

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**Optimización de los parámetros de extracción discontinua
sólido-líquido de los antioxidantes de las hojas de Anona
(*Annona x atemoya* Mabb.)**

TESIS PRESENTADO POR:

Bachiller: LOBOS QUISPE, Roxana Lizzeth

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ASESOR: Ing. Flores Arizaca, Jesús Manuel

CO-ASESOR: M.Sc. Chañi Paucar, Larry Oscar

PUERTO MALDONADO – PERÚ

– 2018 –

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**Optimización de los parámetros de extracción discontinua
sólido-líquido de los antioxidantes de las hojas de Anona
(*Annona x atemoya* Mabb.)**

TESIS PRESENTADO POR:

Bachiller: LOBOS QUISPE, Roxana Lizzeth

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ASESOR: Ing. Flores Arizaca, Jesús Manuel

CO-ASESOR: M.Sc. Chañi Paucar, Larry Oscar

PUERTO MALDONADO – PERÚ

– 2018 –

Esta tesis ha sido sustentada y aceptada en forma presente por el Jurado calificador de grado, nominado por la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, como requisito para optar el título de Ingeniero Agroindustrial.

.....

Dra. María Isabel Cajo Pinche
PRESIDENTE

.....

M.Sc. Raúl Huamán Cruz
SECRETARIO

.....

M.Sc. Elías Gutiérrez Paredes
VOCAL

ASESORES:

.....

Ing. Jesús Manuel Flores Arizaca
ASESOR
ASESOR - UNAMAD

.....

M.Sc. Larry Oscar Chañi Paucar
CO-ASESOR - UNAMAD

PUERTO MALDONADO - PERÚ

- 2018 -

DEDICATORIA

A Dios por darme fortaleza, sabiduría y salud por estar en los momentos difíciles para llegar a la meta en este trabajo de investigación.

A mis padres Victoria y Manuel por todo el apoyo incondicional brindado y mostrado en todo momento, ayudándome a lograr mis metas, contribuyendo en mi formación profesional y personal.

A todos aquellos, que fueron participes de esta investigación los llevo en mi mente y corazón.

Roxana Lizzeth Lobos Quispe

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMAD por formarme como profesional competitiva con ética y valor.

Al Ing. Jesús Manuel Flores Arizaca e Ing. Larry Oscar Chañiu Paucar por su dirección, colaboración, asesoramiento y aporte valioso brindado en la elaboración de este trabajo de investigación.

A la M.Sc. Química Liset Rodríguez Achata por las facilidades del laboratorio Ambiental para realizar los análisis de la tesis.

A los miembros del jurado, conformado por la Dra. María Isabel Cajo Pinche, M.Sc. Raúl Huáman Cruz, y al M.Sc. Elías Gutiérrez Paredes por todas las valiosas sugerencias y acotación lo que contribuyeron el enriquecimiento del presente trabajo investigación.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera en la realización de este tema de tesis.

Roxana Lizzeth Lobos Quispe

PRESENTACIÓN

El trabajo de investigación fue desarrollado como parte de la formación académica y de investigación como requisito para obtener el título profesional de Ingeniero Agrindustrial, así como el aporte a la industria farmacéutica. El trabajo abordó en la extracción discontinua sólido – líquido de los antioxidantes de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), donde se acondicionaron a diferentes parámetros de extracción, posteriormente los extractos de las hojas de los diferentes tratamientos fueron analizados la actividad antioxidante por el método de espectrofotometría UV-vis.

El trabajo de investigación consta de cuatro capítulos, estructurados de la siguiente manera:

Capítulo I: Problema de Investigación, se consignan la descripción de los problemas, los objetivos, operacionalización de las variables, las hipótesis, justificación. En el Capítulo II: Marco teórico, donde se consignan todos los antecedentes de la investigación y la revisión bibliográfica de los conceptos relevantes utilizados en el estudio. Capítulo III: Tipo de estudio, diseño de estudio, población y muestra, métodos y técnicas, donde se consignan las generalidades de la investigación, materiales y equipos utilizados, asimismo, se describe la metodología utilizada para llevar a cabo la investigación. Capítulo IV: Resultados y discusiones, donde se consignan los resultados obtenidos, mediante tablas y figuras, reforzadas por una discusión e interpretación de dichos resultados.

La presente investigación tiene como objetivo establecer las condiciones operativas óptimas de la extracción discontinua sólido-líquido de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) que permita maximizar el contenido de antioxidantes en el extracto etanólico y minimizar la desnaturalización de los mismos.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue establecer las condiciones operativas óptimas de la extracción discontinua sólido-líquido de las hojas de *Annona x atemoya* Mabb. que permita maximizar el contenido de antioxidantes en el extracto etanólico y minimizar la desnaturalización de los mismos.

La extracción sólido-líquido, se llevó a cabo en un reactor discontinuo. El extracto obtenido, se centrifugó en una centrífuga refrigerada, y se concentró en un rotavapor, luego fue analizado por espectrofotometría UV-Vis. Todos los datos experimentales se analizaron en el software Design-Expert® Versión 11, utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM). La actividad antioxidante medida por el ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de las hojas de Anona en función del tamaño partícula (13, 25, 40 N° malla), la temperatura de extracción (30, 46.5, 48, 60 ° C), relación masa muestra: masa solvente (1:15, 1:19.5, 1:20.5, 1:25 g:g) y concentración de etanol (70, 81.31, 81.7, 96 %v/v). de los compuestos antioxidantes de las hojas de Anona.

Los resultados de las condiciones óptimas de extracción de los fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante fueron los siguientes: tamaño partícula a 13 (N°malla), temperatura de extracción a 58,24 °C, relación masa muestra: masa solvente de 1:15 g:g, y concentración etanol 96% v/v. Como resultado, 1978,93 µgEAG/mL fenoles totales, 31998,78 µgEC /mL, flavonoides totales y actividad antioxidante 121,43 % inhibición. Se concluye que los parámetros de extracción influyeron sobre las concentraciones de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante.

Palabras clave: *Annona x atemoya* Mabb.; actividad antioxidante; Fenoles totales, Flavonoides totales.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to establish the optimal operating conditions of solid-liquid discontinuous extraction of the leaves of *Annona x atemoya* Mabb. that allows to maximize the content of antioxidants in the ethanolic extract and minimize the denaturation thereof.

The solid-liquid extraction was carried out in a batch reactor. The extract obtained was centrifuged in a refrigerated centrifuge and concentrated in a rotary evaporator, then analyzed by UV-Vis spectrophotometry. All the experimental data were analyzed in the Design-Expert® Version 11 software, using the response surface methodology (RSM). The antioxidant activity measured by the assay of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) of the leaves of *Anona* depending on particle size (13, 25, 40 mesh N°.), extraction temperature (30, 46.5, 48, 60 ° C), sample mass ratio: solvent mass (1:15, 1:19.5, 1:20.5, 1:25 g: g) and ethanol concentration (70, 81.31, 81.7, 96% v / v). of the antioxidant compounds of the *Anona* leaves.

The results of the optimal extraction conditions of total phenols, total flavonoids and antioxidant activity were as follows: particle size at 13 (mesh No.), extraction temperature at 58,24 ° C, sample mass ratio: solvent mass of 1 : 15 g: g, and ethanol concentration 96% v / v. As a result, 1978,93 µg EA / mL total phenols, 31998,78 µg CE / mL, total flavonoids and antioxidant activity 121,43% inhibition. It is concluded that the extraction parameters influenced the concentrations of total phenols, total flavonoids and antioxidant activity.

Key words: *Annona x atemoya* Mabb.; antioxidant activity; Total phenols, total flavonoids.

INTRODUCCIÓN

La Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) también popularmente conocida como atemoya es un pequeño árbol perteneciente a la familia Annonaceae, género *Annona*. Es una planta de fruto comestible y se destaca por su aromática, subácida y jugosa pulpa (Moura, R. et al. 2015). Es un árbol nativo de América Tropical, se le encuentra en todo el continente americano y se cree que su origen es la cuenca del Río Amazonas (González-esquinca et al. 2011). Las hojas han sido utilizadas como medicina tradicional debido a sus acciones farmacológicas, tales como analgésicos, antiinflamatorios, antiparasitaria, anticancerígeno, entre otros (Saha, R. 2011). Los antioxidantes, especialmente los compuestos fenólicos que se encuentran en las plantas medicinales, han recibido una atención creciente debido a su posible papel en la prevención de enfermedades humanas (Cai, Y. et al. 2004). Sin embargo, no se han investigado los métodos para optimizar las capacidades de extracción de los fenólicos (FT) y los flavonoides (Ft) de las hojas de *Annona x atemoya* Mabb. Por lo tanto, para hacer un mejor uso de una buena fuente de antioxidantes, es necesario maximizar la extracción de antioxidantes de las hojas de *Annona x atemoya* Mabb. Teniendo en cuenta la composición de las fuentes naturales de los compuestos fenólicos, así como su estructura y propiedades físico-químicas, no se puede concebir un protocolo de extracción universal y se debe diseñar y optimizar un procedimiento de extracción específico para cada fuente fenólica (Contini, M. et al. 2008).

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como tamaño partícula, temperatura de extracción, relación masa muestra: masa solvente y concentración etanol influyen en la estabilidad de los antioxidantes, así como también en la concentración de los fenoles totales y flavonoides totales extraídas (Bridgers, E. et al. 2010). Así, se debe maximizar la concentración de los fenoles totales y flavonoides totales, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. El conocimiento de los factores involucrados en su estabilidad y de

los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción y uso de los antioxidantes como alimentos funcionales.

En la presente investigación, el etanol se adoptó como medio de extracción debido a sus efectos ecológicos y su no toxicidad para la salud humana. La concentración del etanol y la temperatura de extracción es uno de los principales factores que afectan la extracción de polifenoles de las hojas de Anona, los autores han estudiado el efecto de la concentración de etanol en la extracción de fenoles de 10 al 90%; el 60% de etanol fue el disolvente más eficiente para los fenoles y 60 °C de temperatura de extracción (Taralkar, S. et al. 2016). Entre los diversos factores que contribuyen a la eficiencia del proceso de extracción con solventes y la extracción de compuestos antioxidantes a partir de las hojas. Los parámetros de extracción como el tamaño partícula (Nºmalla), temperatura de extracción (°C), relación masa muestra: masa solvente (g:g) y concentración etanol (%) se investigan a menudo (Yang, L. et al. 2009). Mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta través del diseño D-optimal serán estudiadas los factores que muestran efectos significativos ($p < 0,05$) en la capacidad de extraer compuestos fenólicos de las hojas de *Annona x atemoya* Mabb, que permite la evaluación de los efectos combinados de todos los factores y determina una amplia región en la que los resultados son válidos (Pérez-Jiménez et al. 2008).

El objetivo de la tesis, fue: establecer las condiciones operativas óptimas de la extracción discontinua sólido-líquido de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) que permita maximizar el contenido de antioxidantes en el extracto etanólico y minimizar la desnaturalización de los mismos.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
PRESENTACIÓN	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	vi
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
7.1 <i>Descripción del problema</i>	1
7.2 <i>Formulación del problema</i>	3
7.3 <i>Objetivos</i>	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
7.4 <i>Variables</i>	3
7.4.1 Variables independientes	3
7.4.2 Variables Dependientes	4
7.5 <i>Operacionalizacion de variables</i>	4
7.6 <i>Hipótesis</i>	4
7.7 <i>Justificación</i>	5
7.8 <i>Consideraciones éticas</i>	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
8.1 <i>Antecedentes de estudio</i>	7
8.2 <i>Marco Teórico</i>	10
8.2.1 Anona (<i>Annona x atemoya Mabb.</i>)	10
8.2.1.1 Clasificación taxonómica	11
8.2.2 Descripción botánica	11

8.2.3	Composición nutricional de la Anona	13
8.2.4	Composición fitoquímica de las hojas de anona	14
8.2.5	Antioxidantes	14
8.2.5.1	Compuestos fenólicos	15
8.2.5.2	Flavonoides	15
8.2.6	Proceso de extracción sólido-líquido	18
8.2.6.1	Extracción Discontinua	19
8.2.6.2	Influencia de los Parámetros de Funcionamiento en la Cinética extracción	21
8.2.7	Optimización del proceso	38
8.3	<i>Definición de términos</i>	39
CAPITULO III: METODOLOGIA DE INVESTIGACIÓN		41
9.1	<i>Tipo de estudio</i>	41
9.2	<i>Diseño del estudio</i>	41
9.3	<i>Población y muestra</i>	42
9.3.1	Población	42
9.3.2	Muestra	42
9.4	<i>Método y técnicas</i>	42
9.4.1	Lugar de estudio:	42
9.4.2	Materiales para secado de las hojas:	42
9.4.3	Material de laboratorio	43
9.4.4	Insumos:	44
9.4.5	Equipos:	45
9.4.6	Instrumentos:	45
9.5	<i>Metodología</i>	46
9.5.1	Pre-tratamiento de las hojas de Anona (<i>Annona x atemoya Mabb.</i>)	47
9.6	<i>Tratamientos de los datos</i>	51
CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		53
10.1	<i>Identificación botánica del Especimen</i>	53
10.2.2	Cuantificación de flavonoides totales.	55
10.3	<i>Evaluación de los parámetros de operación</i>	57
10.3.1	Fenoles totales	57
10.3.2	Flavonoides totales	64

10.3.3	Actividad antioxidante	70
10.4	<i>Optimización de los parámetros de extracción</i>	75
10.4.1	Efectos de la concentración de etanol en los antioxidantes	81
10.4.2	Efectos de la temperatura de extracción en los antioxidantes	82
10.4.3	Efectos de la relación de sólidos a solventes en antioxidantes	82
10.4.4	Efectos del tamaño de partícula en antioxidantes	83
	CONCLUSIONES	84
	SUGERENCIAS	86
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables	4
Tabla 2. Valor alimenticio en 100 g de pulpa de Anona	13
Tabla 3. Composición Fitoquímico de las Hojas de Anona	14
Tabla 4. Clasificación de los Antioxidantes	15
Tabla 5. Propiedades físico-químicas de etanol	38
Tabla 6. Matriz de Variables y sus Niveles	41
Tabla 7. Matriz de Diseño para la investigación Diseño D-Optimal	52
Tabla 8. Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales	54
Tabla 9. Coeficiente de Determinación de la curva de calibración	54
Tabla 10. Coeficiente de Modelo Ajustado para la curva de	55
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) de la curva de calibración para	55
Tabla 12. Curva de calibración para cuantificación de flavonoide totales	56
Tabla 13. Coeficiente de Determinación de la curva de calibración	57
Tabla 14. Coeficiente de Modelo Ajustado para la curva de calibración	57
Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) de la curva de calibración para	57
Tabla 16. Matriz de diseño con resultados de fenoles totales.	58
Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de extracción de	59
Tabla 18. Ajuste del coeficiente de determinación del modelo	59
Tabla 19. Coeficientes en términos de factores codificados	63
Tabla 20. Componentes de varianza.	64
Tabla 21. Matriz de diseño con resultados de flavonoides totales	65
Tabla 22. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de extracción de	65
Tabla 23. Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado para los	66
Tabla 24. Coeficientes en términos de factores codificados	69
Tabla 25. Componentes de varianza	69
Tabla 26. Matriz de diseño con resultados de Actividad antioxidante	70
Tabla 27. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de extracción de	71
Tabla 28. Ajuste del coeficiente de determinación del modelo	71
Tabla 29. Coeficientes en términos de factores codificados	74
Tabla 30. Componentes de varianza	75
Tabla 31. Ajuste del modelo de optimización	78
Tabla 32. Coeficientes del modelo de ajuste de los antioxidante	79
Tabla 33. Comparación entre los resultados estimados y experimentalmente.	80

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Frutos y hojas de Anona	11
Figura 2. Flavonoides. Estructura básica y tipos.	16
Figura 3. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides	17
Figura 4. Curva Típica de Extracción Discontinua con Solvente	20
Figura 5. Sistema de extracción convencional	21
Figura 6. Diagrama de flujo de la Preparación de muestra de las hojas de Anona	46
Figura 7. Diagrama de proceso de extracción discontinua	49
Figura 8. Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico	54
Figura 9. Curva de absorbancia vs. Concentración de catequina	56
Figura 10. Linealidad de los valores experimentales con los predichos vs actual	60
Figura 11. Gráfico de contornos del contenido de fenoles totales en el extracto	61
Figura 12. Gráficos de superficie de respuesta del contenido de fenoles	62
Figura 13. Linealidad de los valores experimentales con los predichos	66
Figura 14. Gráfico de contornos del contenido de flavonoides totales	67
Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta del contenido de flavonoides	68
Figura 16. Linealidad de los valores experimentales con los predichos	72
Figura 17. Gráfico de contornos de la actividad antioxidante	73
Figura 18. Gráfico de superficie de respuesta de la actividad antioxidante	73
Figura 19. Gráfico de barras de desirability de la actividad antioxidante	76
Figura 20. Gráfico superficies de respuesta y contornos de la actividad	77

CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción del problema

Esta búsqueda de la salud y el estilo de vida saludable han incrementado el interés por los compuestos bioactivos naturales que podrían introducirse en nuestra dieta o ser utilizados en la industria farmacéutica (Silva, E. et al. 2007). En este contexto, los antioxidantes fenólicos son el grupo de moléculas más prometedor debido a su alta actividad antioxidante (Aguirre, J. et al. 2012). La actividad biológica de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) se relaciona con la presencia de polifenoles. En particular, se ha informado que los polifenoles de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) presentan propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobiana, entre otros (Rabêlo, S. et al. 2014). Por estas razones, se ha realizado un gran esfuerzo para extraer los polifenoles contenidos en las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) por el método de extracción sólido – líquido (Wongkittipong, R. et al. 2004). Teniendo en cuenta la diversidad en la composición de las fuentes naturales de antioxidantes, así como la estructura y las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, no es concebible un protocolo de extracción universal y deben optimizarse procesos específicos para cada fuente fenólica (Silva, E. et al. 2007). Muchos factores contribuyen a la eficacia de la extracción discontinua sólido - líquido, como el tipo de disolvente, el tamaño partícula, temperatura de extracción, relación masa muestra: masa solvente y concentración etanol (Pinelo, M et al. 2005). Los efectos de las condiciones paramétricas como el tamaño partícula, temperatura, Ratio Masa muestra: Masa solvente y concentración etanol sobre la actividad antioxidante promueven variaciones en su composición química.

El tamaño de las partículas es una variable importante a considerar. Estudios previos han demostrado que los mejores rendimientos de polifenoles se logran cuando se trabaja con partículas finas, muy probablemente debido al aumento en la superficie de intercambio y la disminución en la longitud del camino necesaria para la superficie, lo que aumenta el tiempo de extracción (Spigno, G. et al. 2007).

El efecto de la temperatura en la actividad antioxidante en el nivel de extracción de fenoles totales es en el rango de 15 °C a 95 °C; donde claramente parece que el rendimiento de polifenoles se incrementa con el aumento de la temperatura. Sin embargo, los valores de temperatura más altos de 50 °C pueden dar lugar a la desnaturalización de las membranas vegetales (Sahin, S. et al. 2015). Se debe mantener la temperatura de extracción por debajo de un cierto límite, teniendo en cuenta el alto contenido en fenólicos en hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), fijamos una temperatura máxima (valor axial) de 65,2 °C (Sahin, S. et al. 2015).

La relación masa muestra: masa solvente de 1:35 (m/v) constituyen las mejores condiciones para la extracción de polifenoles por contacto sólido-líquido, empleando para dicha operación la menor temperatura estudiada (Valdés-Hernández, et al., 2015).

El efecto de la concentración del solvente (etanol) en la actividad antioxidante tienen un efecto significativo en la extracción de fenoles, ya que se obtienen diferentes rendimientos, cantidad de fenoles y capacidad antioxidante en los extractos obtenidos (Soto-García y Rosales-Castro 2016).

Por tanto, el conocimiento de los mecanismos por los cuales se realizan las condiciones de extracción, junto con el modelamiento matemático ayuda a establecer las condiciones óptimas operativas, para maximizar la extracción de los antioxidantes y minimizar la desnaturalización de los antioxidantes y mejorando la calidad de los productos.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son las condiciones operativas óptimas de la extracción discontinua sólido-líquido de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) que permita maximizar el contenido de antioxidantes en el extracto etanólico y minimizar la desnaturalización de los mismos?

1.3. Objetivos

Objetivo general

- Establecer las condiciones operativas óptimas de la extracción discontinua sólido-líquido de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) que permita maximizar el contenido de antioxidantes en el extracto etanólico y minimizar la desnaturalización de los mismos.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la variación de los parámetros de operación de la extracción discontinua sólido-líquido de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante de los extractos obtenidos.
- Evaluar las condiciones operativas del proceso discontinuo de extracción sólido-líquido a las cuales se tendrá una máxima separación de componentes antioxidantes contenidas en las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.)
- Optimizar el modelo matemático que describa el proceso de extracción de componentes antioxidantes de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), maximizando la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.

1.4. Variables

1.4.1. Variables independientes

Condiciones de extracción

- ↪ Z1: Tamaño de partícula
- ↪ Z2: Temperatura de extracción
- ↪ Z3: Relación Mm:Ms
- ↪ Z4: Concentración etanol

1.4.2. Variables Dependientes

Componentes Antioxidantes

- ↪ Y1: Fenoles totales
- ↪ Y2: Flavonoides totales
- ↪ Y3: Actividad Antioxidante

1.5. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de las variables

VARIABLES	INDICADORES	INDICES
VARIABLES INDEPENDIENTES		
Condiciones de operación	Z1: Tamaño de partícula (N° malla)	13, 25, 40
	Z2: Temperatura de extracción (°C)	30, 46.5, 48, 60
	Z3: Relación Mm:Ms (g:g)	1:15, 1:19.5, 1:20.5, 1:25
	Z4: Concentración etanol (% v/v)	70, 81.31, 81.7, 96
VARIABLES DEPENDIENTES		
Y1: componentes Antioxidantes	Y1.1: Flavonoides totales (µg EqAG/mL)	
	Y1.2: Fenoles totales (µgEqC/mL)	
	Y1.3: Actividad Antioxidante (% inhibición)	

Fuente: Elaboración Propia (2017)

1.6. Hipótesis

H₀: A temperaturas de extracción inferiores a 60°C, tamaño de partícula menor a 40 (N°malla), relación masa muestra:masa solvente menor a 1:25 (g:g) y concentración etanolica 96 (%v/v) en la extracción del extracto de hojas de Anona (*Annona x atemoya*)

Mabb.) no se desnaturalizan significativamente los flavonoides totales, fenoles totales y mantiene una actividad antioxidante inicial.

H1: A temperaturas de extracción superiores a 60°C, tamaño de partícula menor a 40 (N° malla), relación masa muestra:masa solvente menor a 1:25 (g:g) y concentración etanólica 96 (%v/v) en la extracción del extracto de hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), se desnaturalizan significativamente los flavonoides totales, fenoles totales y no mantiene una actividad antioxidante inicial.

1.7. Justificación

El interés creciente de la industria alimentaria, farmacológica y química fina por el uso de productos naturales en los últimos años, fue incrementándose sostenidamente, sobre todo, por el contenido de biomoléculas (metabolitos secundarios), responsables de actividades biológicas beneficiosas para la salud humana (García, Y. et al. 2016). Las frutas tropicales del oriente peruano, han sido objeto de poco o ningún estudio respecto a la determinación química y/o bioquímica de sus componentes bioactivos, y su uso como producto nutracéutico o funcional fue aún más crítico (Nava, E. et al. 2015). La Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), híbrido interespecífico de la Anona (*Annona squamosa* L.) y *Annona cherimoya* Mill., tiene una inusitada importancia, dado que los extractos etanólicos de las hojas presentan actividad antioxidante y antimicrobiano, y un alto contenido de fenoles totales y flavonoides totales (Rabêlo, S. et al. 2013), no habiendo reportes de la caracterización química de los extractos de hojas de *A. x atemoya* Mabb.

La Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) es un recurso natural con un gran potencial e importancia en la Amazonía peruana. Sus frutos son consumidos por habitantes de esta parte del mundo, así como también sus hojas son usadas para fines medicinales (Orwa, C. et al. 2009). Por otro lado, esta planta por poseer propiedades

nutritivas y funcionales, con alto poder antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides con actividad biológica, despierta un interés inusitado en el sector agroindustrial, convirtiéndose en un reto para los investigadores el estudio de los procesos de extracción y optimización de los componentes antioxidantes de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), motivo de esta investigación.

Por consiguiente, el establecimiento de las condiciones óptimas permitirá implementar procesos industriales fiables para el procesamiento de las hojas, de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) dando un alto valor agregado a este producto, coadyuvando al desarrollo de la agroindustria.

Por todo lo anterior, el presente trabajo trata de fomentar el consumo y aprovechamiento de la Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) y busca establecer las condiciones óptimas del proceso discontinuo de extracción sólido – líquido que maximice la cantidad de componentes antioxidantes separadas de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.)

De las referencias bibliográficas consultadas, podemos indicar que, para el caso de las hojas de Anona no existe un estudio detallado en el cual se haya establecido las condiciones óptimas del proceso discontinuo de extracción sólido – líquido que maximice la cantidad de componentes antioxidantes separadas de las hojas de Anona en función a las variaciones de los parámetros de extracción tales como tamaño de partícula, temperatura, concentración etanólica, Relación Masa muestra:Masa solvente.

1.8. Consideraciones éticas

El presente trabajo de investigación aborda el tema de los aspectos éticos involucrados en las investigaciones científicas donde el proceso de obtención de los extractos fue realizado en óptimas condiciones cumpliendo con las normas de higiene (BPM).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de estudio

Selin S., y Zeynep I. (2014). Realizaron el trabajo intitulado “Estudio sobre condiciones óptimas de extracción para hoja de olivo extractos ricos en polifenol y flavonoides”, En este estudio, la metodología fue la siguiente: La extracción fue asistida por ultrasonido (EAU) de polifenoles y flavonoides de hojas de olivo fue investigado los efectos de la temperatura (27-37 °C), concentración de solvente (10-70% v/v de etanol) y el tiempo (30-60 min) se determinaron por la metodología (RSM) tanto por superficie experimental como de respuesta técnicas. Actividad de eliminación de radicales libres para la capacidad antioxidante fue probado por el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados fueron: Para el contenido fenólico total (TPC), 43,8252 mg-GAE / g de hoja seca se predijo en las condiciones óptimas (34.18 °C, 43.61% v/v de etanol y 59,99 min). En conclusión, para el caso de contenido total de flavonoides (TFC), 31.9920 mg-CE / g hoja seca se calculó en las condiciones óptimas (34,44 °C, 70% v/v de etanol y 60 min).

Taralkar, S. et al., (2016). Realizaron una investigación sobre: “Optimización paramétrica y modelado de lotes de proceso de extracción para la extracción de ácido betulínico de Hojas de *Vitex negundo* Linn.” La metodología de este estudio fue la siguiente: La extracción de ácido betulínico de las hojas de *Vitex negundo* Linn se llevó a cabo en una serie de disolventes (metanol, etanol, alcohol isopropílico y agua). El metanol dio el rendimiento máximo de extracción y, por lo tanto, se utilizó para investigar la influencia del tamaño de partícula, la velocidad de agitación, carga sólida, y temperatura, etc., sobre la velocidad y la recuperación en un reactor discontinuo agitado. La difusividad intrapartícula del ácido

en cada disolvente a diferentes temperaturas se estimó usando un modelo de difusión masiva de estado inestable. Los resultados de la difusividad del ácido betulínico a través de la celulosa la matriz de hojas están en el rango de 1.7×10^{13} a $9.23 \times 10^{-11} \text{ m}^2 / \text{s}$ y está fuertemente influenciada por temperatura de extracción. En conclusión, la metodología de superficie de respuesta se usó para estimar las condiciones óptimas para la extracción de ácido betulínico.

Nunes, R. y Granato, C. (2014). Realizaron el trabajo intitulado “Optimización de fenólicos y condiciones de extracción de flavonoides y Actividad Antioxidante de las Hojas de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) utilizando la metodología de superficie de respuesta”, su objetivo fue: Maximizar la extracción de fenoles totales y flavonoides, así como la actividad antioxidante medida por el ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en función del tiempo (5, 7.5 y 10 min) y la temperatura de extracción (60, 75 y 90 °C). Los datos fueron sometidos a Metodología de superficie de respuesta y los resultados mostraron que el polinomio las ecuaciones fueron significativas, no presentaron falta de ajuste y presentaron coeficientes de determinación ajustados superior al 98%, lo que demuestra su idoneidad para fines de predicción. Usando la función de deseabilidad, el óptimo se encontró que las condiciones de operación para obtener una mayor extracción de antioxidantes son de 10 minutos de extracción a 90 °C, y el té preparado en estas condiciones experimentales presentó 427,74 mg de ácido gálico equivalentes por litro y 80,02% de inhibición del radical DPPH. El contenido de flavonoides era altamente correlacionado ($r = 0,9046$, $p < 0,001$) con la capacidad antioxidante.

Lee, A. y Nikraz, H. (2015). Realizaron el trabajo intitulado “Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de

medicamentos hierbas utilizando la metodología de superficie de respuesta”, El presente estudio tiene como objetivo investigar la influencia de dos variables independientes, a saber, la temperatura (°C) y tiempo (horas) en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante de ajo, orégano y perejil. Las condiciones optimizadas para la extracción de componentes bioactivos de las plantas medicinales se determinaron usando el diseño compuesto central (CCD) de dos factores combinado con la respuesta metodología de superficie (RSM). El orden de los experimentos se aleatorizó por completo utilizando composite central diseño con cinco puntos centrales. Todos los datos experimentales se analizaron con el software "Design Expert" (Prueba de Design-Expert 7.0.0, State-Ease Inc., Minneapolis MN, EE. UU.). Un modelo polinomial de segundo orden propuesto para predecir las respuestas. Factores principales que afectan el rendimiento de los componentes bioactivos de los extractos de ajo, orégano y perejil se determinaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los resultados se analizaron usando un nivel significativo de 95%. La actividad antioxidante disminuye a partir de: orégano> perejil> ajo. El análisis ANOVA indicó que todos los datos experimentales estaban en acuerdo con los datos previstos, por lo tanto, que indican la fiabilidad de los datos experimentales y la idoneidad de la propuesta modelo cuadrática. En conclusión, las condiciones óptimas propuestas por ANOVA fueron 47,1 °C, 6 horas para la extracción usando método de maceración.

Rabêlo, S. et al., (2013). Realizaron el trabajo intitulado “Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de Atemoya (*Annona cherimola mill.* x *A. squamosa* L.)”. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los contenidos de fenoles y flavonoides totales, así como evaluar las actividades antioxidante y antimicrobiana de extractos obtenidos de los tallos y hojas de Atemoya (*A. cherimola Mill.* X *A. squamosa* L.), que pertenece a la familia Annonaceae. La actividad

antioxidante fue evaluada por los métodos de secuestro de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), así como por el método de la cooxidación del producto, β -caroteno / ácido linoleico. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos fue analizada contra 10 cepas de bacterias. Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos mostraron que el extracto etanólico de los tallos (EEt) fue el antioxidante más efectivo ($IC_{50} = 10,44 \pm 1,25 \mu\text{g} / \text{mL}$) en el método del secuestro del DPPH, así como en el secuestro del radical ABTS ($24,81 \pm 0,49\%$). El extracto hexánico de las hojas presentó el mejor porcentaje de actividad antioxidante en el ensayo del β -caroteno / ácido linoleico ($41,12 \pm 4,35\%$). Los extractos etanólicos de los tallos y metanatos de las hojas se mostraron activos contra cepas de *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Anona (*Annona x atemoya* Mabb.)

La Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) es una planta híbrida entre *A. cherimoia* Mill. y *A. squamosa* L., pertenece a la familia *Annonaceae*, comprende cerca de 2500 especies y 135 géneros, la mayoría de las cuales son nativas de las regiones tropicales (Rabêlo, S. et al. 2013). Los frutos resultantes eran de una calidad superior a la de la anona y se les dio el nombre de "atemoya", una combinación de ate, antiguo nombre mexicano de la anona, y "moya" de chirimoya. muy cultivada en Brasil y en regiones de clima cálido, y la cherimoya (*Annona Cherimoia* Mill.), Fruto subtropical nativo de lugares de clima templado: regiones andinas de Chile, Perú, Bolivia, Ecuador (Moura, R. et al. 2015).

Clasificación taxonómica

Según la clasificación de Cronquist, (1981), la clasificación taxonómica de la Anona (*Annona x atemoya* Mabb.), es:

Nombre Científico: *Annona x atemoya* Mabb.

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *Annona x atemoya* Mabb.

Nombre común:

“Anón”, “Atemoya”, “chirimoya”, “anona”, “custard Apple”, “chirimorinon”, “achta”, “mamón”, o “saramuyo”.



Figura 1. Frutos y hojas de Anona

Fuente: Cronquist, (1981).

2.2.2. Descripción botánica

Es un árbol semicaducifolio de porte bajo o arbusto de 3 a 7 m de altura, con copa esparcida o abierta, formada por ramas que crecen en forma irregular. Los brotes jóvenes crecen en zigzag y

son grisáceo-cerosas con muchas lenticelas rugosas. Estos son densamente pubescentes y las partes más antiguas lisas. Todas sus partes son olorosas al triturarlas (Francisco, S. et al. 2001).

El árbol presenta un sistema radical bastante superficial y ramificado, pudiendo originar dos o tres pisos o planos de raíces a diferentes niveles, pero poco profundos (González-esquinca et al. 2011b).

Las hojas. - son sencillas, alternas, elípticas o elíptico-lanceoladas y con margen entero, de 5 a 11 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho, subagudas en el ápice, cuneiformes en la base; a veces ligeramente asimétricas; grisáceo-cerosas cuando jóvenes, negruzcas al secarse, verde oscuro en la cara superior y verde-azul-pálido en la inferior, lisas en los bordes. Por el haz son glaucas, mientras que por el envés son pubescentes (González-esquinca et al. 2011b)

Las flores. - son péndulas, axilares, hermafroditas y por lo general solitarias, aunque pueden crecer en grupos de dos a cuatro opuestos a las hojas; fragantes y de coloración verde en la parte externa y crema en la parte interna. Presentan seis pétalos, en dos series: los externos lineal-oblongos, obtusos, de 1 a 3 cm de largo, carnosos (Francisco, S. et al. 2001).

Los frutos. - son globosos-oviformes, casi de forma acorazonada, de 5 a 12 cm de diámetro y un peso de 200 a 800 g. Es de color verde-amarillento pero se conocen variedades de color púrpura. Externamente la unión de los carpelos es laxa, con toda su superficie marcadamente prominente, dándole al fruto apariencia tuberculada. La pulpa es blanca o amarillenta entre la unión de los carpelos; cada escama pertenece a un carpelo fecundado (Florida, L. et al. 2006).

Las semillas. - son oblongas, negro-lustrosas o café-oscuras, de 1,25 cm de longitud y constituyen entre el 31% y 41% del total del

fruto y contienen entre 14 y 49% de aceite (Francisco, S. et al. 2001).

2.2.3. Composición nutricional de la Anona

La anona presenta en su composición minerales como potasio, fósforo, calcio y vitamina C en 100g de pulpa de fruta.

De acuerdo con la tabla 2, la anona, posee valor de fibra alimenticia y carbohidratos en 100g de la pulpa. Las fibras alimentarias tienen importantes en los efectos de los parámetros de la función intestinal en el control de los niveles de lípidos y de azúcar en la sangre (Moura, R. et al. 2015).

Tabla 2. Valor alimenticio en 100 g de pulpa de Anona

COMPOSICION POR 100 g DE PULPA	
Componente	Valor
Humedad	72,7
Calorías (Kcal)	97,0
Proteína (g)	1,0
Carbohidrato (g)	25,3
Fibra (g)	2,10
Colesterol (mg)	n/a
Lípidos	0,30
Cenizas (g)	0,70
Ácido Graso saturado (g)	0,10
Ácido Graso Mono insaturado (g)	0,10
Ácido Graso Poli insaturado (g)	0,10
Calcio (mg)	23,0
Magnesio (mg)	25,0
Manganeso (mg)	0,16
Fosforo (mg)	23,0
Hierro (mg)	0,20
Potasio (mg)	300
Zinc (mg)	0,20
Sodio (mg)	1,0
Vitamina B1 (mg) – Tiamina	0,09
Vitamina B2 (mg) – Riboflavina	0,07
Vitamina B6 (mg) – Piridoxina	0,07
Vitamina B3 (mg) – Niacina	1,58
Vitamina C (mg)	10,1

Fuente: Paladino, S. (2009)

2.2.4. Composición fitoquímica de las hojas de anona

Las hojas de la anona poseen sustancias fenólicas, principalmente los flavonoides, los cuales proporcionan una actividad antioxidante y antimicrobiana. Los compuestos fenólicos inhiben la acción de radicales libres, protegiendo las moléculas del organismo (por ejemplo, ADN), pudiendo prevenir algunos procesos carcinogénicos (Rabêlo, S. et al. 2013).

En la Tabla 3 se presentan la concentración de fenoles totales y flavonoides del extracto obtenido a partir del extracto de las hojas de anona.

Tabla 3. Composición Fitoquímico de las Hojas de Anona

Compuestos fenólicos	
Fenoles Totales (mgEqAG/g)	Flavonoides Totales (mgEqC/g)
207,80 ± 7,21 ¹	151,96 ± 7,30
1346,95 ²	154,63

Fuente: Rabelo et al., (2014); Mazepa L. (2014).

2.2.5. Antioxidantes

Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo y las relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química, poniendo fin a la reacción en cadena, estabilizando así al átomo, que ha estado intentando encontrar una pareja para su electrón desaparejado. Ejercen sus propiedades protectoras previniendo la producción de radicales libres o neutralizando los

¹ Autor: Rabelo et al., (2014)

² Autor: Mazepa L. (2014)

producidos en el cuerpo en sus funciones habituales, como la respiración o la digestión (Challem, J. y Block, M. 2008).

Tabla 4. Clasificación de los Antioxidantes

EXOGENOS	ENDÓGENOS	COFACTORES
Vitamina E	Glutation	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacarotenos	Ácido Fólico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas catalasa	Hierro
	Superóxido dismutasa	

Fuente: Challem y Block. (2008)

2.2.5.1. **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10 000 compuestos: algunos son solubles sólo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles (Lordêlo, M. et al. 2010).

La fórmula general AR-OH, donde AR es un anillo aromático y el -OH está directamente unido a este anillo, son caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos. Actúan como antioxidantes naturales, esta actividad puede variar significativamente dependiendo de ciertas variables como su concentración, la estructura química de la molécula y su grado de oxidación. En cuanto a la concentración se ha encontrado que aún con cantidades pequeñas de antioxidantes, algunos antioxidantes fenólicos entran a la circulación sistémica y causan un aumento significativo en el estado antioxidante del plasma (Lordêlo, M. et al. 2010).

2.2.5.2. **Flavonoides**

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las

plantas y frutas. Los flavonoides son moléculas polifenólicas que pueden ser vistos como dos anillos de benceno unidos por una pequeña cadena de tres carbonos. Uno de estos átomos de carbono está siempre conectado a uno de los anillos de benceno (Gracia M. 2006).

Los flavonoides son sustancias producidas como metabolitos secundarios por las plantas, cuyo elemento estructural común es la existencia de un esqueleto de difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano (Cartaya y Reynaldo 2001). Sobre este esqueleto pueden darse miles de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas. Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en cantidad variable en frutas, verduras, semillas, especias y bebidas derivadas de vegetales, como el té, las infusiones, el mosto, los zumos y el vino, por lo que entran a formar parte de nuestra dieta (Martínez-Flórez et al. 2002). El consumo diario medio en humanos de flavonoles más flavonas se ha calculado en unos 20-25 mg, pero hay grandes variaciones dependiendo de los hábitos nutricionales y de las zonas geográficas (Duarte y Pérez-Vizcaíno 2015).

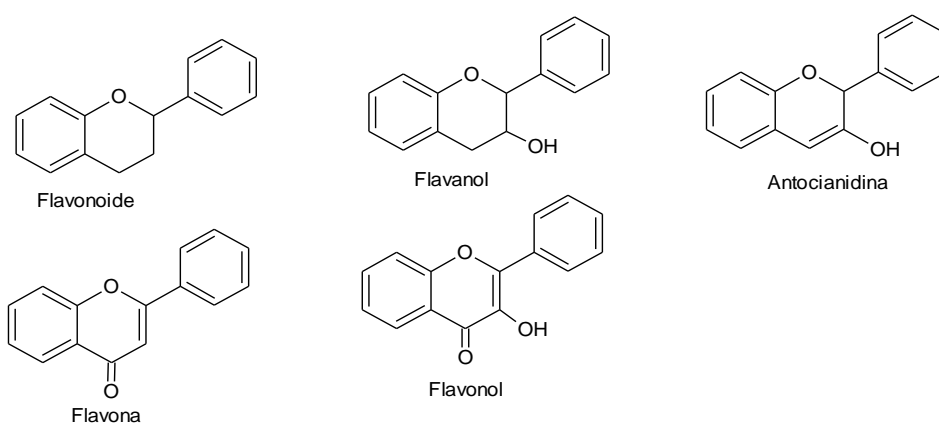


Figura 2. Flavonoides. Estructura básica y tipos.

Fuente: Imagen sistematizada de Martínez et al., (2002)

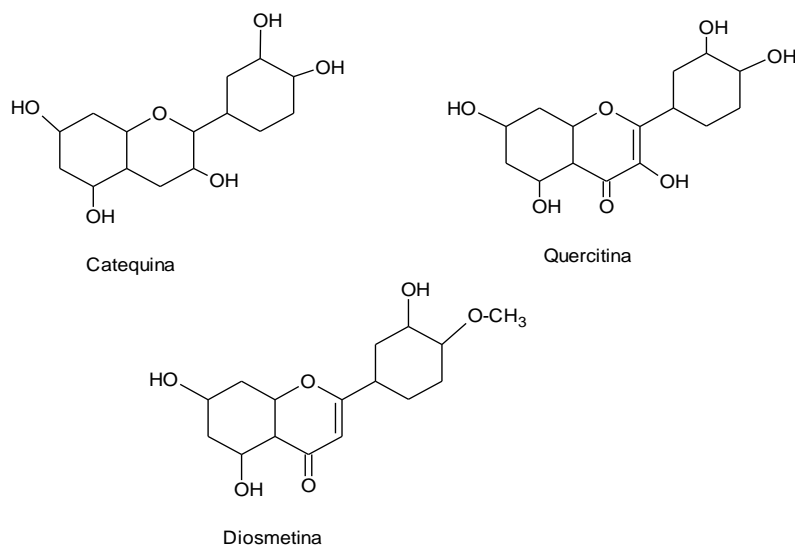


Figura 3. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides

Fuente: Imagen sistematizada de Martínez et al., (2002)

Estructura química de los metabolitos secundarios de los grupos de flavonoides

Flavanol.- son derivados de flavonoides que usan la estructura 2-fenil-3,4-diidro-2H-cromen-3-ol (Lordêlo, M. et al. 2010).

Antocianidina.- Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico (Martínez-Flórez et al. 2002).

Flavona.- es el compuesto químico 2-fenil-1-benzopiran-4-ona. Esta es la molécula base de las flavonas, un subgrupo de los flavonoides (Lordêlo, M. et al. 2010).

Flavonol.- Flavonoles son una clase de flavonoides que tienen como columna vertebral a la 3-hidroxi-flavona (IUPAC name: 3-hydroxy-2-phenylchromen-4-one). Su diversidad se deriva de las diferentes posiciones de los grupos fenólico –OH (Lordêlo, M. et al. 2010).

Catequina.- La molécula de catequina posee dos anillos bencénicos (denominados los anillos A- y B-) y un heterociclo dihidropirano (el anillo C) con un grupo hidroxilo sobre el carbono 3. El anillo A es similar al grupo funcional del resorcinol mientras que el anillo B es similar al grupo funcional del catecol. Su estructura esta dada por (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxifenil)-3,4-dihidro-2H-chromene-3,5,7-triol (Martínez-Flórez et al. 2002).

Quercitina.- Químicamente, la quercetina es un flavonoide tricíclico polihidroxilado, que en la naturaleza se encuentra glicosilado formando parte de la rutina (quercetin-3-rutinósido), de la isoquercitrina (quercetin-3-O-glucósido) o de otros glicósidos siendo la aglicona de todos ellos. En la cual su estructura es la siguiente: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one (Duarte y Pérez-Vizcaíno 2015).

Diosmetina.- Es una flavona que se puede extraer de las plantas del género *Vicia*. Su estructura química es 5,7-dihidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil) cromen-4-ona (Lordêlo, M. et al. 2010).

2.2.6. Proceso de extracción sólido-líquido

Muchas sustancias biológicas, así como compuestos inorgánicos y orgánicos, se encuentran como mezclas de diferentes componentes en un sólido. Para separar el soluto deseado o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos se difunden desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama lixiviación líquido-sólido o simplemente, lixiviación. En la industria farmacéutica se obtiene una gran diversidad de productos por lixiviación de raíces, hojas y tallos de plantas (Romilda A. y Rajesh N. 2016). Los materiales biológicos tienen estructura celular y los constituyentes solubles suelen estar dentro de las células. En ocasiones, la velocidad de lixiviación es bastante baja, debido a que las paredes celulares constituyen una resistencia adicional a la difusión.

No obstante, es poco práctico moler los materiales biológicos a tamaño suficientemente pequeño para exponer el contenido de las células individuales (Geankoplis, C. 1998). Para lixiviar productos farmacéuticos de hojas, tallos y raíces, el secado del material antes de la extracción ayuda a romper las paredes celulares (Geankoplis, C. 1998).

2.2.6.1. Extracción Discontinua

El mecanismo de extracción se inicia cuando las moléculas del disolvente penetran en las matrices de la planta, provocando que la capa de citoplasma al ser expuesto directamente al disolvente (Crossley y Aguilera 2001). Esto facilita la disolución de los compuestos activos en el disolvente. En el principio del proceso de extracción, el paso rápido corresponde a una velocidad de extracción constante. A una velocidad extremadamente rápido, el periodo en este paso de extracción es difícil de determinar (Franco, D. et al. 2007).

Durante la etapa de extracción lenta, los compuestos activos se difunden desde el interior de las matrices de la planta y se disuelven en el disolvente. El rendimiento de la extracción durante este paso depende en gran medida de las células que permanecen intactos después de la etapa de lavado (Crossley, J. y Aguilera, J. 2001). De hecho, las características de las etapas de lavado y de difusión, en la extracción se pueden determinar por la proporción de células rotas e intactas en la preparación de las muestras, por ejemplo, molienda (So, G. y Macdonald, D. 1986). Las muestras molidas y remojadas en solvente se aplican comúnmente antes de la extracción con el fin de reducir el tamaño de las partículas de la muestra para mejorar el mecanismo de difusión (Tsibranska, I. et al. 2011) y para mejorar la penetración del disolvente en la estructura de la planta (Gujar J., et al. 2010). La mejora de la cinética de extracción también se puede lograr usando pretratamiento avanzada, como explosión de vapor y la caída instantánea de presión controlada (DIC). Estos métodos de pretratamiento fragmentan la muestra formando microporos ya que se

descomprime a través de la liberación repentina de la presión de vapor (Ben, B. y Allaf, K. 2009). Esto mejora la etapa de lavado en la extracción (Chen, G. y Chen, H. 2011) y aumenta la difusión del soluto en el disolvente (Ben, B. y Allaf, K. 2009). Se dispone de varias configuraciones de sistemas de extracción convencionales. Por ejemplo, una configuración básica consiste en un recipiente agitado con un baño de agua para control de la temperatura, como se muestra en la Figura 4 Esta disposición se ha aplicado ampliamente en la industria para proporcionar un movimiento mayor convección en el disolvente. Esto reduce la barrera de transferencia de masa y mejora la extracción (Franco, et al. 2007).

En algunas aplicaciones, un condensador está conectado a la parte superior del recipiente para evitar la evaporación del solvente debido a un sobrecalentamiento durante la extracción (Xu, H. y He, C. 2008). Los inconvenientes asociados con la técnica de extracción convencional en términos de tiempo de extracción y el alto consumo de disolvente, hace que se desarrollen nuevas técnicas de extracción de solventes con medios asistidos para superar estas limitaciones. La curva de extracción con disolvente comprende típicamente un paso rápido de extracción (etapa de lavado) y una etapa de extracción lenta (etapa de difusión) se muestra en la Figura 4 (Chan, C. et al. 2014a).

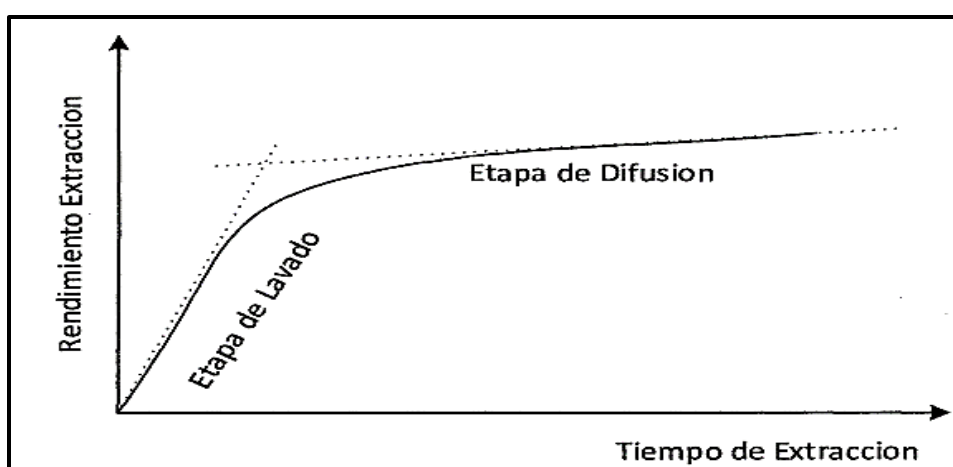


Figura 4. Curva Típica de Extracción Discontinua con Solvente de componentes Activos desde Matrices Sólidas de Plantas.

Fuente: Chan et al., (2014)

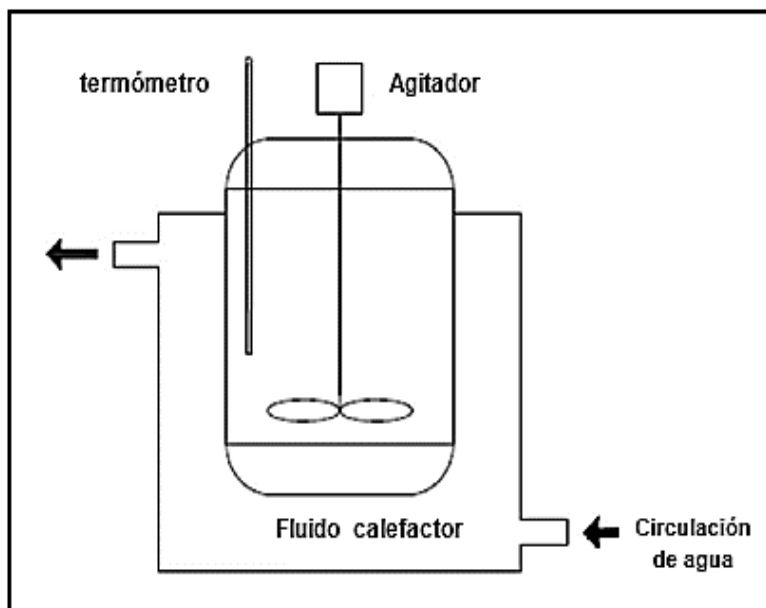


Figura 5. Sistema de extracción convencional

Fuente: Chan et al., (2014)

2.2.6.2. Influencia de los Parámetros de Funcionamiento en la Cinética de extracción

La selección de los equipos para un proceso de extracción se ve influenciada por los factores que son responsables de limitar la velocidad de extracción. Por lo tanto, si la difusión del soluto a través de la estructura porosa de los sólidos residuales es el factor de control, el material debe ser de pequeño de manera que la distancia que el soluto tiene que viajar es pequeña. Por otro lado, si la difusión del soluto desde la superficie de las partículas a la mayor parte de la solución es el factor de control, un alto grado de agitación del fluido que se requiere. Por tanto, se describe el efecto de los parámetros generales de funcionamiento considerados como cruciales en las técnicas convencionales de extracción por lotes y de percolación:

El disolvente de extracción y su concentración desempeñan un papel importante en la extracción de compuestos activos de las plantas. Diferentes disolventes de extracción tienen diferentes energías de activación para la extracción (Rakotondramasy-rabesiaka et al. 2007). Se requiere esta energía para penetración del solvente en el interior de las células vegetales. Los disolventes orgánicos acuosos se emplean

normalmente para la extracción. Por ejemplo, se utiliza con frecuencia la mezcla de etanol y agua como un disolvente de extracción en la extracción de compuestos activos de *Fumaría officinalis* L. (Rakotondramasy-rabesiaka et al. 2007), madera de castaño (Gironi, F. y Piemonte, V. 2011). Un disolvente adecuado para la extracción puede mejorar la etapa de lavado y acortar el tiempo de extracción (Rakotondramasy-rabesiaka et al. 2007).

También puede mejorar la difusividad del soluto en el disolvente y posteriormente maximizar el rendimiento de extracción de equilibrio (Xu, H. y He, C. 2008).

Efecto de la relación de masa muestra: masa solvente

Otro parámetro importante, el cual cuando se aplica correctamente, puede disminuir la barrera de transferencia de masa durante la difusión de compuestos activos y, posteriormente, mejorar el rendimiento de la extracción (Franco, D. et al. 2007). Sin embargo, si la relación está más allá del óptimo, el exceso de disolvente no tiene un efecto significativo en los rendimientos de extracción de equilibrio, resultando en desperdicio de disolvente e incremento de los costos operativos. Se observa, que la velocidad inicial de extracción durante el período de lavado no se ve afectada

significativamente por el ratio m:mm (Herodez, S. et al. 2003). Por otro lado, la extracción que se lleva a cabo a bajo ratio m:mm, tiende a alcanzar el equilibrio mucho más rápidamente que los que se llevan a cabo en ratios elevados, debido a rendimientos inferiores de equilibrio (Stanisavljevic, I. et al., 2007).

Por lo tanto, los criterios de selección de una adecuada temperatura de extracción deben basarse tanto en la eficiencia de la extracción y la estabilidad térmica de los compuestos activos.

La agitación del disolvente es importante porque esto aumenta la difusión turbulenta y por lo tanto la transferencia de material de la superficie de las partículas a la mayor parte de la solución, como se

discute en la siguiente sección. Además, la agitación de suspensiones de partículas finas impide la sedimentación y el uso más eficaz posible de la superficie interfacial.

Efecto de la velocidad de agitación

La cinética de extracción también se ve muy afectada por el tamaño de las partículas de la muestra de matrices sólidas de la planta. Pequeños cambios en el tamaño de las partículas pueden afectar significativamente el resultado de la extracción. El rendimiento de la extracción durante la etapa de lavado se puede mejorar con tamaños más pequeño de partícula de muestras (Spigno, G. y De Faveri, D. 2009) pero se vuelve desfavorable cuando conduce a extracción de compuestos indeseables (Cissé, M. et al., 2012). En cuanto a la cinética de extracción, un tamaño menor de partícula aumenta la difusividad y mejora el mecanismo de transferencia de masa en la etapa de difusión. Esto debido a mayor área de superficie de contacto en la trayectoria de difusión entre el soluto (compuesto activo) y el disolvente (Herodež, S. et al., 2003). Como resultado, se requiere menor tiempo de extracción.

$$N_{js} = Sv^{0.1} \left[\frac{g_{0(\rho_s - \rho_1)}}{\rho_1} \right]^{0.45} x^{0.13} d_p^{0.2} D^{-0.85} \quad (1.1)$$

La velocidad crítica de agitación o velocidad de agitación crítica (RPS), S es la constante para la geometría dada y depende del diámetro del tanque a la relación del diámetro del agitador, V es el La viscosidad cinemática del líquido (m^2/s), ρ_s es la densidad sólida (kg / m^3), ρ_1 es la densidad del líquido donde, N_{js} (kg / m^3), x es la relación de sólido a líquido en porcentaje, d_p es el diámetro de partícula (m), D es el donde, N_{js} es el diámetro del agitador (m).

Además, la velocidad de extracción en la etapa de lavado tiene a aumentar con la temperatura que probablemente podría ser debido al

creciente poder de solvatación del disolvente (Rakotondramasy-rabesiaka, L. et al. 2007).

Por el contrario, para los compuestos sensibles al calor, una elevada temperatura de extracción ejerce efecto negativo sobre la extracción y debe evitarse a toda costa. La tendencia general exhibida por estos compuestos es que la estabilidad disminuye al aumentar la temperatura de extracción (Cissé, M. et al. 2012). Esto también significa que la velocidad de degradación o descomposición de compuestos sensibles al calor depende de la temperatura de extracción (Xiao, X. et al. 2012).

Efecto del tamaño de partícula

Dado que, a mayor velocidad de agitación, el proceso de difusión intra partícula es la etapa de control de velocidad; el tamaño de partícula tendría un efecto significativo en las tasas de extracción.

$$EDT = \frac{dp^2}{4D}$$

(1.2)

Donde, EDT es el tiempo de difusión esperado en segundos, dp es el diámetro de partícula en (m) y D es el coeficiente de difusión en m^2 / seg

Efecto de la temperatura

Se puede atribuir fácilmente a una mayor solubilidad en todos los disolventes a temperaturas más altas. La energía cinética y la difusividad del disolvente aumentan con la temperatura y, por lo tanto, penetra mejor dentro de la matriz celular lo que lleva a una liberación más rápida de las moléculas de ácido. A temperaturas más altas de solvente, la matriz de celulosa se rompe lo que ayuda a una mejor

penetración de disolvente en la matriz de células vegetales (Taralkar, S. 2016).

Convencionalmente, la temperatura de extracción es controlada ya que afecta a la estabilidad de los compuestos activos y el rendimiento de la extracción. Para la extracción de 1 compuestos térmicamente estables, el mejor rendimiento de la extracción a temperaturas elevadas, se logró en el más corto tiempo de extracción (Cissé, M. et al. 2012).

Esto puede explicarse porque a alta temperatura aumenta la difusividad del soluto y disminuye la barrera de energía de la extracción (Rakotondramasy-rabesiaka et al. 2007).

Modelamiento Matemático de la Extracción Discontinua por Solvente

Las ecuaciones para el modelamiento, se derivan teóricamente o empíricamente formulados. Ampliamente se utiliza la Ley de difusión de Fick, ecuaciones cinéticas químicas y otras dos ecuaciones empíricas paramétricas. Por lo tanto, esta sección se centra en la derivación y aplicaciones del modelamiento matemático de la extracción por solvente del lote.

La Ley de Fick

La etapa de difusión en la extracción por lote depende de dos mecanismos de extracción; difusión interna y la difusión externa. La difusión interna de compuestos activos, es explicada por Ley de Fick, generada por la diferencia de concentración entre la matriz de la planta y el disolvente, de la siguiente manera (Bird, R. et al. 2006):

$$N = -D \frac{dC}{dx}$$

(1.3)

Donde N es el flujo de masa del soluto, C es la concentración del soluto en la partícula sólida, D es conocida como la difusividad o coeficiente de difusión para el soluto en el disolvente, y x es la distancia

en la dirección de la transferencia. Para la difusión externa, los compuestos activos se difunden desde la superficie externa del sólido al líquido que lo rodea. La determinación del mecanismo limitante de velocidad en la etapa de difusión es importante para la cinética de extracción, ya que determina un enfoque matemático adecuado para modelar la extracción. Para asegurar una eficaz extracción, la resistencia de transferencia de masa externa tiene que minimizarse de manera que la velocidad de extracción sólo dependa de la difusión interna de los compuestos activos. La difusividad en la Ley de Fick, Ec.

(1.3) es una propiedad importante que indica la velocidad de transferencia de masa

y es útil para el diseño del equipo (Perez, E. et al. 2011). En la mayor parte del modelamiento cinético en la literatura, se investiga la difusividad u otros coeficientes de transferencia de masa para la extracción con disolventes. La caracterización de la extracción, se puede realizar a través de la derivación de la Ley de Fick con condiciones iniciales y de contorno. La solución del problema de transferencia de masa puede obtenerse analíticamente o numéricamente dependiendo de la complejidad de las ecuaciones involucradas. Algunos supuestos básicos (Chan, C. et al. 2014b) que pueden utilizarse para simplificar las áreas de problemas de transferencia de masa son:

- Muestras de partículas simétricas y porosas. La geometría esférica de las partículas sólidas con radio R , ó placa delgada con espesor medio de L .
- La partícula sólida como un medio pseudo-homogénea. La concentración de los compuestos activos en la partícula sólida depende del tiempo y el radio, r o espesor, x .
 - La distribución uniforme de los compuestos activos en la matriz de la muestra.
 - Mezcla homogénea entre el solvente y las muestras particuladas de la planta.

- La concentración del soluto en el disolvente sólo depende del tiempo.
- La transferencia de masa de compuestos activos desde el sólido es un fenómeno de difusión en el que el coeficiente de difusión es independiente del tiempo.
- La difusión del soluto y otros compuestos están en paralelo y no hay interacción entre ellos.
- La resistencia a la transferencia de masa externa es despreciable. La concentración del soluto en el disolvente en el interior de la partícula sólida es igual a la concentración del soluto en el disolvente que lo rodea.

Transferencia de Masa en las Partículas Sólidas

El modelo de proceso de extracción puede ser desarrollado considerando sólo el balance de masa en una partícula sólida esférica como se muestra:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(-D\nabla C) \quad (1.4)$$

Donde t , es el tiempo de extracción. Teniendo en cuenta únicamente la geometría esférica de las partículas con radio r , las respectivas condiciones iniciales y de contorno se pueden escribir como sigue:

$$t = 0, \quad C = C_0 \quad \forall r \quad (1.5)$$

$$t > 0, \quad C = C_i = 0 \quad r = R \quad (1.6)$$

$$t > 0, \quad \frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad r = 0 \quad (1.7)$$

Donde, C_0 es la concentración inicial de soluto en la partícula de la muestra, C_i es la concentración de soluto en la interfase de la partícula de la muestra. Con la suposición de la resistencia a la transferencia de masa externa insignificante, la concentración en la interfaz de partícula se convertirá en cero como se describe en la Ec. (1.6). La ecuación diferencial ordinaria (ODE) tanto para la geometría esférica y placa de la muestra puede entonces expresarse, según las Ecs. (1.8) y (1.9), respectivamente (Chan, C. et al. 2014b):

Esférico:

$$\frac{C - C_o}{C_i - C_o} = 1 + \left[\frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \operatorname{sen} \frac{\pi n r}{R} \exp \left\{ -\frac{D n^2 \pi^2 t}{R^2} \right\} \right] \quad (1.8)$$

Placa:

$$\frac{C - C_o}{C_i - C_o} = 1 - \left[\frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2L} \exp \left\{ -\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D t}{4L^2} \right\} \right] \quad (1.9)$$

La masa de soluto transferido de la partícula de la muestra en cualquier momento, M puede ser calculado mediante la integración de la concentración de soluto sobre el radio o el espesor de las partículas en las Ecs. (1.8) y (1.9) para obtener las ecuaciones. (1.10) y (1.11), respectivamente.

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left\{ -\frac{D n^2 \pi^2 t}{R^2} \right\} \quad (1.10)$$

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 + \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left\{-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 Dt}{4L^2}\right\}$$

(1.11)

Donde M_{∞} es la cantidad total de soluto transferido en un tiempo infinito. Después de un cierto lapso de tiempo, o por lo general después de la etapa de lavado, sólo el primer término de la serie sigue siendo significativa (Herodež et al. 2003). Ambas Ecs, (1.10) y (1.11), entonces se puede reducir a la siguiente forma (Perez, E. et al. 2011):

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 1 - Ae^{-Bt}$$

(1.12)

Donde A es la constante del modelo, y B es la constante de velocidad de difusión. Teóricamente, $B = \pi^2 D / r^2$ es para partículas esféricas y $B = \pi^2 D / 4L^2$ es para partículas tipo placas. La constante B podría no ser aplicable bajo ciertas condiciones cuando su valor tiene a depender de la geometría de muestras de las plantas. La expresión en la Ec. (1.12) puede ser modificada basada en la fracción no-extraída del soluto en la partícula de la muestra, E . Reordenando, la versión simplificada se muestra a continuación (Chen, G. y Chen, H. 2011):

$$E = 1 - \frac{M(t)}{M_{\infty}} = A \exp(-Bt)$$

(1.13)

$$\ln E = \ln A - Bt$$

(1.14)

Alternativamente, la concentración de soluto en el disolvente de extracción en cualquier momento, e puede expresarse considerando sólo el primer término de las Ecs. (1.10) y (1.11) (Chan, C. et al. 2014b) con las formas simplificadas se muestran como sigue:

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty}-C}\right) = 0.498 + \frac{9.87Dt}{R^2}$$

(1.15)

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty}-C}\right) = 0.21 + \frac{9.87Dt}{4L^2}$$

(1.16)

Donde C_{∞} es la concentración de soluto en el disolvente de extracción después de un tiempo infinito. Al graficar la Ec. (1.15) o la Ec. (1.16) utilizando la curva experimental de extracción, de la intersección de las dos líneas rectas se pueden extraer la pendiente, siendo de la primera la más pronunciada que la segunda. La intersección entre las líneas es el punto de transición. Esta denota el punto donde la extracción cambia su fase de la etapa de lavado a la etapa de difusión (Chan, C. et al. 2014b). Para lograr mejores resultados de los modelos, sugirieron que el modelado del proceso de extracción debe tener en cuenta tanto las etapas de lavado y de difusión, expresadas a través de las siguientes ecuaciones:

Esférico:

$$\frac{C_{\infty}-C}{C_{\infty}} = \frac{6}{\pi^2} \left[f_1 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_1 t}{R^2}\right\} + f_2 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_2 t}{R^2}\right\} \right]$$

(1.17)

Placa:

$$\frac{C_{\infty}-C}{C_{\infty}} = \frac{8}{\pi^2} \left[f_1 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_1 t}{4L^2}\right\} + f_2 \exp\left\{-\frac{\pi^2 D_2 t}{4L^2}\right\} \right]$$

(1.18)

Donde f_1 y f_2 son las fracciones de soluto extraído de las etapas de lavado y de difusión con coeficiente de difusión de D_1 y D_2 , respectivamente. Los parámetros D_2 y f_2 se pueden determinar a partir de la pendiente y los puntos de intersección de la Ec. (1.15) o la Ec. (1.16) como el segundo término exponencial es significativo para la segunda etapa de la extracción. En la primera etapa de extracción, el segundo término exponencial es cercano a la unidad por lo tanto se puede determinar D_1 y f_1 .

Transferencia de Masa en las Partículas Sólidas y el Disolvente de Extracción

Los modelos desplegados en la sección anterior pueden ser teóricamente, resolviendo la transferencia de masa en partículas sólidas. Para hacer que los modelos sean más realistas, se debe tener en cuenta el balance de masa del solvente. Desde el balance de masa en las partículas sólidas mostradas en la Ec. (1.4), el balance de masa en el disolvente se puede expresar según:

$$V_L \frac{dC}{dt} = J(t) \quad (1.19)$$

Donde, V_L es el volumen de disolvente utilizado en la extracción. Las condiciones iniciales y de contorno en la extracción se presentan en las Ecs. (1.20) y (1.21) y las Ecs. (1.22) - (1.24), respectivamente:

$$t = 0, \quad C = C_o \quad \forall r \quad (1.20)$$

$$t = 0, \quad C = 0 \quad (1.21)$$

En el centro, $r = 0$

$$r = 0,$$

$$\frac{\partial C}{\partial r} = 0$$

(1.22)

En la interfaz, $r = R$

i. El flux difusivo de la partícula sólida (Cissé et al. 2012):

$$J(t) = -DA_s \frac{\partial C}{\partial r}$$

(1.23)

ii. El flux entrante en el disolvente (Tsibranska et al. 2011):

$$J(t) = -V_s \frac{dC}{dt}$$

(1.24)

Donde A_s es el área específica de la partícula sólida y V_s es el volumen de muestra de la planta.

Transferencia de Masa con Variación de la Temperatura de Extracción

El enfoque de modelos presentados hasta ahora se limita a la temperatura de extracción específica. Para investigar la influencia de la temperatura sobre el proceso de extracción, la ecuación de Arrhenius se muestra en la Ec. (1.25), utilizada para describir el efecto de la temperatura en la difusividad del sistema.

$$D = A' \exp\left[\frac{-E_\alpha}{RT}\right]$$

(1.25)

Donde, A' es el factor pre-exponencial y E_α es la energía de activación del modelo de Arrhenius. Al comparar el valor de difusividad de referencia, D_{ref} la temperatura de referencia, T_{ref} , la difusividad D en la temperatura de extracción T se puede expresar como sigue:

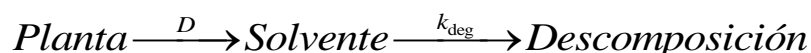
$$\frac{D}{D_{ref}} = \frac{A' \exp(-E_{\alpha} / RT)}{A' \exp(-E_{\alpha} / RT_{ref})} = \exp \left[\frac{E_{\alpha}}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right]$$

(1.26)

Sustituyendo esta expresión relacionada con la temperatura en el sistema de modelado discutido previamente, se puede determinar la influencia de la temperatura sobre el proceso de extracción (Xu, H. et al. 2008).

Transferencia de Masa con Degradación de Compuestos Activos

Cuando la extracción implica compuestos térmicamente sensibles tales como las vitaminas, el perfil de extracción está impulsado por dos procesos a saber; la difusión de compuestos activos a partir de muestras de plantas y la degradación térmica de los compuestos activos en el disolvente de extracción (Xiao, X. et al. 2012):



Para mejorar la precisión en el modelamiento, los términos de degradación se pueden añadir como primer orden en la ecuación de velocidad en las expresiones de balance de masa para partículas sólidas y disolvente, como se muestra en las Ecs. (1.27) y (1.28), respectivamente (Cissé, M. et al. 2012).

Balance de masa en las partículas sólidas con término de degradación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(-D\nabla C) - k_{deg} C$$

(1.27)

Balance de masa en el solvente con término de degradación:

$$V_L \frac{dC}{dt} = J(t) - k_{deg} CV_L$$

(1.28)

Donde, k_{deg} describe la constante de degradación de la extracción que se puede relacionar a las ecuaciones de Arrhenius como se muestra en la Ec. (1.29):

$$k_{\text{deg}} = k_{\infty} \exp\left[\frac{-E_{\alpha}}{RT}\right] \quad (1.29)$$

Donde, k_{∞} es la constante de velocidad de degradación para componente activo. Los parámetros de la Ec. (1.29), es decir k_{∞} y E_{α} , y las condiciones iniciales y de contorno en Ecs. (1.20) - (1.24) están obligados a resolver la degradación térmica asociada con el problema de la transferencia de masa.

Transferencia de Masa con la Resistencia a la Transferencia de Masa Externa

Cuando la resistencia de transferencia de masa externa en el sistema de extracción se vuelve significativa, se considera el coeficiente de transferencia de masa por convección. Se requiere una forma adimensional de la Ec. (1.2) para modelar esta condición particular (Franco, D. et al. 2007).

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial r^2} = \left(\frac{\partial Y}{\partial t}\right) \quad (1.30)$$

Donde los grupos adimensionales para el radio, el tiempo de extracción y el rendimiento pueden ser definidos, según

i. radio adimensional

$$\bar{r} = \frac{r}{R} \quad (1.31)$$

ii. tiempo de extracción adimensional

$$\bar{t} = \frac{Dt}{R^2} \quad (1.32)$$

iii. rendimiento adimensional

$$Y = \frac{(C - C_e)}{(C_o - C_e)} \quad (1.33)$$

Donde C_e se define como la concentración de soluto que permanece en la partícula de la muestra después de tiempo de extracción infinito. Las condiciones iniciales y de contorno son similares a las Ecs. (1.5) y (1.7), sólo las condiciones de contorno en la interfaz son diferentes y se define como:

$$t > 0, \quad \frac{\partial Y}{\partial r} = \frac{k_c R}{D} Y = \frac{k_c R}{D} \left(\frac{C_\infty - C}{C_\infty} \right) \quad (1.34)$$

Donde, k_c el coeficiente de transferencia de masa por convección. Este problema de transferencia de masa se informó por (Chan, C. et al. 2014b) y la solución analítica sugerida se muestra a continuación:

$$Y(\bar{r}, \bar{t}) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{B_n}{r} \sin(\lambda_n^2 \bar{t}) \quad (1.35)$$

Mientras que B_n se puede determinarse a partir de la Ec. (1.36)

$$B_n = \left(\frac{4}{\lambda_n} \right) \frac{\sin(\lambda_n) - \lambda_n \cos(\lambda_n) + \lambda_n}{2\lambda_n - [\sin(\lambda_n)]^2} \quad (1.36)$$

Dónde λ_n son los valores propios de la función dada en la Ec. (1.37):

$$\lambda \cot g(\lambda) + \frac{k_c R}{D} = 1 \quad (1.37)$$

La fracción media no extraída del soluto en la partícula de la muestra puede obtenerse a partir de la Ec. (1.35) como sigue:

$$\bar{Y} = \int_0^1 Y(\hat{r}, \hat{t}) d\hat{r} \quad (1.38)$$

Extracción de lotes

Según Geankoplis, C. (1998) la extracción por lotes se realiza en un vaso cilíndrico de borosilicato agitado para estimar la cinética de extracción y analizar la influencia de los parámetros de operación. Se utiliza un agitador de turbina de cuatro palas (2 cm de diámetro) para

agitar la masa en un rpm predeterminado. Todos los experimentos se realizan en un baño termostático.

Extracción de los polifenoles

La extracción de compuestos bioactivos es el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de solvente y concentración de disolvente influyen en la estabilidad de los polifenoles, así como también en la concentración de estos metabolitos en el extracto. Así limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. Los factores involucrados en su estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción y uso de los polifenoles como alimentos funcionales (Buttery, R. 2010). En caso del tiempo de extracción, el mejor rendimiento se obtiene cuando el tiempo de extracción es de 2 horas lo que indicaría, que en este tiempo se alcanzaría el equilibrio entre las fases sólida y líquida (Zapata, L. et al., 2014). La extracción de polifenoles difieren en cuanto a variables de operación tales como la temperatura, el tipo de disolvente, el tiempo de extracción y la relación soluto-disolvente (S-D); la combinación más apropiada de estos parámetros es fundamental para lograr los mejores resultados en cuanto al contenido de polifenoles, flavonoides y otras sustancias antioxidantes (Valdés-Hernández, et al., 2015).

El extracto vegetal

El extracto vegetal es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos orgánicos cuyo origen proviene de las plantas. El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden extraer diferentes principios activos, lo cual depende del solvente empleado (Caldas, A. 2012).

Descripción del solvente usado en el proceso de extracción

En la rama química un solvente es una sustancia líquida que tiene la capacidad de disolver gases, sólidos o líquidos; permite la disolución

de un soluto, es decir, extraer componentes deseados de su origen. Se caracterizan según su polaridad y estructura molecular, en polares y no polares, orgánicos y sintéticos, y siempre está en mayor proporción que el soluto. Los más comunes son los alifáticos, aromáticos, alcoholes, ésteres, cetonas e hidrocarburos. Su selección va a depender de la selectividad o capacidad para atraer los compuestos de interés: sustancias iguales atraen a sus iguales (Schimel, D. et al. 2000).

Caracterización de solvatación del etanol

La capacidad que tiene tanto el agua como algunos alcoholes de disolver sustancias semejantes es porque actúan como imanes a la hora de atraer partes del soluto (lo que se disuelve en el líquido) que tienen también su carga, cuando el soluto acaba rodeado por el solvente decimos que la disolución se ha solvatado. El más polar (el imán más potente) es el agua, luego el metanol, luego el etanol, luego el propanol, luego la glicerina, luego el propilenglicol (Bonner, W. 2004b).

Para extraer es necesario disolventes polares para solutos polares y al contrario, disolventes apolares para solutos apolares (Bonner, W. 2004a).

El solvente etanol

Es un líquido incoloro, volátil, con olor característico y sabor picante. Se obtiene principalmente al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y posterior hidrólisis. De manera natural, se obtiene a través de fermentación por medio de levaduras a partir de frutas, caña de azúcar, maíz, cebada, sorgo, papas, arroz, entre otros. Es usado para bebidas alcohólicas, en la industria cosmética y farmacéutica (Martínez, F. et al., 2002).

Tabla 5. Propiedades físico-químicas de etanol

Propiedades físico-químicas	
Densidad (g/mL) a 2°C	0.7809
Punto de fusión °C	130
Punto de ebullición °C a 760mmHg	78.3
Índice de refracción	1.361
Punto de congelación	-114.1
Solubilidad	Miscible con agua en todas las proporciones, metanol, cloroformo, acetona y otros disolventes
Manejo	Utilizar bata, lentes de seguridad en un área bien ventilada y si el uso es prolongado, guantes.

Fuente: Martínez et al, (2002)

2.2.7. Optimización del proceso

El proceso de optimización se refiere a la mejora de un sistema, un proceso o un producto con el fin de obtener el máximo beneficio de este. En el campo de la química el término optimización ha sido comúnmente usado para referirse la búsqueda de las mejores condiciones en las cuales un procedimiento permite obtener la mejor respuesta posible (Taralkar, S. et al. 2016).

Tradicionalmente, el proceso de optimización se ha llevado a cabo evaluando la influencia de un solo factor sobre la respuesta experimental, manteniendo constantes las demás variables del proceso. Este proceso de optimización es conocido con el nombre de una variable en un tiempo. Sin embargo, la mayor desventaja de este proceso es que no estudia las posibles interacciones entre todos los factores involucrados en el sistema o proceso, siendo incapaz de describir completamente los efectos de las variables sobre la respuesta en estudio. Además, implica generalmente la realización de un gran

número de experimentos para llevar a cabo la investigación, aumentando así la inversión tanto de tiempo como de carácter económico (Taralkar, S. et al. 2016).

Diseño D – optimal

Los diseños óptimos (personalizados) se utilizan cuando el proceso requiere ajustes en el experimento que no pueden ser acomodados por un diseño estándar. Estos ajustes incluyen:

- La diferencia entre el alto y el bajo de todos los componentes de la mezcla no es el mismo.
- Variables de mezcla y proceso en el mismo diseño.
- Dos mezclas independientes en el mismo diseño.
- Restricciones además de los límites de los factores

Modelos distintos del cuadrático completo (todas las interacciones lineales de dos factores y los términos cuadrados) Demasiadas ejecuciones en los diseños estándar.

- Las réplicas necesitan diseminarse a lo largo del diseño.

El principio de optimalidad utilizado para generar diseños D-óptimos es uno de maximizar $|X'X|$, el determinante de la matriz de información $X'X$. Este principio de optimalidad resulta en minimizar la varianza generalizada de las estimaciones de los parámetros para un modelo preespecificado.

2.3. Definición de términos

Extracción solido-liquido: Consiste en separar un sólido haciendo uso de un líquido.

Fenoles totales: Son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química (donador de H+ o electrones) necesarios para el

funcionamiento de las células vegetales; que se encuentran en frutas y verduras.

Flavonoides totales: Se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas.

Antioxidantes: Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo y las relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química, poniendo fin a la reacción en cadena, estabilizando así al átomo, que ha estado intentando encontrar una pareja para su electrón desaparejado.

CAPITULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de estudio

La investigación es de tipo correlacional. Según Tamayo (1999), se refiere al “grado de relación (no causal) que existe entre dos o más variables. Para realizar este tipo de estudio, primero se debe medir las variables y luego, mediante pruebas de hipótesis correlacionales acompañadas de la aplicación de técnicas estadísticas, se estima la correlación”.

3.2. Diseño del estudio

Se utilizó el diseño D-optimal de cuatro factores y tres niveles para evaluar el efecto de los parámetros de extracción, todos los datos experimentales se analizaron en el software Design-Expert® Versión 11.0.

Tabla 6. Matriz de Variables y sus Niveles

Variables	Unidades	Niveles		
		(- 1)	(0)	(+1)
z_1 Tamaño partícula	N° malla	13	25	40
z_2 Temperatura de extracción	°C	30	47.25	60
z_3 Ratio Mm:Ms	g:g	1:15	1:20	1:25
z_4 Concentración etanol	%	70	81.51	96
y_1 Flavonoides totales	$\mu\text{g EqC/mL}$			
y_2 Fenoles totales	$\mu\text{g EqAG/mL}$			
y_3 Actividad Antioxidante	%inhibición			

Fuente: Elaboración propia (2017)

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

Se trabajó con una población de 100 Kg de hojas que es la cantidad sembrada de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) de la parcela del señor Alberto Quispe Ancasí. Dicha población fue recolectada del distrito de Las Piedras, Centro poblado menor del Triunfo, provincia de Tambopata en la Región Madre De Dios.

3.3.2. Muestra

Se tomó como muestra 4 Kg de Hoja seca de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) de la Plantación del Señor Alberto Quispe Ancasí que está ubicado en el centro poblado menor del Triunfo, Distrito de Las Piedras, en la provincia de Tambopata, Región Madre de Dios.

3.4. Método y técnicas

3.4.1. Lugar de estudio:

La investigación se llevó a cabo en los siguientes laboratorios de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMAD:

- ↪ Laboratorio de química
- ↪ Laboratorio de proceso
- ↪ Laboratorio de biología
- ↪ Laboratorio de investigación I.A.G
- ↪ Laboratorio Regional Ambiental

3.4.2. Materiales para secado de las hojas:

- ✚ 01 deshidratador artesanal construido en madera y mallas metálicas de acero galvanizadas, de dos niveles, con dimensiones: 130 x 50 x 40 cm (LxHxP).
- ✚ 01 Molino de disco manual, Modelo UJ-3529, Marca Corona
- ✚ 10 Bolsas de polietileno de alta densidad

- ✚ 01 selladora al vacío, modelo DZ-260, Potencia (KW): 0.37, Voltaje (Voltios): 220V/60Hz. Según Anexo 7.

3.4.3. Material de laboratorio

- ✚ Embudo de vidrio pyrex
- ✚ Probetas de vidrio pyrex (10,100,500 mL)
- ✚ Micro - espátula
- ✚ Pipetas (1, 5,10 mL)
- ✚ Pera de succión
- ✚ Vasos precipitados de vidrio pyrex (10,50,100,500,1000 mL)
- ✚ Mascarillas
- ✚ Guantes de hule
- ✚ Mandil de color blanco, material fibras sintéticas
- ✚ Toca
- ✚ Cuaderno de apunte
- ✚ Papel aluminio
- ✚ Goteros
- ✚ Soporte universal
- ✚ Pinzas
- ✚ Envases esmerilados (50,100 mL)
- ✚ Mortero
- ✚ Piceta
- ✚ Plancha de calefactora
- ✚ Matraz 500ml
- ✚ Barilla
- ✚ Gradilla
- ✚ Tubos de ensayo

- ❖ Termómetro
- ❖ Termómetro laser
- ❖ Pinza
- ❖ Fiolas (10,50,100,250,1000 mL)
- ❖ Filtro 0.45 μm
- ❖ Molino manual
- ❖ Bolsas de alta densidad
- ❖ Matraz Erlenmeyer
- ❖ Tamices (13,25,40,)
- ❖ Tecnopor
- ❖ Frascos acaramelados 1L
- ❖ Paletas de agitación
- ❖ Micropipeta 1mL

3.4.4. Insumos:

- ✓ Ácido gálico
- ✓ DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- ✓ Folin-Ciocalteu.
- ✓ Etanol 96%
- ✓ Agua destilada
- ✓ (+) – Catequina
- ✓ Alcohol rectificado
- ✓ Nitrito de sodio al 5%
- ✓ Cloruro de aluminio al 10%
- ✓ Hidróxido de sodio (NaOH)
- ✓ Metanol grado Q.P
- ✓ Carbonato de sodio (NaCO)

- ✓ Metanol al 80%
- ✓ Hielo
- ✓ Agua destilada

3.4.5. Equipos:

- ↪ Balanza Analítica: Modelo GR-200, Carga nominal: 210g, min: 10mg Precisión: 0.1mg, Fuente de alimentación: AC 110-240V, Calibración: Auto Calibración.
- ↪ Estufa: Termorregulador Hidráulico (50 – 300°C) p/ Est.de Esterilización y secado, modelo SR-0110.
- ↪ Extractor: Solido – Liquido, Acero inoxidable, capacidad 1 litro
- ↪ Mesa de trabajo acero inoxidable
- ↪ Rotavapor: Marca BUCHI SWITZERLAND N°R-210;
- ↪ Refrigeradora: Capacidad de 620 L, Modelo HM10.
- ↪ Equipo Destilador de alcohol: Marca Kimax USA : Capacidad 1000mL

3.4.6. Instrumentos:

- Termómetro: Varilla de vidrio. Rango de Temperatura -10 a +110°C.
- Termómetro laser: Puntero láser de desviación de un solo punto. Retiene los valores en pantalla durante 7 segundos. Rango de temperatura desde -30 °C a 500 °C
- Balanza Analítica: Modelo GR-200, Carga nominal: 210g, min: 10mg Precisión: 0.1mg, Fuente de alimentación: AC 110-240V, Calibración: Auto Calibración.
- Espectrofotómetro: marca: HACH; Modelo: DR 5000; Fuente de luz: Lámpara de tungsteno en atmósfera gaseosa (visible) y lámpara de deuterio (UV); Rango de longitud de onda: 190–1100 nm.

3.5. Metodología

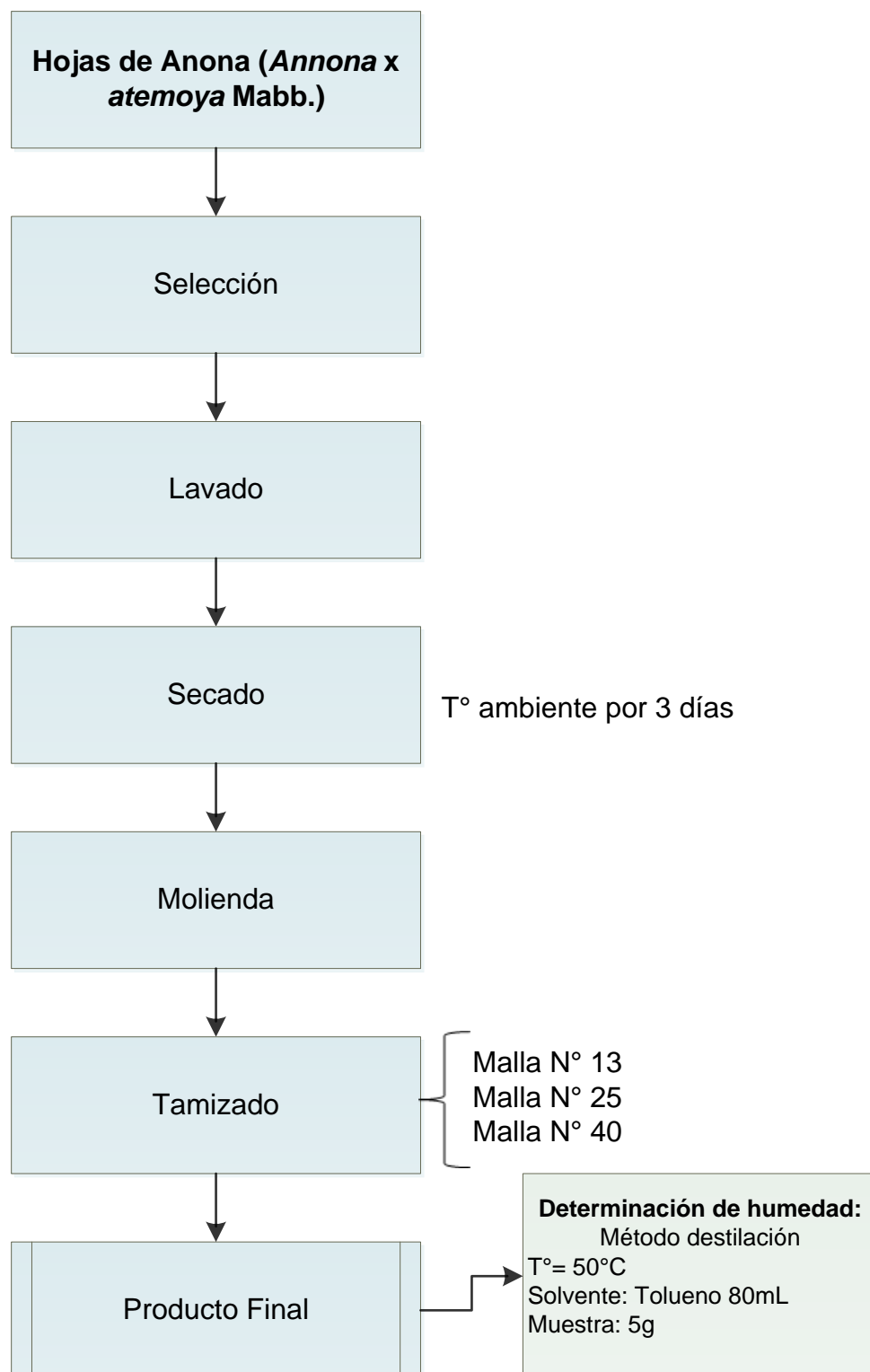


Figura 6. Diagrama de flujo de la Preparación de muestra de las hojas de *Annona x atemoya* Mabb. para el proceso extracción del extracto.

Fuente: Elaboración propia (2017)

Reconocimiento Taxonómico de las hojas de Anona

Una de los elementos importantes a la hora de trabajar con muestras vegetales es la corroboración de la taxonomía de la muestra colectada, que fue realizado por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que certificó el espécimen de la muestra con las cuales se ha trabajado. Ver Anexo 6.

3.5.1. Pre-tratamiento de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb).

- a) **Materia Prima.** - La materia prima fueron recolectadas en la mañana; se ha obtenido las hojas frescas cuya superficie externa tienen una coloración verde y sin deterioro alguno por efectos físicos y biológicos.
- b) **Selección.** – Se seleccionó las hojas en estado verde que se encuentren en buen estado.
- c) **Lavado.** – En esta etapa se lavó con chorros fuertes de agua y frotamientos para retirar componentes solidos adheridos en las hojas.
- d) **Secado.** – Las hojas se secaron a una temperatura ambiente durante 3 días.
- e) **Molienda.** - una vez retiradas del ambiente de secado se procede al molido de las hojas secas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb); obteniendo partículas de hojas de diferentes tamaños.
- f) **Tamizado.** - Se utilizó tres tamices con N° malla (13, 25, 40) respectivamente, donde se obtuvo diferentes tamaños de partículas de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) Ver fig.9
- g) **Producto final.** – Obteniendo polvo con diferentes tamaños de partículas. Luego se hizo la **determinación de humedad:** En esta operación se hizo por el Método Destilación a Reflujo con solventes Inmiscibles con el agua:

- ✘ Se Pesó 5 g de muestra de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) y se colocó en el matraz del equipo.
- ✘ Se añadió 80 ml de tolueno (Pe 100°C)
- ✘ Se conectó el matraz al brazo colector y este al condensador de bolas del equipo
- ✘ Se calentó el matraz y contenido sobre manta calefactora y hasta que el contenido entre en ebullición
- ✘ Se ajustó la manta calefactora de modo que el contenido del matraz se mantenga justamente en ebullición y se continuará calentando durante al menos 1 ½ hr.
- ✘ Se desconectó la manta calefactora y se dejará que el aparato se enfríe, especialmente el brazo colector graduado.
- ✘ Se registró el volumen de agua en el brazo colector graduado.

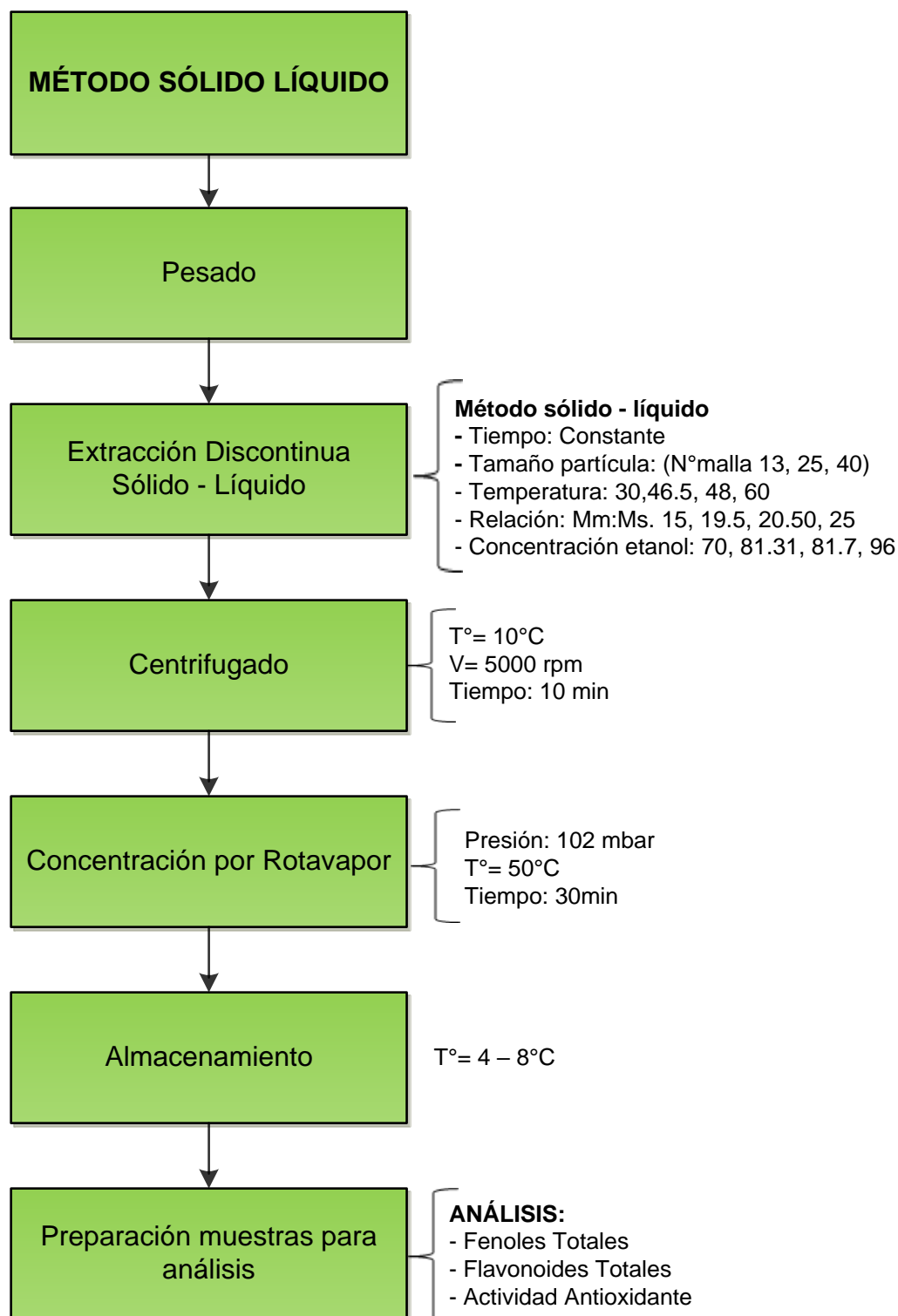


Figura 7. Diagrama de proceso de extracción discontinua de los antioxidantes de las hojas de Anona por el método de extracción sólido – líquido.

Fuente: Elaboración propia (2017)

3.5.2. Proceso de extracción del extracto de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) método de solido - liquido.

- a) **Pesado de la muestra.** - se realizó según la tabla (Matriz de Resultados la Extracción solido - liquido según Diseño D-optimal).
- b) **Extracción solido - liquido.** - En esta operación se ha extraído en un reactor por el método de Solido - Líquido, donde se acondicionó con los siguientes parámetros Tiempo: constante, Tamaño partícula (N° malla 13,25 ,40), Temperatura: 30, 46.5, 48, 60 °C, Relación Mm:Ms. 1:15, 1:19.5, 1:20.5, 1:25 g:g y Concentración etanol: (70, 81.31, 81.7, 96 %v/v).
- c) **Centrifugado.** - En esta etapa se centrifugó los extractos en una centrifuga refrigerante para separar los sólidos que se encuentren en el extracto, a una $V=5000$ rpm, $\theta=10$ min y $T^{\circ}= 10^{\circ}\text{C}$.
- d) **Concentración por Rotavapor.** - En esta operación las muestras extraídas se llevaron al equipo de Rotavapor para evaporar el solvente etanólico a una $T= 50^{\circ}\text{C}$, $\theta = 30$ min, $P = 102$ mbar y obteniendo el extracto acuoso de *Annona x atemoya* Mabb.
- Almacenamiento.** - Se almacenaron las muestras a una $T= 4-8^{\circ}\text{C}$
- e) **Preparación de las muestras para análisis.** - Se utilizaron tubos de ensayo donde se colocaron las muestras de extracto de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) todas codificadas para las respectivas corridas. Se analizaron de la muestra de extracto de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) los fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante:

Fenoles totales:

Se analizaron las muestras de extracto de hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) por espectrofotometría para el contenido de fenoles totales utilizando un Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Donde se utilizaron los reactivos siguientes: ácido gálico estándar, reactivo Folin – Ciocalteu, agua destilada y carbonato de sodio al 7%. Los análisis se realizaron por triplicado.

Flavonoides totales:

El contenido total de flavonoides se determinaron por el método colorimétrico descrito por Dewanto, V. et al. (2002), utilizando soluciones estándar de catequina en el intervalo de concentración 50-1000 mg / L. El contenido de flavonoides totales, expresada en mg por gramo de equivalentes de muestra de catequina (EqC $\mu\text{g} / \text{g}$) se calculará a partir de la ecuación de línea recta obtenida para la curva de calibración. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Ver fig.14

Actividad antioxidante:

La actividad antioxidante se determinaron por el método descrito por Brand-Williams, (1995). Donde se utilizó el DPPH (2,2 – difenil-1-picrilhidrazilo) como radical libre y metanol grado espectrofotométrico.

La reacción que describe al método es la siguiente:



El porcentaje de DPPH remanente fue calculado como:

$$\% \text{inhibición} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Donde:

Ac = absorbancia del control negativo

As = absorbancia de la muestra

3.6. Tratamientos de los datos

En la investigación se realizaron 21 tratamientos donde las variables independientes fueron las siguientes:

Tamaño partícula (N° malla), temperatura de extracción (°C), relación Masa muestra: Masa solvente (g:g) y concentración etanol (%v/v).

Tabla 7. Matriz de Diseño para la investigación Diseño D-Optimal

Tratamiento	Z1: Tamaño partícula (N° malla)	Z2: Temperatura extracción (°C)	Z3: Relación Mm:Ms (g:g)	Z4 : Concentración Etanol (% v/v)
1	40	60	1:25	96
2	13	60	1:25	96
3	13	60	1:19.5	70
4	40	60	1:19.5	70
5	25	60	1:15	81.31
6	40	60	1:15	96
7	13	60	1:15	96
8	40	30	1:25	96
9	13	30	1:25	96
10	13	46.5	1:25	81.7
11	25	60	1:25	70
12	40	30	1:25	70
13	13	30	1:25	70
14	13	30	1:15	70
15	25	30	1:15	70
16	13	30	1:15	96
17	40	30	1:15	96
18	25	46.5	1:20.5	96
19	40	30	1:19.5	81.7
20	40	48	1:15	70
21	13	48	1:15	70

Fuente: *Elaboración propia (2017).*

CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

4.1. Identificación botánica del Especimen

El especimen con la cual se ha trabajado fue identificado por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ver certificación del Anexo 6), cuyo resultado, nos indican que las muestras de hojas pertenecen a la familia *Annonaceae* y su nombre científico es *Annona x atemoya* Mabb, híbrido de *A. chirimolia* x *A. squamosa*.

4.2. Cuantificación de los antioxidantes en las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.)

4.2.1. Cuantificación de los fenoles totales expresados como porcentaje de ácido gálico

La curva de calibración establecida se puede observar en la Figura 8, observándose que los datos experimentales ajustan con una desviación del 0.323 % a una ecuación lineal, para un grado de confiabilidad del 95 % ($\alpha = 0.05$), tal como se observa en la Tabla 8. Estos son consistentes, comparado con datos obtenidos por (Vásquez, L. y Aristizabal, L. 2013)

$$\text{Concentración} = 0.0446 + 0.0089 (A)$$

Primeramente, se realizó la curva de calibración del ácido gálico para obtener la ecuación de la recta utilizada para la determinación.

Tabla 8. Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales utilizando como patrón Ácido gálico (longitud de onda de 725 nm)

Concentración AG (μg)	Absorbancia
0	0.024
10	0.122
20	0.218
40	0.452
60	0.581
80	0.757
100	0.930
120	1.099

Fuente: Elaboración propia (2017).

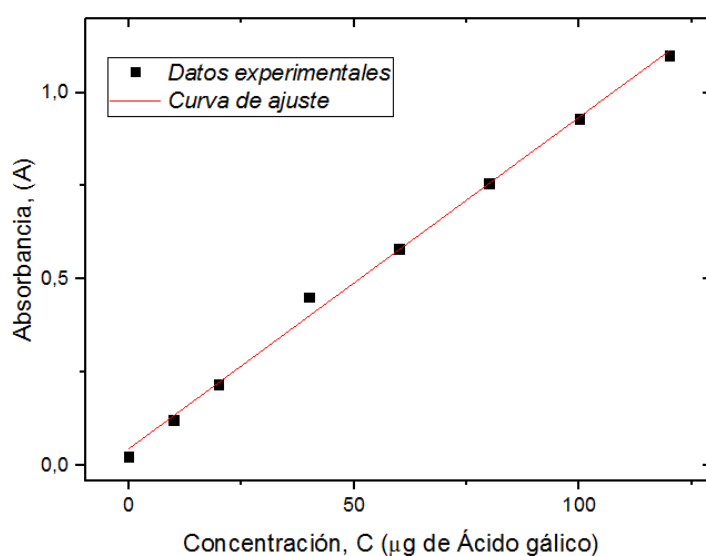


Figura 8. Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 9. Coeficiente de Determinación de la curva de calibración

Intercepto		Pendiente		Estadística
Valor	Error Estándar	Valor	Error Estándar	R^2_{Adj}
0,0446	0,01397	0.0089	2,067E-4	0,99623

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 10. Coeficiente de Modelo Ajustado para la curva de calibración

		Valor	Error estándar	t	P
Abs.	b0	0.0446	0.01397	3.19349	0.01875
	b1	0.0089	2.06763E-04	43.03552	1.05E-08

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) de la curva de calibración para cuantificar fenoles totales.

		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Abs.	Regresión	1	1.06	1.05998	1852.06	1.05E-08
	Residual	6	0.0034	5.72E-04		
	Total	7	1.063			

Fuente: Elaboración propia (2017).

4.2.2. Cuantificación de flavonoides totales.

La curva de calibración establecida se puede observar en la Figura 9, observándose que los datos experimentales ajustan con una desviación del 0.046 % a una ecuación lineal, para un grado de confiabilidad del 95 % ($\alpha = 0.05$), tal como se observa en la Tabla 12. Estos son consistentes, comparado con datos obtenidos por (Gracia, N. 2006).

$$\text{Concentración} = 0.04208 + 0.000398162(A)$$

Primeramente, se realizó la curva de calibración de la catequina para obtener la ecuación de la recta utilizada para la determinación.

Tabla 12. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales utilizando como patrón Catequina (longitud de onda de 510nm).

Concentración catequina (μg)	Absorbancia
200	0.117
400	0.207
600	0.280
800	0.358
1000	0.445
1600	0.677

Fuente: Elaboración propia (2017).

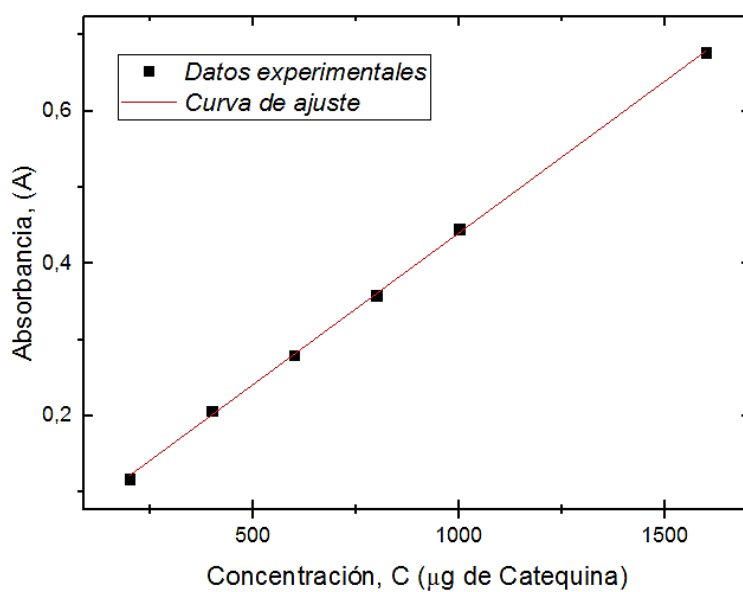


Figura 9. Curva de absorción vs. Concentración de catequina para cuantificación de flavonoides.

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 13. Coeficiente de Determinación de la curva de calibración

Intercepto		Pendiente		Estadística
Valor	Error Estándar	Valor	Error Estándar	R^2_{Adj}
0,04208	0,00379	3,982E-04	4,25E-06	0,99943

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 14. Coeficiente de Modelo Ajustado para la curva de calibración

		Valor	Error estándar	t	P
Abs.	b0	0,04208	0.00379	11,1114	3,73E-04
	b1	3,981E-04	4,25141E-06	93,6541	7,79E-08

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) de la curva de calibración para cuantificar flavonoides totales.

		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Abs.	Regresión	1	0,19552	1,19552	8771,08891	7,79E-08
	Residual	4	8,92E-05	2,22E-05		
	Total	5	0.19561			

Fuente: Elaboración propia (2017).

4.3. Evaluación de los parámetros de operación

4.3.1. Fenoles totales

El diseño experimental a utilizar es (D – optimal) de cuatro factores Z₁: Tamaño Partícula N° malla, Z₂: Temperatura °C, Z₃: Relación Mm:Ms g:g, Z₄: Concentración %v/v. Y₂: Fenoles totales µg EAG/mL. Se determinó 21 corridas mediante la metodología de superficie de respuesta (MRS) de manera aleatoria para garantizar la validez estadística de los resultados.

Tabla 16. Matriz de diseño con resultados de fenoles totales.

Corrida	Z1: Tamaño Particula malla #	Z2: Temperatura °C	Z3: Relación Mm:Ms g:g	Z4: Concentración %v/v	Y1: Fenoles totales µg EAG/mL
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1898,8
2	-1,000	1,000	1,000	1,000	1441,9
3	-1,000	1,000	-0,100	-1,000	1917,5
4	1,000	1,000	-0,100	-1,000	1581,9
5	-0,111	1,000	-1,000	-0,130	2278,6
6	1,000	1,000	-1,000	1,000	2103,3
7	-1,000	1,000	-1,000	1,000	2015,7
8	1,000	-1,000	1,000	1,000	1074,8
9	-1,000	-1,000	1,000	1,000	1065,8
10	-1,000	0,100	1,000	-0,100	1140,7
11	-0,111	1,000	1,000	-1,000	1444,1
12	1,000	-1,000	1,000	-1,000	1399,2
13	-1,000	-1,000	1,000	-1,000	1381,2
14	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	1668,1
15	-0,111	-1,000	-1,000	-1,000	1925
16	-1,000	-1,000	-1,000	1,000	1325,8
17	1,000	-1,000	-1,000	1,000	1240,4
18	-0,111	0,100	0,100	1,000	1232,1
19	1,000	-1,000	-0,100	-0,100	1427,6
20	1,000	0,200	-1,000	-1,000	2082,3
21	-1,000	0,200	-1,000	-1,000	1967

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la Tabla 17. Se puede apreciar los valores de $P < 0,05$, donde indican que los términos del modelo son significativos. En este caso la temperatura, Relación Mm:Ms, concentración de etanol, la combinación de la temperatura de extracción y la concentración de etanol son términos significativos del modelo. Este resultado es similar a lo reportado previamente por Chen, X. et al. (2013) quien reportó que el efecto de la concentración de etanol sobre el contenido de compuestos fenólicos a partir de hojas de *Ficus virens*, puede desnaturalizar las proteínas, lo que evita la disolución de los polifenoles que influye en la tasa de extracción. Por lo tanto, la polaridad de un solvente está determinada por su concentración y una cierta concentración logra una alta tasa de extracción (Spigno, G. et al. 2007).

Asimismo, Spigno, G. et al., (2007). Reportó a partir de las semillas de uva Los efectos de la temperatura en los compuestos fenólicos donde

mostraron una tendencia similar, la temperatura de extracción afecta la solubilidad, la velocidad de transferencia de masa y la estabilidad de los compuestos fenólicos (Spigno, G. et al., 2007).

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de extracción de los fenoles totales para el modelo polinomial cuadrático.

Fuente	GL	F	P	
	Error			
modelo	11,00	14,55	0,0001	significativo
b-Temperatura de extracción	11,00	40,55	0,0001	
c-Relación Mm:Ms	11,00	45,73	0,0001	
d-Concentración Etanol	11,00	9,71	0,0098	
Bc	11,00	3,69	0,0811	
Bd	11,00	7,16	0,0216	
Cd	11,00	4,82	0,0504	
b ²	11,00	2,89	0,1173	
c ²	11,00	2,26	0,1609	
Submodelo	11,00	1,23	0,2909	
A-Tamaño Partícula	11,00	1,23	0,2909	

Leyenda: F (Test de Fisher), P (Valor de probabilidad)

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la tabla 18. Muestra los resultados de análisis de regresión múltiple efectuada para los fenoles totales. Los datos ajustaron bien al modelo utilizado, presentando un $R^2 = 0,9140$ y R^2 ajustado 0,8089, esos resultados indican que el modelo ajustado obtenido explica el 80,89% de variación de los fenoles totales obtenidos en los ensayos.

Interpretación: En este caso, El 80,89% de las condiciones de extracción (temperatura de extracción, relación Mm:Ms, concentración etanol) explican los fenoles totales.

Tabla 18. Ajuste del coeficiente de determinación del modelo

Desviación Estandar	Media	Coeficiente de variación %	R ²	R ² ajustado
148,83	1600,56	9,30	0,9140	0,8089

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el ajuste de los datos experimentales con los predichos vs actual, se puede corroborar en la Figura 10. Donde los datos experimentales son los puntos de colores y los valores predichos se encuentran en la línea de recta, por lo tanto se puede apreciar que los valores experimentales no están tan dispersos de los predichos.

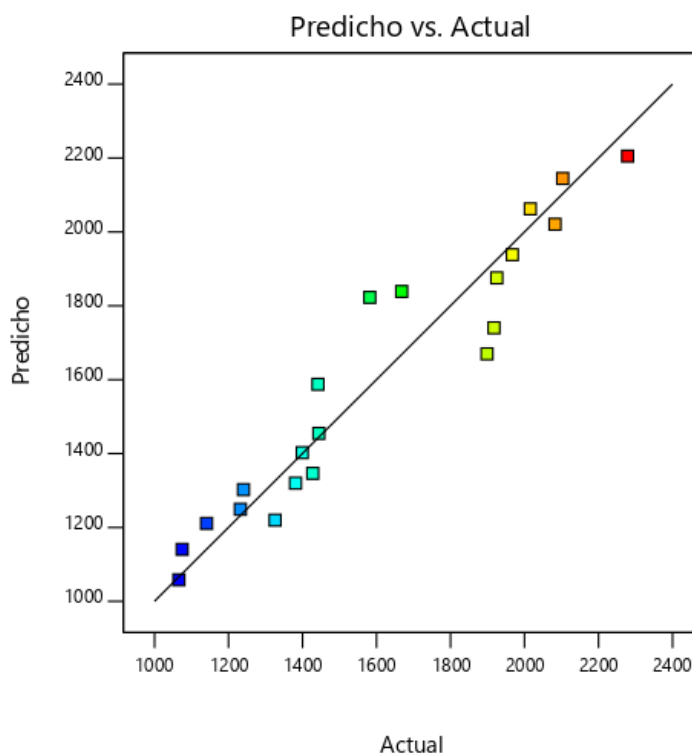


Figura 10. Linealidad de los valores experimentales con los predichos vs actual para el contenido de fenoles totales en el extracto de las hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

Como se puede apreciar en la figura de superficie de respuesta del valor de fenoles totales (Fig. 12) y figura de contorno (Fig. 11), el valor máximo de fenoles totales se encuentra en la región roja.

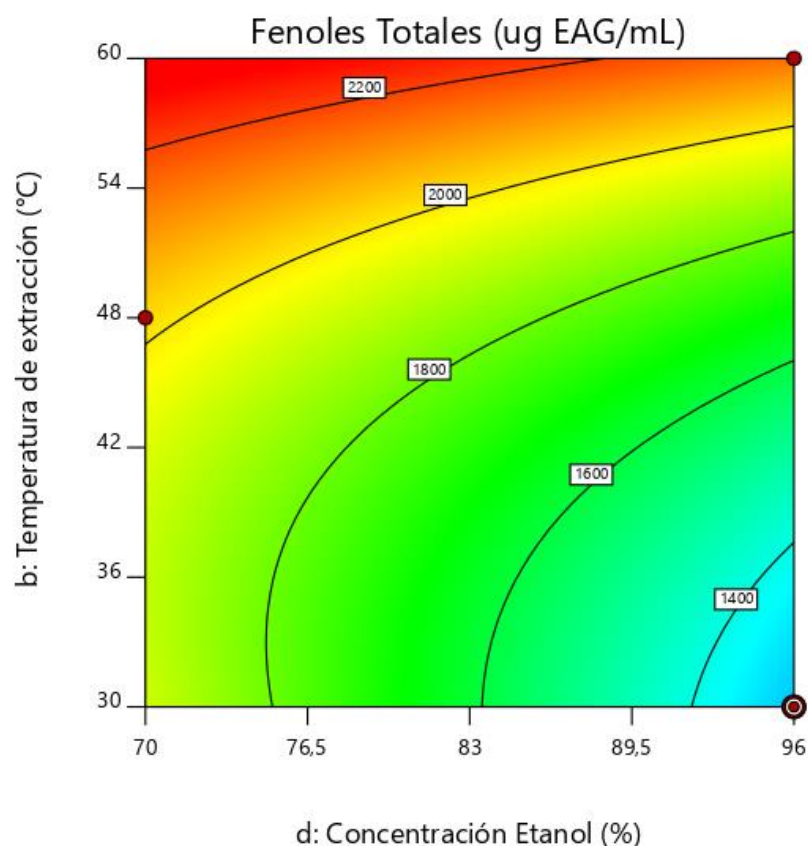


Figura 11. Gráfico de contornos del contenido de fenoles totales en el extracto de las hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la Figura 11 se puede observar cuando la temperatura aumenta de 30-60°C, y la concentración del etanol disminuye de 96 -70%, la concentración de los fenoles totales extraídos aumenta desde 2000 $\mu\text{gEAG/mL}$ hasta 2200 $\mu\text{gEAG/mL}$. Este resultado es similar a lo reportado previamente por Franco, D. et al. (2007) quien reportó que el contenido de compuestos fenólicos extraídos a partir de trigo y de la piel de *Mangifera pajang* Kosterm, respectivamente, aumentaba cuando la concentración de etanol en el solvente de extracción aumentaba desde aproximadamente 30 hasta un 70 %.

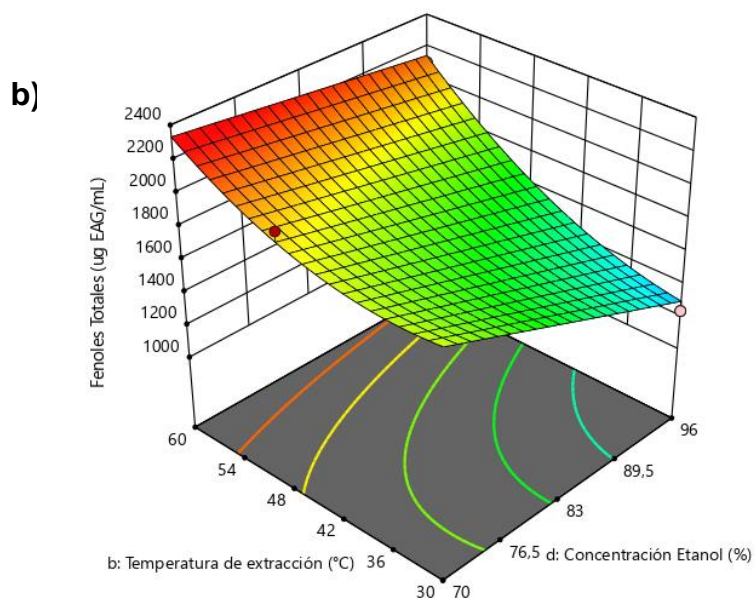
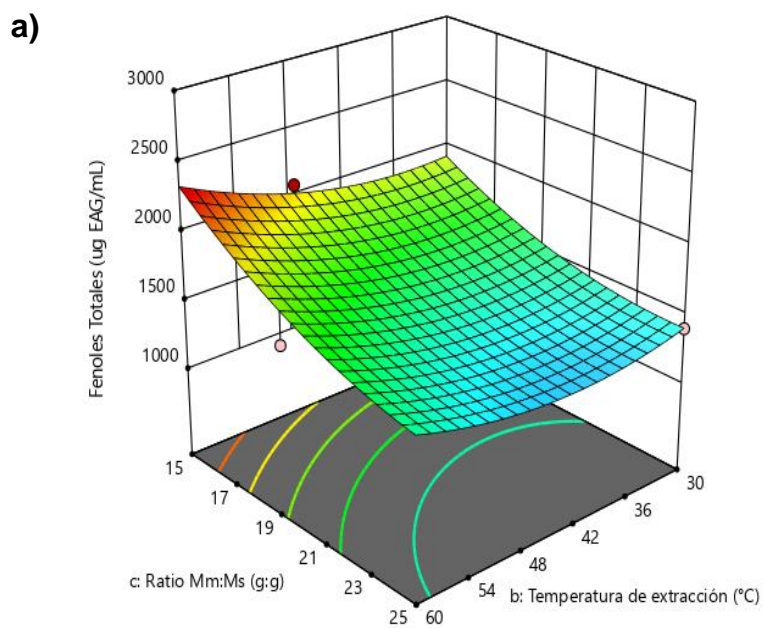


Figura 12. Gráficos de superficie de respuesta del contenido de fenoles totales en el extracto de hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

El gráfico superficie de respuesta para fenoles totales del extracto de hojas de Anona en función de la relación masa muestra: masa solvente

a la temperatura de extracción (tamaño partícula =40 N° malla) y (concentración del etanol = 70 %v/v). Se puede apreciar en la Fig. 12, cuando la relación masa muestra: masa solvente va desde 1:25 -1:15 g:g y la temperatura de 60 a 30°C los fenoles totales se incrementan a 2200 $\mu\text{gEAG/mL}$. También se puede apreciar en la fig. b, (tamaño partícula =40 N° malla) y (relación masa muestra: masa solvente = 1:15 g:g), cuando la temperatura de extracción aumenta de 30 – 60°C y la concentración del etanol disminuye de 96 a 70%, la concentración de los fenoles totales aumenta aproximadamente a 2200 $\mu\text{gEAG/mL}$.

Tabla 19. Coeficientes en términos de factores codificados

Fuente	Coeficiente estimado	Error estándar	VIF
Intercepta	1345,71	107,01	
Términos de la parcela completa:			
b-Temperatura de extracción	235,11	36,92	1,05
c-Relación Mm:Ms	-248,41	36,73	1,03
d-Concentración Etanol	-112,33	36,05	1,06
bc	-78,32	40,79	1,06
bd	107,83	40,30	1,11
cd	89,30	40,66	1,12
b ²	153,37	90,24	1,13
c ²	136,52	90,82	1,18
Términos de la sub parcela			
A-Tamaño Partícula	41,24	37,17	1,06

Fuente: Elaboración propia (2017)

Ecuación final en términos de factores codificados

Mediante la aplicación de la técnica de MSR el modelo matemático se presenta en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Fenoles totales} = & 1345.71 + 41.24A + 235.11b - 248.41c - 112.33d \\ & - 78.32b * c + 107.83b * d + 89.30c * d + 153.37b^2 + 136.52c^2 \end{aligned} \quad (\text{Ec. 1})$$

Ecuación final en términos de factores reales

Ecuación 2. Ecuación del modelo correspondiente de compuestos fenólicos totales.

$$\begin{aligned} \text{Fenoles totales} = & 9241.1 + 3.054T_p - 70.69T_E - 335.16R - 61.0C_E - 1.04T_E * R \\ & + 0.552T_E * C_E + 1.37R * C_E + 0.682T_E * A^2 + 5.46R^2 \end{aligned} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

T_p = Tamaño partícula

T_E = Temperatura de extracción

R = Relación Mm:Ms

C_E = Concentración del etanol

Tabla 20. Componentes de varianza.

Fuente	Varianza	Error estándar	95% CI bajo	95% CI alto
grupo	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Residual	22151,18	9445,29	11115,99	63857,18
Total	22151,18			

Fuente: Elaboración propia (2017)

4.3.2. Flavonoides totales

El diseño experimental a utilizar es (D – optimal) de cuatro factores Z1: Tamaño Partícula N° malla, Z2: Temperatura °C, Z3: Relación Mm:Ms g:g, Z4: Concentración %v/v. Y2: Flavonoides totales µg EqC/mL. Se determinó 21 corridas mediante la metodología de superficie de respuesta (MRS) de manera aleatoria para garantizar la validez estadística de los resultados.

Tabla 21. Matriz de diseño con resultados de flavonoides totales

Corrida	Z1: Tamaño Partícula N° malla	Z2: Temperatura °C	Z3: Relación Mm:Ms g:g	Z4: Concentración %v/v	Y2: Flavonoides totales µg EqC/mL
1	1,000	1,000	1,000	1,000	22898,3
2	-1,000	1,000	1,000	1,000	16431,7
3	-1,000	1,000	-0,100	-1,000	11231,7
4	1,000	1,000	-0,100	-1,000	8498,3
5	-0,111	1,000	-1,000	-0,130	16498,3
6	1,000	1,000	-1,000	1,000	31598,3
7	-1,000	1,000	-1,000	1,000	38631,7
8	1,000	-1,000	1,000	1,000	23781,7
9	-1,000	-1,000	1,000	1,000	22098,3
10	-1,000	0,100	1,000	-0,100	10465
11	-0,111	1,000	1,000	-1,000	9231,7
12	1,000	-1,000	1,000	-1,000	8698,3
13	-1,000	-1,000	1,000	-1,000	8065
14	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	11065
15	-0,111	-1,000	-1,000	-1,000	11531,7
16	-1,000	-1,000	-1,000	1,000	25781,7
17	1,000	-1,000	-1,000	1,000	24981,7
18	-0,111	0,100	0,100	1,000	20298,3
19	1,000	-1,000	-0,100	-0,100	11548,3
20	1,000	0,200	-1,000	-1,000	16148,3
21	-1,000	0,200	-1,000	-1,000	15648,3

Fuente: Elaboración propia (2017)

En este caso, el relación Mm:Ms y la concentración etanol son términos significativos del modelo.

Tabla 22. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de extracción de los flavonoides totales para el modelo polinomial cuadrático.

Fuente	GL Error	F	P		
modelo	6,46	10,26	0,0047	Significante	
b-Temperatura de extracción	6,25	1,27	0,3019		
c-Relación Mm:Ms	6,31	9,08	0,0222		
d-Concentración Etanol	6,08	44,66	0,0005		
cd	5,90	0,8775	0,3856		
c ²	7,11	1,84	0,2160		
d ²	7,75	2,16	0,1806		
submodelo	6,99	2,01	0,2038		Insignificante
A-Tamaño Partícula	7,14	0,0058	0,9413		
Ac	6,86	4,03	0,0856		

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la tabla 23. Muestra los resultados de análisis de regresión múltiple efectuada para los flavonoides totales. Los datos ajustaron bien al modelo utilizado, presentando un $R^2 = 0,944$ y R^2 ajustado 0,8879, esos resultados indican que el modelo ajustado obtenido explica el 88,79% de variación de los flavonoides totales obtenidos en los ensayos.

Interpretación: En este caso, El 88,79% de las condiciones de extracción (relación Mm:Ms, concentración etanol) explican los flavonoides totales.

Tabla 23. Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado para los flavonoides totales.

Desviación Estandar	Media	Coeficiente de variación %	R^2	R^2 ajustado
3595,27	17387,22	20,68	0,944	0,8879

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el ajuste de los datos experimentales con los predichos vs actual, se puede corroborar en la Figura 13.

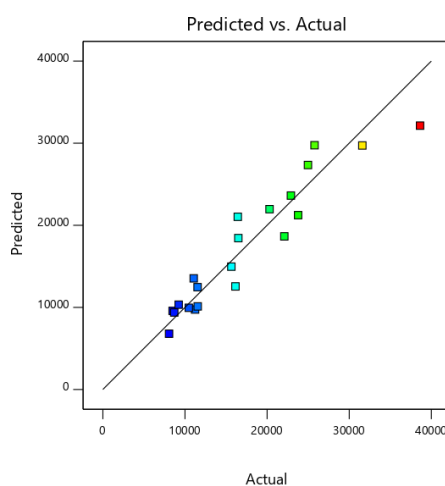


Figura 13. Linealidad de los valores experimentales con los predichos para el contenido de flavonoides totales en el extracto de las hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

Como se puede apreciar en la figura de superficie de respuesta del valor de fenoles totales (Fig. 15) y figura de contorno (Fig. 14), el valor máximo de flavonoides totales se encuentra en la región amarillo.

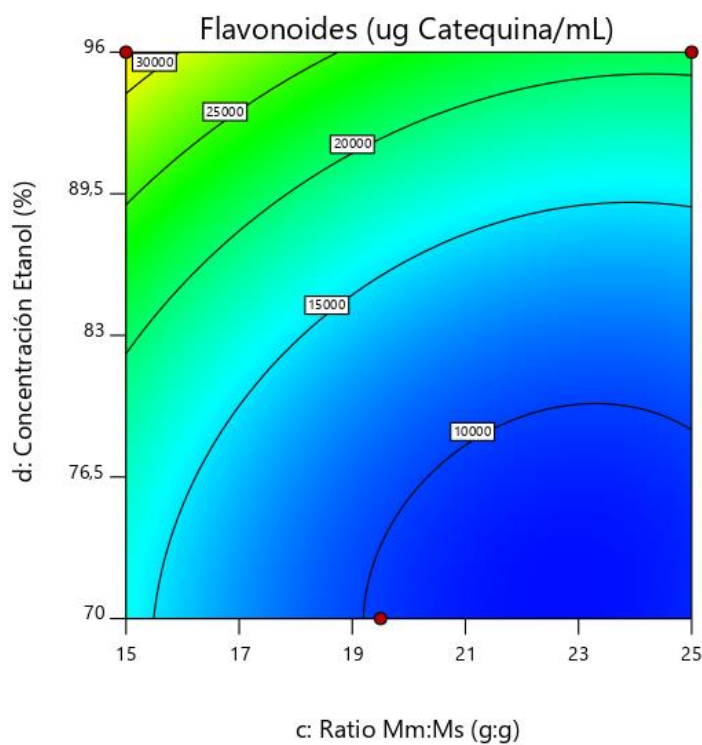
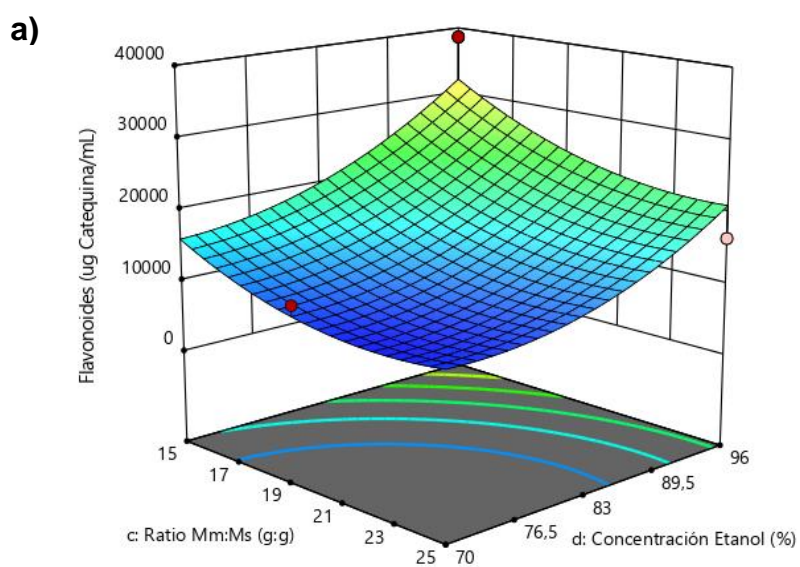


Figura 14. Gráfico de contornos del contenido de flavonoides totales.

Fuente: Elaboración propia (2017)



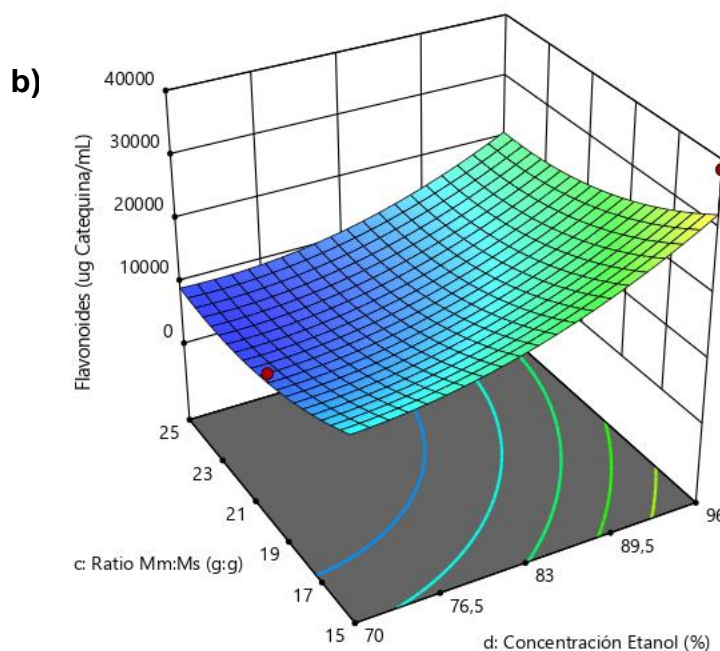


Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta del contenido de flavonoides totales en el extracto de hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)

El gráfico superficie de respuesta para flavonoides totales del extracto de hojas de Anona en función de la relación masa muestra: masa solvente a la concentración etanol (tamaño partícula =13 N° malla) y (temperatura = 60 °C). Se puede apreciar en la Fig. 15, cuando la relación masa muestra: masa solvente va desde 1:25 -1:15 g:g y la concentración del etanol de 96 a 70% los flavonoides totales se incrementan a 30000 µgEC/mL.

Ecuación final en términos de factores codificados

$$\text{Flavonoides totales} = 11724.09 + 43.99A + 1192.14b - 3210.89c + 7018.53d + 1249.09A * c - 1090.43c * d + 3175.33c^2 + 3522.47d^2$$

(Ec. 3)

Ecuación final en términos de factores reales

Ecuación 4. Ecuación del modelo correspondiente de compuestos flavonoides totales.

$$\text{Flavonoides totales} = 1.588e^{05} - 314.45T_p + 91.19T_E - 5030.81R - 2720,85C_E + 16.47T_p * R - 16.93R * C_E + 133.70R^2 + 21.68C_E * A^2$$

(Ec. 4)

Donde: T_p = Tamaño partícula T_E = Temperatura de extracción R = Relación Mm:Ms C_E = Concentración del etanol**Tabla 24.** Coeficientes en términos de factores codificados

Fuente	Coeficiente estimado	Error estándar	VIF
Intercepta	11724,09	2630,52	
Términos de la parcela completa:			
b-Temperatura de extracción	1192,14	1059,79	1,01
c-Relación Mm:Ms	-3210,89	1065,49	1,01
d-Concentración Etanol	7018,53	1050,25	1,01
cd	-1090,43	1164,03	1,01
b ²	3175,33	2338,51	1,04
c ²	3522,47	2394,07	1,03
Términos de la sub parcela			
A-Tamaño Partícula	43,99	576,54	1,02
Ac	1249,09	622,32	1,02

*Fuente: Elaboración propia (2017)***Tabla 25.** Componentes de varianza

Fuente	Varianza	Error estándar	95% CI bajo	95% CI alto
Grupo	8,123E+06	6,376E+06	-4,375E+06	2,062E+07
Residual	4,803E+06	2,635E+06	2,064E+06	2,094E+07
Total	1,293E+07			

Fuente: Elaboración propia (2017)

4.3.3. Actividad antioxidante

El diseño experimental a utilizar es (D – optimal) de cuatro factores Z1: Tamaño Partícula N° malla, Z2: Temperatura °C, Z3: Relación Mm:Ms g:g, Z4: Concentración %v/v. Y2: Actividad antioxidante % inhibición. Se determinó 21 corridas mediante la metodología de superficie de respuesta (MRS) de manera aleatoria para garantizar la validez estadística de los resultados.

Tabla 26. Matriz de diseño con resultados de Actividad antioxidante

Corrida	Z1: Tamaño Particula malla #	Z2: Temperatura °C	Z3: Relación Mm:Ms g:g	Z4: Concentración %v/v	Y3: Actividad antioxidante % inhibición
1	1,000	1,000	1,000	1,000	104,28
2	-1,000	1,000	1,000	1,000	117,54
3	-1,000	1,000	-0,100	-1,000	83,19
4	1,000	1,000	-0,100	-1,000	102,97
5	-0,111	1,000	-1,000	-0,130	80,01
6	1,000	1,000	-1,000	1,000	96,75
7	-1,000	1,000	-1,000	1,000	114,07
8	1,000	-1,000	1,000	1,000	124,68
9	-1,000	-1,000	1,000	1,000	125,78
10	-1,000	0,100	1,000	-0,100	113,84
11	-0,111	1,000	1,000	-1,000	127,69
12	1,000	-1,000	1,000	-1,000	128,24
13	-1,000	-1,000	1,000	-1,000	116,93
14	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	112,38
15	-0,111	-1,000	-1,000	-1,000	81,56
16	-1,000	-1,000	-1,000	1,000	121,77
17	1,000	-1,000	-1,000	1,000	127,8
18	-0,111	0,100	0,100	1,000	118,27
19	1,000	-1,000	-0,100	-0,100	80,15
20	1,000	0,200	-1,000	-1,000	94,12
21	-1,000	0,200	-1,000	-1,000	79,26

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la tabla 27. Se puede apreciar los valores de $p < 0,05$, indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, de la combinación de tamaño de partícula y concentración de etanol, (Tamaño de partícula)² son términos significativos del modelo.

Tabla 27. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de extracción de los antioxidantes para el modelo polinomial cuadrático.

Fuente	Error df	F	P	
Modelo	2,14	0,2824	0,9287	Insignificante
b-Temperatura de extracción	2,15	0,0012	0,9757	
c-Relación Mm:Ms	2,10	0,7296	0,4793	
d-Concentración Etanol	2,10	0,1417	0,7413	
bc	2,11	0,2183	0,6842	
bd	2,09	0,1310	0,7508	
cd	2,09	0,6781	0,4936	
b ²	2,14	0,1922	0,7014	
c ²	2,14	0,2533	0,6619	
d ²	2,15	0,4441	0,5695	
Submodelo	4,80	5,03	0,0603	Insignificante
A-Tamaño Partícula	4,40	1,24	0,3223	
Ad	4,36	8,89	0,0365	
A ²	6,05	9,36	0,0220	

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la tabla 28. Muestra los resultados de análisis de regresión múltiple efectuada para la actividad antioxidante. Los datos ajustaron bien al modelo utilizado, presentando un $R^2 = 0,931$ y R^2 ajustado 0,7691, esos resultados indican que el modelo ajustado obtenido explica el 76,91% de variación de los fenoles totales obtenidos en los ensayos.

Interpretación: En este caso, El 76,91% de las condiciones de extracción (tamaño de partícula y concentración de etanol, Tamaño de partícula) explican la actividad antioxidante.

Tabla 28. Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado para la actividad antioxidante

Desviación Estandar	Media	Coeficiente de variación %	R ²	R ² ajustado
32,80	107,20	30,60	0,931	0,7691

Fuente: Elaboración propia (2017)

En el ajuste de los datos experimentales con los predichos vs actual, se puede corroborar en la Fig. 16. Donde los datos experimentales son los puntos de colores y los valores predichos se encuentran en la línea de recta, por lo tanto se puede apreciar que los valores experimentales no están dispersos de los predichos

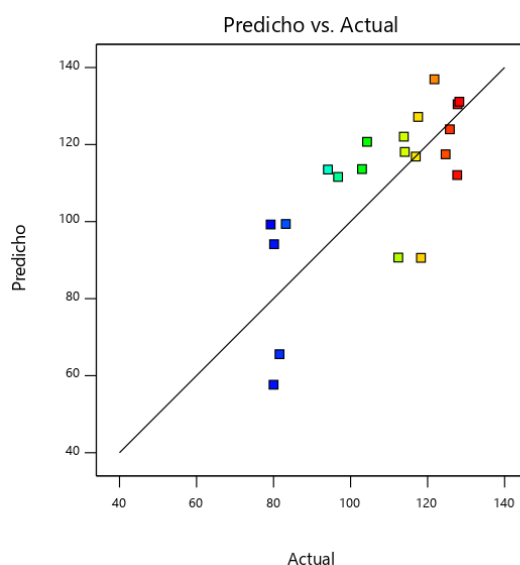


Figura 16. Linealidad de los valores experimentales con los predichos para la actividad antioxidante en el extracto de las hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017).

Como se puede apreciar en la figura de superficie de respuesta del valor de fenoles totales (Fig. 18) y figura de contorno (Fig. 17), el valor máximo de Actividad antioxidante se encuentra en la región roja.

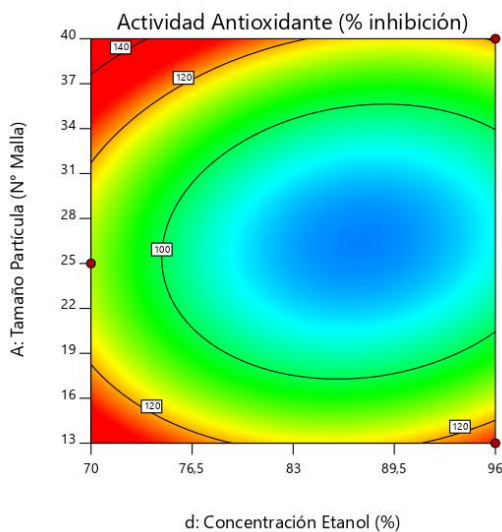


Figura 17. Gráfico de contornos de la actividad antioxidante en el extracto de las hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

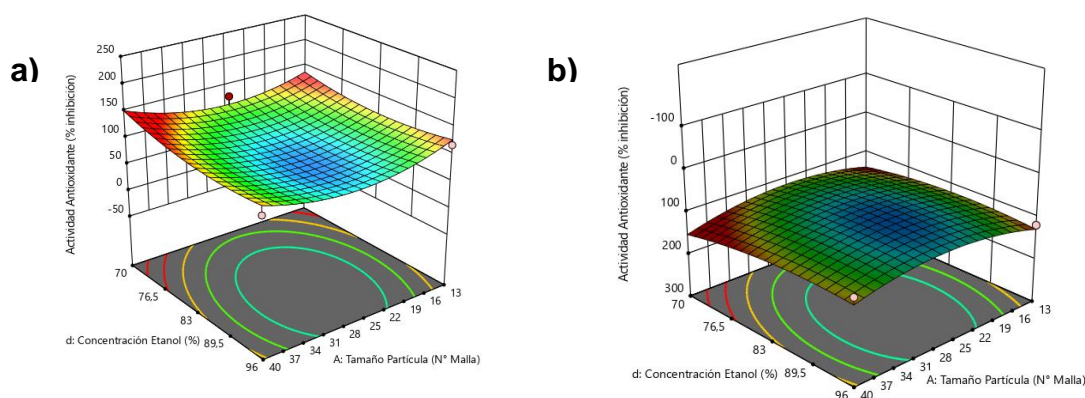


Figura 18. Gráfico de superficie de respuesta de la actividad antioxidante en el extracto de hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

El gráfico superficie de respuesta para la actividad antioxidante del extracto de hojas de Anona en función del tamaño de partícula a la concentración etanol (temperatura = 60°C) y (relación Mm:Ms= 1:25 g:g).

Se puede apreciar en la Fig. 18, cuando la concentración del etanol disminuye y el tamaño partícula va de 13 a 40 (N°malla) el porcentaje de inhibición aumenta aproximadamente a 120% -140%. Esto está

corroborado con el ajuste de los datos al modelo matemático, cuyo análisis estadístico establece que el coeficiente de determinación del modelo ajustado es de 93.10 %, indicativo que sólo el 6.9 % de los datos están dispersos a la superficie del modelo planteado.

Tabla 29. Coeficientes en términos de factores codificados

Fuente		Coeficiente estimado	Error estándar	VIF
Intercepto		71,28	28,77	
Terminos de la parcela:				
b-Temperatura de extracción	de	0,3559	10,45	1,03
c-Relación Mm:Ms		8,83	10,34	1,01
d-Concentración Etanol		3,89	10,34	1,01
bc		5,52	11,82	1,06
bd		-4,26	11,78	1,06
cd		-9,80	11,90	1,08
b ²		-10,08	22,99	1,10
c ²		11,32	22,50	1,07
d ²		15,08	22,63	1,08
Sub términos de la parcela:				
A-Tamaño Partícula		1,94	1,74	1,05
Ad		-5,18	1,74	1,04
A ²		31,81	10,40	1,08

Fuente: Elaboración propia (2017)

Ecuación final en términos de factores codificados

$$\text{Actividad antioxidante} = 71.28 + 1.94A + 0.36b + 8.83c + 3.89d - 5.18A * d + 5.52b * c - 4.26b * d - 9.80c * d + 31.81A^2 - 10.08b^2 + 11.32c^2 + 15.08d^2$$

(Ec. 5)

Ecuación final en términos de factores reales

Ecuación 6. Ecuación del modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de DPPH.

$$\text{Actividad antioxidante} = 580.88 + 1.723T_p + 2.00T_E - 5.761R - 12.793C_E - 0.02T_p * C_E + 0.039T_E * R - 0.015T_E * C_E - 0.1273R * C_E - 0.002T_p * A^2 - 0.021T_E * A^2 + 0.4145R * A^2 + 0.1021C_E * A^2$$

(Ec. 6)

Donde: T_p = Tamaño partícula T_E = Temperatura de extracción R = Relación Mm:Ms C_E = Concentración del etanol**Tabla 30.** Componentes de varianza

Fuente	Varianza	Error estándar	95% CI bajo	95% CI alto
Grupo	1034,91	1039,87	-1003,20	3073,02
Residual	41,03	27,98	15,13	303,38
Total	1075,94			

Fuente: Elaboración propia (2017)

4.4. Optimización de los parámetros de extracción sobre el contenido de la actividad antioxidante

Las condiciones óptimas de extracción se determinaron mediante el Método de Superficie de Respuesta (MSR) utilizando el Software Design-Expert® Versión 11, analizando el efecto de las variables temperatura de extracción (T), tamaño de partícula (N° malla), relación Mm:Ms y concentración etanol (%) sobre las variables respuesta: Concentración de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante. El diseño completo consistió de 21 corridas experimentales. Los promedios de los datos obtenidos fueron analizados ajustándose al modelo polinomial cuadrática siguiente:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i < j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ec.7.})$$

Donde y es la actividad antioxidante, $0, i, ii, ij$ son coeficientes constantes de los términos de intersección, lineal, cuadrático e interacción, respectivamente mientras que x_i y x_j son las variable independiente;

temperatura extracción, relación Mm:Ms, concentración etanol y tamaño partícula.

Para determinar los parámetros óptimos de extracción se procedió a transformar las variables (fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante) en una variable llamada “Desirability” o deseable, por lo cual se requiere determinar el valor máximo de concentración de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante en el extracto de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.).

El perfil de deseabilidad para los fenoles totales, flavonoides totales y una capacidad antioxidante óptimos. Indica que la máxima conveniencia de 0,80 (en una escala de 0 a 1) se puede lograr para tamaño partícula a 13 (N°malla), temperatura de extracción a 58,24 °C, relación masa muestra: masa solvente de 1:15 g:g, y concentración etanol 96% v/v. En estas condiciones, los fenoles totales, flavonoides totales fueron 31998,78 µgEC /mL y 1978,93 µgEAG/mL respectivamente. La capacidad antioxidante medida por el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) fue 121,43 % inhibición.

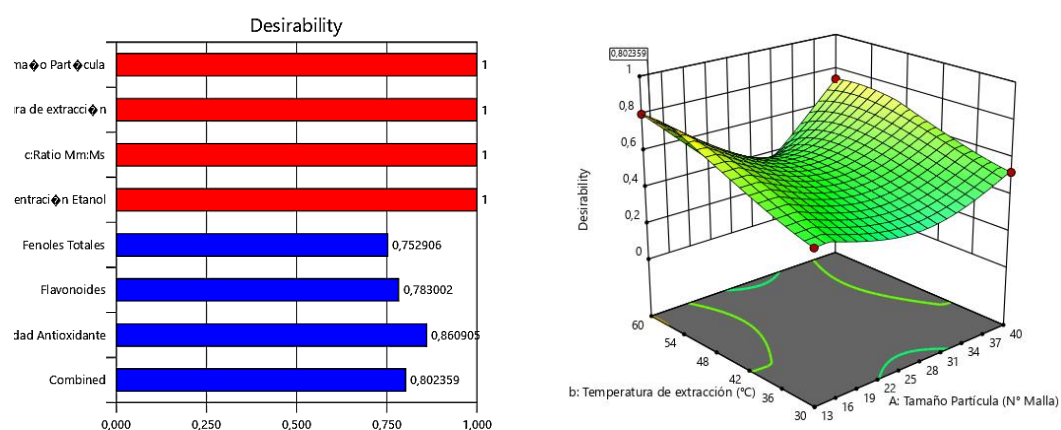


Figura 19. Gráfico de barras de desirability de la actividad antioxidante en el extracto de hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

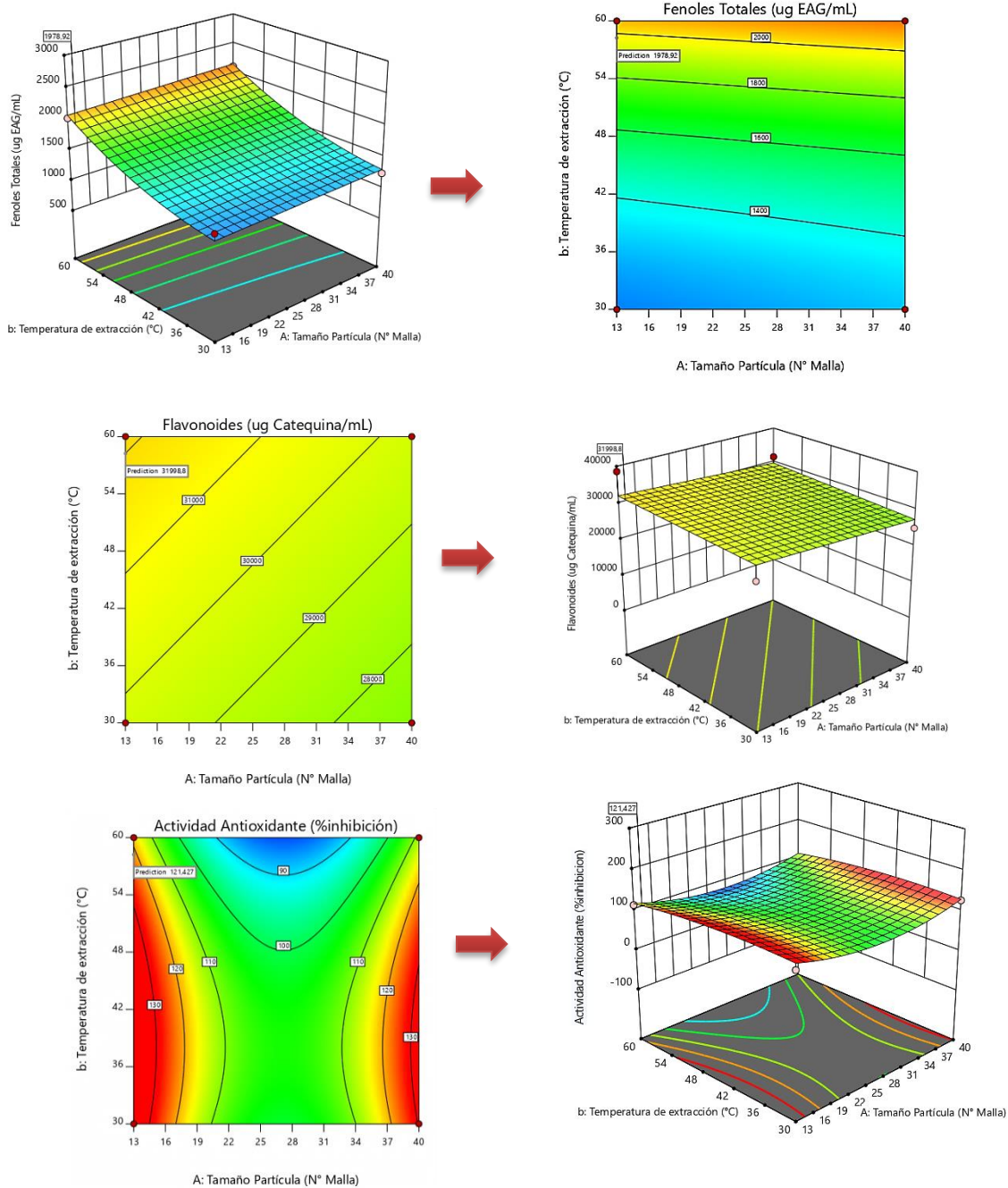


Figura 20. Gráfico superficies de respuesta y contornos de la actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides en el extracto de las hojas de Anona.

Fuente: Elaboración propia (2017)

Tabla 31. Ajuste del modelo de optimización

respuesta	media pronosticada	mediana predicha	Total desviación estandar	SE media	Error df	95% CI bajo para media	95% CI alto para media	95% TI bajo para 99%	95% TI alto para 99%
Fenoles Totales	1715,93	1715,93	158,201	126,93	9	1428,8	2003,07	812,84	2619,03
Flavonoides totales	21555,5	21555,5	3111,96	2665,29	4,62511	14533,7	28577,3	-1370,27	44481,3
Actividad Antioxidante	120,711	120,711	32,8015	30,1037	2,13278	-1,3864	242,808	-308,799	550,22

Fuente: Elaboración propia (2017)

Tabla 32. Coeficientes del modelo de ajuste de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante

	interceptar	A	b	c	d	Ab	Ac	Ad	bc	bd	cd	A2	b2	c2	d2
Fenoles totales	1356,99	40,0473	237,321	-243,648	-109,118		23,0867	27,2312	-80,5281	104,974	84,5611		140,917	134,096	
p-valor		0,3388	0,0002	0,0002	0,0196		0,6134	0,5290	0,0970	0,0372	0,0850		0,1838	0,1991	
Flavonoi des	10595,7	62,7493	1329,41	-3389,3	6907,34	-318,028	1154,78		-1985,51		-	1165,39	-623,192	3238,84	4301,02
p-valor		0,9328	0,2427	0,0333	0,0062	0,6940	0,1904		0,1485		0,4369	0,5977	0,7834	0,1931	0,1010
Activida d antioxida nte	71,2806	1,94343	0,35590 5	8,83127	3,89247			-5,18187	5,52119	-	-	31,8078	-10,0798	11,323	15,083 1
p-valor		0,3223	0,9757	0,4793	0,7413			0,0365	0,6842	0,7508	0,4936	0,0220	0,7014	0,6619	0,5695

Fuente: Elaboración propia (2017)

Tabla 33. Comparación entre los resultados estimados mediante el modelo de extracción y los obtenidos experimentalmente.

Corrida	Tamaño Partícula (N°malla)	Temperatura (°C)	Relación Mm:Ms (g:g)	Concentración (%w/v)	Fenoles totales			Flavonoides totales			Actividad antioxidante		
					FT (µg EAG/mL)	FT (µg EAG/mL)	Desv.(%)	Ft (µg EqC/mL)	Ft (µg EqC/mL)	Desv.(%)	DPPH (% inhib.)	DPPH (% inhib.)	Desv.(%)
					Experimental	Calculado		Experimental	Calculado		Experimental	Calculado	
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1898,8	1670,02	228,78	22898,3	23624,32	-726,02	104,28	120,71	-16,43
2	-1,000	1,000	1,000	1,000	1441,9	1587,54	-145,64	16431,7	21038,17	-4606,47	117,54	127,19	-9,65
3	-1,000	1,000	-0,100	-1,000	1917,5	1740,42	177,08	11231,7	9744,89	1486,81	83,19	99,39	-16,2
4	1,000	1,000	-0,100	-1,000	1581,9	1822,9	-241	8498,3	9583,05	-1084,75	102,97	113,64	-10,67
5	-0,111	1,000	-1,000	-0,130	2278,6	2205,06	73,54	16498,3	18441,71	-1943,41	80,01	57,66	22,35
6	1,000	1,000	-1,000	1,000	2103,3	2144,88	-41,58	31598,3	29728,78	1869,52	96,75	111,61	-14,86
7	-1,000	1,000	-1,000	1,000	2015,7	2062,4	-46,7	38631,7	32138,98	6492,72	114,07	118,09	-4,02
8	1,000	-1,000	1,000	1,000	1074,8	1140,77	-65,97	23781,7	21240,04	2541,66	124,68	117,48	7,2
9	-1,000	-1,000	1,000	1,000	1065,8	1058,3	7,5	22098,3	18653,89	3444,41	125,78	123,96	1,82
10	-1,000	0,100	1,000	-0,100	1140,7	1211,02	-70,32	10465	9957,09	507,91	113,84	122,05	-8,21
11	-0,111	1,000	1,000	-1,000	1444,1	1454,61	-10,51	9231,7	10331,36	-1099,66	127,69	112,09	15,6
12	1,000	-1,000	1,000	-1,000	1399,2	1402,5	-3,3	8698,3	9383,84	-685,54	128,24	131,14	-2,9
13	-1,000	-1,000	1,000	-1,000	1381,2	1320,03	61,17	8065	6797,69	1267,31	116,93	116,89	0,0402
14	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	1668,1	1838,81	-170,71	11065	13536,78	-2471,78	112,38	90,66	21,72
15	-0,111	-1,000	-1,000	-1,000	1925	1875,47	49,53	11531,7	12465,58	-933,88	81,56	65,58	15,98
16	-1,000	-1,000	-1,000	1,000	1325,8	1219,89	105,91	25781,7	29754,7	-3973	121,77	136,95	-15,18
17	1,000	-1,000	-1,000	1,000	1240,4	1302,36	-61,96	24981,7	27344,51	-2362,81	127,8	130,47	-2,67
18	-0,111	0,100	0,100	1,000	1232,1	1249,29	-17,19	20298,3	21967,16	-1668,86	118,27	90,59	27,68
19	1,000	-1,000	-0,100	-0,100	1427,6	1346,49	81,11	11548,3	10126,34	1421,96	80,15	94,13	-13,98
20	1,000	0,200	-1,000	-1,000	2082,3	2020,77	61,53	16148,3	12557,15	3591,15	94,12	113,51	-19,39
21	-1,000	0,200	-1,000	-1,000	1967	1938,29	28,71	15648,3	14967,35	680,95	79,26	99,26	-20

Fuente: Elaboración propia (2017)

4.4.1. Efectos de la concentración de etanol en fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante

El efecto de la concentración de etanol en la extracción de los fenólicos totales fue significativo ($p < 0,05$) de etanol sobre la concentración de fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante, que se confirmó mediante la prueba de Fisher. Los cambios en la concentración de etanol modifican las propiedades físicas del solvente, incluyendo su densidad, viscosidad dinámica y constante dieléctrica (Cacace y Mazza 2003). Por lo tanto, la polaridad de un solvente está determinada por su concentración y una cierta concentración logra una alta tasa de extracción (Spigno, G. et al. 2007). La concentración de dichos compuestos se maximizó cuando se usó la concentración de etanol al 70%, mostrando una ligera disminución con incrementos adicionales de etanol. Cabe precisar que el etanol es un disolvente de menor polaridad que el agua. La polaridad del etanol se incrementará con la adición de agua (Zhang, Z. et al. 2007). Asimismo, la combinación del etanol con agua contribuye a la creación de un medio que asegura eficacia en la extracción de los compuestos fenólicos (Lapornik, B. et al. 2005).

Los fenoles totales del extracto de las hojas generado se extraeron mediante extracción discontinua sólido-líquido. Bajo diferentes concentraciones de etanol, la concentración de los fenoles totales aumentó al principio cuando la concentración de etanol aumentó desde niveles bajos, y luego disminuyó después de alcanzar un máximo de (2200 μg EAG/mL) en etanol al 70%v/v. La concentración de los flavonoides mostró una tendencia similar, con el valor más alto de (3000 μg E Catequina/mL) a 70%v/v de etanol.

4.4.2. Efectos de la temperatura de extracción en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante

Las temperaturas de extracciones para cada condición de operación se llevaron a cabo a temperaturas de rango de 30 a 60 ° C. Como la temperatura afecta la estabilidad de los polifenoles, los valores más de 60°C no se seleccionaron como temperatura de extracción. Además, los valores de temperatura más altos de 60 ° C puede dar lugar a la desnaturalización de las membranas vegetales (Pinelo, M. et al. 2005). Investigando más a fondo el efecto de la temperatura en la eficiencia de extracción debido a la temperatura de extracciones impacta la solubilidad, la tasa de transferencia de masa, y estabilidad de los compuestos fenólicos (Spigno, G. et al. 2007). La concentración de fenoles totales aumentó con el aumento de la temperatura antes de llegar a 60 ° C con un valor de (2200 mgEAG/mL), y luego aumentado los efectos de la temperatura en la concentración de los flavonoides totales mostraron una tendencia similar. La temperatura en la actividad antioxidante no fue significativa. Los resultados del análisis ANOVA de los efectos de la temperatura sobre los fenoles totales mostraron p valores de 0,0001.

4.4.3. Efectos de la relación de sólidos a solventes en fenoles totales, flavonoides totales actividad antioxidante

El efecto de la relación Masa muestra: Masa solvente en la extracción de compuestos fenólicos totales fue significativo ($p < 0,05$) sobre la concentración de fenoles totales y flavonoides totales, que se confirmó mediante el ANOVA. Tabla 15,20.

La influencia del porcentaje de la relación Masa muestra: Masa solvente (g:g) en la concentración de extracción de fenoles totales fue investigado en un rango de concentración de etanol de 70 – 96 % v/v con un tamaño de partícula (N° malla) 13 - 40. En la figura 11 muestra el valor de la concentración de los fenoles totales extraídos donde aumentó la temperaturas a 60 °C con disminución de carga sólidos aproximadamente 1:15 (g:g). Rakotondramasy-Rabesiaka et al. (2007)

también informaron que el aumento de la carga sólida reduce el porcentaje de recuperación del etanol. Dado que inicialmente el solvente está libre de cualquier soluto, las moléculas de los fenoles experimentan una gran fuerza impulsora para que se disuelva en el solvente, pero en las etapas posteriores, la diferencia de concentración disminuye afectando la velocidad de la disolución y, por lo tanto, la liberación de los fenoles totales es bastante rápido inicialmente, y luego se ralentiza antes de alcanzar el equilibrio. El extraído la concentración de equilibrio de los fenoles totales cuando se compara con la cantidad máxima de fenoles presente en la muestra seca presenta una disminución a mayores cargas. A mayores cargas sólidas, la naturaleza de la suspensión también es diferente a la de la menor carga de sólidos debido a la velocidad crítica de la suspensión aumenta con el aumento de la carga sólida.

Por lo tanto, las condiciones óptimas de extracción de los fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante fueron los siguientes: tamaño partícula (N°malla) a 13, temperatura de extracción a 58,24 °C, relación masa muestra: masa solvente de 1:15, y concentración etanol 96 %v/v. Como resultado, 1978,93 µgEAG/mL fenoles totales, 31998,78 µgEC /mL, flavonoides totales y actividad antioxidante 121,43 % inhibición.

4.4.4. Efectos del tamaño de partícula en fenoles totales, flavonoides totales actividad antioxidante

El tamaño de partícula en combinación con la concentración del etanol tendría un efecto significativo ($p < 0,05$) en la extracción de los antioxidantes. Con un tamaño de partícula reducido, la actividad antioxidante esperado aumentó a 140 el porcentaje de inhibición. Según Taralkar, S. et al. (2016), las partículas más pequeñas tienen una trayectoria difusional más corta y más alta superficie específica, ambos factores ayudan a aumentar la recuperación del soluto. La partícula de mayor tamaño, por el contrario, muestra un aumento en la concentración del etanol.

CONCLUSIONES

En la investigación se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con el objetivo de optimizar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes presentes en el extracto de hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.). A partir de los resultados se han obtenido las siguientes conclusiones:

- ✎ Las condiciones operativas óptimas de extracción fueron las siguientes: Tamaño partícula 13 (N° malla), temperatura de extracción 58,24 (°C), relación masa muestra: masa solvente 1:15 (g:g) y concentración etanol 96 (%v/v) en la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante en las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.) empleando la extracción discontinua sólido - líquido.
- ✎ En la evaluación de los parámetros de operación: tamaño partícula (N°malla), temperatura de extracción (°C), relación masa muestra: masa solvente (g:g) y concentración etanol (%), El efecto del tamaño de partícula reducido aproximadamente 40 (N° malla), la actividad antioxidante esperado aumentó a 140 el porcentaje de inhibición; La concentración de fenoles totales aumentó con el aumento de la temperatura antes de llegar a 60 ° C con un valor de (2200 mgEAG/mL), Como la temperatura afecta la estabilidad de los polifenoles, los valores más de 60°C no se seleccionaron como temperatura de extracción; la concentración de los fenoles totales extraídos donde aumentó la temperaturas a 60 °C con disminución de carga sólidos aproximadamente 1:15 (g:g); La concentración de los fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante se maximizó cuando se usó la concentración de etanol al 70%v/v, cabe precisar que el etanol es un disolvente de menor polaridad que el agua, la polaridad del etanol se incrementó con la adición de agua.
- ✎ En la evaluación de las condiciones operativas del proceso discontinuo de extracción sólido - líquido: tamaño partícula (N°malla), temperatura de

extracción (°C), relación masa muestra: masa solvente (g:g) y concentración etanol (%v/v), se maximizó los componentes antioxidantes en donde se obtuvo mayor extracción de compuestos fenólicos totales de 1978,93 µgEAG/mL, flavonoides totales de 31998,78 µgEC/mL y actividad antioxidante 121,43 % inhibición a partir del extracto de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.).

- ✎ En este estudio, se logró el proceso de optimización de los antioxidantes donde fueron analizados en el software Design-Expert® Versión 11, asimismo con la alta correlación obtenida indica que el modelo polinomial cuadrático fue adecuado para la optimización de la temperatura de extracción, relación masa muestra: masa solvente, tamaño partícula y la concentración etanol en la extracción de los antioxidantes del extracto de las hojas de Anona. El modelo matemático que describe el proceso de optimización son los siguientes:

Ecuación 1. Ecuación del modelo correspondiente de compuestos fenólicos totales

$$\text{Fenoles totales} = 1356,99 + 40,05T_p + 237,32T_E - 243,65R - 109,12C_E + 23,09T_p * R + 27,23T_p * C_E - 80,53T_E * R + 104,97T_E * C_E + 84,56R * C_E + 140,92T_E^2 + 134,1R^2$$

Ecuación 2. Ecuación del modelo correspondiente de compuestos flavonoides totales

$$\text{Flavonoides totales} = 10595,7 + 62,75T_p + 1329,41T_E - 3389,3R + 6907,34C_E - 318,03T_p * T_E + 1154,78T_p * R - 1985,51T_E * R - 883,61R * C_E + 1165,39T_p^2 - 623,19T_E^2 + 3238,84R^2 + 4301,02C_E^2$$

Ecuación 3. Ecuación del modelo correspondiente actividad antioxidante.

$$\text{Actividad antioxidante} = 71,28 + 1,95T_p + 0,356T_E + 8,84R + 3,89C_E - 5,182T_p * C_E + 5,53T_E * R - 4,26T_E * C_E - 9,81R * C_E + 31,81T_p^2 - 10,1T_E^2 + 11,32R^2 + 15,1C_E^2$$

Donde:

T_E : Temperatura de extracción

T_p : Tamaño partícula

R : Relación Masa muestra: Masa solvente

C_E : Concentración etanol

SUGERENCIAS

Las siguientes sugerencias para futuras investigaciones siguiendo la línea del proyecto de investigación.

- ↪ Para una mejor determinación de los compuestos fenólicos en el extracto, se sugiere determinar por cromatografía líquida, que faciliten la cuantificación de los compuestos presentes en los extractos evaluados.
- ↪ En base de la revisión bibliográfica y los resultados reportados en este estudio, se recomienda realizar estudios cinéticos de degradación de los antioxidantes de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIRRE, J.A., ZUGASTI, A., BELMARES, R., AGUILAR, C.N., GARZA, H.D.E.L.A., QU, C., GONZ, S. y NARRO, A.A., 2012. Artículo Actividad antioxidante de algunas plantas tropicales , subtropicales y semidesérticas . , no. 7.
2. BEN, B. y ALLAF, K., 2009. Impacto de la texturización mediante el tratamiento instantáneo de caída de presión antes de la extracción con disolvente de antocianinas de Roselle de Malasia (*Hibiscus sabdariffa*). *Food Chemistry* [en línea], vol. 115, no. 3, pp. 820-825. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.12.094. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.094>.
3. BIRD, R, B., STEWART, W.E. y LIGHTFOOT, E.N., 2006. Fenómenos del transporte. , vol. 55, no. 1, pp. 895. ISSN 0471410772. DOI 10.1051/jp4:20020462.
4. BONNER, W., 2004a. Cadena Agroindustrial ETANOL. , pp. 1-28.
5. BONNER, W., 2004b. Cadena Agroindustrial ETANOL. [en línea], pp.
6. BRAND-WILLIAMS, M.E.C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. , vol. 30, pp. 25-30.
7. BRIDGERS, E.N., CHINN, M.S. y TRUONG, V. Den, 2010. Extracción de antocianinas de batatas industriales de pulpa púrpura y hidrólisis enzimática de residuos para azúcares fermentables. *Industrial Crops and Products* [en línea], vol. 32, no. 3, pp. 613-620. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2010.07.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.020>.
8. BUTTERY, R.G., 2010. *Aroma volátil / componentes del sabor de las pasas (Dried Grapes)*. S.I.: s.n. ISBN 9780470227213.
9. CACACE, J.E. y MAZZA, G., 2003. Proceso de transferencia de masa durante la extracción de compuestos fenólicos de bayas molidas. *Journal of Food Engineering*, vol. 59, no. 4, pp. 379-389. ISSN 02608774. DOI 10.1016/S0260-8774(02)00497-1.
10. CAI, Y., LUO, Q., SUN, M. y CORKE, H., 2004. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos de 112 plantas medicinales chinas

- tradicionales asociadas con anticancerígenos. *Life Sciences*, vol. 74, no. 17, pp. 2157-2184. ISSN 00243205. DOI 10.1016/j.lfs.2003.09.047.
11. CALDAS, A., 2012. Optimización escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. , pp. 1-48.
12. CARTAYA, O. y REYNALDO, I., 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, vol. 22, no. 2, pp. 5-14. ISSN 0258-5936.
13. CHALLEM, J. y BLOCK, M., 2008. Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares Jack Challem & Melissa Block. , vol. 1.
14. CHAN, C.H., YUSOFF, R. y NGOH, G.C., 2014a. Estudio de modelado y cinética de extracción convencional y asistida por lotes con solvente. *Chemical Engineering Research and Design* [en línea], vol. 92, no. 6, pp. 1169-1186. ISSN 02638762. DOI 10.1016/j.cherd.2013.10.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>.
15. CHAN, C.H., YUSOFF, R. y NGOH, G.C., 2014b. Estudio de modelado y cinética de extracción convencional y asistida por lotes con solvente. *Chemical Engineering Research and Design* [en línea], vol. 92, no. 6, pp. 1169-1186. ISSN 02638762. DOI 10.1016/j.cherd.2013.10.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>.
16. CHEN, G. y CHEN, H., 2011. Extracción y desglucosilación de flavonoides de frutos de zumaque mediante explosión de vapor. *Food Chemistry* [en línea], vol. 126, no. 4, pp. 1934-1938. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.12.025. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.025>.
17. CHEN, X., WU, X., CHAI, W. y FENG, H., 2013. Optimización de la extracción de fenólicos de hojas de *Ficus virens*. , vol. 14, no. 10, pp. 903-915. DOI 10.1631/jzus.B1200365.
18. CISSÉ, M., BOHUON, P., SAMBE, F., KANE, C., SAKHO, M. y DORNIER, M., 2012. Extracción acuosa de antocianinas de Hibiscus

- sabdariffa: cinética y modelado experimental. *Journal of Food Engineering*, vol. 109, no. 1, pp. 16-21. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.012.
19. CONTINI, M., BACCELLONI, S., MASSANTINI, R. y ANELLI, G., 2008. Extracción de antioxidantes naturales de la cáscara de avellana (*Corylus avellana* L.) y desechos de la piel mediante una larga maceración a temperatura ambiente. *Food Chemistry*, vol. 110, no. 3, pp. 659-669. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.02.060.
20. CROSSLEY, J.I. y AGUILERA, J.M., 2001. Modelado del efecto de la microestructura en la extracción de alimentos. *Journal of Food Process Engineering*, vol. 24, pp. 161-177. ISSN 00086223. DOI 10.1016/S0008-6223(03)00142-8.
21. DEWANTO, V.; WU, XIANZHONG; ADOM, KAFUI K.; y LIU, R.H.L., 2002. El procesamiento térmico aumenta el valor nutricional de los tomates al aumentar la actividad antioxidante total. , pp. 3010-3014.
22. DUARTE, J. y PÉREZ-VIZCAÍNO, F., 2015. Protección cardiovascular con flavonoides. Enigma farmacocinético. *Ars Pharmaceutica*, vol. 56, no. 4, pp. 193-200. ISSN 00042927. DOI 10.4321/S2340-98942015000400002.
23. FRANCISCO, S.S., SÉRGIO, P. y NOGUEIRA, D.C., 2001. Produção de Atemóia no Submédio São Francisco.
24. FRANCO, D., SINEIRO, J., PINELO, M. y NÚÑEZ, M.J., 2007. Extracción etanólica de sustancias solubles de *Rosa rubiginosa*: equilibrios de solubilidad en aceite y estudios cinéticos. *Journal of Food Engineering*, vol. 79, no. 1, pp. 150-157. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2006.01.047.
25. GARCÍA, Y.H., SALOMÓN IZQUIERDO, S., ACOSTA ESQUIJARROSA, J., ROMERO DÍAZ, A., LÓPEZ, M. y MERCADO VIDAL, J., 2016. Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de *Annona muricata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 21, no. 3, pp. 298-308.
26. GEANKOPLIS, C. 1998. Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. , vol. 3ra Edició, pp. 773-780.

27. GIRONI, F. y PIEMONTE, V., 2011. Efectos de temperatura y disolventes en el proceso de extracción de polifenoles de madera de castaño Fausto. *Chemical Engineering Research and Design* [en línea], vol. 89, no. 7, pp. 857-862. ISSN 02638762. DOI 10.1016/j.cherd.2010.11.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.11.003>.
28. GONZALEZ-ESQUINCA, A.R., LULTLA-CAZARES, L.M., GUTIERREZ-JIMENEZ, J., SCHLIE-GUZMAN, M.A. y VIDAL-LOPEZ, D.G., 2011. *Anonaceas: Plantas antiguas, estudios recientes*. S.l.: s.n. ISBN 9786077510918.
29. GRACIA, M.A., 2006. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. *Universidad Autonoma de Querétaro*, pp. 1-4. ISSN 03788741. DOI 10.1590/S0102-695X2010000200015.
30. GUJAR, J.G., WAGH, S.J. y GAIKAR, V.G., 2010. Estudios experimentales y de modelado sobre la extracción asistida por microondas de timol a partir de semillas de *Trachyspermum ammi* (TA). *Tecnología de separación y purificación*, vol. 70, no. 3, pp. 257-264. ISSN 13835866. DOI 10.1016/j.seppur.2009.08.005.
31. HERODEZ, S.S., HADOLIN, M., SKERGET, M. y KNEZ, Z., 2003. Estudio de extracción solvente de antioxidantes de hojas de Bálsamo (*Melissa officinalis* L.). *Food Chemistry*, vol. 80, no. 2, pp. 275-282. ISSN 03088146. DOI 10.1016/S0308-8146(02)00382-5.
32. LAPORNIK, B., PROSEK, M. y WONDRA, A.G., 2005. Comparación de extractos preparados a partir de subproductos vegetales utilizando diferentes disolventes y tiempo de extracción. *Journal of Food Engineering*, vol. 71, no. 2, pp. 214-222. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036.
33. LEE, A. y NIKRAZ, H., 2015. Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de hierbas medicinales utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Actas Internacionales de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental.*, vol. 51, no. 26, pp. 139-142.
34. LORDÊLO, M., SILVA, C., SILVA COSTA, R., DOS, A., SANTANA,

- S., GABRIELA, M. y KOBLITZ, B., 2010. Compostos fenólicos, carotenóides y actividad antioxidante en productos vegetales compuesstod fenolicos, carotenoides em plantas. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 31, no. 3, pp. 669-682. ISSN 16790359. DOI 10.5433/1679-0359.2010v31n3p669.
35. ZAPATA, L.; HEREDIA, A.; QUINTEROS, C.; MALLERET, A.; CLEMENTE, G; CÁRCEL, J. 2014. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, vol. 25, no. 49, pp. 166-192. ISSN 1851-1716. DOI ISSN 1851-1716.
36. MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J.M. y TUÑÓN, M.J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, vol. 17, no. 6, pp. 271-278. ISSN 0212-1611.
37. MARTÍNEZ, F., GÓMEZ, A. y ÁVILA, C.M., 2002. Volúmenes molales parciales de transferencia de algunas sulfonamidas desde el agua hasta la mezcla agua-etanol ($X = 0.5$). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 21, no. 2, pp. 107-118. ISSN 03262383.
38. MOURA, R., MARTIN, L. y NETO, S., 2015. Atemoya: caracterización, cultivo y propiedades nutricionales. , pp. 4-19.
39. NAVA, E., MICHELENA, G., ILINA, A. y MARTINEZ, J.L., 2015. Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia de la Unversidad Autónoma de Aguascalientes*, vol. 23, no. 66, pp. 64-70.
40. NUNES, R. y GRANATO, C., 2014 Optimización de fenolicos y condicions de extracción de flavonoides y Actividad Antioxidante de las hojas de Yerba Mate (*LLex paraguariensis A. St-Hill., Aquifoliaceae*), pp.34 - 37.
41. ORWA, C., A, M., KINDT, R., JAMNADASS, R. y S, A., 2009. *Annona squamosa L . Base de datos Agroforestree: una versión de referencia y guía de selección de árbol 4.0*, vol. 0, pp. 1-5.
42. PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ- RUBIO, M.E., SERRANO, J., GOÑI, I. y SAURA-CALIXTO, F., 2008. Metodología actualizada para determinar la capacidad antioxidante en

- alimentos, aceites y bebidas vegetales: extracción, medición y expresión de resultados. *Food Research International*, vol. 41, no. 3, pp. 274-285. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2007.12.004.
43. PEREZ, E.E., CARELLI, A.A. y CRAPISTE, G.H., 2011. Coeficiente de difusión dependiente de la temperatura del aceite de diferentes semillas de girasol durante la extracción con hexano. *Journal of Food Engineering* [en línea], vol. 105, no. 1, pp. 180-185.
44. PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J. y NÚÑEZ, M.J., 2005. Efecto del disolvente, la temperatura y la relación de disolvente a sólido sobre el contenido fenólico total y la actividad antirradical de extractos de diferentes componentes de orujo de uva. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 2111-2117. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf0488110.
45. RABÊLO, S.V., COSTA, M.M. da, LIBÓRIO, R.C. y ALMEIDA, J.R.G. da S., 2014. Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de atemoya (*Annona cherimola* Mill. X *A. squamosa* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* [en línea], vol. 36, no. spe1, pp. 265-271.
46. RABÊLO, S.V., MATIUZZI, M., COSTA, D.A., LIBÓRIO, R.C., ROBERTO, J., DA, G. y ALMEIDA, S., 2013. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE ATEMOYA (*Annona cherimola* Mill . x *A . squamosa* L .) 1 ATIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIAL DE LOS EXTRACTOS. , pp. 265-271.
47. RAKOTONDRAMASY-RABESIAKA, L., HAVET, J., PORTE, C. y FAUDUET, H., 2007. Extracción sólido-líquido de protopina de *Fumaria officinalis* L. - Determinación de análisis, reacción cinética y construcción de modelos. , vol. 54, pp. 253-261. DOI 10.1016/j.seppur.2006.09.015.
48. ROMILDA, A. y RAJESH NITHYANANDAM, 2016.
49. Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de hierbas medicinales utilizando la metodología de superficie de respuesta. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, vol. 99, no. 26, pp. 139-142. ISSN 2010-4618.

50. SAHA, R., 2011. Farmacognosia y farmacología de *Annona squamosa*: una revisión. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 2, no. 10, pp. 1183-1189.
51. SAHIN, S., İLBAY, Z. y KIRBAŞLAR, İ., 2015. Estudio de optimización de las condiciones de extracción de las hojas de Oliva ricos en polifenoles y flavonoides. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, vol. 50, no. 8, pp. 1181-1189.
52. SELIN ŞAHIN, ZEYNEP İLBAY, İ.K., 2014. Estudio sobre condiciones óptimas de extracción de extractos de hoja de olivo ricos en polifenol y flavonoides. *Separation Science and Technology*, no. Diciembre 2014, pp. 37-41.
53. SILVA, E.M., ROGEZ, H. y LARONDELLE, Y., 2007. Optimización de extracción de polifenoles de las hojas de *Inga edulis* usando Metodología de superficie de respuesta. *Separation and Purification Technology*.
54. SO, G.C. y MACDONALD, D.G., 1986. Cinética de extracción de aceite de colza (colza). *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 64, no. 1, pp. 80-86. ISSN 1939019X. DOI 10.1002/cjce.5450640112.
55. SPIGNO, G. y DE FAVERI, D.M., 2009. Extracción asistida por microondas de fenoles de té: un estudio fenomenológico. *Journal of Food Engineering* [en línea], vol. 93, no. 2, pp. 210-217. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2009.01.006. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.006>.
56. SPIGNO, G., TRAMELLI, L. y DE FAVERI, D.M., 2007. Efectos del tiempo de extracción, la temperatura y el solvente en la concentración y la actividad antioxidante de los fenólicos del orujo de uva. *Journal of Food Engineering*, vol. 81, no. 1, pp. 200-208. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021.
57. STANISAVLJEVIC, I.T., LAZIC, M.L. y VELJKOVIC, V.B., 2007. Extracción ultrasónica de aceite de semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 14, no. 5, pp. 646-652. ISSN 13504177. DOI 10.1016/j.ultsonch.2006.10.003.

58. TARALKAR, S. V., CHATTOPADHYAY, S. y GAIKAR, V.G., 2016. Optimización paramétrica y modelado del proceso de extracción de lotes para la extracción de ácido betulínico de hojas de *Vitex Negundo* Linn. *Separation Science and Technology (Philadelphia)* [en línea], vol. 51, no. 4, pp. 641-652. ISSN 15205754. DOI 10.1080/01496395.2015.1105822. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/01496395.2015.1105822>.
59. TSIBRANSKA, I., TYLKOWSKI, B., KOCHANOV, R. y ALIPIEVA, K., 2011. Extracción de compuestos biológicamente activos de *Sideritis* ssp. L. *Food and Bioproducts Processing* [en línea], vol. 89, no. 4, pp. 273-280. ISSN 09603085. DOI 10.1016/j.fbp.2010.10.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.10.004>.
60. VALDÉS-HERNÁNDEZ, G.; CRUZ-VIERA, L.; COMET-RODRÍGUEZ, R., 2015. Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *CENIC. Ciencias Químicas*.
61. VÁSQUEZ, L.M.G. y ARISTIZABAL, L.S.R., 2013. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) Evaluation of antioxidant activity of *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) extracts. *Revista Cubana de Farmacia*, vol. 47, no. 4, pp. 483-491. ISSN 15612988.
62. WONGKITTIPONG, R., PRAT, L., DAMRONGLERD, S. y GOURDON, C., 2004. Extracción sólido-líquido de andrographolide de plantas - Estudio experimental, reacción cinética y modelo. *Separation and Purification Technology*, vol. 40, no. 2, pp. 147-154. ISSN 13835866. DOI 10.1016/j.seppur.2004.02.002.
63. XIAO, X., SONG, W., WANG, J. y LI, G., 2012. Extracción asistida por microondas realizada a baja temperatura y al vacío para la extracción de compuestos lábiles en muestras de alimentos. *Analytica Chimica Acta* [en línea], vol. 712, pp. 85-93. ISSN 00032670.
64. XU, H.N., HUANG, W.N. y HE, C.H., 2008. Modelado para la extracción de isoflavonas del tallo de *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi utilizando un sistema disolvente bifásico de n-butanol / agua.

Separation and Purification Technology, vol. 62, no. 3, pp. 590-595. ISSN 13835866. DOI 10.1016/j.seppur.2008.03.023.

65. YANG, L., JIANG, J.G., LI, W.F., CHEN, J., WANG, D.Y. y ZHU, L., 2009. Proceso óptimo de extracción de polifenoles de la corteza de *Phyllanthus emblica* L. basado en la metodología de superficie de respuesta. *Journal of Separation Science*, vol. 32, no. 9, pp. 1437-1444. ISSN 16159306. DOI 10.1002/jssc.200800744.
66. ZHANG, Z.S., LI, D., WANG, L.J., OZKAN, N., CHEN, X.D., MAO, Z.H. y YANG, H.Z., 2007. Optimización de la extracción etanol-agua de lignanos de linaza. *Separation and Purification Technology*, vol. 57, no. 1, pp. 17-24. ISSN 13835866. DOI 10.1016/j.seppur.2007.03.006.

ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de los fenoles totales en el extracto de las hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.)

Corridas	Repeticiones	ABS (725nm)	Promedio ABS	CONCENTRACION ug EAG	CONCENTRACION EXTRACTO DILUIDO (1:9) ug EAG/mL del extracto	CONTENIDO DE FENOLICOS DEL EXTRACTO CONCENTRADO ug EAG/mL	VOLUMEN DE EXTRACTO CONCENTRADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA DPPH			
							30ug/mL	60ug/mL	120ug/mL	240ug/mL
1	1	0.936	0.890	94.94	189.9	1898.8	0.2	0.3	0.6	1.3
	2	0.868								
	3	0.865								
2	1	0.674	0.686	72.09	144.2	1441.9	0.2	0.4	0.8	1.7
	2	0.682								
	3	0.703								
3	1	0.897	0.898	95.88	191.8	1917.5	0.2	0.3	0.6	1.3
	2	0.887								
	3	0.91								
4	1	0.738	0.749	79.10	158.2	1581.9	0.2	0.4	0.8	1.5
	2	0.749								
	3	0.759								
5	1	1.057	1.059	113.93	227.9	2278.6	0.1	0.3	0.5	1.1
	2	1.036								
	3	1.083								
6	1	0.989	0.981	105.16	210.3	2103.3	0.1	0.3	0.6	1.1
	2	0.973								
	3	0.98								
7	1	0.942	0.942	100.78	201.6	2015.7	0.1	0.3	0.6	1.2
	2	0.944								
	3	0.939								
8	1	0.516	0.523	53.74	107.5	1074.8	0.3	0.6	1.1	2.2
	2	0.531								
	3	0.522								

...Continúa **Anexo 1.**

16	1	0,609								
	2	0,641	0,635	66,29	132,6	1325,8	0,2	0,5	0,9	1,8
	3	0,654								
17	1	0,592								
	2	0,605	0,597	62,02	124,0	1240,4	0,2	0,5	1,0	1,9
	3	0,593								
18	1	0,596								
	2	0,598	0,593	61,61	123,2	1232,1	0,2	0,5	1,0	1,9
	3	0,585								
19	1	0,687								
	2	0,677	0,680	71,38	142,8	1427,6	0,2	0,4	0,8	1,7
	3	0,676								
20	1	0,975								
	2	0,963	0,971	104,12	208,2	2082,3	0,1	0,3	0,6	1,2
	3	0,976								
21	1	0,918								
	2	0,925	0,920	98,35	196,7	1967,0	0,2	0,3	0,6	1,2
	3	0,917								

Fuente: Elaboración propia (2017)

Anexo 2. Lectura de las absorbancias de los flavonoides totales

TRATAMIENTO	REPETICIONES	ABS (nm)	PROMEDIO ABS	TRANS(%)	TRATAMIENTO	REPETICIONES	ABS (nm)	PROMEDIO ABS	TRANS(%)
1	1	0,508	0,500	31,1	8	1	0,539	0,517	28,9
	2	0,497		31,8		2	0,514		30,6
	3	0,494		32,1		3	0,499		31,7
2	1	0,375	0,370	42,1	9	1	0,492	0,484	32,2
	2	0,367		43		2	0,484		32,8
	3	0,369		42,7		3	0,475		33,5
3	1	0,27	0,266	53,8	10	1	0,253	0,251	55,8
	2	0,265		54,4		2	0,25		56,2
	3	0,264		54,4		3	0,25		56,2
4	1	0,213	0,212	61,2	11	1	0,227	0,226	59,3
	2	0,211		61,5		2	0,226		59,4
	3	0,211		61,5		3	0,226		59,4
5	1	0,372	0,372	42,5	12	1	0,217	0,216	60,7
	2	0,372		42,4		2	0,215		60,9
	3	0,371		42,5		3	0,215		60,9
6	1	0,686	0,674	20,6	13	1	0,203	0,203	62,7
	2	0,677		21		2	0,202		62,8
	3	0,658		22		3	0,204		62,5
7	1	0,847	0,814	14,2	14	1	0,263	0,263	54,5
	2	0,821		15,1		2	0,264		54,5
	3	0,775		16,8		3	0,262		54,7

...Continúa **Anexo 2.**

TRATAMIENTO	REPETICIONES	ABS (nm)	PROMEDIO ABS	TRANS(%)
15	1	0,274	0,272	53,2
	2	0,272		53,4
	3	0,271		53,6
16	1	0,578	0,557	26,4
	2	0,546		28,5
	3	0,548		28,3
17	1	0,552	0,541	28
	2	0,542		28,7
	3	0,53		29,5
18	1	0,455	0,448	35,1
	2	0,447		35,7
	3	0,441		36,2
19	1	0,272	0,273	53,4
	2	0,274		53,2
	3	0,272		53,4
20	1	0,368	0,365	42,8
	2	0,364		43,3
	3	0,362		43,4
21	1	0,356	0,355	44,1
	2	0,354		44,3
	3	0,354		44,3

Fuente: *Elaboración propia (2017)*

Anexo 3. Contenido de fenoles totales en el extracto de hojas de Anona (*Annona x atemoya* Mabb.)

CORRIDAS	PROMEDIO ABS(nm)	CONCENTRACION ug EAG	CONCENTRACION EXTRACTO DILUIDO (1:9) ug EAG/mL del extracto	CONTENIDO DE FENOLICOS DEL EXTRACTO CONCENTRADO ug EAG/mL	CORRIDAS	PROMEDIO ABS(nm)	CONCENTRACION ug EAG	CONCENTRACION EXTRACTO DILUIDO (1:9) ug EAG/mL del extracto	CONTENIDO DE FENOLICOS DEL EXTRACTO CONCENTRADO ug EAG/mL
1	0,500	1144,92	2289,8	22898,3	8	0,517	1189,08	2378,2	23781,7
2	0,370	821,58	1643,2	16431,7	9	0,484	1104,92	2209,8	22098,3
3	0,266	561,58	1123,2	11231,7	10	0,251	523,25	1046,5	10465,0
4	0,212	424,92	849,8	8498,3	11	0,226	461,58	923,2	9231,7
5	0,372	824,92	1649,8	16498,3	12	0,216	434,92	869,8	8698,3
6	0,674	1579,92	3159,8	31598,3	13	0,203	403,25	806,5	8065,0
7	0,814	1931,58	3863,2	38631,7	14	0,263	553,25	1153,2	11065,0

...Continúa **Anexo 3.**

CORRIDAS	PROMEDIO ABS(nm)	CONCENTRACION ug EAG	CONCENTRACION EXTRACTO DILUIDO (1:9) ug EAG/mL del extracto	CONTENIDO DE FENOLICOS DEL EXTRACTO CONCENTRADO ug EAG/mL
15	0,272	576,58	1153,2	11531,7
16	0,557	1289,08	2578,2	25781,7
17	0,541	1249,08	2498,2	24981,7
18	0,448	1014,92	2029,8	20298,3
19	0,273	577,42	1154,8	11548,3
20	0,365	807,42	1614,8	16148,3
21	0,355	782,42	1564,8	15648,3

Fuente: Elaboración propia (2017)

Anexo 4. Concentraciones crecientes (30, 60, 120 y 240 µg /mL)

Corridas	IC50 µg/mL				% inhibición
	30 µg/mL	60 µg/mL	120 µg/mL	240 µg/mL	
1	25,89	37,8	70,72	89,92	104,28
2	25,12	30,53	54,53	90,76	117,54
3	35,45	58,2	74,32	93,78	83,19
4	27,3	31,61	66,99	98,52	102,97
5	35,69	65,88	74,33	90,28	80,01
6	12,24	47,42	79,93	96,6	96,75
7	12,66	38,22	61,13	92,07	114,07
8	13,04	31,53	53,36	88,63	124,68
9	21,93	33,58	60,63	78,12	125,78
10	14,4	35,74	64,73	90,28	113,84
11	24,12	32,18	49,89	83,25	127,69
12	22,59	33,98	48,54	83,35	128,24
13	24,93	34,96	53,32	89,9	116,93
14	23,36	27,4	62,22	94,21	112,38
15	32,38	57	80,07	95,96	81,56
16	23,44	35,61	51,31	86,52	121,77
17	14,81	35,95	57,72	79,85	127,8
18	14,21	34,85	62,39	87,24	118,27
19	42,45	50,85	81,94	89,92	80,15
20	16,06	55,17	77,64	93,3	94,12
21	35,25	53,45	78,86	97,92	79,26

Fuente: Elaboración propia (2017)

Anexo 5. Resultados de la optimización numérica y deseabilidad.

N°	Tamaño Partícula	Temperatura de extracción	Relación Mm:Ms	Concentración Etanol	Fenoles Totales	Flavonoides	Actividad Antioxidante	Desirability
1	13,000	58,236	15,000	96,000	1978,925	31998,781	121,427	0,802
2	13,007	59,585	15,000	96,000	2042,410	32105,318	118,864	0,801
3	13,000	56,611	15,000	96,000	1905,758	31869,344	124,257	0,800
4	13,025	57,947	15,021	96,000	1963,636	31924,224	121,747	0,800
5	13,021	56,500	15,000	96,000	1900,963	31858,977	124,339	0,799
6	13,000	56,236	15,000	95,995	1889,438	31833,431	124,858	0,799
7	13,000	55,079	15,011	96,000	1839,017	31722,240	126,668	0,795
8	13,107	58,146	15,060	96,000	1969,141	31840,822	120,839	0,794
9	13,000	54,230	15,000	95,999	1805,053	31678,726	127,974	0,791
10	13,000	57,417	15,000	95,458	1946,270	31307,532	121,012	0,783
11	13,000	53,618	15,000	95,829	1782,285	31432,692	128,240	0,783
12	13,556	58,388	15,000	96,000	1987,640	31960,803	118,449	0,782
13	13,376	55,646	15,177	96,000	1848,032	31342,202	123,305	0,771
14	40,000	56,132	15,000	96,000	1967,341	29421,048	118,568	0,751
15	39,998	57,428	15,000	96,000	2024,538	29524,488	116,378	0,750
16	40,000	54,507	15,000	96,000	1898,852	29292,151	121,094	0,749
17	40,000	58,539	15,000	96,000	2075,410	29612,398	114,397	0,747
18	13,002	50,779	15,000	95,994	1672,916	31398,654	132,434	0,744
19	40,000	59,302	15,000	96,000	2111,340	29673,278	112,965	0,744
20	13,000	57,092	15,006	94,275	1941,585	29943,898	117,637	0,743
21	39,743	56,231	15,000	95,974	1971,078	29421,634	117,201	0,742
22	13,206	50,622	15,000	96,000	1667,848	31375,239	131,636	0,742
23	40,000	59,785	15,000	96,000	2134,468	29711,618	112,033	0,741
24	39,920	51,672	15,000	96,000	1787,722	29074,014	124,576	0,737
25	40,000	55,669	15,224	96,000	1925,848	28968,803	118,452	0,735
26	40,000	55,323	15,001	95,372	1938,841	28630,412	118,159	0,732
27	40,000	59,996	15,000	95,761	2146,401	29450,571	110,991	0,732
28	13,000	50,325	15,000	94,661	1673,466	29846,336	128,243	0,728
29	13,000	56,509	16,072	96,000	1802,079	29456,664	120,793	0,721
30	40,000	52,863	15,428	96,000	1793,720	28380,193	121,717	0,713
31	39,826	47,792	15,000	96,000	1653,444	28774,048	128,240	0,710
32	38,372	52,038	15,000	96,000	1796,683	29241,239	117,657	0,696
33	40,000	46,620	15,000	96,000	1617,499	28664,646	129,982	0,695
34	13,000	60,000	16,662	96,000	1907,762	28533,033	113,323	0,687
35	40,000	45,680	15,000	96,000	1589,679	28590,245	130,670	0,683
36	38,311	59,965	15,000	96,000	2138,043	29876,766	104,623	0,674
37	14,936	45,247	15,041	95,981	1497,435	30676,085	128,242	0,663
38	40,000	56,363	16,622	96,000	1832,294	26723,342	113,079	0,647
39	40,000	60,000	25,000	96,000	1670,016	23624,316	120,711	0,615
40	40,000	59,993	25,000	95,824	1668,616	23449,183	120,522	0,611
41	39,894	60,000	24,976	96,000	1669,521	23598,163	120,107	0,611
42	39,999	59,998	24,829	96,000	1668,886	23514,686	119,788	0,608
43	40,000	59,567	24,852	96,000	1652,648	23494,743	120,445	0,606
44	40,000	60,000	25,000	95,156	1664,513	22797,367	119,813	0,598
45	39,377	60,000	25,000	96,000	1668,110	23564,612	117,992	0,598
46	40,000	59,469	24,572	96,000	1647,698	23322,825	119,124	0,595
47	40,000	58,114	24,719	95,956	1598,236	23254,905	121,376	0,591
48	39,817	59,999	24,489	96,000	1667,221	23304,422	117,237	0,590
49	39,686	60,000	24,575	96,000	1667,013	23339,194	117,091	0,589
50	13,000	60,000	25,000	96,000	1587,539	21038,168	127,188	0,588
51	13,005	59,846	25,000	95,999	1581,702	21025,690	127,350	0,586
52	38,898	60,000	25,000	95,984	1666,531	23503,069	115,977	0,584
53	39,861	55,578	17,834	96,000	1710,775	25072,875	111,295	0,584
54	40,000	55,826	24,986	96,000	1522,739	23283,143	125,017	0,582
55	13,001	59,991	24,763	96,000	1585,812	21006,669	125,931	0,581
56	13,366	60,000	25,000	96,000	1588,654	21073,230	125,398	0,580
57	13,000	59,943	24,704	96,000	1583,737	20997,412	125,688	0,579
58	13,596	59,998	25,000	95,999	1589,274	21094,242	124,297	0,575
59	13,000	60,000	24,544	96,000	1585,417	20991,489	124,801	0,575
60	39,914	60,000	23,950	96,000	1668,292	23065,154	115,116	0,574
61	39,977	60,000	23,862	96,000	1668,894	23036,427	115,005	0,574
62	13,000	60,000	24,418	96,000	1585,240	20987,735	124,173	0,572
63	13,792	60,000	24,982	96,000	1589,835	21111,014	123,278	0,570
64	13,039	59,511	15,000	89,295	2089,123	25217,822	99,703	0,568
65	38,414	59,999	24,899	96,000	1664,479	23410,033	113,512	0,567
66	13,000	60,000	19,690	96,000	1703,691	23769,428	111,076	0,566
67	40,000	60,000	25,000	93,315	1652,487	21094,963	118,295	0,564
68	13,000	60,000	23,816	95,996	1586,738	21022,838	121,376	0,559
69	40,000	60,000	23,369	95,881	1672,409	22764,789	112,882	0,558
70	13,000	59,989	23,718	96,000	1586,948	21040,780	120,975	0,557
71	13,000	36,385	15,000	92,789	1361,525	26733,831	127,888	0,555
72	40,000	58,479	18,974	96,000	1759,463	24140,304	106,832	0,554
73	40,000	59,970	23,269	95,656	1671,424	22509,765	112,222	0,551
74	13,000	60,000	23,159	95,999	1592,926	21173,335	118,709	0,549
75	13,000	53,570	15,000	87,170	1873,623	22960,026	104,221	0,546
76	40,000	57,466	19,495	96,000	1689,575	23640,272	108,366	0,542
77	14,894	58,579	25,000	95,994	1540,542	21100,353	120,090	0,538

... Continúa Anexo 5.

78	37,155	59,267	25,000	96,000	1633,759	23293,544	110,283	0,536
79	40,000	60,000	21,410	96,000	1714,803	22892,914	107,022	0,531
80	13,000	33,542	15,000	93,122	1318,345	26854,160	128,079	0,531
81	13,000	33,271	15,000	92,524	1328,603	26214,912	125,881	0,522
82	13,000	60,000	22,380	95,143	1603,856	20613,354	114,113	0,520
83	40,000	49,963	25,000	96,000	1356,374	22826,568	128,607	0,515
84	14,802	55,238	25,000	96,000	1427,102	20832,288	123,702	0,507
85	13,815	53,953	25,000	95,568	1383,249	20208,393	128,240	0,498
86	13,000	31,983	15,000	90,202	1369,362	23854,601	117,666	0,485
87	40,000	55,173	15,003	70,000	2183,134	13123,329	108,846	0,462
88	40,000	53,904	15,000	70,000	2149,590	13026,348	110,007	0,462
89	40,000	58,175	15,000	70,495	2268,338	13411,465	104,580	0,453
90	13,000	60,000	25,000	89,848	1547,408	15687,427	118,652	0,451
91	39,997	59,952	15,000	70,000	2330,830	13507,292	103,164	0,446
92	39,762	60,000	25,000	83,555	1588,116	14410,657	119,214	0,440
93	40,000	56,832	15,001	72,377	2209,709	13570,435	103,041	0,439
94	40,000	44,441	24,963	96,000	1241,523	22363,638	128,946	0,437
95	34,573	52,145	25,000	95,878	1396,029	22358,489	108,349	0,434
96	40,000	59,762	25,000	80,178	1559,884	13034,012	125,236	0,423
97	39,999	59,996	25,000	79,059	1559,392	12700,006	127,024	0,420
98	13,001	50,000	15,000	70,000	1976,615	15126,216	98,419	0,407
99	13,000	48,696	15,000	70,000	1951,008	15022,662	99,009	0,406
100	13,000	49,764	15,000	70,139	1970,012	15119,316	98,406	0,405

Fuente: Elaboración propia (2017)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N°104-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (frutos), recibida de Roxana Lizzeth LOBOS QUISPE, ha sido estudiada y clasificada como: ***Annona x atemoya* Mabb.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: MAGNOLIALES

FAMILIA: ANNONACEAE

GENERO: *Annona*


ESPECIE: *Annona x atemoya* Mabb. [= *A. cherimolia* x *A. squamosa*]

Nombre vulgar: annona

Determinado por: Mg. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 9 de junio de 2017


Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRÍA
 JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/tdb

Anexo 6. Constancia de reconocimiento taxonómico de las hojas de Anona.

Fuente: Museo de Historia Natural (2017)



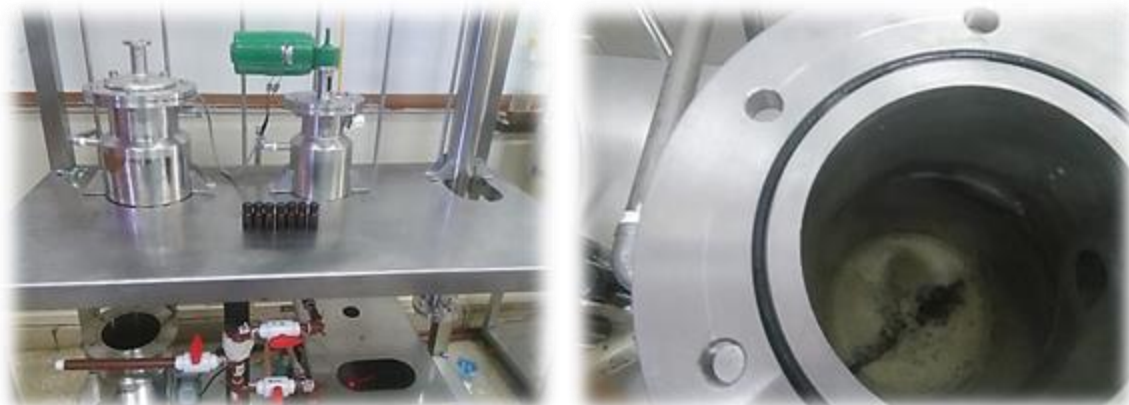
Anexo 7. a). Hojas Anona recolectadas; b). Hojas de Anona secas

Fuente: Elaboración propia (2017)



Anexo 8. a). Muestras de hojas de Anona sellando al vacío; b). Muestras secas; c). Tamizado de la muestra.

Fuente: Elaboración propia (2017)



Anexo 9. Extracción del extracto de las hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)



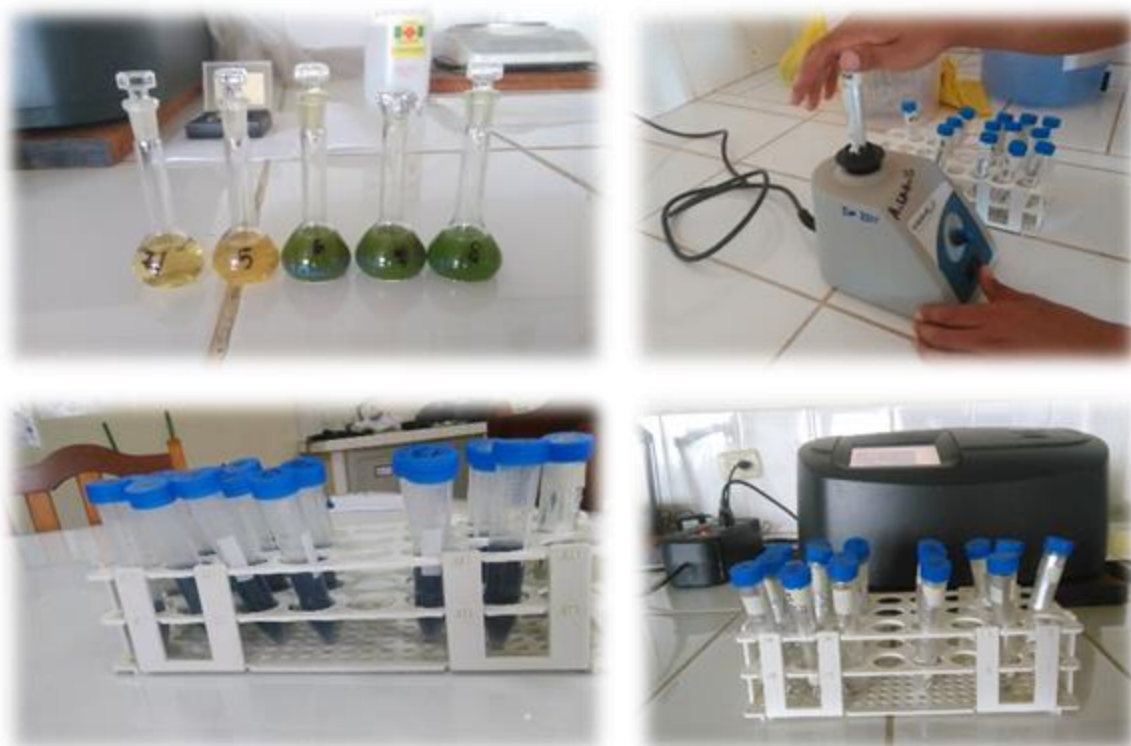
Anexo 10. Centrifugación refrigerada del extracto de las hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)



Anexo 11. Concentrado del extracto de las hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)



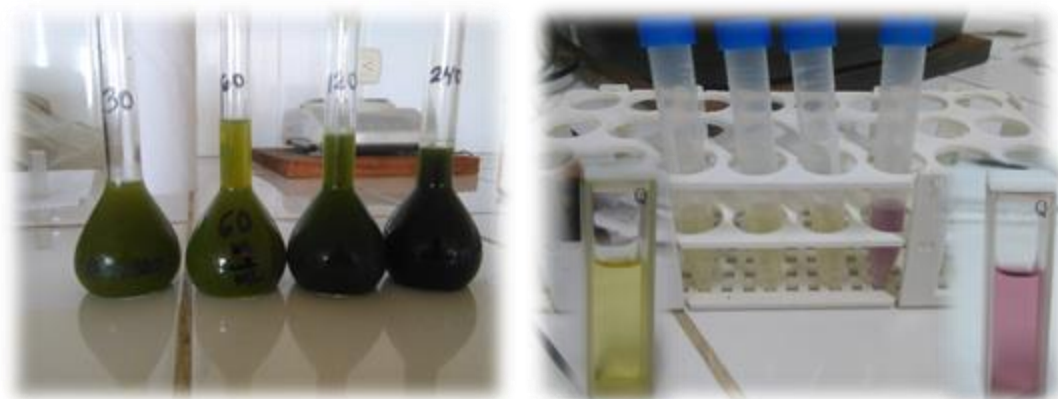
Anexo 12. Análisis de fenoles totales del extracto de las hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)



Anexo 13. Análisis de flavonoides totales del extracto de las hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)



Anexo 14. Análisis de antioxidante del extracto de las hojas de Anona

Fuente: Elaboración propia (2017)