



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER EN
AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

Trabajo de Titulación

TEMA:

**EFFECTO DEL TIEMPO DE SECADO EN HOJAS DE NÍSPERO
(*Achras zapota*) Y RELACIÓN DE SOLVENTE PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES**

AUTORES:

ING. ARNALDO NARCIZO CEVALLOS MENDOZA

ING. EDWIN RICARDO PALACIOS BRAVO

TUTOR:

Mg. FRANCISCO MANUEL DEMERA LUCAS

COTUTOR:

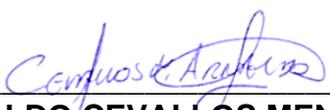
Mg. ANGEL DEL JESUS PRADO CEDEÑO

CALCETA, ENERO 2021

DERECHOS DE AUTORÍA

ARNALDO NARCIZO CEVALLOS MENDOZA y EDWIN RICARDO PALACIOS BRAVO, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumimos la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



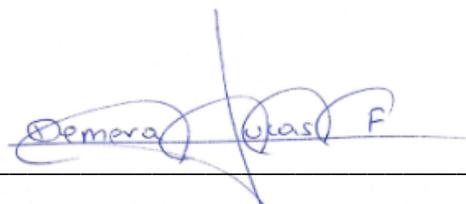
ARNALDO CEVALLOS MENDOZA



RICARDO PALACIOS BRAVO

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

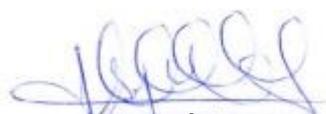
M.g. FRANCISCO MANUEL DEMERA LUCAS, certifica haber tutelado el trabajo de titulación **Efecto del tiempo de secado en hojas de níspero (*Achras zapota*) y relación de solvente para la obtención de compuestos antioxidantes**, que ha sido desarrollado por **ARNALDO NARCIZO CEVALLOS MENDOZA** y **EDWIN RICARDO PALACIOS BRAVO**, previo la obtención del título de Magister en AGROINDUSTRIA, de acuerdo al Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Mg. FRANCISCO MANUEL DEMERA LUCAS

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **Efecto del tiempo de secado en hojas de níspero (*achras zapota*) y relación de solvente para la obtención de compuestos antioxidantes** que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por **ARNALDO NARCIZO CEVALLOS MENDOZA y EDWIN RICARDO PALACIOS BRAVO**, previa la obtención del título de Magister en AGROINDUSTRIA, de acuerdo al Reglamento de la unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Mg. SOFIA VELÁZQUEZ CEDEÑO
MIEMBRO



JULIO SALTOS SOLÓRZANO Ph.D
MIEMBRO



ELY FERNANDO SACÓN VERA Ph.D
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fortaleza y permitirme seguir cumpliendo cada día mis objetivos profesionales.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A mi mamá Carmen Mendoza por ser un pilar fundamental en mi vida, por sus consejos y sus cuidados, siendo una madre ejemplar que me ha enseñado valores y ética profesional. A mi hermana de corazón Johana Cevallos; hermanos Maricela, Julián, Jonathan, Steeven y Melanie Suárez, a mi padre José Suárez; mis abuelos paternos Aminta Celorio y Jorge Cevallos; al que considero como un padre Gustavo Navarrete y toda la familia de él; a todos ellos doy gracias de corazón por ser ese gran apoyo en los momentos difíciles que los he necesitado como familia.

A nuestras familias en general, nuestros compañeros y amigos de maestría que estuvieron presente en todo momento con sus consejos y orientaciones; a las personas que conforman el Laboratorio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí en Manta y Extensión Pedernales, gran ayuda en una de las fases del desarrollo experimental.

A nuestro tutor Francisco Manuel Demera Lucas por sus orientaciones, por la confianza depositada para la realización del trabajo de titulación; gracias infinitas. No quedando desapercibido nuestro co-tutor el Ing. Ángel Prado por su valioso aporte a esta investigación.

ARNALDO NARCIZO CEVALLOS MENDOZA

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fortaleza y permitirme seguir cumpliendo cada día mis objetivos profesionales.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A mi esposa María Denisse Chica Quijano por ese apoyo incondicional, por motivarme; gracias de corazón.

A mis Padres José Ricardo Palacios Saltos y Gregoria Judith Bravo Vera, por el apoyo emocional de las veces en que me han escuchado y por la felicidad que le dan a mi corazón de tenerlos con vida estando presente en todo momento; en especial a mis suegros Grenne Quijano y Marcos Chica por sus sabios consejos y apoyo incondicional.

A nuestras familias en general, nuestros compañeros y amigos de maestría que estuvieron presente en todo momento con sus consejos y orientaciones; a las personas que conforman el Laboratorio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí en Manta y Extensión Pedernales, gran ayuda de una de las fases del desarrollo experimental.

A nuestro tutor Francisco Manuel Demera Lucas por sus orientaciones, por la confianza depositada para la realización del trabajo de titulación; gracias infinitas. No quedando desapercibido nuestro co-tutor el Ing. Ángel Prado por su valioso aporte a esta investigación.

EDWIN RICARDO PALACIOS BRAVO

DEDICATORIA

A Dios por ser la guía en toda mi etapa de estudio, dándome conocimiento, sabiduría y fuerza para seguir adelante sin desmayar, a mis padres Carmen Mendoza y José Suárez por enseñarme a valorar mis estudios. También dedico a todos mis familiares que siempre estuvieron presentes en esta etapa de mi vida.

ARNALDO NARCIZO CEVALLOS MENDOZA

A Dios quien me guio en los momentos de toda la fase de estudio, dándome sabiduría y fuerza para seguir adelante, no desmayando en los retos que se presentaron días tras días. También quisiera dedicar mi tesis con mucho amor y cariño a mis dos ángeles Ricardo Estefano Palacios Lucas y Clarisse Stefanía Palacios Chica que con sus cariños y muestras de afectos me han enseñado a encontrar en cada uno de ellos lo dulce de la vida, sobre todo la inocencia en sus ojos; también a quienes siempre me motivaron dándome consejos y me desearon lo mejor para seguir adelante en este logro.

EDWIN RICARDO PALACIOS BRAVO

“El mundo que hemos creado es un proceso de nuestro pensamiento. No se puede cambiar sin cambiar nuestra forma de pensar”.

Albert Einstein

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vii
CONTENIDO DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
KEY WORDS.....	xi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	5
1.4. HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE <i>Achras zapota</i>	6
2.1.1. HÁBITAT Y CULTIVOS.....	7
2.1.2. USOS Y APLICACIONES DE <i>Achras zapota</i>	8
2.2. OPCIONES ÓPTIMAS DE SECADO	9
2.3. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....	11
2.3.1. ANTIOXIDANTES.....	11
2.3.2. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES POR MACERACIÓN.....	12
2.4. SOLUCIONES EXTRACTIVAS.....	14
2.4.1. SOLVENTES.....	14
2.4.2. REACTIVO 2,2- DIFENIL-1-PICRIHIDRAZILLO (DPPH)	15
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	16
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
3.2. DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
3.3. FACTORES DE ESTUDIO	16
3.4. NIVELES DE FACTORES.....	16
3.5. TRATAMIENTOS	17
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	18
3.8. MANEJO DE EXPERIMENTO	19
3.8.1. DIAGRAMA DE FLUJO.....	19
3.8.2. DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE NÍSPERO.....	20
3.9. VARIABLES A MEDIR Y MÉTODO DE EVALUACIÓN.....	22
3.9.1. pH.....	22
3.9.2. ACIDEZ TITULABLE	22
3.9.3. HUMEDAD	23
3.9.4. POLIFENOLES TOTALES.....	24
3.9.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ VISIBLE.....	25
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA HOJA DE NÍSPERO (<i>Achras zapota</i>) SECAS	27
4.2. TIEMPO DE SECADO DE LA HOJA DE NÍSPERO (<i>Achras zapota</i>) EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....	28
4.3. RELACIÓN IDÓNEA DE ALCOHOL POTABLE (96%) Y AGUA DESTILADA EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	29
4.4. RELACIÓN DE SOLVENTE ALCOHOL POTABLE (96%)-AGUA DESTILADA Y TIEMPO DE SECADOS PARA TRATAMIENTOS.....	32
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
5.1. CONCLUSIONES.....	35
5.2. RECOMENDACIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS	45

CONTENIDO DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

Contenido de Tablas

Tabla 1. Detalle de los tratamientos	17
Tabla 2. Caracterización de la materia prima.	27
Tabla 3. Supuesto de Normalidad.	28
Tabla 4. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el factor A.	29
Tabla 5. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el factor B.	30
Tabla 6. Prueba de subconjunto homogéneo del factor B para la variable Fenoles totales (mg Aci. gálico/g).....	30
Tabla 7. Prueba de subconjunto homogéneo para el factor b la variable Capacidad antioxidantes (µmol ET/g).....	31
Tabla 8. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para los tratamientos.....	32
Tabla 9. Prueba de subconjunto homogéneo para los tratamientos de Fenoles totales (mg Aci. gálico/g).....	32
Tabla 10. Prueba de subconjunto homogéneo para los tratamientos de Capacidad antioxidantes (µmol ET/g).....	33

Contenido de Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la obtención del extracto de las hojas de níspero (<i>Acrhas zapota</i>).	19
---	----

Contenido de Anexos

Anexo 1. Hojas de nísperos secas.....	46
Anexo 2. Hoja de níspero pulverizada.	46
Anexo 3. Preparación de muestras previo a los análisis fisicoquímicos.....	47
Anexo 4. Realización de análisis fisicoquímicas.	47
Anexo 5. Cálculos de los análisis fisicoquímicos.	48
Anexo 6. Muestra envasada de los extractos.	48

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto del tiempo de secado en hojas de níspero (*Achras zapota*) y relación de solvente para la obtención de compuestos antioxidantes por maceración en la ciudad de Calcuta, se utilizó un arreglo bifactorial A2XB4 en Diseño Completamente al Azar (DCA) con ocho tratamientos y tres repeticiones, lo cual dieron como resultado 24 unidades experimentales. Para el factor A (tiempo de secado) se emplearon los siguientes niveles: a1=60 minutos y a2=70 minutos, mientras que para el factor B (relación solvente alcohol 96%-agua destilada) fueron: b1=20:80, b2=40:60, b3=60:40, b4=80:20 con relación al 100%. Las variables evaluadas fueron capacidad antioxidantes y fenoles totales para el extracto obtenido de la maceración y a las hojas se realizaron análisis fisicoquímicos. Las variables que no cumplieron con el supuesto del ANOVA de Normalidad, se procedió a realizarse la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y para el análisis de los datos se le efectuó por medio del programa de Microsoft office Excel 2013 y SPSS 21 versión libre. Dentro de los análisis que se realizaron se determinó que el mejor tratamiento fue el T4 (a1b4) con la composición 80:20 alcohol-agua obteniéndose un valor de 21,5mg Ác. gálico/g para fenoles totales y capacidad antioxidante con 21,333 μ mol ET/g. Se determinó que a mayor composición de alcohol con temperatura de secado a 37°C con la duración de 60min se obtiene mayor concentración de compuestos bioactivos en la maceración de 48 horas.

PALABRAS CLAVE

Compuestos bioactivos, antioxidantes, alcohol, níspero, secado, maceración.

ABSTRACT

The present research aims to evaluate the effect of the drying time in medlar leaves (*Achras zapota*) and the solvent ratio to obtain antioxidant compounds by maceration in the city of Calceta, a bifactorial arrangement A2XB4 was used in Completely Random Design (DCA) with eight treatments and three repetitions, which resulted in 24 experimental units. For factor A (drying time) the following levels were used: a1=60 minutes and a2=70 minutes, while for factor B (96% solvent-distilled water ratio) they were: b1=20:80, b2= 40:60, b3=60:40, b4=80:20 relative to 100%. The variables evaluated were antioxidant capacity and total phenols for the extract obtained from the maceration and physicochemical analyzes were performed on the leaves. The variables that did not comply with the assumption of the ANOVA of Normality, the non-parametric Kruskal Wallis test was carried out and for the data analysis it was carried out using the Microsoft office Excel 2013 program and SPSS 21 free version. Within the analyzes that were carried out, it was determined that the best treatment was T4 (a1b4) with the 80:20 alcohol-water composition, obtaining a value of 21,5mg Ac. gallic/g for total phenols and antioxidant capacity with 21,333 μ mol ET/g. It was determined that a higher alcohol composition with a drying temperature of 37°C with a duration of 60min, a higher concentration of bioactive compounds is obtained in the 48-hour maceration.

KEY WORDS

Bioactive compounds, antioxidants, alcohol, medlar, dried, maceration.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Las hojas de níspero contiene compuestos antioxidantes según (Guadarrama, 2018) que son sustancias protectoras capaces de neutralizar la acción oxidante por medio de la liberación de electrones, los que son captados por los radicales libres (Avello & Suwalsky, 2006).

En estudios desarrollados por Guadarrama (2018) se encontró que los niveles intermedios en hojas de guayaba presentaron una mayor actividad antioxidante con valores de 96,8 a 97,15 micromoles de trolox/gramos ($\mu\text{M TEAC/g}$) de muestra seca y la del higo presentó menor actividad antioxidante oscilando entre 12,15 a 22,43 $\mu\text{M TEAC/g}$ de muestra seca, en comparación con los resultados de la hoja de níspero que fueron bajos; también determinó que la actividad antioxidante de los extractos acuosos en diferentes tamaños de partículas no implicó que los componentes fenólicos totales sean iguales, en consecuencia se obtiene a partir de maceración.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. En este caso el agente extractante (la fase líquida) suele ser agua, pero también se emplean otros líquidos como vinagre, jugos, alcoholes o aceites aderezados con diversos ingredientes que modificarán las propiedades de extracción del medio líquido. En el caso que se utilice productos extraídos se suele emplear etapa de secado, con calor o incluso una liofilización (Bastidas, 2011).

Continuando con Bastidas (2011) menciona que en efecto es una difusión en el que se produce un intercambio continuo que pretende extraer el contenido de las células vegetales hasta obtener la mayor parte de las sustancias solubles; se fundamenta en los fenómenos de osmosis y difusión en donde por diferencias de concentración los componentes solubles de la materia seca fluirán en la mezcla,

cuyo tiempo de equilibrio dependerá de las diferencias en concentración de relación fruta u hojas - mezclas hidroalcohólicas.

Otro factor que influyen en la liberación de compuestos antioxidantes es la humedad, para ello se ha estudiado diferentes métodos de secados de las partes vegetativas bajo condiciones naturales o controladas, que en ambos casos se logran actividades similares, aunque el rendimiento sea menor en secado controlado y mayor en condiciones naturales. Sobresale el hecho de que la exposición a la luz (en el secado natural) no afecta los metabolitos antioxidantes, como se observa lo reportado por Durango, Gallardo & Contreras (2015).

En el secado de un material se remueve humedad libre de la superficie y también agua retenida en el interior. Si se determina el cambio en el contenido de humedad del material con respecto al tiempo, temperatura y otros factores como características propias del alimento, se pueden obtener productos que presenten una adecuada estabilidad (Fito, André, Barat & Albors, 2001).

El secado también provoca cambios indeseables en los alimentos como el tamaño y la forma que puede cambiar considerablemente, de manera que cuando se reconstituye el alimento este no recupera su forma y tamaño original. Otro aspecto importante es el cambio en la temperatura que según Claudio & Nájera (2012) en su estudio del mortiño, se evidencio un aumento de actividad antioxidantes debido a temperaturas utilizadas de 90°C por 15 minutos hasta temperaturas de 70°C por 30 minutos; por lo que este incremento puede relacionar a la ruptura de la membrana celular y a la inactivación enzimática, en la remoción de la humedad.

Por lo cual la literatura reporta estudios de los procesos de deshidratación y de extracción de principios activos de diferentes materias primas, sin embargo se desconoce los parámetros del proceso de secado de las hojas de níspero (*Achras zapota*) y su influencia en el potencial antioxidante; y cómo estas condiciones de secado repercuten en la calidad de los compuestos que se extraen en los procesos de extracción con solventes a través de los diferentes cambio bioquímicos y microbiológicos que pueden ocurrir.

Con estos antecedentes se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuánto influirán las condiciones de tiempos de secado de las hojas de níspero (*Achras zapota*) y la relación de solvente para la obtención de compuestos antioxidantes?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La provincia de Manabí es rica en biodiversidad, cuenta con una amplia y exuberante flora, de interés tanto para productores e investigadores, con un potencial uso en el desarrollo de nuevos productos tanto alimenticio como farmacéutico (EcuRed, 2019) y según Rata, Aranda & Duarte (2000) la innovación involucra el desafío o desarrollo de nuevos productos, que es amplia y variada. En la actualidad existe escasa información sobre el níspero (*Achras zapota*), y las propiedades antioxidantes que poseen.

El INEC (2018) estableció que hay un decremento de árboles perenne, de estos se encuentra el níspero, que tiene propiedades medicinales y que en la actualidad el país cuenta con una legislación que respalda el uso de preparaciones y comercio de plantas medicinales, la misma que está regulada por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCOSA, 2014), que establece los requisitos para la inscripción del registro sanitario de productos naturales y procesados de uso medicinal nacional, a fin de obtener extractos naturales estandarizados para definir su calidad constante, con ficha técnica que contenga especificaciones de control de calidad.

Uno de los aspectos importantes en la actualidad es el impulso que surge desde de la industria alimenticia que busca implementar tecnologías apropiadas y que con diversas técnicas y métodos, transforman la materia (Alarcón, 2014). Con estas nuevas tecnologías, se puede extraer compuestos antioxidantes, en la que beneficia a la industria por lo que se determinarán cuáles son las condiciones óptimas de tiempo de secado de la hoja de níspero para emplear en procesos de maceración que ayude a la liberación de compuestos antioxidantes.

Según Rincón, Gómez & Zapata (2016) para la extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) desarrolló un Diseño Central Compuesto (DCC), en el cual consideraron como factores la relación solvente/hojas (RSH), que van con valores entre 2/1 y 4/1 (v/p) y el tiempo de extracción (t) con niveles entre 36 y 60h, con el fin que se optimice la variable respuesta, que en este caso fue cantidad de fenoles totales (FT) extraídos del material vegetal.

Alvarez, De La Rosa, Amarowicz & Shahidi (2011) menciona que los compuestos antioxidantes beneficia a la salud humana, por lo que puede controlar la obesidad y síndrome metabólico. Por lo tanto, según en la Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 32, manda que: "La Salud es un derecho que garantiza el Estado, cuya realización se vincula al ejercicio de otros derechos, entre ellos el derecho al agua, la alimentación, y otros que sustentan el buen vivir".

El uso de la hoja de níspero puede contribuir mediante sus compuestos antioxidantes naturales a mejorar la salud de la población reduciendo el consumo de antioxidantes sintéticos que se encuentran en la ingesta de la dieta alimenticia. Optimizar el proceso de secado de las hojas de níspero (*Achras zapota*) permitirá conservar la calidad nutricional y sensorial, el cual dará un valor nutricional que estará enfocado a la presencia de los compuestos antioxidantes, que pueden producir la pérdida de componentes bioactivos debido a los tiempos largos de extracción (Costa, Garipey, Rocha & Raghavan, 2014).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tiempo de secado en hojas de níspero (*Achras zapota*) y relación de solvente para la obtención de compuestos antioxidantes por maceración en la ciudad de Calcuta.

1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas de la hoja de níspero en diferentes tiempos de secado.
- Evaluar el tiempo de secado de la hoja de níspero para la obtención de sustancias antioxidantes por el método de maceración.
- Establecer la relación idónea de alcohol potable (96%) y agua destilada que permitan la mayor obtención de compuestos antioxidantes de la hoja de níspero por el método de maceración.

1.4. HIPÓTESIS

El tiempo de secado de las hojas de níspero (*Achras zapota*) y las diferentes relaciones de alcohol-agua por maceración influyen en la obtención de compuestos antioxidantes.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE *Achras zapota*

El *Malnikara zapota* también conocida como su nombre científico *Achras zapota*, pertenece a la familia Sapotaceae, que es un árbol de hoja perenne con una altura aproximadamente de ocho a quince metros. Es nativo de México, Centroamérica y Norte de Suramérica (Chanda & Nagani, 2010; Rajakumar & Abdul, 2012).

En el continente americano existen más de 107 especies de la familia Sapotaceae; esta planta en su savia tiene componentes que actúa como una fuente primordial en la goma de mascar (Melfi, 2006). Las hojas de esta planta son coriáceas que llegan a medir de 18 a 45cm, según la variedad pueden ser oscura y brillante, con bordes aserrados que tiene un ciclo de crecimiento de dos y tres años (Gariglio, Castillo, Juan, Almela & Agustí, 2002).

Posee hojas que son coriáceas que llegan a medir hasta 45cm, que según la variedad pueden ser oscura y brillante, con un ciclo de crecimiento de dos y tres años (Gariglio et al., 2002). Además, se conoce como árbol del chicle; por lo cual antes de sintetizar la base para la producción de chicle se extrae el látex blanco que forma la base; también tiene copa redondeada y copa densa, con las ramas principales horizontales; pero con relación a lo anterior, su tronco con la corteza es de color pardo, agrietada, que al cortarla exuda un látex blanco (INFOJARDIN, 2017).

Se toma en consideración que la producción de níspero se encuentra en bajo incremento, según el boletín técnico N° 01-2018 ESPAC del Instituto Nacional de Estadística y Censos (2018), sobre la encuesta de superficie y producción agropecuaria, en el período del mismo año el área destinada a cultivos permanentes fue de 1'385.805 ha, presentando una variación del menos 3,1% en relación al año 2017 con una cifra de 1'430.497 ha (INEC, 2018).

2.1.1. HÁBITAT Y CULTIVOS

Según Meghala, Ravishankar, Lalitha & Rekha (2005) *Manilkara zapota* (L.) también conocida como chicozapote, zapotilla o zapota, produce frutos de calidad excelente, es nativa de México y Centro América pero se cultiva en otros países tropicales por su fruto, látex y madera, citado por González, García & Guntin (2012).

INFOJARDIN (2017) menciona que en terrenos escarpados, planos o ligeramente inclinados de naturaleza calcárea, cañadas, acahuales, potreros, planicies inundadas, vega de ríos es próspero; vive en clima húmedo con 1000 a 2000mm de lluvia, y 24°C de temperatura media, incluso estos árboles jóvenes pueden morir o pueden dañarse a temperaturas de 0 a -1°C y los árboles maduros si pueden soportar temperaturas bajas de hasta -4°C por pocas horas con daños menores; también habitan en suelos con buen drenaje y ricos en nutrientes. Muy tolerante a condiciones secas bien marcadas y muy resistente al daño por huracanes.

Según Gazel (2002) la destrucción de hábitats y el exceso de monocultivo se da principalmente por la pérdida de la diversidad biológica que persiste en el mundo, principalmente debido a la desacertada introducción de plantas y animales en medio ajeno. Por lo tanto urgen intervención en la conservación y mantenimiento del material genético, las especies y el ecosistema; por lo que es necesario formular estrategias que facilite la preservación y a la vez utilizar de modo sostenible la diversidad biológica, como estrategia universal en el desarrollo a largo plazo.

La conservación de cultivos es importante para la perseverancia del germoplasma vegetal; la cual es necesaria, puesto que las proyecciones del Fondo Mundial de la Naturaleza (WWF) y la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales (IUCN) ambas por su siglas en inglés; indican que a mediados del siglo XXI, 60.000 especies de plantas, equivalentes al 25% de las especies del planeta, estarán cerca de la extinción (Gazel, 2002).

2.1.2. USOS Y APLICACIONES DE *Achras zapota*

En las medicinas herbales o populares se ha utilizado comúnmente durante muchos tiempo en el tratamiento y prevención de enfermedades, promoción de la salud y mejora de la duración y la calidad de vida. Por lo general, se cree que las hierbas medicinales tradicionales son seguras en comparación con las drogas sintéticas, porque se originan en plantas naturales y se han utilizado durante bastante tiempo (Mosihuzzaman, 2012). Sin embargo, varios productos y componentes a base de hierbas con una larga historia de tradición de uso, puede causar efectos secundarios peligrosos (Moreira, Teixeira, Monteiro, De-Oliveira & Paumgarten, 2014).

Las hojas de níspero se han utilizado para tratar enfermedades del pulmón, enfermedades estomacales y de la piel; también se ha encontrado que son efectivos en el tratamiento crónico de bronquitis, inflamación, asma, dolor lumbar y tumores; además el chicle de la corteza se usa en cirugía dental (Alshaker, Qinna, Qadan, Bustami & Matalka, 2011). En muchos casos las hojas de esta planta se utilizan en muchas formas, incluidas las hojas secas crudas, el té, las hojas en polvo, y los extractos de hojas. Es importante mencionar que las frutas son comestible dulce, con rico y fino sabor.

Jeong et al. (2018) mencionan que las hojas, aunque se usan ampliamente como medicina tradicional, la información que existe es escasa, sobre su posible potencial toxicidad en humanos y animales de experimentación. Probablemente estudios previos, de una administración oral única del extracto n-butanólico de las hojas a ratones, no produce ningún efecto adverso relacionado con el tratamiento hasta un nivel de dosis de 2.000mg/kg (Cha, Eun & Jeon, 2011), y un extracto etanólico al 70% de las hojas tenía una DL₅₀ de 40,1g/kg en ratones (Li, Wu, Ren, Chen & Lu, 2007).

Recientemente, Li, Li, Li, Shi & Guo (2017) anunciaron que la administración oral de ácido triterpeno de las hojas de *Eriobotrya japonica* a ratones ICR no causaron mortalidad, ni manifestaron efectos tóxicos contra los órganos principales de los animales en un breve estudio de toxicidad de dosis única (300, 650, 1.390 y

3.000mg/kg) y en un estudio de toxicidad de dosis repetidas durante cuatro semanas (150, 300 y 600mg/kg al día).

Según Huang et al. (2007); Kumar & Yadav (2008) el uso de plantas para sintetizar nanopartículas es rápido siendo un método de un solo paso para el proceso de biosíntesis; además es de bajo costo, ecológico y seguro para uso terapéutico humano que es citado por Rajakumar & Abdul (2012).

También se ha demostrado que los productos a base de hierbas inhiben y/o inducen enzimas metabolizadoras de fármacos. Por lo tanto, han surgido preocupaciones con respecto a los posibles efectos adversos de las hierbas medicinales en la salud humana (Lee et al., 2016).

La *Eriobotrya japonica* como hierba medicinal se compone de quercetina, ácido ursólico, ácido oleanólico, taninos, ácido clorogénico y ácido cafeoilquínico (Cha et al., 2011). Se ha informado que estos compuestos son biológicamente activos y exhiben propiedades antiinflamatorias, antimutagénicas y antitumorales (Maher, Yassine & Sofiane, 2015).

2.2. OPCIONES ÓPTIMAS DE SECADO

De acuerdo con Heldman, Lund & Sabliov (2018) definen el secado como la remoción de humedad debido a la transferencia simultánea de calor y masa. Cabe mencionar que según Andrade et al. (2003) estos son útiles como herramientas para estimar el tiempo necesario para reducir el contenido de agua del producto en diferentes condiciones y la temperatura idónea, mejorando así la eficiencia del proceso.

El secado según Fito et al. (2001) es una de las técnicas antiguamente más utilizada en la conservación de alimentos desde los inicios de la humanidad, en la que proporciona la posibilidad de subsistencia en épocas de carencia; siendo este tipo de secado natural el más económico; sin embargo, presenta alguna limitaciones. En condiciones normales puede tardar de dos a tres días y en épocas

de baja radiación solar y de lluvias, el secado se prolonga hasta cinco días o más, asimismo el producto puede ser afectado por agentes biológicos.

Doymaz (2006) estudió el comportamiento de secado en capa fina de las hojas de menta para un rango de temperatura de 35 a 60°C en el horno secador. Este aumento de la temperatura del aire redujo significativamente el tiempo de secado de estas hojas por lo cual, se ajustaron los datos a cuatro modelos experimentales de secado en capa delgada y entre todos los modelos de estos secado, se encontró que el modelo logarítmico se ajustó satisfactoriamente en la descripción de la cinética de secado.

Evidentemente existen varios métodos de secado, pero dentro de los cuales el secado convectivo (CD) es el método que más se está aplicando para reducir el contenido de humedad de vegetales y frutas, incluyendo hierbas aromáticas. Por lo tanto, este método tiene varias limitaciones, tales como el uso de altas temperaturas que degrada importantes sabores y componentes nutricionales. Estas consecuencias negativas son adicionalmente intensificadas por un tiempo largo de secado (Doymaz, 2006).

Mediante el desarrollo Diseño Central Compuesto (DCC) expuesto por Rincón, Gómez & Zapata (2016) el tiempo de extracción (t) es con niveles de entre 36 y 60h, con la finalidad de optimizar la variable respuesta cantidad de fenoles totales que fueron extraído del material vegetal. Mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) se determinó las condiciones, en las cuales se obtiene mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Así que la temperatura, el tiempo de extracción y el tamaño de partícula son los factores de gran importancia, porque influyen en la eficiencia de extracción en términos de la calidad y rendimiento del producto a obtener (Bucić, Planinić, Tomas, Bilić & Velić, 2007). Esta eficiencia también se ve significativamente afectada por la composición del solvente (Gironi & Piemonte, 2011).

Por lo ante expuesto, según Flores, León, Estarron & Orozco (2016) las soluciones hidroetanólicas ensayadas fueron al 30, 60 y 96% v/v, en contenido de alcohol y

fueron preparadas mezclando agua destilada y etanol grado reactivo. Asimismo, algunos estudios se han enfocado hacia el uso de sistemas de extracción acelerada por solventes (ASE) para extraer compuestos específicos a partir de especias obteniendo excelentes resultados (Herrero et al., 2005).

2.3. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

2.3.1. ANTIOXIDANTES

Son sustancias químicas que se identifican por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, por lo tanto estos antioxidantes en muchos casos son potenciadores de la salud y se utiliza para la prevención de enfermedades crónicas y no transmisibles como algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares entre otras (Zamora, 2007).

Continúa agregando Zamora (2007) que por lo consiguiente otra de las funciones de los antioxidantes es facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias celulares, ayudando a disminuir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno, formando complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales oxidantes; también conocidos como radicales libres y por consiguiente protagonizando una función fundamental en la prevención de las enfermedades crónicas no trasmisibles.

Los antioxidantes se divide en:

- **Antioxidante primarios**

Protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres, lo quiere decir que son interruptores de cadena, donde participan en la etapa de propagación reaccionando con los radicales peróxilos para que se convierta en productos más estables (Rojano, 1997).

- **Antioxidante secundarios**

Son aquellos que reducen la velocidad de la etapa de iniciación de una reacción en cadena, por medio de diversos mecanismos con compuestos que retardan la velocidad de oxidación de los lípidos. Estos antioxidantes pueden operar por una variedad de mecanismos que incluyen agentes atrapadores de oxígeno, especies que descomponen los hidroperóxidos formados previamente, desactivadores de oxígeno (Rojano, 1997).

2.3.2. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES POR MACERACIÓN

Gironi & Piemonte (2011) han demostrado una mejor eficiencia de extracción de polifenoles, provenientes de la corteza del árbol de nuez (*Castanea* sp) y hojas del muile (*Justicia spicigera*) equitativamente, con mezclas binarias etanol-agua como medio de extracción con respecto a los solventes puros, pero dentro de la extracción se encuentra la maceración; que consiste en una extracción que se realiza a temperatura, en un ambiente protegido de la luz.

La maceración simple o estática reside en poner el material crudo, en contacto con el solvente, en recipientes o equipos cerrados, protegidos de la luz solar, a temperatura ambiente y por un tiempo que puede variar entre horas, varios días e incluso meses en maceración. Los solventes más utilizados en la maceración son: agua, glicerina o mezclas hidroalcohólicas (Pulluquitin, 2013).

Con respecto a este tipo de extracción, González (2004) menciona que la maceración reside en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, etanol o glicerina) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles, se tapa y se deja en reposo por un período de dos a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto.

Según Palma & Velásquez (2019) en la obtención de aceite esencial de plantas medicinales; se pone un tercio de la capacidad del bote de cristal con la planta medicinal cortada o puede ser machacada ligeramente y se termina de llenar el bote con el aceite base como son: oliva virgen extra, almendras dulces, argán, coco, entre otras. Después de esto se procede en un lugar oscuro y fresco durante cuatro a seis semanas. Pasado ese tiempo se cuela y se guarda en un frasco de cristal opaco en la que ayude a conservar los principios activos que ha liberado la planta y que ahora se encuentran en el aceite.

Por lo tanto en los extractos vegetales se pueden obtener por diferentes procesos como son: físicos, químicos y microbiológicos, a partir de una fuente vegetal y utilizable en cualquier campo de la industria química y médico-farmacéutica (Treybal, 1986). En los extractos vegetales se concentra los compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes, que es relacionada con la actividad antioxidante, es fundamental en el campo nutricional, medicinal y farmacológico (Shindo, Saito, Sekiya, Matsui & Koike, 2008).

Según Shindo et al. (2008) los antioxidantes son componentes protectores que intervienen en arreglos enzimáticos y nutrientes esenciales (como vitaminas, pigmentos) cuya función principal es prevenir la formación de radicales libres e interceptar los que ya se han generado para proteger el cuerpo humano de efectos.

La actividad antioxidante total o capacidad antioxidante total es la medición analítica de concentraciones de radicales con diferente naturaleza, en un sistema oxidativo controlado. En productos de origen vegetal y en pétalos de la mayoría de plantas, se atribuye esta capacidad a la presencia de compuestos fenólicos, porque poseen uno o más grupos hidroxilo unido a un anillo aromático, importante para ejercer una acción antioxidante actuando como captosres de radicales libres (Ciappini, Stoppani, Martinet, & Alvarez, 2013).

La capacidad antioxidante de origen de vegetal ha despertado gran interés en los últimos tiempos; se comercializan como ingredientes alimentarios y algunos alimentos se expenden indicando esta propiedad, no cabe duda que es el atributo principal de interés para contribuir a la conservación de la salud o a la prolongación

de la vida útil de los productos (Blasa, Candiracci, Accorsi, Piacentini & Piatti, 2007); en la que se obtiene mediante el empleo de soluciones extractivas (Bastidas, 2011).

2.4. SOLUCIONES EXTRACTIVAS

2.4.1. SOLVENTES

Es el componente de una solución que se encuentra en una mezcla líquida de agua, en la cuales son solubles en ella; pero en el caso que el solvente sea miscible en todas las relaciones de mezcla con otra sustancia, el solvente será el componente cuya actividad química sea menor (Talace, 2017). Dentro de los solventes se tienen los primordiales que son los siguientes:

- **Metanol**

El metanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$), también conocido como alcohol metílico, alcohol de madera, alcohol de quemar o carbinol, es una sustancia altamente tóxica y el más simple de los alcoholes (Alcaláx, 2002). Las relaciones de metanol con agua según Hernández, Lugo, Díaz & Socorro (2005) fueron de 95mL de metanol y 5mL de agua con una temperatura de 25°C.

- **Acetona**

La acetona es un líquido incoloro y su fórmula es $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$; es el compuesto más simple y más importante del grupo de las cetonas, siendo un excelente disolvente y a la vez un precursor de muchos otros productos químicos (Vaquero, 2016). Las relaciones de acetona-agua según Calonge et al. (2002) fueron de 2:1 en una mezcla de 25mL de solución.

- **Etanol**

El etanol o también llamado alcohol etílico, es un líquido aromático y combustible que procede de la fermentación de sustancias azucaradas, del almidón y de la celulosa y que pueden dar lugar a una intoxicación común, accidental o voluntaria, y a una intoxicación profesional (Quispe & Loayza, 2011).

La mezcla de etanol-agua en la extracción de los compuestos antioxidantes, tiende ser de distintas relaciones; como es en un estudio que realizaron Guntero, Martini, Longo, Ciparicci & Andreatta (2015) en la que menciona que el mejor rendimiento se obtuvo utilizando la relación 1:1; así también las relaciones que establece Hinojosa et al. (2017) en la extracción de glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni, fueron de 30:70 respectivamente en v/v, teniendo un menor aprovechamiento en el rendimiento por el tipo de relación que uso y por métodos convencionales que se aplicó.

2.4.2. REACTIVO 2,2- DIFENIL-1-PICRIHIDRAZILO (DPPH)

El DPPH es un polvo cristalino de color oscuro compuesto por moléculas estables de radicales libres. Tiene aplicaciones principalmente en investigación de laboratorio, más notablemente en ensayos de compuestos antioxidante común (Sharma & Bhat, 2009). Este es un radical libre en la que se puede obtener directamente disolviendo el reactivo en un medio orgánico (Herrera, 2016).

Continúa agregando Herrera (2016) que la reducción del DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atacar radicales. El empleo del DPPH en el método espectrofotométrico posee ventajas en cuando a confiabilidad, simplicidad, reproducibilidad y rapidez para la determinación de actividad antioxidante.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de esta investigación se realizó en la ciudad de Calceta. La materia prima será recolectada en la finca Don Arturo, ubicada en el sector Las Delicias del cantón Bolívar. La fase experimental y análisis físicos químicos se ejecutó en el laboratorio de Bromatología de la carrera de Agroindustria, de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” ubicada en el sitio El Limón, situado geográficamente entre las coordenadas, 0°49'35"S 80°11'11"O (Zambrano & García, 2012); mientras que los análisis de compuestos antioxidante se desarrolló en el laboratorio de la Facultad de Agropecuaria de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

3.2. DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se desarrolló desde mayo de 2019 hasta marzo de 2020, con una duración de 11 meses.

3.3. FACTORES DE ESTUDIO

Los factores de estudio que se evaluaron en el presente trabajo de investigación son los siguientes:

- **Factor A:** Tiempo de secado de las hojas de níspero (*Achras zapota*).
- **Factor B:** Relaciones de solventes alcohol potable (96%)-agua destilada.

3.4. NIVELES DE FACTORES

Para el factor tiempo de secado de hojas de níspero se utilizaron los siguientes niveles:

- a₁: 60 minutos.
- a₂: 70 minutos.

Para el factor relaciones de solventes alcohol potable (96%) – agua destilada se utilizaron los siguientes:

- b₁: 20% de alcohol y 80% agua.
- b₂: 40% de alcohol y 60% agua.
- b₃: 60% de alcohol y 40% agua.
- b₄: 80% de alcohol y 20% agua.

3.5. TRATAMIENTOS

De las combinaciones de los diferentes niveles de cada factor se obtuvo como resultados los siguientes tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Detalle de los tratamientos

Tratamientos	Codificación	Tiempo de secado	Relación solvente (%)
		Minutos	Alcohol/Agua
1	a ₁ b ₁	60	20:80
2	a ₁ b ₂	60	40:60
3	a ₁ b ₃	60	60:80
4	a ₁ b ₄	60	80:20
5	a ₂ b ₁	70	20:80
6	a ₂ b ₂	70	40:60
7	a ₂ b ₃	70	60:80
8	a ₂ b ₄	70	80:20

Fuente: Autores de la investigación.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un arreglo factorial de A²XB⁴ en Diseño Completamente al Azar (DCA) con ocho tratamientos y tres repeticiones, obteniendo 24 unidades experimentales.

3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

En esta investigación se emplearon por cada repetición 30 gramos de materia seca de hojas de níspero, las cuales estuvieron en un recipiente de vidrio con capacidad de 200mL; que previamente contenía 150mL de solventes de alcohol potable 96% y agua destilada, que estuvieron distribuidos de acuerdo a los tratamientos (Tabla 1).

3.8. MANEJO DE EXPERIMENTO

3.8.1. DIAGRAMA DE FLUJO

En la figura 1 se detalla el proceso de la obtención de compuestos antioxidantes.

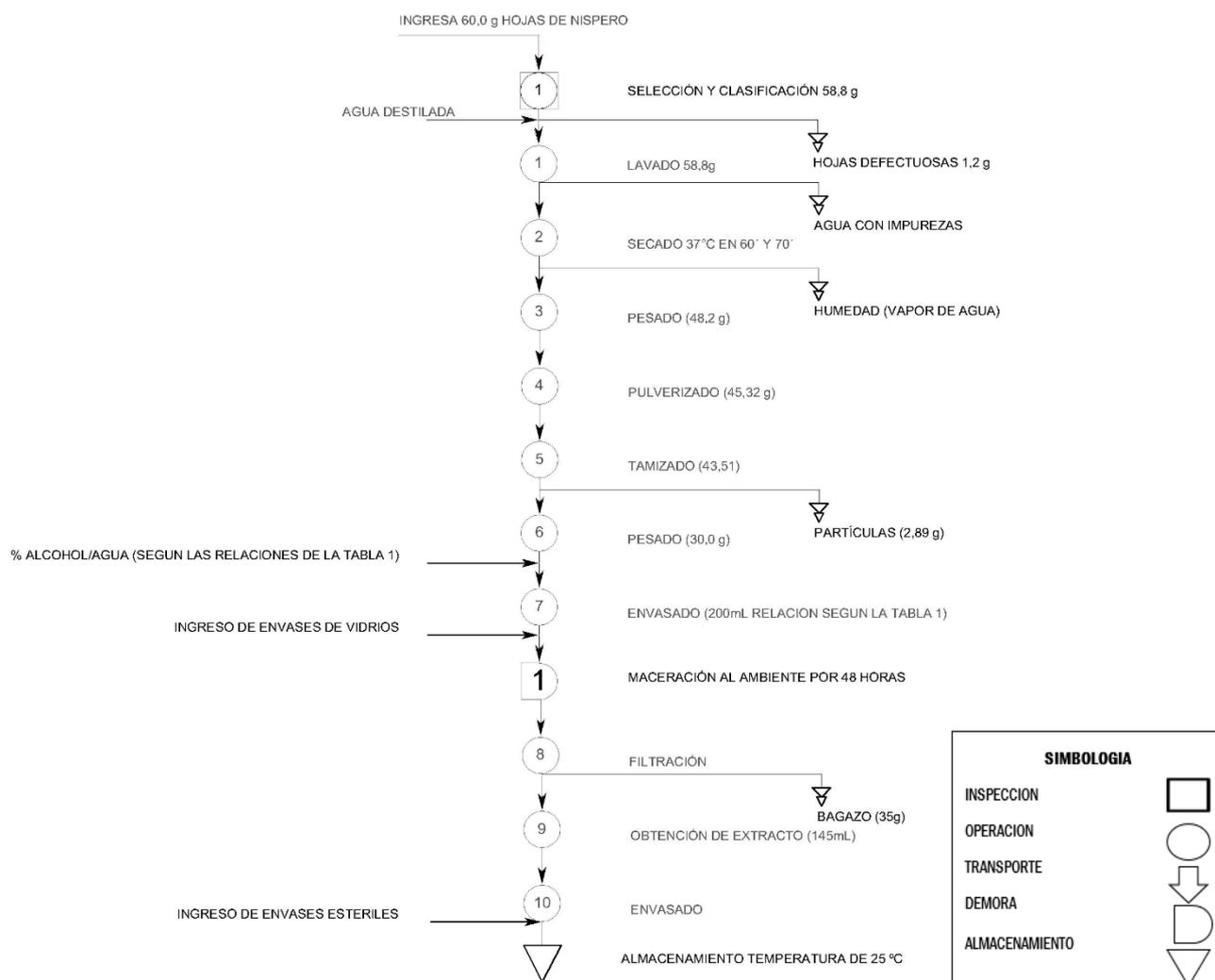


Figura 1. Diagrama de flujo de la obtención del extracto de las hojas de níspero (*Acrhas zapota*).

Fuente: Autores de la investigación.

3.8.2. DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE NÍSPERO

Las hojas de níspero fueron recolectadas en horas de la mañana (entre las 07:00am y 08:00am) y debe de presentar tamaños de 10 a 20cm de hojas, las cuales estuvieron colocadas en fundas pouch e introducidas en una caja de cartón para evitar la luz solar.

Selección y Clasificación: Una vez que se recolectaron las hojas de níspero fueron transportadas al laboratorio de Bromatología de la carrera de Agroindustria de la ESPAM MFL dentro de las siguientes 24 horas para evitar daños físicos y mecánicos, manteniéndose en fundas pouch. Las hojas que no cumplen con las medidas y madurez morfológica, al igual que las que presenten algún daño microbiológico fueron rechazadas como defectuosas.

Lavado: En esta etapa se enjuagaron las hojas de níspero con agua destilada para no alterar la materia prima durante dos minutos, desechando el agua con impurezas. En esta etapa se utilizó la norma de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

Secado: El proceso de secado se realizó en una estufa Conterm LED digital a 37°C por 60 y 70 minutos respectivamente, con la intención de eliminar humedad (vapor de agua) contenida de las hojas secas.

Pesado 1: Se pesaron la muestra seca en la balanza electrónica modelo B164A para realizar el análisis de humedad.

Pulverizado: En esta etapa se produjo mediante el uso de licuadora de marca Oster de 3600rpm con la intención de reducir el tamaño de la hoja de níspero.

Tamizado: Se utilizó un tamiz de malla número 120 (125µm) no considerando aquellas partículas de hojas de tamaño mayor.

Pesado 2: Se pesaron 30 gramos de muestra que conformó la unidad experimental; siendo en su totalidad 24 unidades experimentales, en las que se envasaron por cada una de las muestras.

Envasado 1: Las muestras se envasaron en recipientes de vidrio herméticamente con capacidad de 200mL de material de vidrio pirex y rotulados para cada uno de los tratamientos con la finalidad de macerar.

Macerado: A las muestras de las hojas de níspero molida se le agregaron las relaciones de solventes alcohol potable a 96%-agua destilada a temperatura ambiente (24°C) por 48 horas, con el fin de que los principios activos estén disueltos en el líquido.

Filtración: Culminado el tiempo transcurrido del proceso anterior se produjo las filtraciones del producto, pudiendo eliminarse el residuo por filtración manual, utilizando papel filtro de grado uno con el tamaño de poro de 11µm y de marca Whatman, quedando únicamente los principios activos de la planta (líquido sobrenadante).

Obtención del extracto: De acuerdo con el proceso se obtuvo el líquido sobrenadante que corresponde a la obtención de compuestos en la maceración, por la acción del disolvente sobre las partes activas de la hoja seca.

Envasado 2: Se envasaron en recipientes de vidrio herméticamente con capacidad de 200mL y rotulados respectivamente para sus análisis (fenoles totales y capacidad antioxidantes).

Almacenado: Los recipientes que contienen el líquido, se almacenaron en un cooler de marca Coleman 30QT.

3.9. VARIABLES A MEDIR Y MÉTODO DE EVALUACIÓN

3.9.1. pH

Con la norma INEN 526:2013 se utilizó el equipo HandyLab 100 (Potenciómetro) para hojas de níspero secas, según la metodología propuesta será mediante el siguiente procedimiento:

- Pesar, con aproximación al 0,1mg; 10g de muestra preparada y colocar en el vaso de precipitación, añadir 100cm³ de agua destilada (hervida y enfriada) y agitar suavemente hasta que las partículas queden uniformemente suspendidas.
- Continuar la agitación durante 30 minutos a 25°C, de modo que las partículas se mantengan en suspensión, dejando en reposo durante 10 minutos para que el líquido se decante.
- Decantar el sobrenadante en el vaso de precipitación mediante el uso de pipeta (anexo 4).
- Determinar el pH por lectura directa, introduciendo los electrodos del potenciómetro marca Mettler Toledo en el vaso de precipitación con el líquido sobrenadante, cuidando que éstos no toquen las paredes del recipiente ni las partículas sólidas.

3.9.2. ACIDEZ TITULABLE

Con la norma INEN 521:2013 se utilizaron los siguientes materiales: Matraz Erlenmeyer, Pipetas y Bureta de material de vidrio pírex para hojas de níspero secas, según la metodología propuesta por la norma antes mencionada, fue mediante el siguiente procedimiento:

- La determinación debe realizarse sobre la misma muestra preparada. Pesar, con aproximación al 0,1mg, los 5g de la harina de origen vegetal y transferir al matraz Erlenmeyer de 100cm³.

- Agregar lentamente 50cm³ de alcohol neutralizado al 90% (V/V), tapar el matraz Erlenmeyer y agitar fuertemente.
- Dejar en reposo durante 24h.
- Tomar con la pipeta una alícuota del 10cm³ del líquido claro sobrenadante y transferir al matraz Erlenmeyer de 50cm³; agregar 2cm³ de la solución indicadora de fenolftaleína.
- Agregar lentamente y con agitación la solución 0,02N de hidróxido de sodio (NaOH), hasta conseguir un color rosado que desaparece poco a poco.
- Continuar agregando la solución hasta que el color rosado persista durante 30 segundos.
- Leer en la bureta el volumen de solución empleada, con aproximación a 0,05cm³.

$$A = \frac{490 NV}{m (100-H)} \times \frac{V_1}{V_2} \quad [3.1]$$

Datos:

A = Contenido de acidez de la muestra, en porcentaje de masa de ácido sulfúrico.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio al 0,02N.

V = Volumen de la solución de hidróxido de sodio.

V₁ = Volumen del alcohol empleado en cm³ (50cm³).

V₂ = Volumen de la alícuota tomada para la titulación, en cm³ (10cm³).

m = Masa de la muestra en gramos.

H = Porcentaje de humedad en la muestra.

3.9.3. HUMEDAD

Con la norma INEN 518:1980 se utilizó la estufa de marca Conterm, LED digital para hojas de níspero secas; por diferencia de peso, empleando la balanza de electrónica modelo B164A, según la metodología propuesta por la norma antes indicada, fue el siguiente procedimiento:

- Calentar la bandeja durante 30 minutos en la estufa a 37°C. Enfriar hasta temperatura ambiente (25°C).

- Pesar la muestra preparada, transferirla a la bandeja y distribuirla uniformemente.
- Calentar la bandeja con su contenido durante 60 minutos a temperatura de 37°C.
- Pesar en la balanza electrónica modelo B164A la muestra, tan pronto haya alcanzado la temperatura ambiente mediante el uso del desecador. Tomar lectura.
- Repetir la operación de calentamiento, enfriamiento y pesaje de la muestra para 70 minutos, con la misma temperatura.

$$P_c = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100 \quad [3.2]$$

Datos:

P_c = Pérdida por calentamiento, en porcentaje masa.

m_1 = Masa de la muestra inicial, en gramos.

m_2 = Masa de la muestra final, en gramos.

3.9.4. POLIFENOLES TOTALES

García, Fernández & Fuentes (2015) detalla la cuantificación de polifenoles en los siguientes pasos:

- De la muestra de los compuestos polifenólicos se tomó 3mL y colocó en matraces aforados de 25mL.
- Se añadió 15mL de agua destilada y 1,25mL de reactivo de FolinCiocalteu.
- Homogenizado el contenido de los matraces se dejó reposar 8 minutos a temperatura ambiente.
- Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada matraz 3,75mL de la disolución de carbonato sódico al 7,5% y llevó a un volumen de 25mL con agua destilada.
- Se homogenizó los matraces y mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante dos horas para luego medir la absorbancia a 765nm.

3.9.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ VISIBLE

Según Palma & Velásquez (2019) la técnica para determinar actividad antioxidante es la siguiente:

Preparación Soluciones Patrón:

- Se pesarán 2mg de DPPH y se disolvieron en 100mL de metanol grado analítico (80%).
- La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas de la oscuridad.
- Posteriormente fueron preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de $0,750 \pm 0,050$ para todos los casos a una longitud de onda 517nm.
- Se añadieron 600 μ L del radical DPPH.
- Se añadieron 200 μ L de extracto y se midió la absorbancia 517nm en un espectrofotómetro Jenway modelo 6715 UV/Vis cada 10 minutos por un periodo de 30min.

Curva calibración con ácido ascórbico:

- Se preparó una solución stock 250mg/L de metanol disolviendo 25mg de ácido ascórbico en 100mL de metanol.
- Luego se prepararon diluciones de 25 - 12,5 - 6,25 - 0,625 y 0,0625mg/L de metanol con el fin de realizar la curva de referencia.
- A 600 μ L del radical DPPH. Se le adicionaron 200 μ L de cada una de las diluciones de ácido ascórbico, la medición se realizó a 517nm y el porcentaje de captación se calculará de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de captación DPPH} = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \times 100 \quad [3.3]$$

Donde:

A_{inicial} = Contenido inicial del DPPH.

A_{final} = Contenido final del DPPH (consumo).

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para análisis estadístico de las variables en estudio se realizó las siguientes pruebas:

- Las variables en estudio no cumplieron con el supuesto del ANOVA de Normalidad, procediendo a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.
- El análisis de los datos se lo efectuó por medio del programa de Microsoft office Excel 2013 y SPSS 21 versión libre.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA HOJA DE NÍSPERO (*Achras zapota*) SECAS

La hojas de níspero (*Achras zapota*) en el tiempo de 60 minutos de secado a 37°C tiene una acidez de 3,35%, un pH de 4,73 y una humedad del 18%; en comparación del secado del tiempo de 70 minutos que tiene una acidez de 2,52%, un pH de 4,83 y una humedad del 13%; teniendo en ambos tiempo variabilidad de las diferentes características fisicoquímicas como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de la materia prima.

Tiempo (minutos)	Acidez (%)	pH	Humedad (%)
60	3,35	4,73	18
70	2,52	4,83	13

Fuente: Autores de la investigación.

Para el pH, utilizando la norma INEN 526:2013, los valores obtenidos que oscilan entre 4,73 a 4,83 corroboran las características ácidas débiles de las sustancias que se extraen y como sugiere Ochoa (2013) que probablemente con valores similares pudieran extraerse compuestos bioactivos como son flavonoides, ácido benzoico, fenoles y taninos, saponinas, oleico, lignocérico, entre otros. En varios estudios han indicado que para la extracción de fenoles y actividades antioxidantes, el pH tiene un efecto significativo por lo cual entre más básico sea la sustancia acercándose a pH 8, la extracción de fenoles es mayor; según Sepúlveda, Ciro & Zapata (2016) esto se dio para el caso de la hoja de achiote.

El estudio de Casierra & González (2009) sobre la acidez titulable y pH de dos clases de plantas, estas mostraron valores de pH diferentes en un período de tiempo secado de 60min en comparación con este estudio donde el comportamiento entre acidez y pH fue inversamente proporcional, coincidiendo con los reportado con los investigadores antes mencionados. Cabe indicar que el

contenido de acidez empieza a disminuir a partir del aumento del tiempo donde se liberó especialmente malato (Casierra & González, 2009), siendo esta relación igual con el contenido de acidez de las hojas de níspero.

En el caso de la humedad según Martínez et al. (2016) en los resultados de su investigación con respecto a la hoja de Stevia demuestran una fuente importante de compuestos antioxidantes en hojas frescas con tiempo 0 y humedad del 75%, pero a medida que la temperatura y tiempo pasa, disminuye la humedad y con ello dichos compuestos antioxidantes. También Concha (2014) indica que el secado al sol directo da un mayor contenido de humedad (10,9%) en comparación con el secado convectivo, debido a que el primero está en contacto con la humedad relativa del ambiente, mientras que en el segundo se suministra una corriente de aire caliente forzado.

Martínez et al. (2016) indican que el mayor contenido de polifenoles como de actividad antioxidante se presentó en hojas frescas de stevia (tiempo 0), coincidiendo lo anterior a los resultados de esta investigación donde el 18% de humedad permitió obtener mayor contenidos de sustancias bioactivas, esto se debe a que a mayor contenido de humedad se produce una mejor liberación de acuerdo con el autor antes mencionado.

4.2. TIEMPO DE SECADO DE LA HOJA DE NÍSPERO (*Achras zapota*) EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Las variables en estudio no cumplieron los supuestos de normalidad dando su significancia menor a 0,05 como se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Supuesto de Normalidad.

	Estadístico	Shapiro-Wilk gl	Sig.
Fenoles totales	0,895	24	0,017
Capacidad antioxidantes	0,805	24	0,000

Fuente: Autores de la investigación.

A la variable Fenoles totales y capacidad antioxidantes se les realizó el supuesto de Normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk, la cual determinó que ninguna de las variables en estudio cumplió con el supuesto antes mencionado debido a que su significancia fue menor al 0,05; procediéndose a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Como se evidencia en la tabla 4, no existe diferencia estadística significativa del factor A para las variables en estudio debido a que su significación es mayor que 0,05; a pesar de esto, la información reportada por Martínez et al. (2016) de la hoja de stevia, menciona que el tiempo que se escogió (60min) a temperatura de 40°C dio una diferencia significativa en la obtención de los compuestos antioxidantes.

Tabla 4. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el factor A.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Fenoles totales es la misma entre las categorías de Factor A.	Prueba Kruskal-Wallis muestras independientes	de 0,729	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de Capacidad antioxidantes es la misma entre las categorías de Factor A.	Prueba Kruskal-Wallis muestras independientes	de 0,729	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

4.3. RELACIÓN IDÓNEA DE ALCOHOL POTABLE (96%) Y AGUA DESTILADA EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

El factor B tiene incidencia sobre las variables fenoles totales y capacidad antioxidante debido a que su significancia es menor a 0,05 como se muestra en la tabla 5 mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla 5. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el factor B.

Resumen de prueba de hipótesis					
	Hipótesis nula	Prueba	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Fenoles totales es la misma entre las categorías de Factor B.	Prueba	Kruskal-Wallis	de 0,000	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de Capacidad antioxidantes es la misma entre las categorías de Factor B.	Prueba	Kruskal-Wallis	de 0,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

Como se evidencia en la tabla 6 de las pruebas de subconjunto homogéneo para la variable fenoles totales; la relación que permitió obtener la mayor cantidad de fenoles totales fue 80:20 (alcohol potable 96%-agua destilada), con la cual (Aguado, Nuñez, Bela, Okulik & Bregni, 2013), sugiere que los alcoholes son ácidos más débiles que el agua y que en sistemas biológicos se consideran neutros por lo que su investigación emplearon combinaciones o relaciones 50:50 donde obtuvieron la mayor concentración en la extracción de fenoles totales.

Tabla 6. Prueba de subconjunto homogéneo del factor B para la variable Fenoles totales (mg Aci. gálico/g).

		Subconjunto			
		a	b	c	d
Muestra¹	20% de alcohol y 80% de agua	3,500			
	40% de alcohol y 60% de agua		9,500		
	60% de alcohol y 40% de agua			15,500	
	80% de alcohol y 20% de agua				21,500

Letras iguales en columna no difieren estadísticamente. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

El contenido de Fenoles Totales de los extractos obtenidos por maceración sólido-líquido fue mayor, donde se empleó la relación más alta de etanol (80% de alcohol potable al 96% de pureza y 20% de agua destilada) estos datos tiene coherencia con lo reportado por Flores et al. (2016) donde utilizó la relación 60:20 la cual permitió obtener la mayor cantidad de Fenoles Totales con respecto a la hoja de orégano; esto indica que a mayor relación de alcohol mayor es la obtención de compuestos fenólicos.

Flores et al. (2016) en su estudio indica que esta condición permite obtener los mejores niveles de solubilidad, selectividad, estabilidad y accesibilidad del solvente

hacia los compuestos fenólicos, permitiendo que las extracciones sean más eficientes.

Estos resultados pueden ser explicados de investigaciones anteriores, donde se ha establecido que el incremento de temperatura de secado favorece las reacciones de división y el rompimiento de la pared celular, debido a que la energía térmica aumenta la vibración molecular y por tanto la división y separación de los compuestos, lo que favorece la ruptura de fuerzas intermoleculares y de algunos enlaces (Duque & Morales, 2005).

Además, el incremento de temperatura también puede contribuir a la activación de enzimas que participen de la descomposición de los compuestos complejos que crean puentes de hidrógeno con los compuestos fenólicos en la maceración, facilitando la extracción de éstos (Duque & Morales, 2005).

Como se evidencia en la tabla 7 de las pruebas de subconjunto homogéneo para la variable capacidad antioxidantes; la relación que permitió obtener la mayor cantidad de fenoles totales fue 80:20 alcohol agua.

Tabla 7. Prueba de subconjunto homogéneo para el factor b la variable Capacidad antioxidantes ($\mu\text{mol ET/g}$).

		Subconjunto		
		A	B	c
Muestra¹	20% de alcohol y 80% de agua	5,167		
	40% de alcohol y 60% de agua	8,667		
	60% de alcohol y 40% de agua		14,667	
	80% de alcohol y 20% de agua			21,500

Letras iguales en columna no difieren estadísticamente. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

En la tabla 7 se observan los resultados para los ensayos de capacidad antioxidante realizado para cada una de las relaciones que mostraron al extracto hidroalcohólico Etanol 96%-Agua (80:20 V/V) dió un resultado similar a lo reportado por la variable fenoles totales (21,5mg ácido gálico/g).

Este resultado concuerda con Seo, Lee & Marcus (2013) quienes afirman que para la selección del mejor solvente de extracción para hojas de guayaba se debe tomar

en cuenta la polaridad del mismo, reconociendo que la mezcla hidroalcohólica favorece la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides por presencia de grupos hidroxilo, coincidiendo con esta investigación donde se encontró que la relación 80:20 mostró tener una alta capacidad antioxidante, que incide un alto poder secuestrante de radicales libres en medios acuosos (Kuzma, Druzynska & Obiedzinski, 2014).

4.4. RELACIÓN DE SOLVENTE ALCOHOL POTABLE (96%)-AGUA DESTILADA Y TIEMPO DE SECADOS PARA TRATAMIENTOS

En la tabla 8 se muestra la distribución de fenoles totales y capacidad antioxidante para los tratamientos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, donde se evidencia que existe diferencia estadística significativa.

Tabla 8. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para los tratamientos.

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Fenoles totales es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis muestras independientes	de 0,003	Rechazar la hipótesis nula.
2	La distribución de Capacidad antioxidantes es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba Kruskal-Wallis muestras independientes	de 0,006	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

En el subconjunto homogéneo para la variable fenoles totales, el tratamiento 4 fue el que dio mayor cantidad, como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Prueba de subconjunto homogéneo para los tratamientos de Fenoles totales (mg Aci. gálico/g).

	Subconjunto					
	a	b	c	d	e	f
T1	3,000					
T5	4,000	4,000				
T2	8,667	8,667	8,667			
T6		10,333	10,333	10,333		
T3			14,667	14,667	14,667	
T7				16,333	16,333	16,333
T8					21,333	21,333
T4						21,667

Letras iguales en columna no difieren estadísticamente. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

Se demostró que la cantidad de fenoles totales de esta investigación depende del tiempo de maceración y la cantidad de relación solvente/materia vegetal, utilizando temperatura de 37°C; así también lo demostraron Sepúlveda, Ciro & Zapata (2016) en su estudio de hojas *B. orellana* en la que dice que el incremento de fenoles totales depende de la relación solvente/materia vegetal y el tiempo de extracción, cuanto mayor es el tiempo que transcurra mayor es la penetración del solvente en el material vegetal permitiendo obtener la mayor cantidad de estos compuestos.

Como se aprecia en la Tabla 9 el tratamiento que permitió obtener mayor cantidad de fenoles totales fue el T4 con un valor de 21,667 mientras que (Serna & Torres, 2015) expresa que la extracción al 90% de alcohol y maceración aporta la mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Sahin S. & Samli R. (2013) en el estudio de extracción de polifenoles de las hojas de oliva planteó que la combinación adecuada de etanol-agua es beneficiosa para la extracción, puesto que el agua provoca la inflamación de la hoja, lo cual permite que el etanol debilite o trastorne con más facilidad el enlace entre el soluto y la matriz vegetal. Por otra parte, las mezclas hidroalcohólicas aumentan la permeabilidad de la pared celular, facilitando la eficiente extracción de fenoles totales.

Para el subconjunto homogéneo de la variable capacidad antioxidante, el tratamiento 4 y 8 obtuvieron mayores valores, como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Prueba de subconjunto homogéneo para los tratamientos de Capacidad antioxidantes ($\mu\text{mol ET/g}$).

	Subconjunto		
	A	B	c
Muestra ¹	T1	3,667	
	T6	6,667	6,667
	T5	6,667	6,667
	T2	10,667	10,667
	T3	12,333	12,333
	T7		17,000
	T4		21,333
	T8		21,667

Letras iguales en columna no difieren estadísticamente. El nivel de significancia es 0,05.

Fuente: Autores de la investigación.

En estudios desarrollados por Guadarrama (2018) se encontró que los niveles intermedios en hojas de guayaba presentaron una mayor actividad antioxidante con valores de 96,8 a 97,15 micromoles de trolox/gramos ($\mu\text{M TEAC/g}$) de muestra seca y la del higo presentó menor actividad antioxidante oscilando entre 12,15 a 22,43 $\mu\text{M TEAC/g}$ de muestra seca, en comparación con los resultados de la hoja de níspero que fueron bajos; también se determinó que en la actividad antioxidante de los extractos acuosos los diferentes tamaños de partículas no implican que los componentes difieran entre sí.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Las características fisicoquímicas de las hojas de níspero en referencia al tiempo de 60 minutos de secado a 37°C evidenció una acidez de 3,35%, pH de 4,73 y humedad del 18%; en comparación con el tiempo de secado de 70 minutos que tiene una acidez de 2,52%, pH de 4,83 y humedad del 13%; teniendo en ambos tiempos variabilidad de las diferentes características fisicoquímicas.
- El tiempo de secado realizado a las hojas de nísperos no incidió en la cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidantes.
- La relación idónea que permitió obtener la mayor cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidantes fue 80%-alcohol al 96% y 20%-agua destilada (factor b4) con un valor de 21,5 (mg Aci. gálico/g) y 21,5 (μmol ET/g) respectivamente.
- Los tratamientos que permitieron obtener la mayor cantidad de fenoles totales fue el T4 (80:20 a 60 minutos) con un valor de 21,667 (mg Aci. gálico/g) y capacidad antioxidantes fue el T4 y T8 (80:20 a 70 minutos) con valores de 21,333 y 21,667 μmol ET/g respectivamente.

5.2. RECOMENDACIONES

- Utilizar como referencia para futuras investigaciones con otros tipos de materia prima vegetal al tratamiento t4 debido a que presentó la mayor cantidad de compuestos bioactivos.
- Realizar estudios donde se consideren mayores tiempos de secado de las materias prima vegetales para la extracción de compuestos bioactivos por maceración.
- Aplicar el extracto de la hoja de níspero (*Achras zapota*) en la elaboración de diferentes productos alimentarios o agroindustrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, M., Nuñez, M., Bela, A., Okulik, N., Bregni, C. (2013). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44, 46-51. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57929953006>.
- Alarcón, F. (2014). Transición Vítrea de Hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Secadas por Diferentes Métodos. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Alcaláx, P. (2002). Intoxicación por metanol. *Revista Anales de Medicina Interna*, 19(9), 70-71. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992002000900020.
- Alshaker, H., Qinna, N., Qadan, F., Bustami, M. & Matalka, K. (2011). *Eriobotrya japonica* hydrophilic extract modulates cytokines in normal tissues, in the tumor of Meth-A-fibrosarcoma bearing mice, and enhances their survival time. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 9. doi.org/10.1186/1472-6882-11-9.
- Alvarez, E., De La Rosa, L., Amarowicz, R. & Shahidi, F. (2011). Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapen^o and Serrano Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 163-173. doi.org/10.1021/jf103434u.
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Universidad de Concepción), (494), 161-172. doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010.
- Bastidas, M. (2011). Obtención de licor de coca (*Erythroxylum coca*) var. Lamarck por maceración - Satipo. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del centro delo Perú, Satipo.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P. & Piatti, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*, 104(4), 1635-1640. doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.014.

- Bucić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. & Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027.
- Calonge, M., Pérez, Y., Ordóñez, C., Reguera, R., Balaña, R. & Ordóñez, D. (2002). Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con detector de nitrógenofósforo y confirmación por espectrometría de masas. *Revista de toxicología*, 19(2), 55-60. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: <https://www.redalyc.org/pdf/919/91919201.pdf>.
- Casierra, F. & González, D. (2009). Cambio circadiano de pH y acidez titulable en la savia de fique (*Furcraea castilla* y *F. macrophylla*). *Revista Orinoquia*, 13, 5-13.
- Cha, D., Eun, J. & Jeon, H. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(2), 305-312. doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.017.
- Chanda, S. & Nagani, K. (2010). Antioxidant Capacity of Manilkara zapota L. Leaves Extracts Evaluated by Four in vitro Methods. *Revista Nature and Science*, 8(10), 260-266. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: https://www.researchgate.net/profile/Krunal_Nagani3/publication/228493145_Antioxidant_capacity_of_Manilkara_zapota_L_leaves_extracted_by_four_in_vitro_methods/links/0a85e534f55489f49f000000/Antioxidant-capacity-of-Manilkara-zapota-L-leaves-extracts-evaluated-by-four-in-vitro-methods.pdf.
- Ciappini, M., Stoppani, F., Martinet, R. & Alvarez, M. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista Ciencias y Tecnología*, 15(19), 45-61. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Cristina_Ciappini/publication/317538682_Actividad_antioxidante_y_contenido_de_compuestos_fenolicos_y_flavonoides_en_mieles_de_treboles_eucalipto_y_alfalfa/links/5967d021458515e9af9eb3ba/Actividad-antioxidante-y-contenido-de-compuestos-fenolicos-y-flavonoides-en-mieles-de-treboles-eucalipto-y-alfalfa.pdf.
- Claudio, R. & Nájera, J. (2012). *Evaluación de la actividad antioxidante del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) sometido a tratamiento térmico*. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito.

- Concha, F. (2014). *Transición Vítrea de Hojas de Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) Secadas por Diferentes Métodos* (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Costa, S., Garipey, Y., Rocha, S. & Raghavan, V. (2014). Microwave extraction of mint essential oil – Temperature calibration for the oven. *Journal of Food Engineering*, 126, 1-6. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.033.
- Doymaz, İ. (2006). Thin-layer drying behaviour of mint leaves. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 370-375. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.009.
- Durango, Á., Gallardo, C. & Contreras, A. (2015). Estudios para el aprovechamiento potencial de hojas de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae), para el sector cosmético. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(3), Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152015000300013&script=sci_arttext&tlng=pt.
- Duque, D. & Morales, M. (2005). *El aroma frutal de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.
- EcuRed. (2019). Provincia de Manabí (Ecuador). Recuperado 25 de mayo de 2019, de: https://www.ecured.cu/Provincia_de_Manab%C3%AD (Ecuador).
- Fito Maupoey, P., André Grau, A., Barat Baviera, J. & Albors Sorolla, A. M. (2001). *Introducción al secado de alimentos por aire caliente*. Valencia, España: Editorial de la UPV.
- Fito, P., Chiralt, A., Barat, J. M., Andrés, A., Martínez-Monzó, J. & Martínez-Navarrete, N. (2001). Vacuum impregnation for development of new dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 297-302. doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00226-0.
- Flores, H., León, C., Estarron, M. & Orozco, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del óregano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 773-785. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62048168009.pdf>.
- García, E., Fernández, I. & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Universidad Politécnica de Valencia. Retrieved 7 November 2018, from (2018). Riunet.upv.es.

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>.

- Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V. & Agustí, M. (2002). El Níspero Japonés. Técnicas para mejorar la calidad del fruto. Valencia: Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura, Peixca i Alimentació.
- Gazel, F. (2002). Caracterización de plantas de chicozapote *Manilkara zapota* (L.) P. van Royen) de la colección del CATIE, mediante el uso del análisis multivariado. *Brasileira de Fruticultura*, 24(3), 727-730. doi.org/10.1590/S0100-29452002000300041.
- Gironi, F. & Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(7), 857-862. doi.org/10.1016/j.cherd.2010.11.003.
- González, Á. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. (Tesis de pregrado). Repositorio institucional UNC (Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales), Manizales.
- González, D., García, E. & Guntin, P. (2012). Caracterización genética de *Manilkara zapota* de Veracruz, México, con marcadores SSR. *Revista Agrociencia*, 46(7), 663-675. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000700003&lng=es&tlng=es.
- Guadarrama, A. (2018). Comprimidos nutraceuticos con base en extractos de hojas de higo, guayaba y níspero. *Revista Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos*, 1(1). Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/368>.
- Guntero, V., Martini, R., Longo, M., Ciparicci, S. & Andreatta, A. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. Asociación Argentina de Ingenieros Químicos, 9. CAIQ2015-VII Congreso Argentino de ingeniería química. 3ras. Jornadas Argentinas de seguridad de procesos. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: <http://ria.utn.edu.ar/handle/20.500.12272/2976>.
- Heldman, D., Lund, D. & Sabliov, C. (2018). *Handbook of Food Engineering*. Third Edition. CRC Press.
- Hernández, R., Lugo, E., Díaz, L. & Socorro, V. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de «agave lechuguilla». *Torrey. e-Gnosis*, 3(11),

1-9. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: <http://e-gnosis.udg.mx/index.php/e-gnosis/article/download/45/43>.

Herrera, F. (2016). Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (*Coffea arabica* L.) Empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial. (Tesis de pregrado). Universidad Libre, Bogotá.

Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M. & Cifuentes, A. (2005). Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *Journal of Chromatography A*, 1084(1), 54-62. doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.003.

Hinojosa, J., Tun, A., Canul, A., Ruiz, C., Rocha, J. & Betancur, D. (2017). Extracción de glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni por métodos de fluidos supercríticos. *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*, 2(5), 202-209. doi.org/10.19230/jonnpr.

Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X. & Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104. doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104.

INFOJARDIN, (2017). Chicozapote, Chicozapotes, Chico zapote, Zapota, Zapote chico, Zapotillo, Sapodilla, Sapotí, Mamey zapote, Nisperillo, Níspero de Nicaragua, Sapota, Zapote de abeja, Zapote de chicle—*Manilkara zapota* = *Achras zapota*. Recuperado 1 de septiembre de 2019, de: <http://articulos.infojardin.com/Frutales/fichas/chicozapotes-chico-zapote-zapota-zapote-manilkara.htm>.

Jeong, M., Seong, N., Lee, J., Kim, Y., Shin, N. & Kim, J. (2018). In vitro and in vivo evaluation of the genotoxicity of *Eriobotrya japonica* leaf extract. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 99, 238-243. doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.09.029.

Kumar, V. & Yadav, S. (2008). Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(2), 151-157. doi.org/10.1002/jctb.2023.

Kuzma, P., Druzynska, B. & Obiedzinski, M. (2014). Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum crispum*). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13, 145-154

- Lee, J., Jun, S., Hong, S., Ahn, Y., Lee, D. & Son, C. (2016). Systematic Review of Adverse Effects from Herbal Drugs Reported in Randomized Controlled Trials. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1412-1419. doi.org/10.1002/ptr.5647.
- Li, F., Li, Y., Li, Q., Shi, X. & Guo, Y. (2017). Acute and Subacute Oral Toxicity Evaluation of Eriobotrya japonica Leaf Triterpene Acids in ICR mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi.org/10.1155/2017/4837839.
- Li, W., Wu, J., Ren, B., Chen, J. & Lu, C. (2007). Pharmacological Studies on Anti-Hyperglycemic Effect of Folium Eriobotryae. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(04), 705-711. doi.org/10.1142/S0192415X07005193.
- Maher, K., Yassine, B. A. & Sofiane, B. (2015). Anti-inflammatory and antioxidant properties of Eriobotrya japonica leaves extracts. *African Health Sciences*, 15(2), 613-620-620. doi.org/10.4314/ahs.v15i2.39.
- Martínez, M., Covarrubias, A., Medina, N., Ayora, T., García, N., Pacheco, N. (2016). Efecto del secado de hojas de stevia sobre la capacidad antioxidante y contenido de compuestos polifenólicos. *Revista del centro de graduados e investigación. Instituto Tecnológico de Mérida*, 31, 98-100. Recuperado de: <https://www.yumpu.com/es/document/view/56603570/rcgi-v31-n63>.
- Meghala, R., Indian I., Ravishankar, K., Lalitha, L. & Rekha, A. (2005). Genetic diversity of Indian sapota (Manilkara zapota) cultivars characterized by RAPD markers. *Plant Genetic Resources Newsletter (IPGRI/FAO)*, 142, 43-46. Recuperado 2 de septiembre 2019, de: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QJ2007000058>.
- Moreira, D. de L., Teixeira, S., Monteiro, M., De-Oliveira, A. & Paumgarten, F. (2014). Traditional use and safety of herbal medicines. *Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 248-257. doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.006.
- Mosihuzzaman, M. (2012). Medicina herbaria en la asistencia sanitaria: Una visión general. *Natural Product Communications*, 7(6), 807-812. doi.org/10.1177/1934578X1200700628.
- Naveda, G. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (Ruta graveolens), con alto contenido de polifenoles*. (Tesis de pregrado). Recuperada de: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2295/1/CD-3036.pdf>.

- NTE INEN 526. (2013). Harinas de origen vegetal. Determinación de la concentración de ión hidrógeno o pH. Procedimiento. Quito.
- NTE INEN 521. (2013). Harinas de origen vegetal. Determinación de la acidez titulable. Procedimiento. Quito.
- NTE INEN 521. (2013). Harinas de origen vegetal. Determinación de la pérdida por calentamiento. Procedimiento. Quito.
- Palma, K. & Velásquez, C. G. M. (2019). Diseño de un sistema de extracción a escala piloto para los principios activos de la especie vegetal *Lippia alba*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo.
- Pulluquitin, G. (2013). Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación tema: Flor de campo en la estancia y mushukwiñary en Tambalo de Pasa, para promover su desarrollo. (Tesis de maestría). Universidad Técnica de Ambato. Ambato.
- Quispe, Y. & Loayza, E. (2011). Evaluación del método analítico colorimétrico de dosaje etílico frente al método de cromatografía de gases: Estudio en bebedores sociales y diabéticos abstemios de la ciudad del Cusco, determinación de interferentes: Especial interés en acetona e isopropanol. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.
- Rajakumar, G. & Abdul, A. (2012). Acaricidal activity of aqueous extract and synthesized silver nanoparticles from *Manilkara zapota* against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 303-309. doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.001.
- Rata, B., Aranda, D., & Duarte, A. (2000). Desarrollo de nuevos productos: Consideraciones sobre la integración funcional. *Cuadernos de estudios empresariales*, (10), 165-184. Recuperado 2 de septiembre de 2019, de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=241381>.
- Rincón, C., Gómez, G. & Zapata, J. (2016). Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 133-144. Recuperado 2 de septiembre de 2019, de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962016000200002&script=sci_arttext&lng=pt.
- Rojano, B. A. (1997). Oxidación de Lípidos y Antioxidantes. (Documento de trabajo - Monograph). Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Recuperado 13 de septiembre de 2019, de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8413/>.

- Sahin S. & Samli R. (2013). *Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry, 20, 595-602.*
- Seo J., Lee S & Marcus, L. (2013). Estudio para encontrar el mejor solvente de extracción para usar con (*Psidium guajava* L.) para una alta eficacia antioxidante. *Revista Ciencia de los Alimentos y Nutrición, 2, 174-180.*
- Sepúlveda, C., Ciro, G. & Zapata, E. (2016). Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de Bixa orellana L. (achiote). *Revista Cubana de plantas medicinales, 21, 133-144.*
- Serna, L. & Torres, C. (2015). Potencial agroindustrial de cáscaras de mango de las variedades Keitt, y Tommy Atkins (*Mangifera indica*). *Acta Agronómica, 64, 110-117.*
- Sharma, O. & Bhat, T. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry, 113(4), 1202-1205.* doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008.
- Shindo, K., Saito, E., Sekiya, M., Matsui, T., & Koike, Y. (2008). Antioxidative activity of the flower of *Torenia fournieri*. *Revista Journal of Natural Medicines, 62, 247-248.* doi.org/10.1007/s11418-007-0207-y.
- Talace, B. (2017). *Diseño y construcción de planta piloto de extracción por solventes y electrodeposición de cobre.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna, Tacna.
- TopTropicals. (2019). Manilkara zapota, Manilkara achras, Achras sapota, Sapodilla, Ciku, Naseberry, Nispero, Sapote, Brown Sugar Fruit -. Recuperado 24 de mayo de 2019, de TopTropicals.com—Rare plants for home and garden, website: https://toptropicals.com/catalog/uid/achras_zapota.htm.
- Treybal, R. E. (1986). Operaciones de transferencia de masa (2.a ed.). La Habana, Cuba. Universidad de Rhode Island.
- Vaquero, F. (2016). Ingeniería Conceptual de una Planta de Producción de Acetona. (Tesis de pregrado). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Zambrano Dueñas, Á. & García Zamora, F. (2012). *Diseño e implementación de un sistema de riego por goteo para el cultivo del pepino en el área convencional ESPAM-MFL.* (Tesis de pregrado) Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí «Manuel Félix López», Calceta.

Zamora, J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34, 17-26. doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002.

ANEXOS

Anexo 1. Hojas de nísperos secas.



Anexo 2. Hoja de níspero pulverizada.



Anexo 3. Preparación de muestras previo a los análisis fisicoquímicos.



Anexo 4. Realización de análisis fisicoquímicas.



Anexo 5. Cálculos de los análisis fisicoquímicos.

60 minutos

$$Ac = \frac{490 \text{ NV}}{m(100-H)} \times \frac{V_1}{V_2}$$

$$Ac = \frac{490 (0,1N) (5,6)}{5g (100-18)} \times \frac{50 \text{ cm}^3}{10 \text{ cm}^3}$$

$$Ac = \frac{274,4}{410} \times 5$$

$$Ac = 0,6692 \times 5$$

$$Ac = 3,346$$

70 minutos.

$$Ac = \frac{490 \text{ NV}}{m(100-H)} \times \frac{V_1}{V_2}$$

$$Ac = \frac{490 (0,1N) (5 \text{ cm}^3)}{5g (100-13)} \times \frac{50 \text{ cm}^3}{10 \text{ cm}^3}$$

$$Ac = \frac{245}{485} \times 5$$

$$Ac = 0,5051 \times 5$$

$$Ac = 2,52$$

Anexo 6. Muestra envasada de los extractos.

