biocompatible y biodegradable (Sriamornsak et al., 2008), también se ha empleado, como material de recubrimiento y portador de fármacos (Perera et al., 2010) dadas sus propiedades bioadhesivas, que permiten la liberación y entrega óptima del fármaco en los tejidos (Sriamornsak et al., 2011). se consideran un polisacárido complejo insoluble en alcohol y disolventes orgánicos, constituido por ácido Dgalacturónico unido por enlaces  $\alpha$ -1,4 el cual



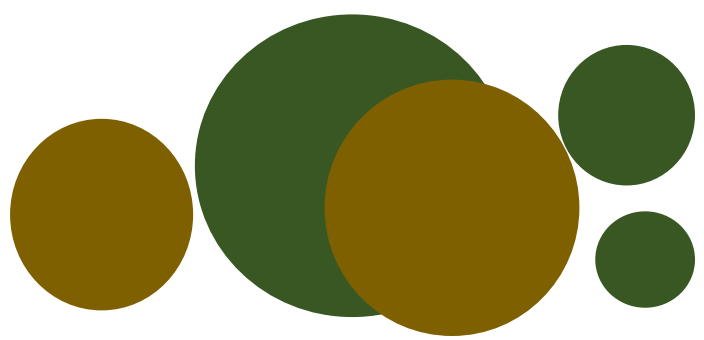
se encuentra parcialmente esterificado por grupos metilo por otra parte las pectinas son consideradas como ingredientes funcionales debido a la capacidad que tienen de disminuir y prevenir enfermedades crónicas degenerativas (cardiovasculares, metabólicas y digestivas) (Wang et al., 2014). En los últimos años han surgido metodologías que permiten hacer más eficientes los procesos de extracción de pectinas, tomando en cuenta las propiedades físicas o químicas de las distintas moléculas en estudio. Como es la extracción con fluidos supercríticos (EFS), la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU), que, respecto a los métodos convencionales donde se usan solventes orgánicos, estas tecnologías presentan ventajas como tiempos cortos de extracción, uso de poco solvente, alta velocidad y cinética de extracción (Balcinde et al., 2003).

## Materiales y métodos

En tubos de centrifuga de 50 mL, se agregó la muestra de residuos de guayaba previamente molida y tamizada en una relación masa: volumen de 1: 20 agregando un volumen final de 50 mL de etanol al 70 %, la mezcla se sometió a sonicación (UP400S Hielscher) con un ciclo continuo a una amplitud de onda 40 cm<sup>-1</sup> durante 10 minutos, pasando el tiempo de extracción, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min. Se recuperó el sobrenadante en frascos de 50 mL a 4°C hasta su análisis en Espectrofotometría IR.

## Resultados y perspectivas

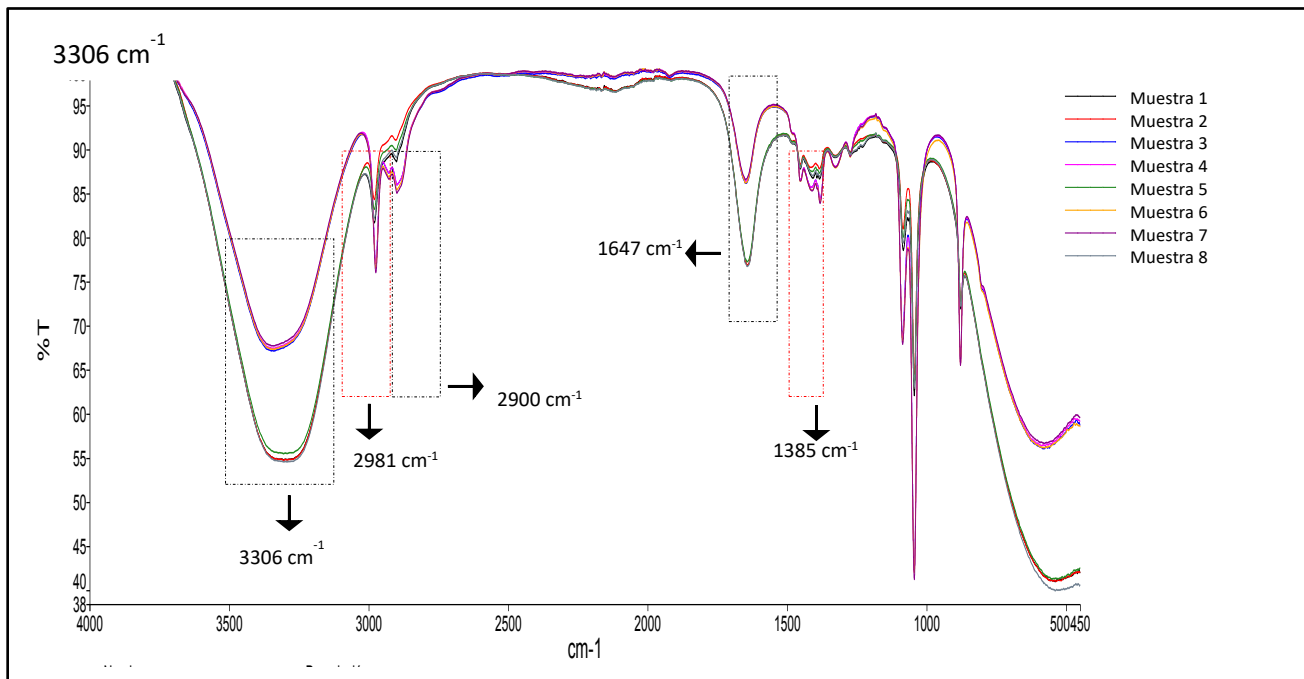
Una de las características físicas que presentan las pectinas es la gelificación (Liu *et al.*, 2016), después de 10 minutos de la centrifugación de las muestras extraídas de pectina mediante el uso del ultrasonido se presentó esta característica como se muestra en la figura 1.



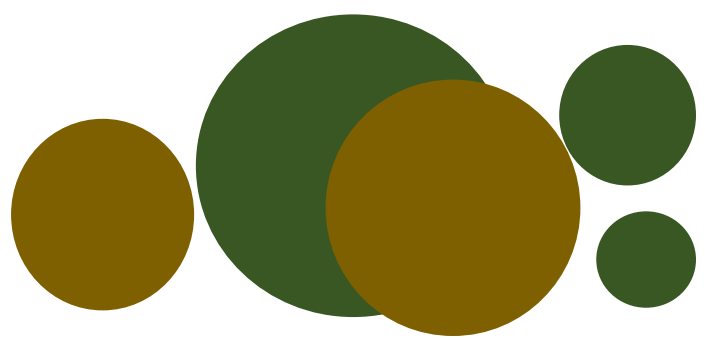
**Figura 8.** Presencia de pectinas en muestras de la extracción asistida por ultrasonido en residuos de guayaba

### Espectrofotometría IR de pectinas obtenidas a partir de residuos de guayaba

Delgado en el 2015 reporta que el uso de ultrasonido conjunto a la alta transferencia de temperatura entre moléculas dada por la interacción entre ellas ocasiona la ruptura de

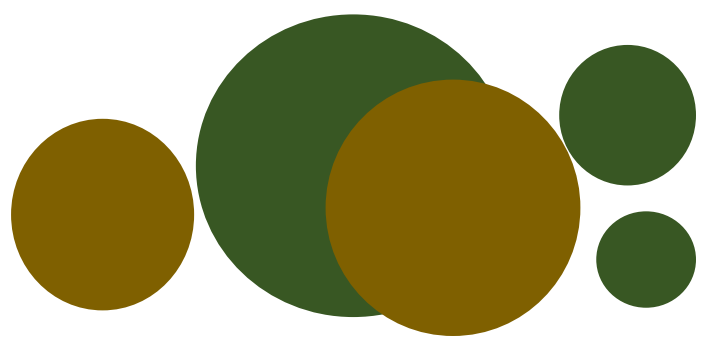


**Figura 9.** Espectro IR de pectinas en muestras de la extracción asistida por ultrasonido en residuos de guayaba



Las vibraciones de estiramiento y flexión se ven, por lo general en pectinas, como una banda superpuesta a la banda OH que varía de 2500 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  (Gnanasambandam, 2000) en el espectro IR de pectinas en muestras de la extracción asistida por ultrasonido en residuos de guayaba puede observar esta señal en 2981  $\text{cm}^{-1}$ . La señal dada en 3306  $\text{cm}^{-1}$  es correspondiente al grupo funcional OH. La señal de 1647  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a grupos carbonilo de ácidos carboxílicos con dobles enlaces conjugados. Meza y colaboradores en el 2017 reporta una que la señal dada en 2900  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo funcional  $\text{CH}_3$ . La banda 1385  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo funcional Ester.

Franco y colaboradores en el 2010 comentaron que el espectro de la pectina comercial presenta una banda entre 1630 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  perteneciente al grupo carbonilo. dicha señal fue presentada en el espectro IR de la extracción de pectinas asistida por ultrasonido, se concluye que la tecnología de ultrasonido es eficaz para la extracción de compuestos de interés comercial, la reducción de tiempo y el uso de solventes amigables con el medio ambiente hace que el proceso sea considerado sustentable.



# 5

# Anexos

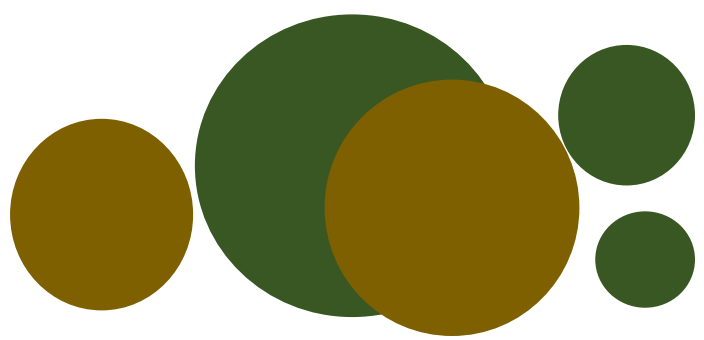
## Diseño de experimentos

Los diseños de experimentos son modelos estadísticos cuyo objetivo es averiguar si determinados factores influyen en una variable de interés y si existe cierta influencia de algún factor, cuantificarla (Jiménez, 2015).

El objetivo del diseño de experimentos es estudiar si cuando se utiliza un determinado tratamiento se produce una mejora en el proceso o no. Para ello se debe experimentar aplicando el tratamiento y no aplicándolo (Pouzeta *et al.*, 2007). Si la variabilidad experimental es grande, sólo se detectará la influencia del uso del tratamiento cuando éste produzca grandes cambios en relación con el error de observación.

La metodología del diseño de experimentos estudia cómo variar las condiciones habituales de realización de un proceso empírico para aumentar la probabilidad de detectar cambios significativos en la respuesta; de esta forma se obtiene un mayor conocimiento del comportamiento del proceso de interés. Para que la metodología de diseño de experimentos sea confiable es fundamental que el experimento esté bien diseñado. Un diseño de experimentos se realiza para (Freund *et al.* 2010):

- Determinar las principales causas de variación en la respuesta.
- Encontrar las condiciones experimentales con las que se consigue un valor extremo en la variable de interés o respuesta.



- Comparar las respuestas en diferentes niveles de observación de variables controladas.
- Obtener un modelo estadístico-matemático que permita hacer predicciones de respuestas futuras.

Los diseños de experimentos están clasificados por categorías como se muestra en la Figura 8.

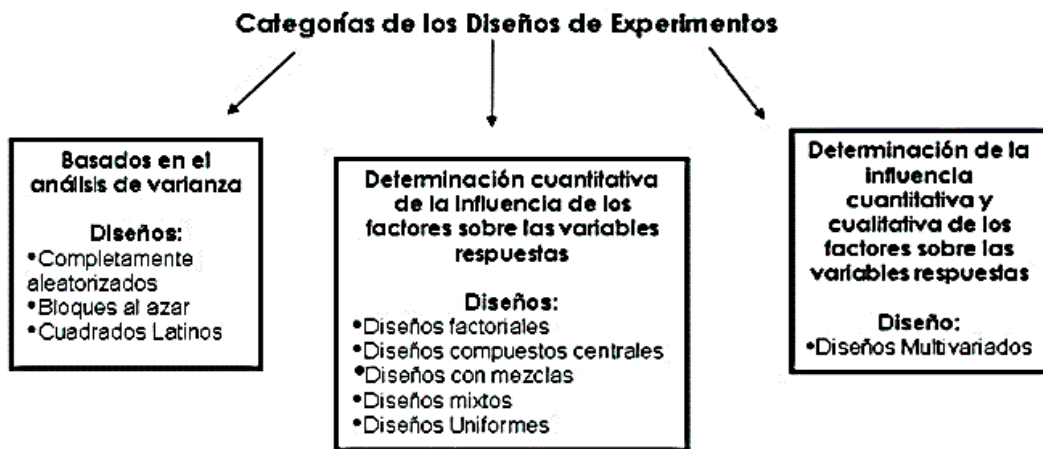
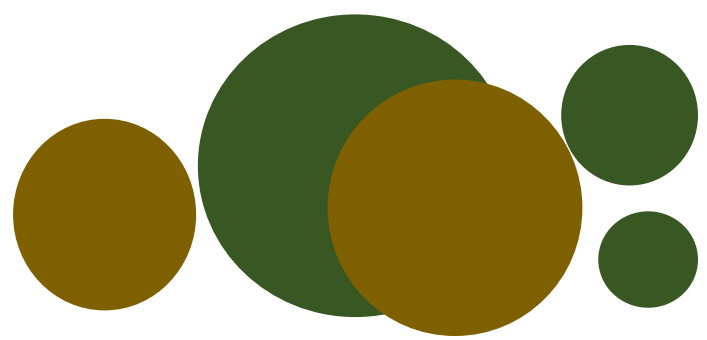


Figura 10. Categoría de los diseños de experimento para su estudio



# 6

# Referencias

Aceves Diez, A. y Castañeda Sandoval, L. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19 (3)

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(4): 261-265.

Anderson, O.M y Francis, G.W. (2004). Techniques of pigment identification. *Annual plant reviews*, 33(4): 293-341.

Balcide, Y., Hung, B., Marreo, A., Tirado, S., Pérez, C., Falero, A. (2003). Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36(1): 5-7.

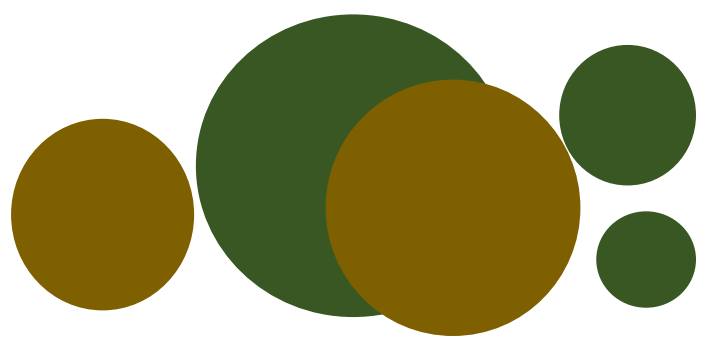
Barbehenn, R.V y Constabel, C.P. (2011). Tannin in plant-herbivore interactions. *Photochemistry*, 72(13):155-156.

Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*: 28 (1), 25-30 (1995).

Dykes, L., Ronney, L.W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits: *Cereal. Foods World*, 52(3):105-111.

Espert, M.M., Castello, G.M., Periche, S.A. (2008). Aplicación de ultrasonidos o energía de Microondas a la extracción de compuestos antioxidantes en infusiones de hoja de estevia. *Food Chemistry*, 56(8): 4-11.

F.J. Barba, N. Grimi, E. Vorobiev Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves *Journal of Food Engineering*, 149 (2015), pp. 222-228



Fernández, E.U., Fernández-C, M., Olivera, R.T., Bermúdez, R.B. (2009). Diseños de experimentos en tecnologías y control de medicamentos. *Latín American Journal*. 27(2): 3-7.

Fraga, C.G. (2010). Plant phenolics and human health *Biochemistry, Nutrition human health pharmacology*. Ed. Wiley. New Jersey. 6(1): 593.

Freund, J. F. (2010). Pruebas relacionadas con las medias de k en Estadística Elemental Moderna. Edición Revolucionaria, La Habana, 330-6.

García J. (2009). Evaluación de los diferentes estados de madurez y análisis del contenido de fibra dietaria en tres distintas variedades de guayaba. Tesis de maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A y Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Phenolic compound extraction system for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12): 813-826.

George, M., Rowlands, D., Price, M., & Maxey, J. (2005). *The Lean Six Sigma Pocket*. United States of America: Mc Graw Hill.

Häkkinen, S. (2000). Flavonols and phenolics acid in berries and berry product. *Food Research International*, 32(5): 345-353.

Jawad, A., Langsh, T.A. (2011). Optimization of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy. *Journal of food Engineering*, 109(1): 162-174.

Jiménez A, Rincón M, Pulido R, Calixto F. (2001) Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. *J Agric Food Chem.*; 49:5489-93.

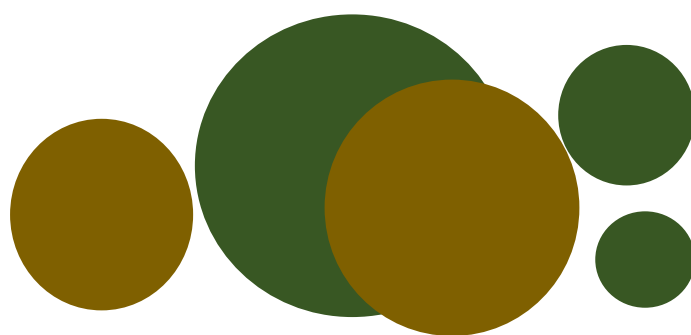
Jimenez, M.G. (2015). Superficie de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. *Revista Varianza*, 17(1): 31-33.

Jimenez-Escrig, A.; Rincon, M.; Pulido, R.; Saura-Calixto, F.; *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5489.

Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo, C., Kwon, J.H., Byun, M.W. (2006). Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology*, 97(4): 614-620.

Kao, Y.Y., Harding, S.A. y Tsai, C.J. (2002). Differential expression of two distinct phenulalanine ammonio-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiology*, 130(2): 192-197.





Kelebek, H., S. Selli, A. Canbas y T. Cabaroglu, HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kosan, *Microchemical Journal*: 91 (2), 187-92 (2009).

Liu, Y., J. Shi, T.A.G. Langrish. 2006. Waterbased extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*. 120: 203-209.

Manach, C., Scalbert, A., Morana, C., Ramesy, C., Jimenez, L., (2005). Polyphenols food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 23(4):727-747.

Marinova, D., F. Ribarova y M. Atanassova, Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*: 40 (3), 255-260 (2005).

Martínez-Valverde, I., Periago, M.J y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta, *Archivos latinoamericanos de nutrición*. Págs. 5-18.

Mora-Rochin, S. (2011). Perfiles y niveles de fitoquímicos en maíces (*Zea mays*) pigmentados, efectos del procesamiento sobre su capacidad antioxidante y propiedades nutraceuticas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3):159.

Oboh, G., Puntel, R.L., Rocha, J.B. (2007). Hot peper (*Capsicum annum*, tepin and *Capsicum chinese habanero*) prevents Fe<sup>2+</sup> Induced lipid peroxidation in brain: invitro, *Food Chemistry*,102(1):178-185.

Olaya, J. (2009) Estudio del contenido de fenoles y su actividad antioxidante en 3 variedades de guayaba (*Psidium Guajava L*) colombiana en diferentes estados de madurez. Tesis de maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

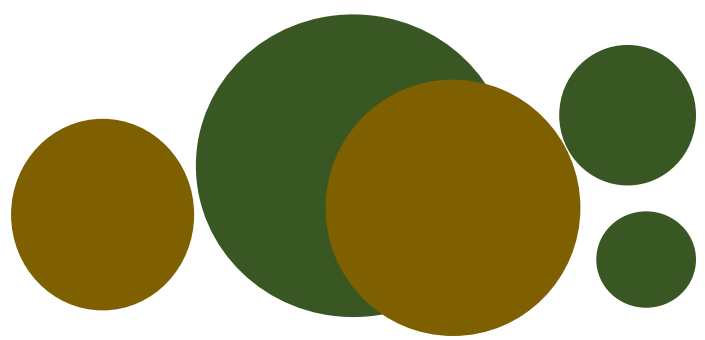
Pouzela et al. (2007). Identifying dispersion effects in robust design experiments-issues and improvements. *Journal of Applied Statistics*, 34(6): 603-701.

Rayne, D.E. (2004). Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry*, 45(5): 399-404.

Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods on overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 51(10): 286-288.

SIAP (2018) Producción anual de guayaba en México. Vol. 2018 Fecha de acceso: Julio 2018.

Sriamornsak P. 1998. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *International Journal of Pharmaceutics*. 169: 213-220.



Sriamornsak, P., N. Thirawong, J. Nunthanid, S. Puttipitkhachorn, J. Thongborisute, y H. Akeuchi. 2008a. Atomic force microscopy imaging of novel self-assembling pectinliposome nanocomplexes. *Carbohydrate Polymers*. 71: 324-329.

Sriamornsak, P., N. Wattanakorn, J. Nunthanid. S. Puttipitkhachorn 2008b. Mucoadhesion of pectin as evidence by wettability and chain interpenetration. *Carbohydrate Polymers*. 74: 458-467.

St-Onge, M.P. (2005). Dietary fats, teas, dairy and nuts: potential functional foods for weight control. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 7-15.

Sun, Yi., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q. (2011). Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Kudingcha made From Ilex Kudingcha CJ Tseng by using Response Surface Methodology. *Separation and Purification Technology*, 78(3): 311-320.

Tanco, Martin., Elisabeth, Viles., Lourdes, Pazueta. (2009). Diferentes Enfoques del diseño de experimentos. *Memorias de trabajo de difusión científica y técnica*, 7:611-622.

Theuwissen E, Mensink R.( 2008) Water soluble dietary fiber and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior* ; 94:285-292.

Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benitez J A & Hernandez-Santiago C (2010) Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 2147-2153.