

**Extracción de Azúcares Reductores de *Azadirachta Indica* (Nim) y *Psidium Guajava*  
(Guayaba), y Determinación de la Cinética de Extracción**

**Diego Alonso Sierra Triana, Juan Camilo Parra Moreno**

**Trabajo de Grado para optar por el título de Ingeniero Químico**

**Director**

**Debora Alcida Nabarlatz**

**PhD. Ingeniería Química**

**Codirector**

**José Gabriel López Ortiz**

**MSc. Ingeniería Química**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas  
Escuela de Ingeniería Química  
Bucaramanga**

**2018**

*A Dios por la vida, la sabiduría, la salud, por guiar mi camino y hacer posible este sueño.*

*A mis padres y hermanos por brindarme su apoyo incondicional durante todo este proceso,*  
*por el amor y cariño, y el ejemplo insistente de luchar por alcanzar cada meta.*

*A mis amigos por su acompañamiento en este arduo sendero, y por el compartir de tantos*  
*momentos llenos de esfuerzos, triunfos y alegrías.*

***Diego Alonso Sierra Triana***

*A mi Padre que ha antepuesto siempre mi bienestar sobre el suyo y ha realizado tantos sacrificios para brindarme las herramientas necesarias para crecer, a mi Madre quien me dio la oportunidad de vivir y siempre me ha brindado su cálido cariño, a mi novia por tantos buenos momentos a lo largo de estos años y a la fortuna por lo ocurrido a lo largo de mi vida y por lo que me tiene deparado.*

***Juan Camilo Parra Moreno***

### **Agradecimientos**

Los autores del presente trabajo expresan sus agradecimientos a:

La **Universidad Industrial de Santander** por brindarnos todas las herramientas necesarias para instruirnos, logrando una constante formación tanto personal como profesional.

A la profesora **Debora Nabarlatz** por su guía personal e intelectual a lo largo de la trayectoria académica, además de su colaboración y confianza en medio del proyecto.

Al **MSc. José Gabriel López** por su apoyo y acompañamiento en el desarrollo de este proyecto.

A la empresa **Zumotec S.A.**, por su apoyo desde los puntos de vista económico y prestación de instalaciones.

A las empresas **Ecopetrol** y **Unired** por el apoyo económico del premio Innóvate 2017.

## Tabla de Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. OBJETIVOS.....	18
1.1 Objetivo General.....	18
1.2 Objetivos Específicos.....	18
2. ESTADO DEL ARTE.....	19
2.1 Azúcares Reductores.....	19
2.1.1 Estructura Química.....	19
2.2 Presencia de Azúcares Reductores en las Plantas.....	19
2.2.1 Maceración.....	20
2.2.2 Extracción Asistida por Microondas (MAE).....	21
2.3 Guayaba ( <i>Psidium Guajava</i> ).....	21
2.4 Nim ( <i>Azadirachta Indica</i> ).....	22
2.5 Cinética de Extracción.....	23
3. METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	23
3.1 Materiales.....	23
3.2 Metodología.....	24
3.2.1 Acondicionamiento del Material Vegetal.....	24
3.2.2 Pruebas de Imbibición.....	25

3.2.3 Caracterización Fisicoquímica de las Hojas de Guayaba y Nim. ....	25
3.2.4 Preparación de los Extractos para la Comparación entre Maceración y MAE.....	25
3.2.5 Análisis Estadístico, Obtención de la Superficie de Respuesta y Optimización de las Variables de Respuesta. ....	27
3.2.6 Determinación del Modelo Cinético de Extracción.....	28
3.2.7 Caracterización Fisicoquímica de los Extractos. ....	29
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	30
4.1 Caracterización Fisicoquímica de las Hojas de Guayaba y Nim .....	30
4.2 Evaluación del Método de Extracción.....	31
4.3 Efecto de las Variables pH, Diámetro de Partícula y Relación L:S Sobre las Variables de Respuesta por Medio de Maceración en la Hoja de Nim. ....	33
4.4 Efecto de las Variables pH, Diámetro de Partícula y Relación L:S Sobre las Variables de Respuesta por Medio de Maceración en la Hoja de Guayaba. ....	36
4.4 Cinética de Extracción.....	40
5. CONCLUSIONES.....	42
6. RECOMENDACIONES .....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
APÉNDICES .....	49

**Lista de Tablas**

	Pág.
Tabla 1. Extracción de azúcares por medio de maceración con diferentes solventes .....	20
Tabla 2. Niveles de los parámetros del diseño de experimentos tipo Box-Behnken.....	27
Tabla 3. Caracterización Físicoquímica de las Hojas de Guayaba y Nim.....	31
Tabla 4. Constantes cinéticas para el modelo de Peleg- modificado.....	40
Tabla C1. Valor Promedio del Porcentaje de Rendimiento y de la Concentración de Azúcares Reductores en la Guayaba $\pm 1$ Desviación Estándar; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C.....	53
Tabla C2. Valor Promedio del Porcentaje de Rendimiento y de la Concentración de Azúcares Reductores en el Nim $\pm 1$ Desviación Estándar; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C .	54
Tabla E1. Cantidad de Solución Absorbida por cada Hoja .....	59
Tabla F1. Maceración vs Extracción Asistida por Microondas MAE a pH 6.3, Relación L:S 4 mL/g, Dp 0.358 mm, Tiempo de Extracción 24h y Temperatura 25°C .....	60
Tabla H1. Concentración de Azúcares Reductores en función del tiempo para el Nim .....	62
Tabla H2. Concentración de Azúcares Reductores en Función del Tiempo para la Guayaba .....	63

### Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama de bloques de la metodología .....	24
Figura 2. Maceración vs Extracción Asistida por Microondas a pH 6.3, Relación L:S 3 mL:g y Dp 0.359 mm, concentración (a) y %Rendimiento (b).....	32
Figura 3. Efecto de las Variables de Entrada sobre la Concentración de Azúcares Reductores y el %Rendimiento en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	34
Figura 4. Superficies de Contorno del Efecto de las Variables de Entrada sobre el %Rendimiento (a) y la Concentración de Azúcares Reductores (b) en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	35
Figura 5. Evaluación del Ajuste de los Modelos de %Rendimiento (a) y Concentración de Azúcares Reductores (b) en el Punto Óptimo para el Nim: pH 8.3, Dp 0.317 mm, L:S 7.48 mL:g. ....	36
Figura 6. Efecto de las Variables de Entrada sobre la Concentración de Azúcares Reductores y el %Rendimiento en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	37
Figura 7. Superficies de Contorno del Efecto de las Variables de Entrada sobre la Concentración de Azúcares Reductores (a) y el %Rendimiento (b) en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	39
Figura 8. Evaluación del Ajuste de los Modelos de %Rendimiento (a) y Concentración de Azúcares Reductores (b) en el Punto Óptimo para la Guayaba: pH 8.43, Dp 0.358 mm, L:S 12 mL:g.....	39

Figura 9. Modelo de Peleg Modificado para la Maceración de Guayaba a pH 4.3, Dp 0.358 mm, L:S 12 mL:g.....	40
Figura 10. Modelo de Peleg Modificado para la Maceración de Nim a pH 8.3, Dp 0.317 mm, L:S 7.48 mL:g.....	41
Figura A 1. Test de Normalidad para la Maceración de Guayaba.....	49
Figura A 2. Test de Normalidad para la Maceración de Nim.....	50
Figura A 3. Test de Normalidad para la Extracción Asisitida por Microondas de Guayaba .....	50
Figura A 4. Test de Normalidad para la Extracción Asisitida por Microondas de Nim .....	51
Figura D 1. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables pH y Dpartícula a Relación L:S Constante de 8 mL:g Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	55
Figura D 2. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y Dpartícula a pH Constante de 6.3 Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	55
Figura D 3. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y pH a Dpartícula Constante de 0.26 mm Sobre el %Rendimiento en la Guayaba por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C.....	56
Figura D 4. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y Dpartícula a pH Constante de 6.3 Sobre el %Rendimiento en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C.....	56

Figura D 5. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables pH y Dpartícula a Relación L:S Constante de 8 mL:g Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	57
Figura D 6. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y pH a Dpartícula Constante de 0.26 mm Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en el Nim por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C .....	57
Figura D 7. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y Dpartícula a pH Constante de 6.3 Sobre el %Rendimiento en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C.....	58
Figura D 8. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y pH a Dpartícula Constante de 0.26 mm Sobre el %Rendimiento en el Nim por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C.....	58
Figura G 1. Parámetros Óptimos de la Extracción de Azúcares Reductores por Maceración de Guayaba; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C .....	61
Figura G 2. Parámetros Optimos de la Extracción de Azúcares Reductores por Maceración de Nim; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C .....	63
Figura H 1. Parámetros Cinéticos Peleg Modificado para la Guayaba a pH 4.3, Dp 0.358 mm, y Relación L:S 12 mL:g.....	67
Figura H 2. Parámetros Cinéticos Peleg Modificado para el Nim a pH 8.3, Dp 0.317 mm, y Relación L:S 7.48 mL:g.....	67

**Lista de Apéndices**

	Pág.
Apéndice A. Residuales y Test de Normalidad .....	49
Apéndice B. Pruebas de Hipótesis para la Diferencia de Medias $\alpha=0.05$ .....	52
Apéndice C. Resultados de las Pruebas de Maceración para Encontrar las Condiciones Óptimas de Extracción .....	53
Apéndice D. Superficies de Contorno del Efecto de las Variables de Entrada Sobre el %Rendimiento y la Concentración de Azúcares Reductores .....	55
Apéndice E. Resultados de las Pruebas de Imbibición.....	59
Apéndice F. Resultados de la Evaluación del Método de Extracción .....	60
Apéndice G. Regresión de Superficie de Respuesta y Óptimos de los Parámetros de Extracción .....	61
Apéndice H. Resultados del Ajuste al Modelo de Peleg Modificado.....	65

## RESUMEN

**TÍTULO:** PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE *AZADIRACHTA INDICA* (NIM) Y *PSIDIUM GUAJAVA* (GUAYABA) Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA EXTRACCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES \*

**AUTORES:** DIEGO ALONSO SIERRA TRIANA, JUAN CAMILO PARRA MORENO\*\*

**PALABRAS CLAVE:** AZÚCARES REDUCTORES, MACERACIÓN, EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE), *PSIDIUM GUAJAVA* (GUAYABA), *AZADIRACHTA INDICA* (NIM).

### DESCRIPCIÓN:

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la extracción de azúcares reductores a partir de hojas de Guayaba (*Psidium guajava*) y Nim (*Azadirachta indica*) como método alternativo de producción de un agente reductor amigable ambientalmente. Se realizaron inicialmente extracciones por maceración y extracción asistida por microondas (MAE) con agua desionizada a pH 6.3, relación líquido: sólido L:S de 4 mL de solución /g hoja seca y diámetro de partícula de 0.359 mm; mientras el proceso MAE se realizó a una frecuencia de 2450 MHz y una potencia de 100W.

Los azúcares reductores fueron cuantificados en todos los casos utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico DNS. Bajo estas condiciones se determinó que el método de maceración permitió obtener un mayor rendimiento de azúcares reductores.

Posteriormente, se estudió la influencia de los parámetros de extracción pH [4.3; 8.3], relación L:S [4; 12] (mL/g) y diámetro de partícula Dp [0.163; 0.359] (mm) en la maceración; esto permitió maximizar el rendimiento de extracción y la concentración de azúcares reductores. Los resultados obtenidos para el punto óptimo fueron: pH: 8.3, Dp: 0.317 mm y relación L:S 7.48 mL/g para el nim con concentración de 2.07 g azúcares extraídos/L de extracto y rendimiento de extracción de 52.74% [(g azúcares extraídos/ g ART)\*100]; y, pH 4.3, Dp 0.358 mm, y relación L:S 12 mL/g para la guayaba con concentración de 6.52 g/L y rendimiento de 70.03%. Se corroboró el ajuste del modelo sobre el punto óptimo con 3 pruebas adicionales para cada tipo de hoja.

Finalmente, a partir de las condiciones óptimas de extracción que resultaron en el mayor rendimiento de azúcares reductores se evaluó la cinética de extracción utilizando el modelo modificado de Peleg. Los modelos obtenidos para las cinéticas de extracción para las dos especies vegetales tienen coeficientes de determinación  $R^2$  superiores a 0.9.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: PhD. Debora Alcida Nabarlatz

**ABSTRACT**

**TITLE:** EXTRACTS PRODUCTION FROM AZADIRACHTA INDICA (NEEM) AND PSIDIUM GUAJAVA (GUAVA) AND DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS FOR THE EXTRACTION OF REDUCING SUGARS \*

**AUTHORS:** DIEGO ALONSO SIERRA TRIANA, JUAN CAMILO PARRA MORENO\*\*

**KEYWORDS:** REDUCING SUGARS, MACERATION, MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION (MAE), *PSIDIUM GUAJAVA* (GUAVA), *AZADIRACHTA INDICA* (NEEM).

**DESCRIPTION:**

This paper aims to evaluate the aqueous extraction of reducing sugars from guava (*Psidium guajava*) and neem (*Azadirachta indica*) leaves as an alternative production method of an environmentally friendly reducing agent. Initially, extractions were made by maceration and microwave assisted extraction (MAE) using deionized water at the following conditions: pH 6.3, liquid: solid ratio 4 [mL solution/ g dry leaves], and particle diameter 0.359 mm; in addition, MAE was performed at 2450 MHz and 100W within 1 minute.

Reducing sugars were quantified in all samples using the colorimetric method 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS). Under these conditions, the maceration method proved to be better than MAE for reducing sugar extraction.

Subsequently, the influence of the extraction parameters in maceration was studied in the following ranges: pH [4.3; 8.3], liquid: solid ratio [4; 12] (mL/g) and particle diameter Dp [0.163; 0.359] (mm). The latter allowed the maximization of the extraction yield and the concentration of reducing sugars. The results obtained in the optimal point were: pH: 8.3, Dp: 0.317 mm and liquid: solid ratio 7.48 mL/g for neem leaves with concentration 2.07 g extracted sugars/L of extract and extraction yield 52.74% [(g extracted sugars/g total reducing sugars) \* 100]; and, pH 4.3, Dp 0.358 mm, and liquid: solid ratio 12 mL/g for guava leaves with concentration 6.52 g/L and yield 70.03%. The model adjustment was tested on the optimal point with 3 additional samples for each leaf type

Finally, the optimal extraction conditions that resulted in the highest yield of reducing sugars were used in the preparation of the extraction kinetics samples; extraction kinetics was assessed using the modified Peleg model. The models obtained have determination coefficients  $R^2$  higher than 0.9 for both plant species.

---

\* Degree work.

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: PhD. Debora Alcida Nabarlatz

## Introducción

El desarrollo de metodologías y procesos químicos eficientes y sostenibles se ha convertido en uno de los objetivos más importantes de la química en el siglo XXI. Es por esto, que ha aumentado la popularidad de la química verde durante las últimas décadas, ya que su objetivo es el diseño de productos químicos o procesos que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias contaminantes (Anastas & Kirchhoff, 2002).

La síntesis de nanopartículas se ha convertido en un tema de gran interés en la actualidad debido a sus propiedades y múltiples aplicaciones, el enfoque de la química verde en este campo ha estado orientado hacia la elección del medio disolvente utilizado, la de un agente reductor ambientalmente amigable, y la de un material no tóxico para la estabilización de las nanopartículas (Bhosale, 2014). Estos tres elementos pueden ser proporcionados simultáneamente por extractos de origen vegetal. El agua usada para la extracción proporciona el medio disolvente (Gross, 2015); los azúcares, polifenoles, terpenos, alcaloides, ácidos fenólicos, vitaminas y proteínas de la planta actúan como agentes reductores en la formación de nanopartículas, y posteriormente, como material estabilizante (Kharissova, Dias, Kharisov, Pérez, & Pérez, 2013; Makarov et al., 2014).

La empresa Zumotec S.A de la ciudad de Bucaramanga-Santander, está desarrollando un proceso de producción de nanopartículas a partir de extractos vegetales. El presente proyecto se enfoca en la primera de las tres fases, siendo ésta la producción de un agente reductor amigable con el medio ambiente, por lo que se evalúa la extracción de los azúcares reductores a partir de hojas de nim y guayaba, analizando la influencia de los métodos de extracción y sus condiciones.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Evaluar la extracción de azúcares reductores a partir de hojas de Guayaba (*Psidium guajava*) y Nim (*Azadirachta indica*) mediante maceración y extracción asistida por microondas, y determinar la cinética de extracción.

### 1.2 Objetivos Específicos

Evaluar los métodos de maceración y extracción asistida por microondas para la extracción de azúcares reductores a partir de hojas de Guayaba (*Psidium guajava*) y Nim (*Azadirachta indica*).

Evaluar la influencia de los parámetros de extracción (pH, diámetro de partícula y relación líquido-sólido) que permitan maximizar el rendimiento de extracción y la concentración de los azúcares reductores en los extractos obtenidos.

Modelar la cinética y los parámetros de extracción por medio del modelo modificado de Peleg.

## 2. Estado del Arte

### 2.1 Azúcares Reductores

Los azúcares reductores pueden ser descritos como los azúcares que contienen grupos funcionales capaces de ser oxidados y, a su vez, provocar la reducción de otros componentes en condiciones específicas (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1990), es decir, un azúcar reductor es aquel que contiene grupos aldehído o cetona en forma libre (Cobos, Germano, Malovini, & Paladino, 2017). En términos generales, un azúcar en su forma cíclica que conserve su grupo hidroxilo libre sobre el carbono hemiacetalico o hemicetalico, se denomina reductor y en caso contrario, no reductor (Grande & Flórez, 2013).

**2.1.1 Estructura Química.** En solución, los azúcares pueden aparecer en forma cíclica (Zoecklein *et al.*, 1990), y estos azúcares son no reductores porque no tienen el grupo aldehído o cetona que pueda oxidarse; sin embargo, debido a que están en equilibrio con la forma abierta, cualquier molécula de éstos que esté en forma de anillo estará en una fracción de segundo en forma abierta, y por lo tanto, podrá reaccionar con el agente oxidante y reducirlo (Soderberg, 2016); así, una vez desaparece la fracción de forma abierta el equilibrio se desplaza hacia la derecha obteniéndose más azúcar que podrá ser oxidado, y el proceso continúa hasta que el azúcar es oxidado en su totalidad (Bruice, 1995).

### 2.2 Presencia de Azúcares Reductores en las Plantas

Los azúcares reductores son una parte esencial del metabolismo y crecimiento de las plantas, éstos se encuentran en forma de carbohidratos no estructurales (NSC por sus siglas en inglés) (Quentin

et al., 2015; Regier, Streb, Zeeman, & Frey, 2010). Muchos grupos de carbohidratos componen los NSC tales como los monosacáridos (glucosa y fructosa), los disacáridos (maltosa), oligosacáridos (rafinosa) y los azúcares alcoholes (Rastall, 1991; Stick & Williams, 2009). En su mayoría estos azúcares están localizados en las semillas, las hojas y la raíz (Raessler, 2011).

**2.2.1 Maceración.** El proceso general a pequeña escala consiste en colocar el material vegetal adecuadamente triturado en un recipiente cerrado y agregar un disolvente, la operación se realiza durante un tiempo determinado hasta alcanzar el equilibrio para finalmente filtrar la solución y separar el extracto del sólido remanente (Aryana, 2014). Su principal ventaja radica en lo económico del tratamiento (Carrión & García, 2010); entre las variables de operación se encuentra la temperatura, tiempo de extracción, pH, tamaño de partícula y el volumen de solvente (Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008). Diversos azúcares han sido aislados a partir de la maceración utilizando diferentes solventes, tal como puede ser observado en la Tabla 1.

Tabla 1.

*Extracción de azúcares por medio de maceración con diferentes solventes*

<b>Sustrato</b>	<b>Solvente</b>	<b>Azúcares en extractos</b>
<b>Hierba de Centeno</b> (Raessler, Wissuwa, Breul, Unger, & Grimm, 2008)	18mMol NaOH	Polialcoholes , glucosa, fructosa, sucrosa, rafinosa e inulina
<b>Alcachofas</b> (Schütz, Muks, Carle, & Schieber, 2006)	Agua, 225 mMol NaOH, 500 mMol NaAc	Fructosa, glucosa, sucrosa, kestosa y nistosa
<b>Olivas</b> (Cataldi et al., 2000)	12mMol NaOH+1 mMol Acetato-Ba	Polialcoholes ,fructosa, galactosa
<b>Cola de Caballo</b> (Currie & Perry, 2006)	1.5–9 mMol NaOH, 1 M NaAc, 150 mMol NaOH	Arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, glucosamina, manosa y xilosa
<b>Hojas de Álamo</b> (Guignard et al., 2005)	NaOH 12–150 mMol	Fructosa, glucosa, inositol, sucrosa, salicina
<b>Cebolla</b> (Davis, Terry, Chope, & Faul, 2007)	Acetonitrilo:Agua 80:20	Fructosa, glucosa y sucrosa

Sustrato	Solvente	Azúcares en extractos
<b>Pera (Raíces y hojas)</b> (Gomez, Rubio, & Augé, 2002)	50 mg/L Ca-EDTA en agua	Fructosa, glucosa, sorbitol, sucrosa
<b>Altramuz Blanco</b> (Antonio et al., 2008)	Acetonitrilo:Agua 4:96%– 25:75%	Glucosa, manitol, rafinosa, sucrosa y estaquiosa
<b>Oruga</b> (Antonio et al., 2007)	Acetonitrilo:Agua:4:96%– Acetonitrilo:Acido formico 25:75% (	Glucosa, glucosa y sucrosa
<b>Oreja de Fraile</b> (Glyad, 2002)	Acetonitrilo:Agua 70:30; 75:25; 80:20 (v/v)	Arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa, rafinosa, ramnosa y sucrosa
<b>Pulmonaria</b> (Glyad, 2002)	Acetonitrilo:Agua 70:30; 75:25; 80:20 (v/v)	Arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa, rafinosa, ramnosa y sucrosa

Los solventes más adecuados para la extracción de NSC son agua, alcoholes, cloroformo y mezclas entre éstos (Raessler, 2011), además la eficiencia de la extracción está ampliamente influenciada por la polaridad de los solventes usados.

**2.2.2 Extracción Asistida por Microondas (MAE).** Es una técnica relativamente nueva, la cual combina la exposición a microondas con la extracción tradicional (maceración) lo que causa cambios en la estructura de la célula (Delazar, Nahar, Hamedeyazdan, & Sarker, 2012), ya que rompe las paredes de ésta y libera los compuestos a ser extraídos (Zhang, Yang, & Wang, 2011). La técnica requiere menos volumen de disolvente y menor tiempo de extracción (Tatke & Jaiswal, 2011).

### 2.3 Guayaba (*Psidium Guajava*)

En cuanto a la obtención de extractos acuosos de hoja de guayaba se han encontrado algunos reportes: (Wang, Xie, Huang, Ma, & Wu, 2017) obtuvieron polisacáridos y azúcares reductores por medio de la técnica de maceración por 2 h usando agua a 70°C, y una relación L:S de 10 mL:g,

lo que resultó en una solución de polisacáridos solubles con concentración 10 g/L. Además, para la optimización de la extracción de azúcares reductores asistida por microondas (Amutha Gnana Arasi, Gopal Rao, & Bagyalakshmi, 2016) arrojó como resultados óptimos una relación L:S de 3 mL:g, un tiempo de irradiación de 20 min y una potencia de 200W con un rendimiento máximo de extracción del 6.8% [(g de polisacáridos/g de fruta)\*100].

#### **2.4 Nim (*Azadirachta Indica*)**

En cuanto al nim, los reportes se enfocan en la producción de extractos a partir de la semilla de la planta; la optimización de los parámetros para la extracción asistida por microondas MAE ha sido estudiada por (Nde, Boldor, & Astete, 2015; Tonthubthimthong, Chuaprasert, Douglas, & Luewisutthichat, 2001) quienes obtuvieron como parámetros óptimos una relación L:S 3 mL:g, temperatura 80°C y de tiempo de extracción de 24 min, logrando extraer cerca del 80% del aceite disponible en la semilla. En cuanto a las hojas, se han realizado extracciones satisfactorias por métodos tradicionales (Maceración) usando solventes polares y alcoholes debido al interés sobre los compuestos con actividad biológica, flavonoides y fenoles antioxidantes (Khamis Al-Jadidi & Hossain, 2015; Safdar *et al.*, 2017; Saleh Al-Hashemi & Hossain, 2016). (Guerrero Rodriguez, 2016) obtuvo extractos acuosos por medio de maceración con rendimiento de 8.34 g de extracto/100g de hoja seca usando una relación L:S 3.3 mL:g, durante 24 h a temperatura ambiente. Se cree que una gran cantidad de estas sustancias extraídas son azúcares solubles de acuerdo a la información reportada por (Moorthy, Ashok, Rao, & Viswanathan, 2015), quienes también obtuvieron azúcares reductores a partir de la hoja de nim mediante maceración con agua como solvente a 100°C y relación L:S 40 mL:g.

## 2.5 Cinética de Extracción

En la literatura se han reportado algunas cinéticas de extracción de polifenoles a partir de sustratos tales como: cacao (Carreño Toledo & Rojas Correa, 2014), semilla de mango (Uribe, 2011), hojas de Lam (Valdés Hernández, Geidy Vivian; Cruz Viera, Luis; Comet Rodríguez, 2015) y aguacate (Segovia Gómez, Corral, & Almajano, 2013); en todas se ha predicho la extracción tradicional con el modelo propuesto por (Peleg, 1988) para el modelamiento de fenómenos de sorción, debido a la similitud a nivel macro de los fenómenos de transporte de masa involucrados en la extracción con la adsorción de agua en alimentos. El modelo de Peleg modificado se describe con la Ecuación

1, donde:

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{k_2 + k_3 t} \quad (1)$$

C(t) concentración de azúcares reductores en el tiempo t,  
 C<sub>0</sub> concentración inicial de azúcares reductores,  
 k<sub>2</sub> constante de velocidad de reacción [mL. Min/g],  
 k<sub>3</sub> constante de capacidad [mL/g].

La constante de velocidad k<sub>2</sub> se relaciona con la tasa de extracción (B<sub>0</sub>) cuando t=0. Ec (2); entretanto, la constante de capacidad k<sub>3</sub> se relaciona con el máximo rendimiento de extracción, es decir, la concentración en el equilibrio (C<sub>eq</sub>) cuando el tiempo tiende a infinito Ec (3) (Bucić-Kojić *et al.*, 2007).

$$B_0 = \frac{1}{k_2} \quad (2) \qquad C(t \rightarrow \infty) = C_{eq} = \frac{t}{k_2 + k_3 t} \quad (3)$$

## 3. Metodología y Materiales

### 3.1 Materiales

Las hojas de Nim (*Azadirachta indica*) y de Guayaba (*Psidium guajava*), fueron recolectadas y

suministradas por Zumotec S.A, provenientes de árboles con más de tres años de haber sido plantados en los municipios de Piedecuesta y Floridablanca respectivamente (Santander, Colombia). Para las extracciones se utilizó agua desionizada, ácido cítrico industrial granulado e hidróxido de sodio industrial (50% p/p) suministrados por Zumotec S.A. El reactivo ácido dinitrosalicílico y la glucosa grado analítico 99.5% (Merck) fueron suministrados por el grupo de investigación INTERFASE.

### 3.2 Metodología

La metodología empleada para el desarrollo y cumplimiento de los objetivos del proyecto se muestra a continuación:

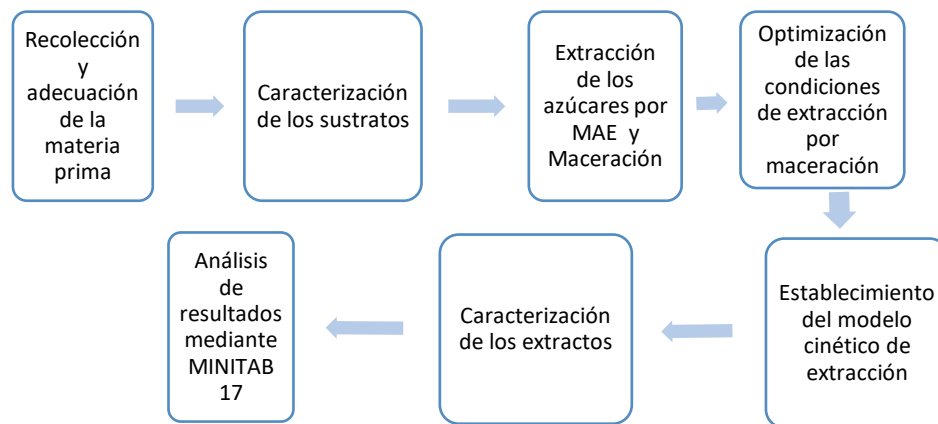


Figura 1. Diagrama de bloques de la metodología

**3.2.1 Acondicionamiento del Material Vegetal.** Las muestras vegetales fueron colocadas en bolsas de polietileno, en las que fueron transportadas hasta el laboratorio, donde fueron secadas a temperatura ambiente y a la sombra durante 7 días. Posteriormente fueron sometidas a una reducción de tamaño en un molino de cuchillas, seguido de una clasificación por tamaños empleando tamices mecánicos de 40, 50, 60, 80 y 90 mesh; finalmente, el polvo resultante fue

almacenado en botellas ámbar a temperatura ambiente.

**3.2.2 Pruebas de Imbibición.** Las hojas finamente molidas retienen volúmenes de agua y otros líquidos, después se expanden, fenómeno conocido como imbibición (Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008) o efecto esponja (Kutlu, Guber, Rivers, & Kravchenko, 2018). Con el fin de mantener la relación líquido-sólido a lo largo de la extracción, se añadió al inicio de cada experimento una cantidad específica de solución dependiendo del tipo de hoja. Esta relación conocida como capacidad de imbibición de Agua se encontró introduciendo 0.5 g de hoja seca en tubos de ensayo, a los cuales se les añadió 0.5 mL de agua desionizada cada 15 min hasta observar que la hoja no podía continuar absorbiendo agua. Posteriormente se esperó durante 2 h para verificar la máxima retención de agua por parte del sustrato. Estos experimentos se realizaron utilizando 7 muestras para cada tipo de hoja y todos fueron realizados a las condiciones de Dp 0.359 mm y pH 6.3.

**3.2.3 Caracterización Físicoquímica de las Hojas de Guayaba y Nim.** Se determinó el porcentaje de humedad y la cantidad de azúcares reductores totales en el material lignocelulósico. Para el primer procedimiento se colocaron 2 g de cada hoja en el horno Memmert W02WVU a una temperatura de 105 °C y durante un tiempo de 48 h; el proceso fue realizado por triplicado mediante gravimetría. Para la determinación de los azúcares reductores totales se realizó por extracción soxhlet a una temperatura de 105 °C durante 12 h, utilizando 2 g de cada especie vegetal y como solvente agua, el procedimiento fue realizado por duplicado, posteriormente se realizó la caracterización físicoquímica de los extractos (ver apartado 3.2.7).

**3.2.4 Preparación de los Extractos para la Comparación entre Maceración y MAE.** Para evaluar el efecto del tipo de tratamiento (maceración, y extracción asistida por microondas MAE)

sobre la extracción de azúcares reductores del nim y la guayaba, se realizaron 30 pruebas para cada tipo de biomasa. Para ello se colocaron 0.5 g de hoja (Dp 0.359 mm) en tubos de ensayo a los cuales se les añadió la cantidad de solución correspondiente a la capacidad de imbibición obtenida. Para los experimentos utilizando maceración (15 muestras para cada tipo de biomasa), la extracción acuosa de azúcares reductores se realizó empleando agua desionizada a una relación L:S 4 [mL:g] y pH 6.3 durante 24 h a temperatura ambiente y en reposo. Para las muestras utilizando extracción asistida por microondas (15 muestras para cada tipo de biomasa), se les aplicó un pretratamiento que consistió en exponer el material vegetal a microondas utilizando un generador ACEB AR HM-0.7 ME BL con una frecuencia de 2450 MHz y una potencia de 100 W durante 1 min, después de esto se realizó la extracción de manera idéntica a la maceración. Al finalizar las 24 h, los extractos fueron centrifugados utilizando una centrífuga Tangkula 800-1 a 3000 rpm durante 1 min, y a continuación, fueron filtrados utilizando una malla de polipropileno con el fin de retirar el material vegetal no precipitado; todos los extractos fueron analizados inmediatamente al culminar la centrifugación (ver el apartado 3.2.7 Caracterización fisicoquímica de los extractos). Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, se realizó un test de normalidad Kolgomorov- Smirnov para cada tipo de biomasa y cada tipo de extracción. Posteriormente, a los grupos de datos que seguían una distribución normal se les aplicó una prueba de hipótesis T, y para aquellos que no, se les aplicó una prueba de hipótesis no paramétrica Kruskal-Wallis; las dos pruebas se realizaron con una significancia del 5% para determinar si existían diferencias significativas en la concentración obtenida en los extractos por los dos

métodos. Para todos los casos se utilizó el software estadístico Minitab 17.

**3.2.5 Análisis Estadístico, Obtención de la Superficie de Respuesta y Optimización de las Variables de Respuesta.** A partir del mejor tipo de extracción obtenida por medio de las pruebas de hipótesis (maceración) se evaluaron las mejores condiciones de extracción. Se utilizó un diseño experimental tipo *Box-Behnken*, con 2 variables de respuesta: el porcentaje de rendimiento de extracción de azúcares reductores (%Rendimiento) y la concentración de azúcares reductores en los extractos [g/L].

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{g Az. Reductores Extraídos}}{\text{g Az. Reductores totales}} * 100\% \quad (4)$$

Para el diseño de experimentos se tuvieron en cuenta 3 factores, los cuales se presentan en la tabla 3 con sus respectivos niveles.

Tabla 2.

*Niveles de los parámetros del diseño de experimentos tipo Box-Behnken.*

	Bajo	Medio	Alto
Diámetro de partícula (mm)	0.163	0.261	0.359
Relación L-S(mL-g)	4	8	12
pH	4.3	6.3	8.3

Los niveles de los diferentes factores fueron escogidos con base a la literatura. El diseño de experimentos contó con 15 puntos con réplica, para un total de 30 extracciones para cada tipo de biomasa; las extracciones fueron realizadas en tubos de ensayo que contenían 0.5 g de hoja (con Dp variable entre 0.163 y 0.359 mm) y la cantidad de solución correspondiente a la capacidad de imbibición (4 mL:g para el Nim y 7 mL:g para la guayaba). Posteriormente se añadió la cantidad de solución correspondiente a las relaciones líquido sólido entre 4 y 12 [mL de solución /g hoja seca] con pH entre (4.3-8.3), siendo este último ajustado con ácido cítrico e hidróxido de sodio.

Las extracciones se realizaron mediante maceración durante 24 h a temperatura ambiente y en reposo. Posteriormente los extractos fueron centrifugados utilizando una centrífuga Tangkula 800-1 a 3000 rpm durante 1 min y a continuación, fueron filtrados utilizando una malla de polipropileno con el fin de retirar el material vegetal no precipitado. Todos los extractos fueron analizados inmediatamente al culminar la centrifugación (ver el apartado 3.2.7).

Los datos experimentales fueron analizados por medio de una Regresión de Superficie de Respuesta (RSREG) que se ajustó a una ecuación polinomial de segundo orden. La maximización de la concentración de azúcares reductores y el porcentaje de rendimiento de extracción se realizó por medio de la metodología de superficie de respuesta (RSM) (Box & Wilson, 1951) empleando el software estadístico Minitab 17.

Con el fin de corroborar el ajuste del modelo obtenido mediante RSREG, se elaboraron 3 pruebas adicionales en los puntos óptimos para cada tipo de hoja y se evaluó un intervalo de confianza del 95% con el fin de verificar la reproducibilidad con datos experimentales adicionales.

**3.2.6 Determinación del Modelo Cinético de Extracción.** Se elaboraron 2 maceraciones para cada tipo de hoja. Las extracciones se realizaron utilizando botellas de ámbar de 250mL que contenían 10 g de hoja molida y la cantidad de solución correspondiente a la capacidad de imbibición (70 mL para el nim y 40mL para la guayaba). El diámetro de partícula de las hojas, la cantidad de solución correspondiente a la relación L:S, y el pH de la solución usada para la maceración fueron los valores óptimos obtenidos para cada uno de los diferentes tipos de hoja mediante la Metodología de Superficie de Respuesta; para la guayaba pH 4.3, Dp 0.359 mm y relación L:S 12 mL/g (120mL de solución) y para el nim pH 8.3, Dp 0.317 mm y relación L:S 7.5 mL/g (75mL de solución). Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente y en reposo. Se

tomaron 20 muestras de 0.25 mL durante tiempos transcurridos hasta las 24 h de iniciada la maceración. Posteriormente los extractos fueron centrifugados utilizando una centrífuga Tangkula 800-1 a 3000 rpm durante 1 min y a continuación, fueron filtrados utilizando una malla de polipropileno con el fin de retirar el material vegetal no precipitado, todos los extractos fueron analizados inmediatamente al culminar la centrifugación (ver el apartado 3.2.7). A partir de los resultados obtenidos por medio de la caracterización a diferentes tiempos, se ajustó una regresión siguiendo el modelo modificado de (Peleg, 1988) por medio del software CurveExpert Profesional 2.6 para cada tipo de hoja.

**3.2.7 Caracterización Fisicoquímica de los Extractos.** Los azúcares reductores fueron cuantificados por medio de espectrofotometría UV Vis utilizando el Método del Ácido 3-5 Dinitrosalicílico (DNS). El procedimiento se basa principalmente en la reducción del ácido 3,5 – dinitrosalicílico DNS (de color amarillo) al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) por la glucosa u otro azúcar reductor; determinándose el cambio de coloración por espectrofotometría UV Vis a una longitud de onda en el rango de 540-600 nm, obteniendo la concentración de azúcares reductores mediante una interpolación en una curva patrón (Miller, 1959).

La curva de calibración fue realizada con glucosa analítica 99.5% Merk, partiendo de soluciones desde 0 hasta 0.6 g/L en agua desionizada, donde se alcanza el límite superior de absorbancia (1). Los extractos fueron diluidos en proporción 1:16 [mL de extracto/mL de agua desionizada] para el nim y 1:30 [mL de extracto/mL de agua desionizada] para la guayaba, tanto para los experimentos preliminares como para los experimentos de determinación de las condiciones óptimas de extracción. Para la evaluación del modelo cinético, los extractos obtenidos

se diluyeron en proporciones desde 1:2 hasta 1:5 [mL de extracto/mL de agua desionizada] para el nim y 1:2 hasta 1:13 [mL de extracto/mL de agua desionizada] para la guayaba, con el fin de no sobrepasar el límite de absorbancia. Para la medición se tomaron 0.5 mL de cada dilución, y se combinaron con 0.5 mL de reactivo ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). La mezcla se calentó durante 5 min a 90°C, y posteriormente se enfrió en baño de hielo durante 5 min, finalmente se adicionaron 3 mL de agua desionizada. El blanco se preparó con 0.5 mL de agua desionizada en lugar de la muestra. Para realizar las mediciones de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 UV-Visible, a una longitud de onda de 540 nm en cubetas de plástico.

#### **4. Análisis de Resultados**

##### **4.1 Caracterización Físicoquímica de las Hojas de Guayaba y Nim**

En la tabla 3 se presentan el contenido de humedad, la cantidad de azúcares reductores totales y la capacidad de imbibición de agua para los dos tipos de hoja, hallados mediante análisis gravimétrico, extracción soxhlet seguida de espectrofotometría y pruebas de absorción de agua, respectivamente. Los datos que se obtuvieron de dichos análisis fueron utilizados para hallar los rendimientos de las extracciones y la cantidad de solución inicial necesaria para cada extracción. Además, se presentan los contenidos de lignina y hemicelulosa, los cuales fueron tomados de la literatura.

Como puede observarse, la hoja de guayaba presenta un mayor contenido de humedad, lignina, y hemicelulosa que la hoja de nim, así como la cantidad de azúcares reductores totales presentes en la hoja de guayaba es aproximadamente 3.6 veces mayor que en la hoja de nim. Por otro lado,

la capacidad de imbibición de la hoja de nim es mayor que la de guayaba. Estas diferencias en la capacidad de absorción de agua entre diferentes especies vegetales son causadas por la naturaleza de las hojas; su diferente porosidad y las fuerzas de tensión presentes en la pared celular (Kutlu *et al.*, 2018).

Tabla 3.

*Caracterización Fisicoquímica de las Hojas de Guayaba y Nim*

<b>Material vegetal</b>	<b>%Lignina [g Lignina/g de hoja seca]*100</b>	<b>%Hemicelulosa [g Hemicelulosa/g de hoja seca]*100</b>	<b>%Humedad [g agua/g de hoja seca]*100</b>	<b>%Azúcares Reductores [g ART/g de hoja seca]*100</b>	<b>Capacida Imbibición [g agua/g de hoja seca]</b>
Hoja de Guayaba	17.77 (Camarena-Tello et al., 2015)	14.79 (Camarena-Tello et al., 2015)	11.092 ± 0.036	10.623 ± 0.713	4 ± 0.756
Hoja de Nim	10.20 (Ramana et al., 2000)	11.05 (Ramana et al., 2000)	8.603 ± 1.058	2.986 ± 0.303	7 ± 0.926

#### 4.2 Evaluación del Método de Extracción

En la figura 2, se observan las concentraciones de azúcares reductores en los extractos obtenidos a partir de hoja de nim y guayaba por medio de los métodos de Maceración y Extracción asistida por microondas (MAE). Como puede observarse, los extractos obtenidos a partir de hoja de guayaba presentan mayores concentraciones de azúcares reductores que la hoja de nim, debido a que la hoja de guayaba contiene una mayor cantidad de azúcares solubles extraíbles tal como se puede observar en la tabla 3.

Del test de normalidad Kolmogorov- Smirnov se obtuvo que las concentraciones de los extractos a partir de la hoja de guayaba siguen una distribución normal ( $p > 0.15$ ), siendo el caso contrario para la hoja de nim (Apéndice A). Según el test paramétrico prueba T (aplicado a los

extractos de guayaba) (Apéndice B), se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción ( $p=0.005$ ), concordante con lo observado, donde se obtienen mayores concentraciones por medio de la maceración. Debido a que los datos obtenidos para la hoja de nim no siguen una distribución normal, se aplicó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Apéndice B) donde se evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.507$ ) entre los métodos de extracción.

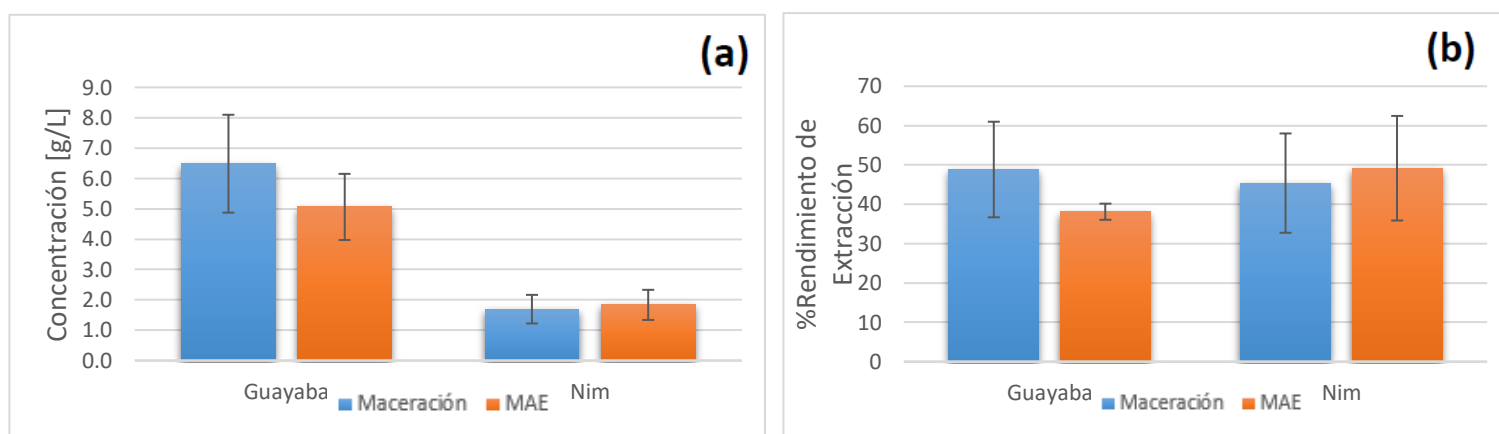


Figura 2. Maceración vs Extracción Asistida por Microondas a pH 6.3, Relación L:S 3 mL:g y Dp 0.359 mm, concentración (a) y %Rendimiento (b).

La extracción asistida por microondas es reconocida como una técnica superior a la maceración en comparación con los tiempos de extracción y el volumen de solvente requerido (Nn, 2015), sin embargo su aplicación puede llevar a bajos rendimientos debido a la degradación térmica de los compuestos de interés (Singh & Kumar, 2014). Esta hipótesis prevalece al observar las concentraciones obtenidas en los extractos tanto de la guayaba como en los de nim donde la extracción asistida por microondas se desempeña pobremente, siendo contrario a lo esperado, por lo tanto, se determina la maceración como el mejor método de extracción de azúcares reductores bajo las condiciones seleccionadas.

#### **4.3 Efecto de las Variables pH, Diámetro de Partícula y Relación L:S Sobre las Variables de Respuesta por Medio de Maceración en la Hoja de Nim.**

A partir de los resultados obtenidos a las condiciones establecidas por el diseño de experimentos [Apéndice C], se elaboró una gráfica factorial [Fig.3] para establecer relaciones claras entre los factores y las variables de respuesta en la extracción de azúcares reductores a partir de la hoja de nim.

En la figura 3 se observa un incremento en el rendimiento de extracción al igual que en la concentración del extracto al aumentar el pH. (Zhu *et al.*, 2016) plantean que “el álcali puede facilitar la disociación completa de los polímeros de la pared celular vegetal al romper los enlaces de hidrógeno y los covalentes, y la lignina puede ser removida efectivamente”, y concluye que “el NaOH tiene un impacto significativo sobre la superficie de la biomasa, ya que los tejidos vegetales son desmantelados y la estructura interior de la pared celular se abre mostrando vacíos que son ausentes en la biomasa sin tratar”, fenómeno presentado en su reporte acerca de la evaluación de las condiciones ácidas y básicas en el pretratamiento de la extracción de azúcares a partir de bagazo de caña. Las extracciones bajo condiciones ácidas permitieron la hidrólisis de la hemicelulosa, pero fue opacada por la disolución de la lignina en condiciones básicas que generó un mayor impacto sobre la disolución de los azúcares reductores debido al cambio de la estructura de los tejidos vegetales, lo que facilitó la liberación de los carbohidratos solubles (azúcares).

De acuerdo con la figura 3 el diámetro de partícula tiene una correlación parabólica con respecto a la concentración de azúcares reductores y del porcentaje de rendimiento de la extracción con un valor óptimo presente; el rendimiento de la extracción y la concentración del extracto aumentan conforme este valor se acerca más al tamaño óptimo de material particulado, el cual es

de 30-40 mesh (aprox. 0.354 mm). Esto ya fue mencionado previamente por (Handa *et al.*, 2008) para la maceración, quienes sugirieron este tamaño de partícula con la finalidad de evitar la formación de coágulos y efectos difusionales que impidan el contacto entre el solvente y el sustrato.

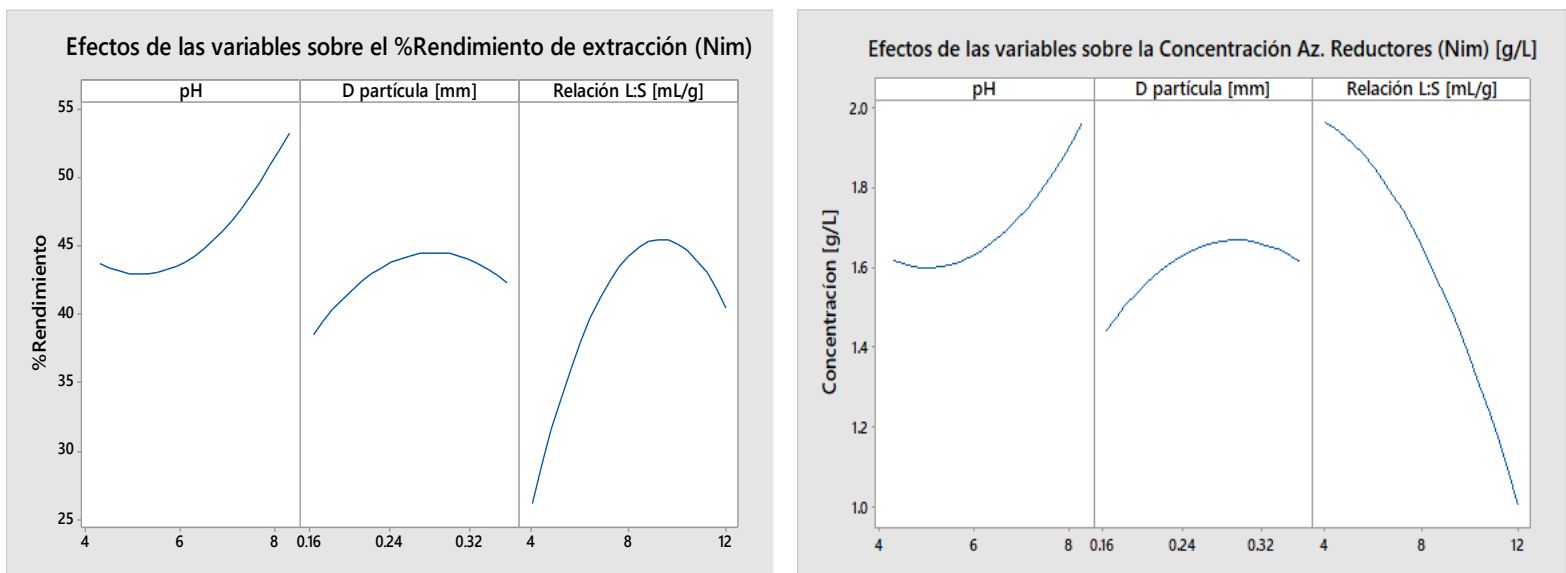


Figura 3. Efecto de las Variables de Entrada sobre la Concentración de Azúcares Reductores y el %Rendimiento en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

El aumento de la relación líquido-sólido tiene diversos efectos sobre las variables de respuesta, dado que mejora el rendimiento de la extracción hasta alcanzar el valor de L:S 9 mL/g y luego decrece, haciendo de este punto un máximo local. Un comportamiento idéntico fue observado por (Kuila *et al.*, 2011) donde decrece el rendimiento de extracción a partir de una relación L:S de 3.26 mL/g en la extracción de azúcares a partir de bagazo de anacardo. Con respecto a la concentración de azúcares reductores en el extracto, ésta aumenta conforme la relación líquido-sólido disminuye, debido a que a menor cantidad de líquido resulta en la saturación del solvente, dado que, se alcanzan altas concentraciones ya que el volumen de extracción es menor.

Los datos obtenidos por medio del diseño de experimentos fueron ajustados a los siguientes modelos de superficie de respuesta:

$$C = 2.05 - 0.466pH + 6.75Dp + 0.072L + 0.0342 pH^2 - 13.08 Dp^2 - 0.01054 L^2 + 0.364 pH.Dp + 0.0034 pH.L - 0.168 Dp.L \quad (5) \quad R^2 = 82.08\%$$

$$\%R = 0.24 - 0.468 pH + 5.38 Dp + 0.335 L + 0.031 pH^2 - 12.04 Dp^2 - 0.0204 L^2 + 0.292 pH.Dp + 0.009 pH.L:S - 0.046 Dp.L \quad (6) \quad R^2 = 79.91\%$$

Donde: **Dp** es el diámetro de partícula [mm], **L** es la relación Líquido: Sólido [mL/g de hoja seca], **C** es la Concentración de azúcares reductores [g Az. Reductores extraídos/ L de extracto] y **%R** es el porcentaje de Rendimiento [(g Az. Reductores extraídos/g Az. Reductores totales)\*100].

A partir de los modelos se realizaron las superficies de respuesta mostradas en la figura 4 y en el Apéndice D, donde se representa el efecto de las variables de entrada sobre la concentración de azúcares reductores y el porcentaje de rendimiento. Además, por medio de una optimización de superficie de respuesta con el fin de maximizar las dos variables (concentración de azúcares reductores en los extractos y rendimiento de extracción), se obtuvieron los siguientes valores óptimos de operación: pH: 8.30, Dpartícula: 0.317 mm y relación Líquido: Sólido: 7.48 mL/g. Estas condiciones permitieron obtener un extracto de nim con una concentración de azúcares reductores de 2.07 g/L, y un porcentaje de rendimiento de 52.74% [(g Az. Reductores extraídos/g Az. Reductores totales)\*100].

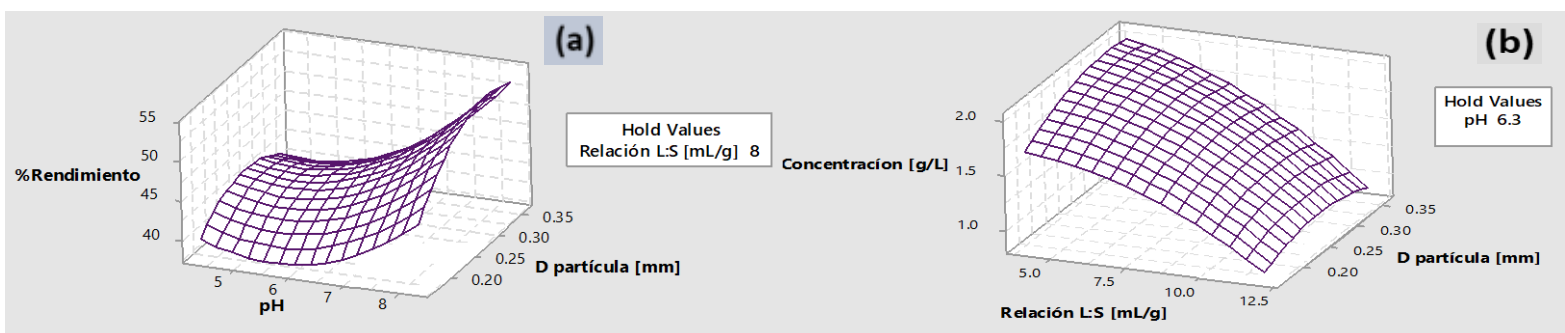


Figura 4. Superficies de Contorno del Efecto de las Variables de Entrada sobre el %Rendimiento (a) y la Concentración de Azúcares Reductores (b) en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

La verificación del modelo de superficie de respuesta sobre el punto óptimo realizada con datos experimentales adicionales se observa en la figura 5, donde los valores encontrados de concentración de azúcares reductores y porcentaje de rendimiento están dentro de un intervalo de confianza del 95%.



Figura 5. Evaluación del Ajuste de los Modelos de %Rendimiento (a) y Concentración de Azúcares Reductores (b) en el Punto Óptimo para el Nim: pH 8.3, Dp 0.317 mm, L:S 7.48 mL:g.

#### 4.4 Efecto de las Variables pH, Diámetro de Partícula y Relación L:S Sobre las Variables de Respuesta por Medio de Maceración en la Hoja de Guayaba.

En la figura 6 se puede observar el comportamiento de la concentración de azúcares reductores y porcentaje de rendimiento de extracción con respecto a la variación en pH, diámetro de partícula y relación L:S para la guayaba.

Como puede observarse, se evidencian similitudes en el comportamiento de los resultados con los obtenidos para la hoja de nim, con excepción de la variable pH. En el caso de la guayaba, tanto la concentración de azúcares reductores como el rendimiento aumentan a medida que el pH disminuye, este resultado sugiere que bajo estas condiciones ocurrió una significativa hidrólisis ácida de la hemicelulosa, “la hemicelulosa es un polímero compuesto principalmente de pentosas

y hexosas, este polímero puede ser fácilmente reducido a azúcares monoméricos, xilosa y glucosa por medio del uso de diluciones levemente ácidas” (Unhasirikul, Naranong, & Narkrugsa, 2012). Esta diferencia entre el pH óptimo obtenido para los dos tipos de hoja se debe al contenido de hemicelulosa, debido a que las extracciones realizadas a pHs ácidos tienen mejor desempeño debido a que hay una mayor cantidad de hemicelulosa que puede ser hidrolizada. (Zhu *et al.*, 2016) en su evaluación de los tratamientos ácidos y básicos para la producción de azúcares a partir de bagazo de caña, obtuvo que, las diluciones ácidas causan una mayor reducción de la hemicelulosa del material vegetal que las diluciones básicas, mientras que la lignina se solubiliza a pH básico. Esto indica que el pH de extracción óptimo de azúcares reductores se debe evaluar específicamente para cada tipo de material lignocelulósico, siendo dependiente de la naturaleza del sustrato, en especial del contenido de lignina, hemicelulosa y azúcares reductores no estructurales.

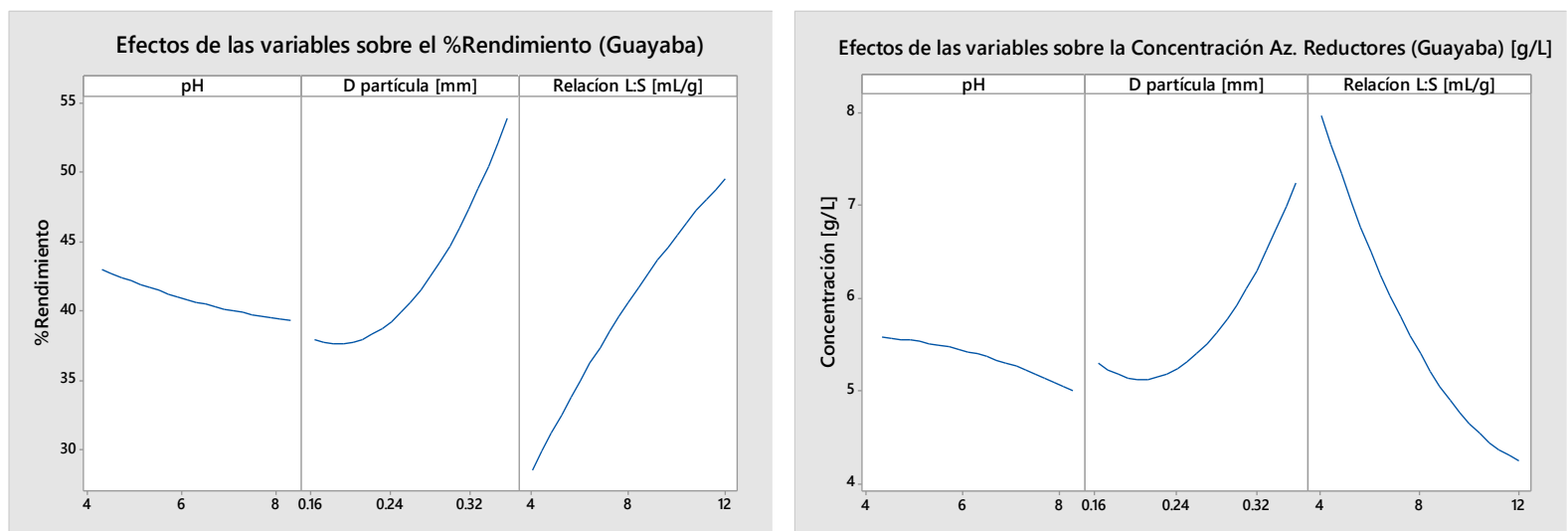


Figura 6. Efecto de las Variables de Entrada sobre la Concentración de Azúcares Reductores y el %Rendimiento en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

El aumento en el diámetro de partícula tiene una relación proporcional respecto a las dos variables de respuesta, ocasionando un notable incremento sobre la concentración de azúcares

reductores y el rendimiento de extracción: al igual que en el caso del nim el valor óptimo se encuentra en el intervalo de los 30-40 mesh (aprox. 0.354 mm).

Igual que en la extracción de hoja de nim, al disminuir la relación L:S aumenta la concentración de azúcares reductores en los extractos de una forma cuadrática. Con respecto al rendimiento, este aumenta con los incrementos de la relación líquido-sólido sin alcanzar un máximo local, es decir el valor de la relación líquido-sólido que maximiza el rendimiento se encuentra fuera del intervalo evaluado. Por lo tanto, mayores relaciones líquido: sólido continuarían incrementando el rendimiento hasta llegar a cierto valor, en donde el rendimiento decae; en las extracciones realizadas a la hoja de nim este valor se encuentra dentro del intervalo evaluado como fue descrito previamente y se puede observar en la figura 5.

Los datos obtenidos por medio del diseño de experimentos fueron ajustados a los siguientes modelos de superficie de respuesta:

$$C = 17.68 + 0.13 pH - 41.7 Dp - 1.556 L - 0.0273 pH^2 + 91.4 Dp^2 + 0.0448 L^2 - 0.45 pH.Dp + 0.0238 pH.L + 0.861 Dp.L \quad (7) \quad R^2 = 82.50\%$$

$$\%R = 8.45 - 0.369 pH - 33.1 Dp - 0.150 L + 0.0130 pH^2 + 58.6 Dp^2 - 0.0107 L^2 - 0.36 pH.Dp + 0.0254 pH.L + 1.684 Dp.L \quad (8) \quad R^2 = 81.45\%$$

Donde: **Dp** es el diámetro de partícula [mm], **L** es la relación Líquido: Sólido [mL/g de hoja seca], **C** es la Concentración de azúcares reductores [g Az. Reductores extraídos/ L de extracto] y **%R** es el porcentaje de Rendimiento [(g Az. Reductores extraídos/g Az. Reductores totales)\*100].

A partir de los modelos se realizaron las superficies de respuesta mostrados en la figura 7 y en el apéndice D, las cuales representan el efecto de las variables sobre la concentración de azúcares reductores y el porcentaje de rendimiento.

Por medio de una optimización de superficie de respuesta con el fin de maximizar las dos variables (concentración de azúcares reductores en los extractos y rendimiento de extracción), se

obtuvieron los siguientes valores óptimos de extracción: pH: 4.30, Dpartícula: 0.358 mm y relación Líquido: Sólido: 12 mL:g. Estas condiciones permitieron obtener un extracto de guayaba con una concentración de azúcares reductores de 6.52 g/L, y un porcentaje de rendimiento de 70.03% [(g Az. Reductores extraídos/g Az. Reductores totales)\*100].

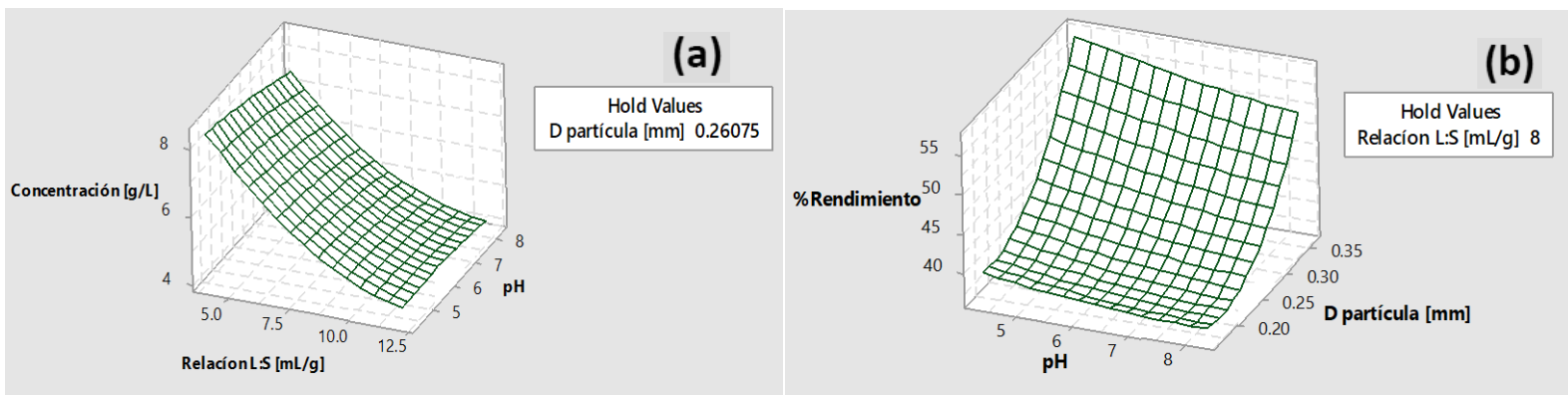


Figura 7. Superficies de Contorno del Efecto de las Variables de Entrada sobre la Concentración de Azúcares Reductores (a) y el %Rendimiento (b) en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

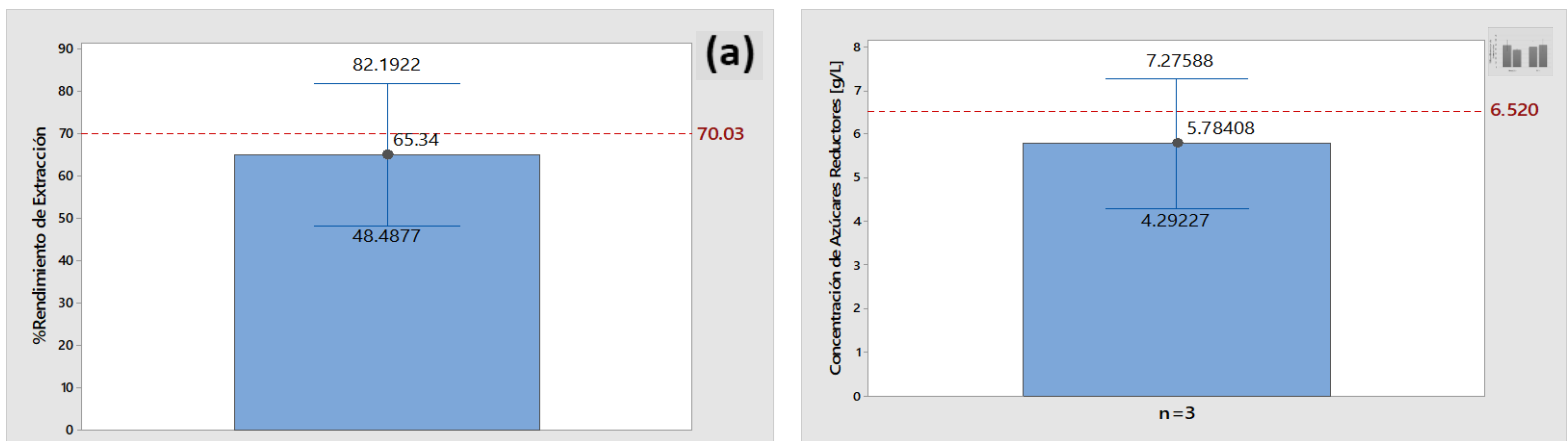


Figura 8. Evaluación del Ajuste de los Modelos de %Rendimiento (a) y Concentración de Azúcares Reductores (b) en el Punto Óptimo para la Guayaba: pH 8.43, Dp 0.358 mm, L:S 12 mL:g.

La verificación del modelo de superficie de respuesta en el punto óptimo realizada con datos experimentales adicionales se observa en la figura 8, donde los valores encontrados de

concentración de azúcares reductores y porcentaje de rendimiento están dentro de un intervalo de confianza del 95%.

#### 4.4 Cinética de Extracción

Las figuras 9 y 10 corresponden al ajuste por medio del modelo de Peleg modificado de la concentración de azúcares reductores en función del tiempo de extracción. Los parámetros de respuesta del modelo se muestran a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4.

*Constantes cinéticas para el modelo de Peleg- modificado*

Constantes	$K_2$ [mL. Min/g]	$K_3$ [mL/g]	$B_0$	$C_e$	$R^2$
Guayaba	17.45	0.12	0.0573	8.333	0.959
Nim	59.16	0.41	0.0169	2.439	0.905

El coeficiente de determinación  $R^2$  es mayor al 90% para el modelamiento de la extracción en los dos tipos de hoja, en consecuencia, se establece que es posible realizar el modelado de la concentración de azúcares reductores con base al tiempo de extracción por medio del modelo modificado de Peleg, aunque no existan reportes adicionales del uso de este modelo en la extracción de este producto de interés.

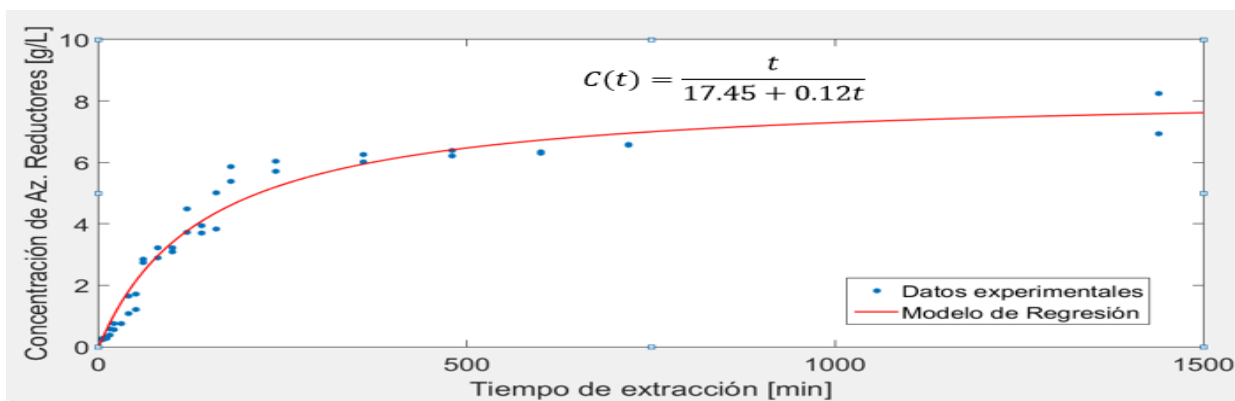


Figura 9. Modelo de Peleg Modificado para la Maceración de Guayaba a pH 4.3, Dp 0.358 mm, L:S 12 mL:g.

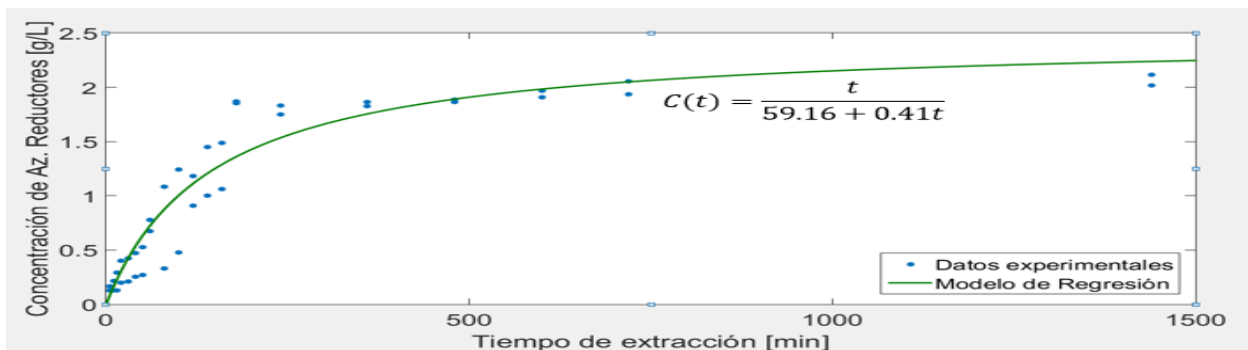


Figura 10. Modelo de Peleg Modificado para la Maceración de Nim a pH 8.3, Dp 0.317 mm, L:S 7.48 mL:g.

En la tabla 4 es posible observar las velocidades de extracción a tiempo cero ( $B_0$ ) [g de Azúcares reductores/ mL de extracto. min], estas son las máximas velocidades de extracción, ya que este valor va decreciendo hasta llegar a cero donde finalmente se alcanza la concentración de equilibrio en el extracto. Las concentraciones de azúcares reductores en el equilibrio son de 8.33 y 2.439 [g de Azúcares reductores/L de extracto] para la guayaba y el nim respectivamente, es decir la concentración en el equilibrio de azúcares reductores a partir de la hoja de guayaba es 3.41 veces la de nim, y la relación entre sus velocidades de extracción a tiempo cero es 3.39. Una relación similar se observa al comparar el porcentaje en peso de azúcares solubles presentes en la hoja de guayaba y nim (10.623% y 2.986%), cuya relación es 3.55, por lo que se concluye que la extracción de azúcares reductores y su velocidad está determinada por la cantidad de azúcares solubles presentes en el material vegetal.

## 5. Conclusiones

En la extracción de azúcares reductores por medio de maceración o extracción asistida por microondas (MAE), no se presentan diferencias significativas a partir de las hojas de nim (*Azadirachta indica*). Por el contrario, para las hojas de guayaba (*Psidium Guajava*) las extracciones realizadas por maceración muestran mejores resultados para la obtención de azúcares reductores que la extracción asistida por microondas. Por esta razón se escogió la maceración como el método adecuado para la extracción de azúcares reductores.

En el proceso de maceración los parámetros óptimos para la extracción de azúcares reductores a partir de la hoja de nim son: pH 8.3, diámetro de partícula 0.317 mm y relación líquido: sólido L:S 7.48 mL/g hoja seca con una concentración de 2.07 g de azúcares extraídos/ L de extracto y un porcentaje de rendimiento del 52.74 % [(g az. extraídos/ g ART)\*100]. Para la hoja de guayaba, en cambio, un pH 4.3, diámetro de partícula 0.358 mm, y relación líquido sólido L:S 12.0 mL /g hoja seca permitieron obtener una concentración de azúcares reductores de 6.52 g de azúcares extraídos/ L de extracto y un rendimiento del 70.03 % [(g az. extraídos/ g ART)\*100].

La cinética de extracción de azúcares reductores a partir de hojas de nim y guayaba puede ser modelada por medio de un ajuste con la ecuación modificada de PELEG con coeficientes de determinación de 0.959 y 0.905 para la guayaba y el nim respectivamente; además, la concentración en el equilibrio de azúcares reductores a partir de la hoja de guayaba es 3.41 veces la de nim, y la relación entre sus velocidades de extracción a tiempo cero es 3.39.

## **6. Recomendaciones**

Comparar los métodos de maceración y extracción asistida por microondas MAE variando las condiciones de operación (potencia, frecuencia y tiempo de exposición).

Evaluar los diversos métodos usados para la concentración de soluciones compuestas por azúcares reductores sin afectar la naturaleza de los mismos.

Realizar un estudio comparativo entre los resultados de laboratorio y pruebas a escala industrial para verificar el escalado del método de extracción.

### Referencias Bibliográficas

- Amutha Gnana Arasi, M. A. S., Gopal Rao, M., & Bagyalakshmi, J. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Psidium guajava* L. fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, *91*, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.039>
- Anastas, P. T., & Kirchhoff, M. M. (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Accounts of Chemical Research*, *35*(9), 686–694. <https://doi.org/10.1021/ar010065m>
- Antonio, C., Larson, T., Gilday, A., Graham, I., Bergström, E., & Thomas-Oates, J. (2007). Quantification of sugars and sugar phosphates in *Arabidopsis thaliana* tissues using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1172*(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.011>
- Antonio, C., Pinheiro, C., Chaves, M. M., Ricardo, C. P., Ortuño, M. F., & Thomas-Oates, J. (2008). Analysis of carbohydrates in *Lupinus albus* stems on imposition of water deficit, using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1187*(1–2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.010>
- Aryana. (2014). Handa Sukhdev Swami - Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Retrieved from <http://www.aryanalibris.com/index.php?post/Handa-Sukhdev-Swami-Extraction-technologies-for-medicinal-and-aromatic-plants>
- Bhosale, R. R. et al. (2014). Innovative Eco-friendly Approaches for Green Synthesis of Silver Nanoparticles. *Int J Pharm Sci Nanotech*, *7*(1), 2328–2337.
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. WileyRoyal Statistical Society. <https://doi.org/10.2307/2983966>
- Bruice, P. (1995). Carbohydrates. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Carbohidratos.PaulaYurkanis\\_8334.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Carbohidratos.PaulaYurkanis_8334.pdf)
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Velic, D., Bucic, A., Kojic, B., Kojic, K., ... Velic, V. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Carreño Toledo, O. J., & Rojas Correa, L. Y. (2014). Determinación Y Ajuste De Parametros Cinéticos De La Extracción De Polifenoles Totales a Partir De La Cáscara De Cacao. *Igarss 2014*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Carrión, A., & García, C. (2010). "Preparación De Extractos Vegetales: Determinación De Eficiencia De Metodica. *Universidad De Cuenca*, (Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmecéutica), 27–31. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
- Cataldi, T. R., Margiotta, G., Iasi, L., Di Chio, B., Xiloyannis, C., & Bufo, S. A. (2000).

- Determination of sugar compounds in olive plant extracts by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Chemistry*, 72(16), 3902–7.
- Cobos, D., Germano, L., Malovini, E., & Paladino, S. (2017). ¿Es posible determinar azúcares reductores en vinos por el método Fehling Causse Bonnans, sin utilizar acetato neutro de plomo? *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(1), 197–204.
- Currie, H. A., & Perry, C. C. (2006). Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolates by high pH anion exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1128(1–2), 90–96.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.06.045>
- Davis, F., Terry, L. A., Choche, G. A., & Faul, C. F. J. (2007). Effect of extraction procedure on measured sugar concentrations in onion (*Allium cepa* L.) bulbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4299–4306.  
<https://doi.org/10.1021/jf063170p>
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., & Sarker, S. D. (2012). Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation (pp. 89–115). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_5)
- Glyad, V. M. (2002). Determination of Monosaccharides, Disaccharides, and Oligosaccharides in the Same Plant Sample by High-Performance Liquid Chromatography. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(2), 277–282.  
<https://doi.org/10.1023/A:1014870011027>
- Gomez, L., Rubio, E., & Augé, M. (2002). A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), 360–369. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1046>
- Grande, C. D., & Flórez, E. (2013). *Manual de práctica de Química Orgánica Aplicada II*. Bonaventuriana.
- Guerrero Rodriguez, M. J. (2016). *Producción de extractos de Azadirachta (Nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de Sitophilus Oryzae*. Universidad Industrial de Santander.
- Guignard, C., Jouve, L., Bogéat-Triboulot, M. B., Dreyer, E., Hausman, J.-F., & Hoffmann, L. (2005). Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1085(1), 137–42.
- Handa, S. ., Khanuja, S., Longo, G., & Rakesh, D. . (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. International centre for science and high technology*.
- Khamis Al-Jadidi, H. S., & Hossain, M. A. (2015). Studies on total phenolics, total flavonoids and antimicrobial activity from the leaves crude extracts of neem traditionally used for the treatment of cough and nausea. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 93–98.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.05.001>
- Kutlu, T., Guber, A. K., Rivers, M. L., & Kravchenko, A. N. (2018). Moisture absorption

- by plant residue in soil. *Geoderma*, 316, 47–55.  
<https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2017.11.043>
- Liu, C. W., Wang, Y. C., Lu, H. C., & Chiang, W. D. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. *Process Biochemistry*, 49(10), 1601–1605.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.009>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moorthy, S. K., Ashok, C. H., Rao, K. V., & Viswanathan, C. (2015). Synthesis and Characterization of Mgo Nanoparticles by Neem Leaves through Green Method. *Materials Today: Proceedings*, 2(9), 4360–4368.  
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.10.027>
- Nde, D. B., Boldor, D., & Astete, C. (2015). Optimization of microwave assisted extraction parameters of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil using the Doehlert's experimental design. *Industrial Crops and Products*, 65, 233–240.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.015>
- Nn, A. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03), 3–8.  
<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Peleg, M. (1988). An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves. *Journal of Food Science*, 53(4), 1216–1217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13565.x>
- Quentin, A. G., Pinkard, E. A., Ryan, M. G., Tissue, D. T., Baggett, L. S., Adams, H. D., ... Woodruff, D. R. (2015). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology*, 35(11), 1146–1165.  
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpv073>
- Raessler, M. (2011). Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(11), 1833–1843.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.013>
- Raessler, M., Wissuwa, B., Breul, A., Unger, W., & Grimm, T. (2008). Determination of water-extractable nonstructural carbohydrates, including inulin, in grass samples with high-performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7649–7654.  
<https://doi.org/10.1021/jf800973v>
- Ramana, D. B. V., Singh, S., Solanki, K. R., & Negi, A. S. (2000). Nutritive evaluation of some nitrogen and non-nitrogen ® xing multipurpose tree species, 88.
- Rastall, R. A. (1991). Methods in plant biochemistry. volume 2 carbohydrates edited by P. M. Dey, Academic Press, London, 1990, pp. ix + 675, price £79.00; US\$149.0. ISBN 0 12 461012 9. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52(4), 588–589. <https://doi.org/10.1002/jctb.280520417>
- Regier, N., Streb, S., Zeeman, S. C., & Frey, B. (2010). Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* x *nigra* cv. Dorskamp) and the

- impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. *Tree Physiology*, 30(8), 979–987. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq047>
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Saleh Al-Hashemi, Z. S., & Hossain, M. A. (2016). Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(2), 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.psra.2016.09.013>
- Schütz, K., Muks, E., Carle, R., & Schieber, A. (2006). Separation and quantification of inulin in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) roots by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Biomedical Chromatography*, 20(12), 1295–1303. <https://doi.org/10.1002/bmc.694>
- Segovia Gómez, F., Corral, J. J., & Almajano, M. P. (2013). Estudio cinético de la extracción Sólido-Líquido de los compuestos polifenólicos del Residuo del Aguacate. *R. Euetib*, 131–138.
- Singh, H. B., & Kumar, A. B. (2014). Handbook of natural dyes and pigments, (April 1998), 306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-93-80308-54-8.50002-2>
- Soderberg, T. (2016). Organic Chemistry with a Biological Emphasis Volume II. *Chemistry Faculty*, 2. Retrieved from [http://digitalcommons.morris.umn.edu/chem\\_facpubs%0Ahttp://digitalcommons.morris.umn.edu/chem\\_facpubs/2](http://digitalcommons.morris.umn.edu/chem_facpubs%0Ahttp://digitalcommons.morris.umn.edu/chem_facpubs/2)
- Stick, R. V., & Williams, S. J. (2009). *Carbohydrates : the essential molecules of life*. Elsevier.
- Tatke, P., & Jaiswal, Y. (2011). An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(1), 21–31. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.21.31>
- Tonthubthimthong, P., Chuaprasert, S., Douglas, P., & Luewisutthichat, W. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of nimbin from neem seeds - an experimental study. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 289–293. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00131-X)
- Unhasirikul, M., Naranong, N., & Narkrugsa, W. (2012). Reducing sugar production from durian peel by hydrochloric acid hydrolysis. *World Academy of Science, Engineering and Technology. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineerin*, 6(9), 708–713. <https://doi.org/scholar.waset.org/1999.1/12589>
- Uribe, S. T. (2011). OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE POLIFENOLES A PARTIR DE LA ALMENDRA DE MANGO HILACHA (*Mangifera indica*, 1–59.
- Valdés Hernández, Geidy Vivian; Cruz Viera, Luis; 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 ISSN;* 46, 135–145.
- Wang, L., Xie, J., Huang, T., Ma, Y., & Wu, Z. (2017). Characterization of silver nanoparticles biosynthesized using crude polysaccharides of *Psidium guajava* L. leaf and their bioactivities. *Materials Letters*, 208, 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.05.014>
- Zhu, Z., Rezende, C. A., Simister, R., McQueen-Mason, S. J., Macquarrie, D. J., Polikarpov, I., & Gomez, L. D. (2016). Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 93, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.017>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1990). Carbohydrates: Reducing Sugars, 114–128. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8146-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8146-8_6)

## Apéndices

### Apéndice A. Residuales y Test de Normalidad

#### Prueba Kolmogorov Smirnov Maceración-Guayaba

**H0:** La población se ajusta a una distribución normal

**H1:** La población no se ajusta a una distribución normal

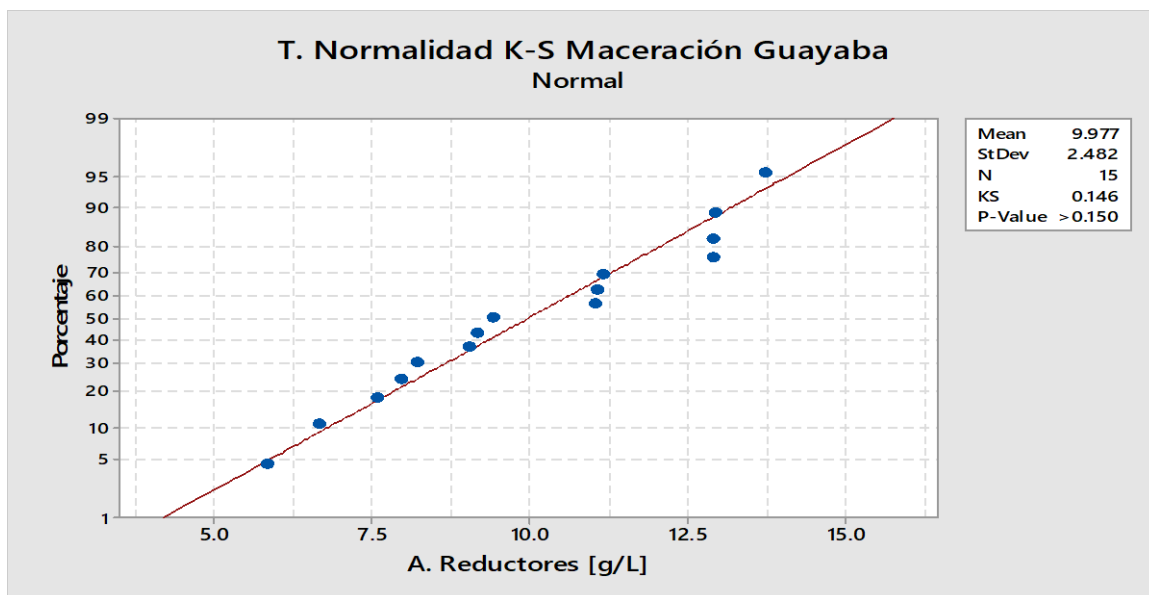


Figura A 1. Test de Normalidad para la Maceración de Guayaba.

Valor-p > 0.15. Se acepta H0 con un grado de significancia del 15%

#### Prueba Kolmogorov Smirnov Maceración-Nim

**H0:** La población se ajusta a una distribución normal

**H1:** La población no se ajusta a una distribución normal

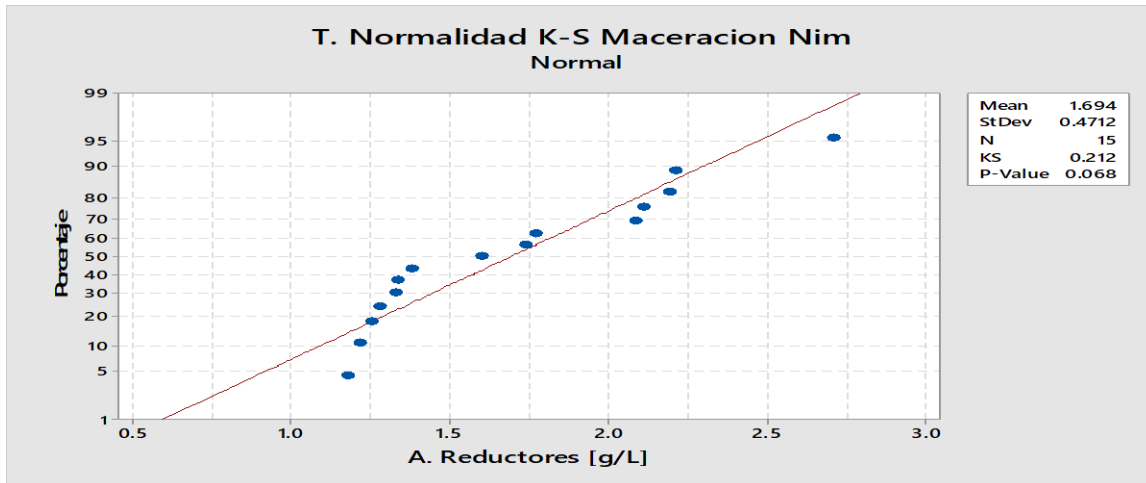


Figura A 2. Test de Normalidad para la Maceración de Nim

Valor-p < 0.15. Rechazo de  $H_0$ , se acepta  $H_1$  con un grado de significancia del 15%

### Prueba Kolmogorov Smirnov MAE-Guayaba

**H0:** La población se ajusta a una distribución normal

**H1:** La población no se ajusta a una distribución normal

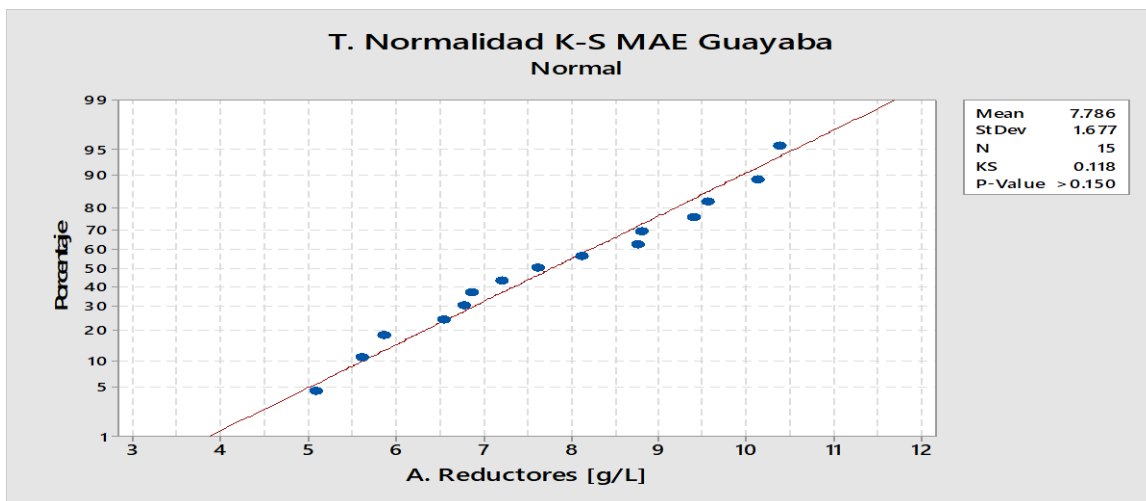


Figura A 3. Test de Normalidad para la Extracción Asistida por Microondas de Guayaba

Valor- $p > 0.15$ . Se acepta  $H_0$  con un grado de significancia del 15%

### Prueba Kolmogorov Smirnov MAE-Nim

**$H_0$ :** La población se ajusta a una distribución normal

**$H_1$ :** La población no se ajusta a una distribución normal

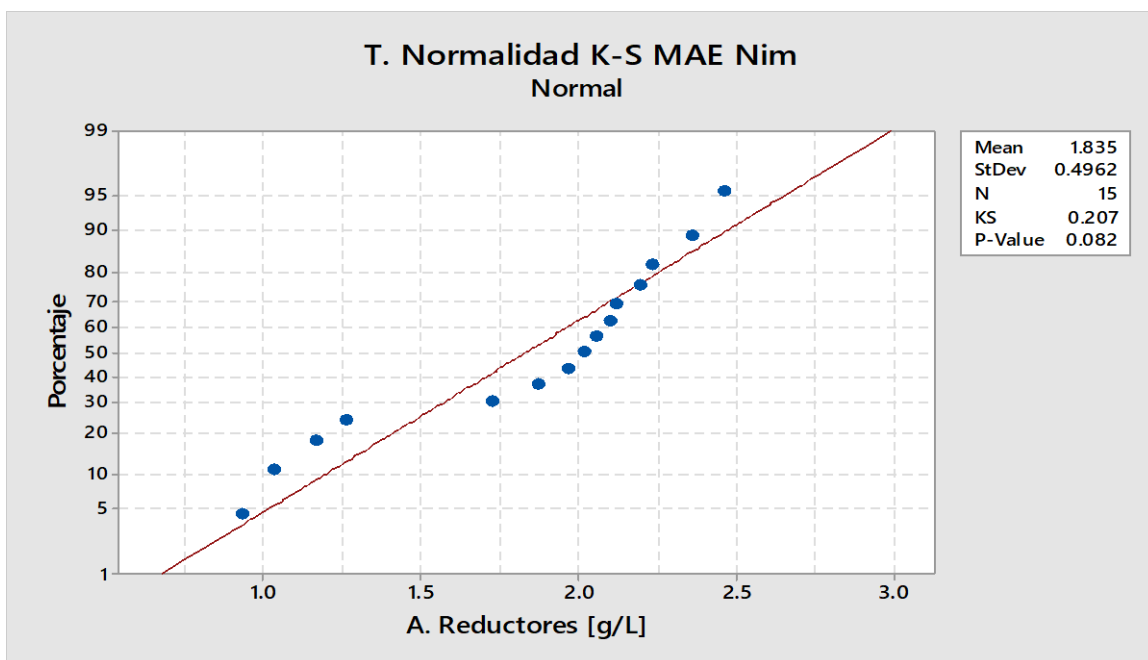


Figura A 4. Test de Normalidad para la Extracción Asisitida por Microondas de Nim

Valor- $p < 0.15$ . Rechazo de  $H_0$ , se acepta  $H_1$  con un grado de significancia del 15%

*Apéndice B. Pruebas de Hipótesis para la Diferencia de Medias  $\alpha=0.05$* **Guayaba**

$$H_0: \mu_{\text{maceración}} \leq \mu_{\text{MAE}}$$

$$H_1: \mu_{\text{maceración}} > \mu_{\text{MAE}}$$

**Two-Sample T-Test and CI: Maceración; MAE**

Two-sample T for Maceración vs MAE

	N	Mean	StDev	SE Mean
Maceración	15	9.98	2.48	0.64
MAE	15	7.79	1.68	0.43

Difference =  $\mu$  (Maceración) -  $\mu$  (MAE)

Estimate for difference: 2.191

95% lower bound for difference: 0.868

T-Test of difference = 0 (vs &gt;): T-Value = 2.83 P-Value = 0.005 DF = 24

Valor-p < 0.05. Rechazo de  $H_0$ , se acepta  $H_1$  con un grado de significancia del 5%**Nim**

$$H_0: \mu_{\text{maceración}} = \mu_{\text{MAE}}$$

$$H_1: \mu_{\text{maceración}} \neq \mu_{\text{MAE}}$$

**Kruskal-Wallis Test: Concentracion Nim versus Tipo Extrac. Nim**

Kruskal-Wallis Test on Concentracion Nim

Tipo	N	Median	Ave Rank	Z
Extrac. Nim				
Maceracion	15	1.602	14.4	-0.66
MAE	15	2.017	16.6	0.66
Overall	30		15.5	

H = 0.44 DF = 1 P = 0.507

Valor-p > 0.05. Se acepta  $H_0$ , y se rechaza  $H_1$  con un grado de significancia del 5%

*Apéndice C. Resultados de las Pruebas de Maceración para Encontrar las Condiciones Óptimas de Extracción*

Tabla C1.

*Valor Promedio del Porcentaje de Rendimiento y de la Concentración de Azúcares Reductores en la Guayaba  $\pm 1$  Desviación Estándar; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C*

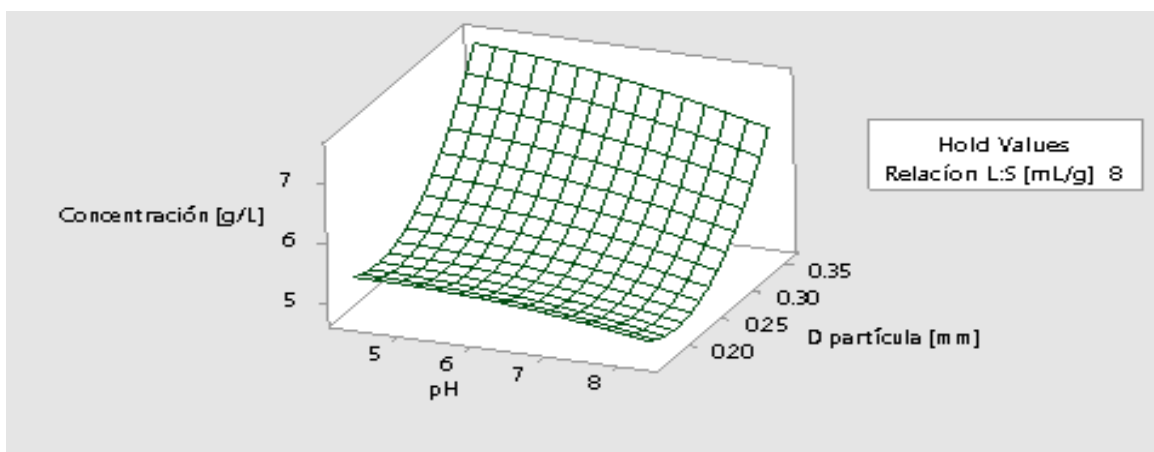
<b>pH</b>	<b>D partícula [mm]</b>	<b>Relación L:S [mL/g]</b>	<b>Conc. Az Reductores [g/L]</b>	<b>%Rend de Extracción</b>
4	0.261	12	3.629	41.00
6	0.359	4	8.627	32.49
6	0.261	8	6.799	51.20
6	0.261	8	6.573	49.50
4	0.261	4	7.333	27.61
4	0.163	8	5.348	40.27
6	0.163	12	3.587	40.52
6	0.261	8	4.803	36.17
6	0.261	8	4.656	35.06
6	0.359	12	5.913	66.80
6	0.163	4	9.502	35.78
6	0.359	4	11.047	41.60
4	0.359	8	8.030	60.47
8	0.359	8	6.793	51.16
8	0.261	12	4.803	54.25
6	0.163	4	7.626	28.72
8	0.359	8	5.913	44.53
4	0.261	12	4.729	53.42
8	0.163	8	5.012	37.75
8	0.163	8	4.132	31.12
8	0.261	4	7.700	28.99
4	0.261	4	7.836	29.51
6	0.359	12	6.270	70.82
6	0.261	8	5.478	41.26
4	0.163	8	6.254	47.10
6	0.163	12	3.357	37.92
8	0.261	4	7.213	27.16
6	0.26075	8	4.095	30.84
8	0.26075	12	4.824	54.49
4	0.3585	8	7.841	59.05

Tabla C2.

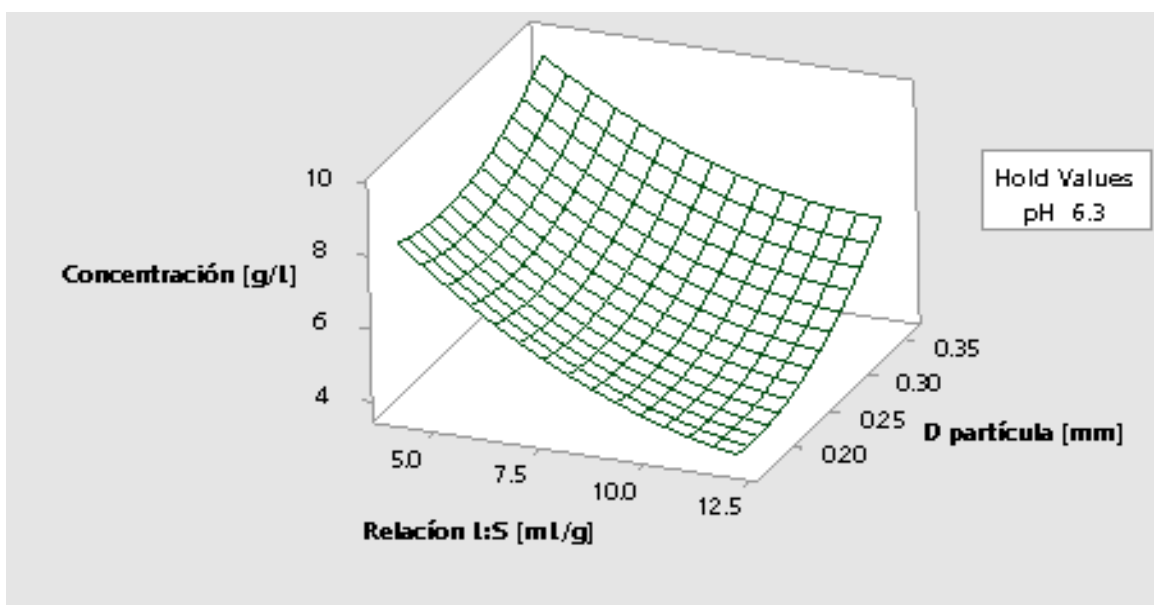
*Valor Promedio del Porcentaje de Rendimiento y de la Concentración de Azúcares Reductores en el Nim  $\pm 1$  Desviación Estándar; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C*

<b>pH</b>	<b>D partícula [mm]</b>	<b>Relación L:S [mL/g]</b>	<b>Conc. Az Reductores [g/L]</b>	<b>%Rend de Extracción</b>
6	0.261	8	1.433	38.39
8	0.261	4	2.461	32.97
6	0.261	8	1.416	37.94
8	0.261	12	1.340	53.88
6	0.163	4	2.053	27.50
6	0.163	12	0.826	33.21
6	0.359	4	1.874	25.11
8	0.359	8	1.662	44.53
4	0.261	12	1.050	42.20
6	0.261	8	2.028	54.33
8	0.261	12	1.326	53.31
6	0.261	8	1.659	44.45
6	0.261	8	1.628	43.63
6	0.359	12	0.854	34.34
4	0.163	8	1.466	39.29
4	0.261	4	1.958	26.23
8	0.359	8	2.416	64.74
4	0.261	12	1.002	40.29
4	0.163	8	1.399	37.49
6	0.359	12	0.874	35.12
6	0.163	4	1.394	18.67
4	0.261	4	1.966	26.34
6	0.163	12	0.818	32.88
8	0.163	8	1.790	47.97
8	0.261	4	1.863	24.96
4	0.359	8	1.494	40.03
6	0.359	4	2.181	29.23
8	0.163	8	1.659	44.45
6	0.261	8	1.754	47.00
4	0.359	8	1.430	38.31

*Apéndice D. Superficies de Contorno del Efecto de las Variables de Entrada Sobre el %Rendimiento y la Concentración de Azúcares Reductores*



*Figura D 1.* Superficie de Contorno del Efecto de las Variables pH y Dpartícula a Relación L:S Constante de 8 mL:g Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C



*Figura D 2.* Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y Dpartícula a pH Constante de 6.3 Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

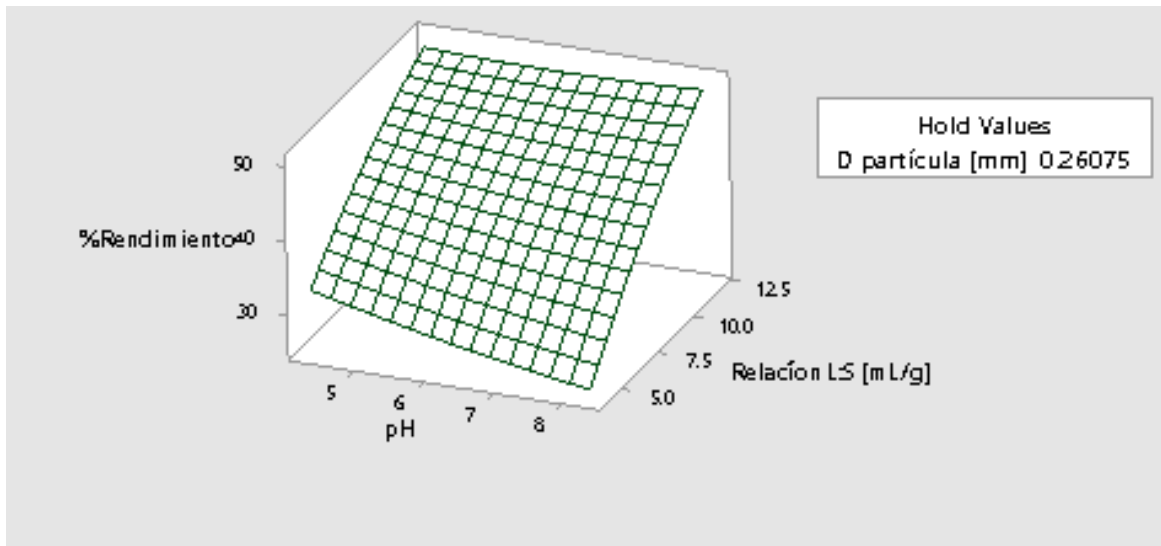


Figura D 3. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y pH a  $D_{partícula}$  Constante de 0.26 mm Sobre el %Rendimiento en la Guayaba por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

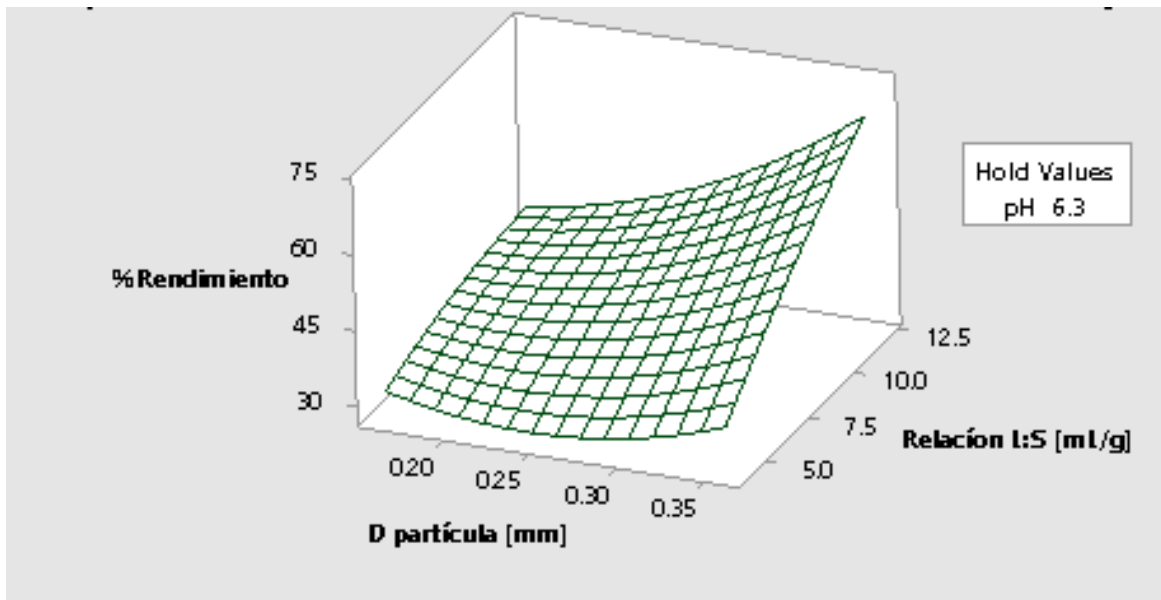
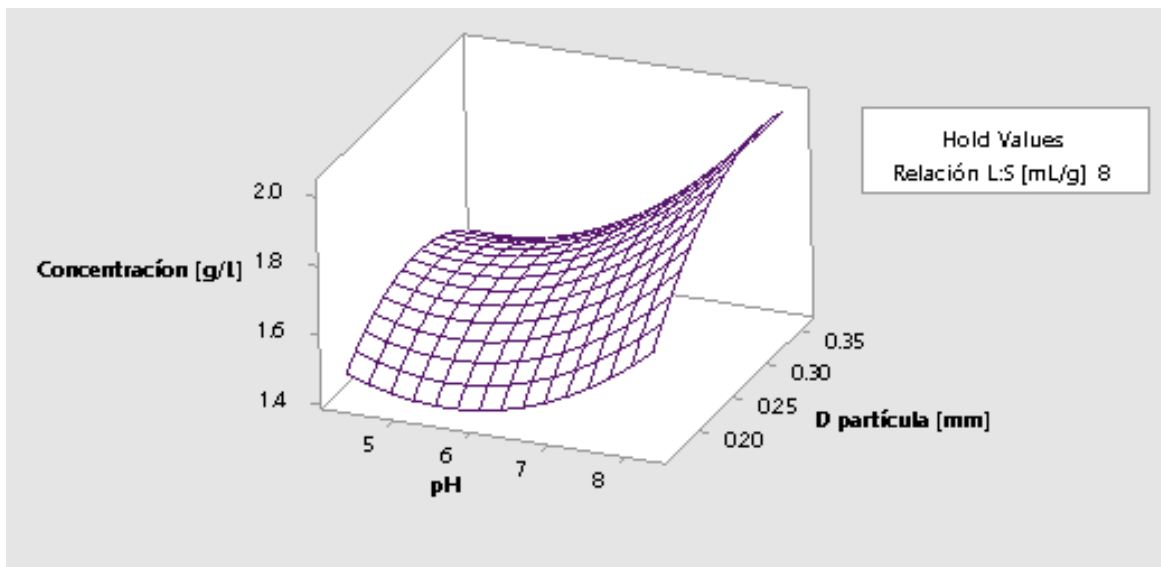
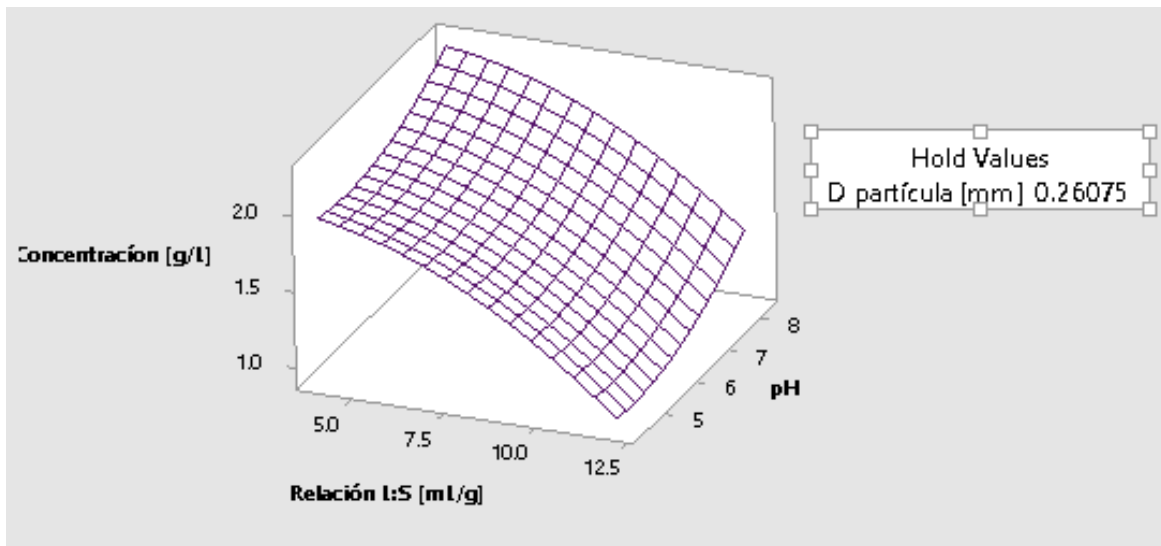


Figura D 4. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y  $D_{partícula}$  a pH Constante de 6.3 Sobre el %Rendimiento en la Guayaba, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C



*Figura D 5.* Superficie de Contorno del Efecto de las Variables pH y Dpartícula a Relación L:S Constante de 8 mL:g Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C



*Figura D 6.* Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y pH a Dpartícula Constante de 0.26 mm Sobre la Concentración de Azúcares Reductores en el Nim por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

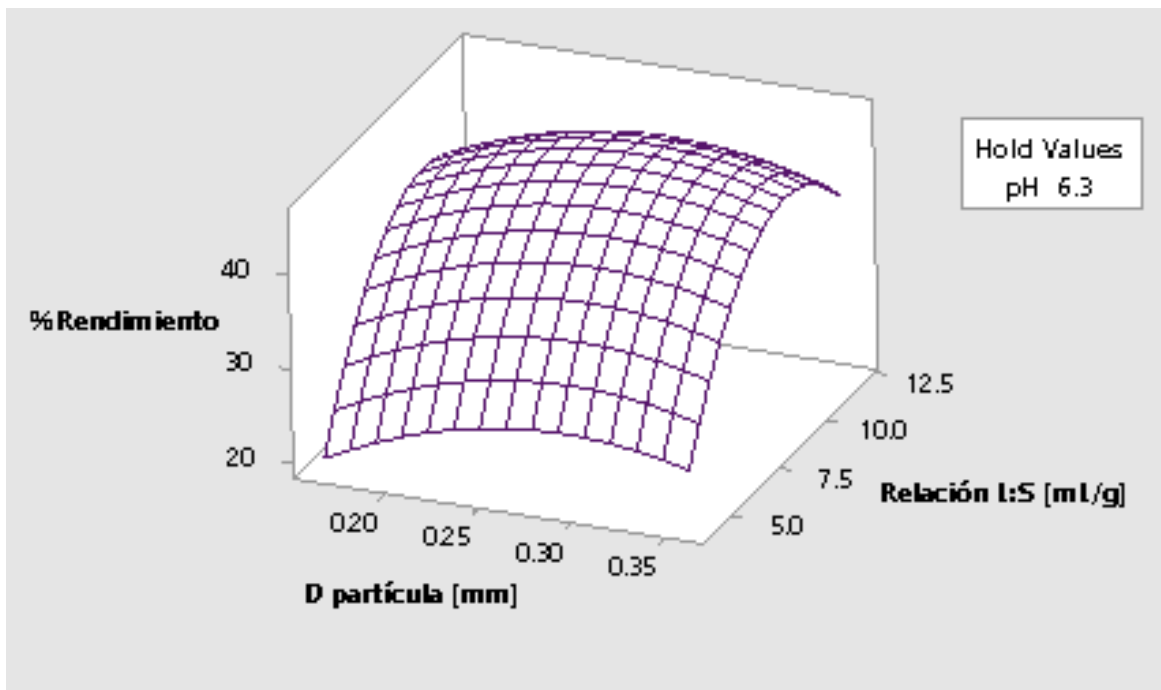


Figura D 7. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y  $D$ partícula a pH Constante de 6.3 Sobre el %Rendimiento en el Nim, por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

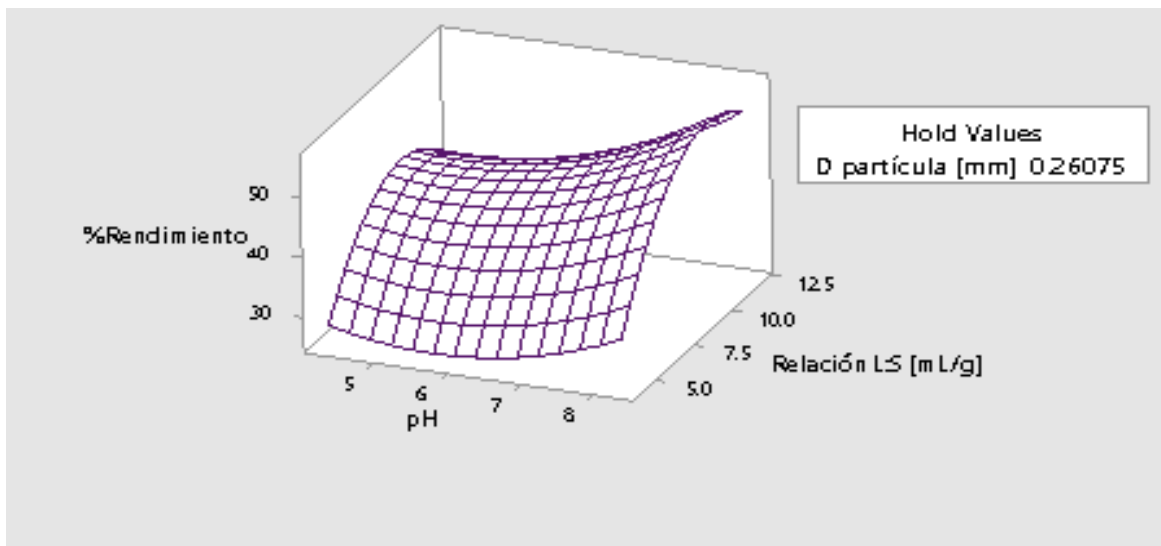


Figura D 8. Superficie de Contorno del Efecto de las Variables Relación L:S y pH a  $D$ partícula Constante de 0.26 mm Sobre el %Rendimiento en el Nim por Maceración durante 24 h, a una Temperatura de 25 °C

*Apéndice E. Resultados de las Pruebas de Imbibición*

Tabla E2.

*Cantidad de Solución Absorbida por cada Hoja*

<b>Neem</b>		<b>Guayaba</b>	
<b>Muestra [1 g]</b>	<b>Volumen absorbido [mL]</b>	<b>Muestra [1 g]</b>	<b>Volumen absorbido [mL]</b>
1	8	1	5
2	7	2	5
3	6	3	4
4	8	4	3
5	8	5	4
6	6	6	3
7	6	7	4
8	7	8	4
<b>Promedio</b>	7	<b>Promedio</b>	4
<b>Desv Std</b>	0,9258201	<b>Desv Std</b>	0,755928946

*Apéndice F. Resultados de la Evaluación del Método de Extracción*

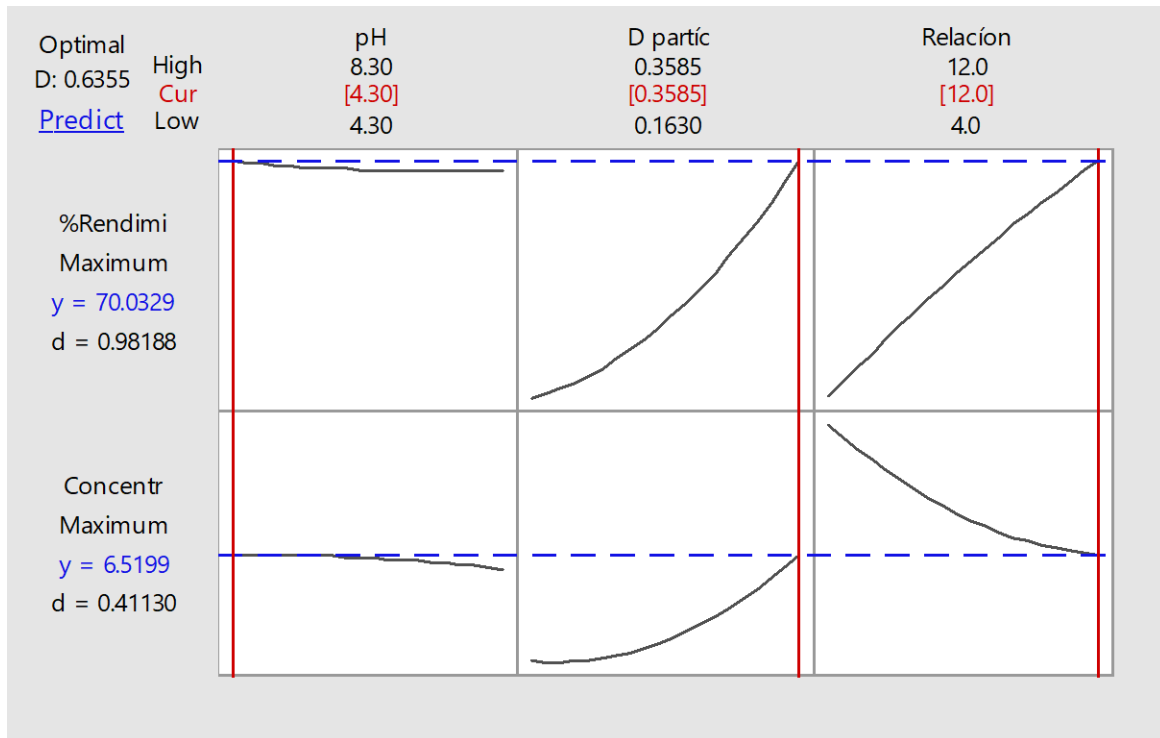
Tabla F3.

*Maceración vs Extracción Asistida por Microondas MAE a pH 6.3, Relación L:S 4 mL/g, Dp 0.358 mm, Tiempo de Extracción 24h y Temperatura 25°C*

<b>Concentración Az. Reductores (Guayaba) [g/L]</b>		<b>Concentración Az. Reductores (Nim) [g/L]</b>	
<b>Maceración</b>	<b>E. Asistida Microondas (MAE)</b>	<b>Maceración</b>	<b>E. Asistida Microondas (MAE)</b>
<b>5.873</b>	5,281	2.707	2.362
<b>6.129</b>	3,656	2.212	1.970
<b>8.386</b>	4,688	1.382	2.120
<b>8.376</b>	6,220	1.739	2.235
<b>7.171</b>	5,720	2.085	1.728
<b>8.407</b>	4,954	1.216	1.876
<b>7.191</b>	3,309	2.196	2.460
<b>8.928</b>	6,108	1.772	0.933
<b>7.252</b>	6,752	1.602	2.017
<b>5.178</b>	4,463	1.329	1.036
<b>4.933</b>	6,578	1.178	2.102
<b>5.965</b>	3,820	1.253	2.196
<b>5.352</b>	4,412	1.282	1.169
<b>4.331</b>	5,689	2.111	1.263
<b>3.799</b>	4,259	1.338	2.055
	<b>Promedio [g/L]</b>		
<b>6.485</b>	5.061	1.694	1.835
	<b>Desviación estándar [g/L]</b>		
<b>1.613</b>	1.089	0.4712	0.4962

*Apéndice G. Regresión de Superficie de Respuesta y Óptimos de los Parámetros de Extracción*

**Guayaba**



*Figura G 1. Parámetros Óptimos de la Extracción de Azúcares Reductores por Maceración de Guayaba; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C*

**Response Surface Regression: Concentración vs. pH; D partícula; L:S**

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	82.3714	9.1524	10.47	0.000
Linear	3	71.9704	23.9901	27.45	0.000
pH	1	1.3284	1.3284	1.52	0.232
D partícula	1	15.2430	15.2430	17.44	0.000
L:S	1	55.3991	55.3991	63.39	0.000
Square	3	9.1416	3.0472	3.49	0.035
pH*pH	1	0.0880	0.0880	0.10	0.754
D partícula*D partícula	1	5.6382	5.6382	6.45	0.019
L:S*L:S	1	3.7924	3.7924	4.34	0.050
2-Way Interaction	3	1.2594	0.4198	0.48	0.700

pH*D partícula	1	0.0625	0.0625	0.07	0.792
pH*L:S	1	0.2905	0.2905	0.33	0.571
D partícula*L:S	1	0.9064	0.9064	1.04	0.321
Error	20	17.4779	0.8739		
Lack-of-Fit	3	4.6950	1.5650	2.08	0.141
Pure Error	17	12.7829	0.7519		
Total	29	99.8494			

## Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.934824	82.50%	74.62%	61.86%

## Regression Equation in Uncoded Units

Concentración = 17.68 + 0.13 pH - 41.7 D partícula - 1.556 L:S - 0.0273 pH\*pH  
+ 91.4 D partícula\*D partícula + 0.0448 L:S\*L:S - 0.45 pH\*D partícula + 0.0238 pH\*L:S  
+ 0.861 D partícula\*L:S

**Response Surface Regression: % Rendimiento vs. pH; D partícula; L:S**

## Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	38.3572	4.2619	9.76	0.000
Linear	3	31.8614	10.6205	24.32	0.000
pH	1	0.5923	0.5923	1.36	0.258
D partícula	1	11.5101	11.5101	26.36	0.000
L:S	1	19.7590	19.7590	45.25	0.000
Square	3	2.6569	0.8856	2.03	0.142
pH*pH	1	0.0201	0.0201	0.05	0.832
D partícula*D partícula	1	2.3121	2.3121	5.30	0.032
L:S*L:S	1	0.2159	0.2159	0.49	0.490
2-Way Interaction	3	3.8389	1.2796	2.93	0.059
pH*D partícula	1	0.0400	0.0400	0.09	0.765
pH*L:S	1	0.3297	0.3297	0.76	0.395
D partícula*L:S	1	3.4692	3.4692	7.95	0.011
Error	20	8.7329	0.4366		
Lack-of-Fit	3	2.3633	0.7878	2.10	0.138
Pure Error	17	6.3696	0.3747		
Total	29	47.0901			

## Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.660792	81.45%	73.11%	61.58%

## Regression Equation in Uncoded Units

% Rendimiento = 8.45 - 0.369 pH - 33.1 D partícula - 0.150 L:S + 0.0130 pH\*pH  
+ 58.6 D partícula\*D partícula - 0.0107 L:S\*L:S - 0.36 pH\*D partícula + 0.0254 pH\*L:S  
+ 1.684 D partícula\*L:S

**Nim**

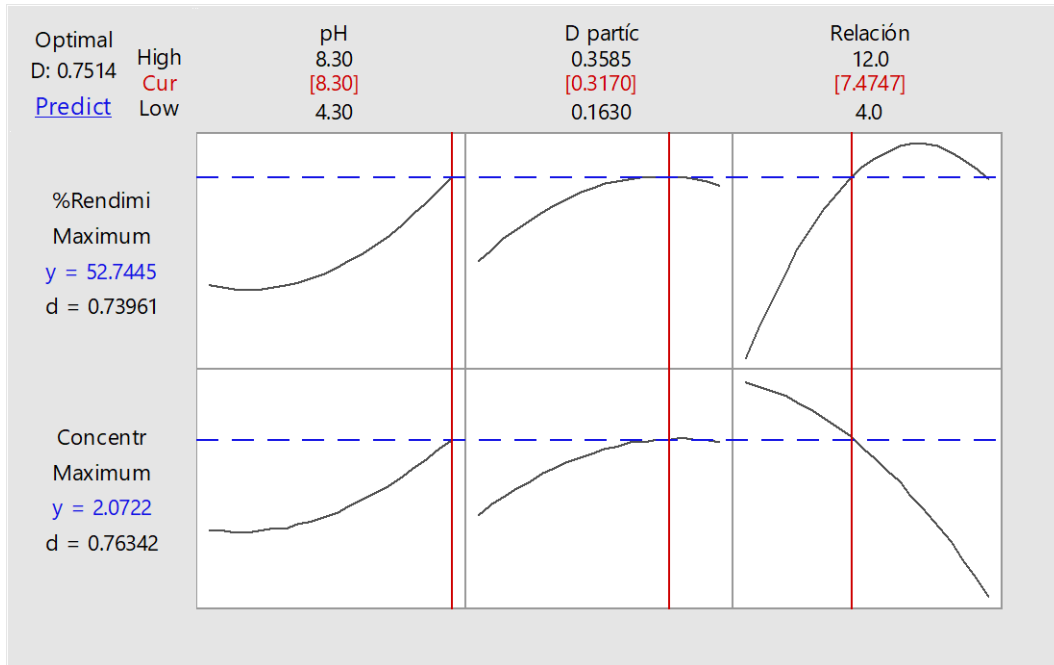


Figura G 2. Parámetros Optimos de la Extracción de Azúcares Reductores por Maceración de Nim; tiempo de extracción 24h y temperatura 25°C

**Response Surface Regression: Concentración vs. pH; D partícula; L:S**

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	4.82770	0.53641	10.18	0.000
Linear	3	4.25821	1.41940	26.94	0.000
pH	1	0.47339	0.47339	8.99	0.007
D partícula	1	0.11907	0.11907	2.26	0.148
L:S	1	3.66575	3.66575	69.58	0.000
Square	3	0.48861	0.16287	3.09	0.050
pH*pH	1	0.13783	0.13783	2.62	0.121
D partícula*D partícula	1	0.11534	0.11534	2.19	0.155
L:S*L:S	1	0.20999	0.20999	3.99	0.060
2-Way Interaction	3	0.08089	0.02696	0.51	0.679
pH*D partícula	1	0.04061	0.04061	0.77	0.390
pH*L:S	1	0.00579	0.00579	0.11	0.744
D partícula*L:S	1	0.03449	0.03449	0.65	0.428
Error	20	1.05373	0.05269		
Lack-of-Fit	3	0.05529	0.01843	0.31	0.815
Pure Error	17	0.99844	0.05873		
Total	29	5.88143			

## Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.229535	82.08%	74.02%	59.01%

## Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \text{Concentración} = & 2.05 - 0.466 \text{ pH} + 6.75 \text{ D partícula} + 0.072 \text{ L:S} + 0.0342 \text{ pH*pH} \\ - & 13.08 \text{ D partícula*D partícula} - 0.01054 \text{ L:S*L:S} + 0.364 \text{ pH*D partícula} \\ + & 0.0034 \text{ pH*L:S} - 0.168 \text{ D partícula*L:S} \end{aligned}$$
**Response Surface Regression: % Rendimiento vs. pH; D partícula; L:S**

## Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	2.20196	0.244662	8.84	0.000
Linear	3	1.10374	0.367913	13.29	0.000
pH	1	0.32711	0.327115	11.82	0.003
D partícula	1	0.04996	0.049963	1.80	0.194
L:S	1	0.72666	0.726663	26.25	0.000
Square	3	1.02793	0.342645	12.38	0.000
pH*pH	1	0.11412	0.114117	4.12	0.056
D partícula*D partícula	1	0.09766	0.097658	3.53	0.075
L:S*L:S	1	0.78658	0.786575	28.41	0.000
2-Way Interaction	3	0.07028	0.023427	0.85	0.485
pH*D partícula	1	0.02599	0.025991	0.94	0.344
pH*L:S	1	0.04173	0.041733	1.51	0.234
D partícula*L:S	1	0.00256	0.002558	0.09	0.764
Error	20	0.55366	0.027683		
Lack-of-Fit	3	0.12634	0.042114	1.68	0.210
Pure Error	17	0.42732	0.025137		
Total	29	2.75562			

## Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.166383	79.91%	70.87%	55.23%

## Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendimiento} = & 0.24 - 0.468 \text{ pH} + 5.38 \text{ D partícula} + 0.3347 \text{ L:S} + 0.0311 \text{ pH*pH} \\ - & 12.04 \text{ D partícula*D partícula} - 0.02040 \text{ L:S*L:S} + 0.292 \text{ pH*D partícula} \\ + & 0.00903 \text{ pH*L:S} - 0.046 \text{ D partícula*L:S} \end{aligned}$$

*Apéndice H. Resultados del Ajuste al Modelo de Peleg Modificado*

Tabla H1.

*Concentración de Azúcares Reductores en función del tiempo para el Nim*

<u>Tiempo [min]</u>	<u>Conc. Az. Reductores [g/L]</u>
5	0.128
5	0.169
10	0.128
10	0.214
15	0.128
15	0.292
20	0.199
20	0.403
30	0.213
30	0.421
40	0.251
40	0.471
50	0.270
50	0.528
60	0.672
60	0.779
80	0.331
80	1.086
100	0.478
100	1.241
120	0.909
120	1.179
140	0.999
140	1.452
160	1.062
160	1.490
180	1.869
180	1.854
240	1.749
240	1.833
360	1.828
360	1.865
480	1.865
480	1.886
600	1.906
600	1.969
720	1.933
720	2.053
1440	2.017
1440	2.116

Tabla H2.

*Concentración de Azúcares Reductores en Función del Tiempo para la Guayaba*

<u>T [min]</u>	<u>Conc. Az. Reductores [g/L]</u>
5	0.266
5	0.237
10	0.314
10	0.265
15	0.573
15	0.379
20	0.743
20	0.564
30	0.753
30	0.757
40	1.653
40	1.078
50	1.713
50	1.210
60	2.737
60	2.860
80	3.224
80	2.904
100	3.212
100	3.099
120	3.729
120	4.494
140	3.698
140	3.933
160	5.013
160	3.829
180	5.374
180	5.856
240	5.706
240	6.033
360	6.019
360	6.264
480	6.210
480	6.387
600	6.292
600	6.346
720	6.564
720	6.591
1440	8.240
1440	6.932

## Overview

---

Name	Peleg_modificado
Kind	Regression
Family	Custom
Equation	$y = x/(k_2+k_3*x)$
# of Indep. Vars	1
Weighting	Default
Standard Error	0.503045480654
Correlation Coeff. (r)	0.979180
Coeff. of Determination (r <sup>2</sup> )	0.958793902097
DOF	38
AICC	-54.912444

## Parameters

---

	Value	Std Err	Range (95% confidence)
k <sub>2</sub>	17.454996	1.238845	14.947085 to 19.962906
k <sub>3</sub>	0.119630	0.004326	0.110873 to 0.128388

*Figura H 1.* Parámetros Cinéticos Peleg Modificado para la Guayaba a pH 4.3, Dp 0.358 mm, y Relación L:S 12 mL:g.

## Overview

---

Name	Peleg_modificado
Kind	Regression
Family	Custom
Equation	$y = x/(k_2+k_3*x)$
# of Indep. Vars	1
Weighting	Default
Standard Error	0.227672292671
Correlation Coeff. (r)	0.951165
Coeff. of Determination (r <sup>2</sup> )	0.904714686554
DOF	38
AICC	-118.334308

## Parameters

---

	Value	Std Err	Range (95% confidence)
k <sub>2</sub>	59.160792	6.447119	46.109282 to 72.212301
k <sub>3</sub>	0.405905	0.022527	0.360301 to 0.451508

*Figura H 2.* Parámetros Cinéticos Peleg Modificado para el Nim a pH 8.3, Dp 0.317 mm, y Relación L:S 7.48 mL:g.