

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Extracción mejorada de metabolitos con potencial farmacológico en enfermedades de alto impacto social a partir de *Momordica charantia*.

INGE-2701

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Liseth Yuliana Ordóñez Buele

Anny Melina Valle Choez

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

El presente proyecto se lo dedico a mis queridos padres, Angel Ordóñez y Silvia Buele, cuyo amor, sacrificio y dedicación, han sido la base de mi formación.

De manera especial, a mi hijo Luis Molina, quien con su alegría y amor incondicional es mi mayor motivación. A mis hermanos Ing. Silvio Ordóñez e Ing. Brayan Ordóñez, por su ejemplo constante de dedicación y por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A mis tíos, Lic. Rosa Buele y Sixter Valarezo, mis padres de corazón, por su respaldo, amor y por estar siempre a mi lado. A mi abuelita Manuela Salazar, quien dejó una huella imborrable en mi vida con su amor y apoyo.

Finalmente, a mi pareja Dayvi Molina y amistades por estar presentes en esta etapa llena de aprendizajes. ¡Muchas gracias a todos!

Liseth Ordóñez Buele

Dedicatoria

A lo largo de este camino lleno de retos y aprendizajes, agradezco profundamente a quienes hicieron posible la culminación de esta etapa de mi vida.

A mi mamá, Betty Choez, por su amor incondicional, palabras de aliento y por ser mi mayor inspiración. A mi papá, Braulio Valle, por su ejemplo de esfuerzo y dedicación, enseñándome que los sueños se logran con trabajo constante. A mi hermano, Anthony Valle, por su apoyo y alegría en los momentos más difíciles.

No puedo olvidar a Bella, mi fiel perrita, cuya compañía llenó mis días de ternura y calma, recordándome que siempre hay espacio para el cariño y la felicidad.

En los días de incertidumbre y sacrificios, el amor y respaldo de mi familia me dieron la fuerza para continuar. Este logro es tan suyo como mío, y a ustedes dedico este esfuerzo con todo mi amor y gratitud.

Anny Valle Choez

Agradecimiento

Nuestros más sinceros agradecimientos a nuestro tutor de este trabajo, PhD. Joan Vera, por su paciencia, apoyo y enseñanzas. A la docente, MSc. Nadia Flores por sus retroalimentaciones, a nuestros profesores, quienes nos formaron académicamente para lograr esta meta. También expresamos nuestra gratitud al Laboratorio de Análisis Químico e Instrumental (LAQUINS) y Laboratorio de Operaciones Unitarias (LOPU) por facilitarnos el uso de sus instalaciones y equipos, indispensables para el desarrollo de este trabajo

Liseth Ordóñez Buele y Anny Valle Choez

Declaración Expresa

Nosotras Lisseth Yuliana Ordóñez Buele y Anny Melina Valle Choez acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

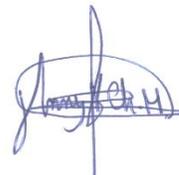
La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por nosotras durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique a los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 08 de octubre del 2024.



Lisseth Yuliana Ordóñez Buele



Anny Melina Valle Choez

Evaluadores

Nadia Flores Manrique, M.Sc.

Profesora de la Materia

Joan Vera Villalobos, Ph.D.

Profesor Tutor

Resumen

En Ecuador, la diabetes mellitus tipo 2 (DTM2) es un problema de salud pública que demanda el desarrollo de tratamientos alternativos eficientes. Este proyecto busca diseñar un método experimental para la extracción y caracterización de metabolitos bioactivos de *Momordica charantia* ecuatoriana, para la obtención de extractos con propiedades antihiper glucemiantes utilizando métodos convencionales y no convencionales. La investigación evalúa el efecto de las técnicas y solventes en la composición fitoquímica de los extractos. Se recolectaron frutos maduros de *Momordica charantia* (MC) de dos provincias de Ecuador que fueron sometidos a secado, molienda y tamizado. Las extracciones se realizaron por maceración y ultrasonido utilizando cloroformo-metanol 1:1 y etanol-agua 7:3. Los extractos fueron concentrados con un rotavaporador y sometidos a caracterización fitoquímica por reacciones, cromatografía en columna y cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Además, se modeló el proceso de extracción en Aspen Plus. Mediante el análisis de varianza (ANOVA), se concluye que la fracción obtenida con la fase móvil cloroformo-metanol (7:3) de maceración con etanol al 70%, presentó mayor cantidad de polifenoles totales, confirmando que la fruta posee un alto potencial como fuente de metabolitos con propiedades antidiabéticas, contribuyendo al desarrollo de tratamientos naturales accesibles en Ecuador.

Palabras Clave: Fitoquímica, extracción, metabolitos secundarios, diabetes tipo 2, *Momordica charantia*.

Abstract

*In Ecuador, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a public health issue that requires the development of efficient alternative treatments. This project aims to design an experimental method for the extraction and characterization of bioactive metabolites from Ecuadorian *Momordica charantia*, obtaining extracts with antihyperglycemic properties using conventional and non-conventional methods. The research evaluates the effect of techniques and solvents on the phytochemical composition of the extracts. Mature fruits of *Momordica charantia* (MC) were collected from two provinces in Ecuador and subjected to drying, grinding, and sieving. Extractions were performed using maceration and ultrasound with chloroform-methanol 1:1 and ethanol-water 7:3 as solvents. The extracts were concentrated using a rotary evaporator and subjected to phytochemical characterization by reactions, column chromatography, and total polyphenol quantification using the Folin-Ciocalteu method. Additionally, the extraction process was modeled using Aspen Plus. Through analysis of variance (ANOVA), it was concluded that the fraction obtained with the mobile phase chloroform-methanol (7:3) using maceration with 70% ethanol showed the highest number of total polyphenols. This confirms the fruit's high potential as a source of metabolites with antidiabetic properties, contributing to the development of accessible natural treatments in Ecuador.*

Keywords: *Phytochemistry, extraction, secondary metabolites, type 2 diabetes, *Momordica charantia*.*

Índice general

Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general	III
Abreviaturas	VIII
Simbología	X
Índice de Figuras	XI
Índice de Tablas	XII
Índice de Apéndice A	XIII
Capítulo 1	1
1.1. Introducción	2
1.2. Descripción del Problema	4
1.3. Justificación del Problema	5
1.4. Objetivos	7
<i>1.4.1. Objetivo general</i>	7
<i>1.4.2. Objetivos específicos</i>	7
1.5. Marco Teórico	8
<i>1.5.1. Diabetes mellitus tipo 2</i>	8
<i>1.5.2. Momordica charantia</i>	8

1.5.3.	<i>Taxonomía y morfología</i>	9
1.5.4.	<i>Metabolitos Bioactivos y su Actividad Hipoglucemiante</i>	10
1.5.5.	<i>Métodos de Extracción y Caracterización Fitoquímica</i>	10
1.5.6.	<i>Relevancia del Estudio en el Contexto Ecuatoriano</i>	11
Capítulo 2		12
2.1.	Metodología	13
2.1.1.	<i>Ubicación de la investigación</i>	13
2.1.2.	<i>Duración</i>	13
2.1.3.	<i>Diagrama del proceso</i>	13
2.2.	Materiales, equipos y reactivos	14
2.2.1.	<i>Materiales</i>	14
2.2.2.	<i>Equipos</i>	15
2.2.3.	<i>Reactivos</i>	15
2.3.	Tratamiento de materia prima	15
2.3.1.	<i>Recolección de la fruta de Momordica charantia</i>	15
2.3.2.	<i>Secado</i>	16
2.3.3.	<i>Molienda</i>	17
2.3.4.	<i>Tamiz</i>	17
2.4.	Extracción Convencional	18

2.4.1.	<i>Extracción por maceración</i>	18
2.5.	Extracción no convencional	18
2.5.1.	<i>Extracción por ultrasonido</i>	18
2.6.	Técnicas	19
2.6.1.	<i>Filtración al vacío</i>	19
2.6.2.	<i>Concentración</i>	19
2.7.	Caracterización fitoquímica cualitativa	20
2.7.1.	<i>Prueba para detección de alcaloides</i>	20
2.7.2.	<i>Prueba para detección de fenoles (Flavonoides, taninos)</i>	21
2.7.3.	<i>Prueba para detección de terpenoides</i>	21
2.7.4.	<i>Prueba para detección de saponinas</i>	21
2.7.5.	<i>Prueba para detección de esteroides</i>	21
2.7.6.	<i>Prueba para detección de glucósidos antraquinónicos</i>	22
2.7.7.	<i>Prueba para detección de glucósidos cardiotónicos</i>	22
2.8.	Cromatografía en columna	22
2.8.1.	<i>Técnica de slurry</i>	22
2.9.	Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	24
2.10.	Diseño experimental	26
2.10.1.	<i>Análisis estadístico</i>	28

2.10.2.	<i>Simulación del proceso</i>	28
2.10.3.	<i>Ingreso de compuestos</i>	30
2.10.4.	<i>Condiciones necesarias para los equipos de la simulación</i>	30
Capítulo 3	33
3.1.	Resultados y análisis	34
3.1.1.	<i>Tratamiento de materia prima</i>	34
3.1.2.	<i>Extracciones</i>	35
3.1.3.	<i>Caracterización fitoquímica cualitativa</i>	36
3.1.4.	<i>Cromatografía en columna</i>	37
3.1.5.	<i>Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu</i>	39
3.1.6.	<i>Análisis estadístico de ANOVA</i>	42
3.1.7.	<i>Modelado y simulación</i>	47
3.1.7.1.	<i>Secado</i>	47
3.1.7.2.	<i>Triturado</i>	47
3.1.7.3.	<i>Maceración</i>	47
3.1.7.4.	<i>Filtración</i>	48
3.1.7.5.	<i>Concentración del Extracto</i>	48
3.1.7.6.	<i>Separación de la Fracción Enriquecida</i>	48
3.1.8.	<i>Análisis económico</i>	50

Capítulo 4	51
4.1. Conclusiones y recomendaciones	52
<i>4.1.1. Conclusiones</i>	52
<i>4.1.2. Recomendaciones</i>	54
Referencias	55
Apéndice A	58

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de Varianza
CFT	Total Phenolic Content (Compuestos Fenólicos Totales)
C-M	Cloroformo - Metanol
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
df	Degrees of Freedom (Grados de Libertad)
E-A	Etanol - Agua
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
F	F – statistic (Estadístico F)
FID	Federación Internacional de Diabetes
GAE	Gallic Acid Equivalent, Equivalente de Ácido Gálico.
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
LAQUINS	Laboratorio de Análisis químicos
LOPU	Laboratorio de Operaciones Unitarias
LSCQ	Laboratorio de Síntesis y Caracterización Química
MC	<i>Momordica charantia</i>
Ms	Mean Square (Cuadrado medio)
MSP	Ministerio de Salud Pública

NMP	Número de Masa Polares
p-valor	Valor de probabilidad
RF	Retention Factor (Factor de Retención)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía en Capa fina)
R1, R2, R3	Réplicas 1, 2 y 3 (en experimentos)
SS	Sum of Squares (Suma de cuadrados)

Simbología

°C	Grados Celsius
FeCl ₃	Cloruro de Férrico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCL	Ácido Clorhídrico
mg GAE/g	Miligramos de Equivalente de Ácido Gálico por gramo
ml	Mililitros
μL	Microlitros
μg/ml	Microgramos por Mililitro
μm	Micrómetros
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₃	Amoniaco
Nm	Nanómetros
NTU	Número de Transferencia de Masa
RPM	Revoluciones por minuto
SiO ₂	Sílice
g	Gramos

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama del proceso experimental	14
Figura 2. Referencia al tamaño de la fruta de Momordica charantia con una moneda de \$0,25	16
Figura 3. Secado de la corteza y semilla de Momordica charantia	17
Figura 4. Equipo Evaporador rotatorio o rota-evaporador	20
Figura 5. Elaboración de columna cromatográfica	23
Figura 6. Flujograma del proceso.....	29
Figura 7. Curva de secado de la fruta	34
Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico	39
Figura 9. Distribución de CFT por fracción en Maceración Etanol-Agua	44
Figura 10. Simulación del proceso de extracción en Aspen Plus.....	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía y Morfología de la Momordica Charantia	9
Tabla 2. Fases móviles de cromatografía en columna	23
Tabla 3. Descripción del diseño experimental.....	26
Tabla 4. Tipos de variables del proceso experimental.....	27
Tabla 5. Datos de extractos obtenidos.....	36
Tabla 6. Resultados de cromatografía en columna.	38
Tabla 7. Resultados de cuantificación de polifenoles por cada fracción	41
Tabla 8. Mejor combinación Método-Solvente - Fracción	43
Tabla 9. Resultados de la ANOVA factorial.....	45
Tabla 10. Comparación múltiple de medias de Tukey HSD	46
Tabla 11. Conclusiones de la ANOVA	46
Tabla 12. Identificación de los equipos.....	49
Tabla 13. Identificación de las corrientes	49
Tabla 14. Precio estimado de los equipos para escalar el proceso de extracción	50

Índice de Apéndice A

Figura A1. Pulverizado de la corteza seca.....	58
Figura A2. Molienda de las semillas secas	58
Figura A3. Tamizado de la corteza seca	58
Figura A4. Primera maceración con cloroformo-metanol 1:1	59
Figura A5. Segunda maceración con etanol al 70%.....	59
Figura A6. Extracción por ultrasonido (Réplicas 1 y 2)	59
Figura A7. Filtración al vacío de la maceración (Réplicas 2 y 3)	60
Tabla A1. Datos de la curva de calibración del ácido gálico.....	60
Tabla A2. Referencia para los resultados de las pruebas de caracterización fitoquímica	61
Figura A8. Reacciones de caracterización fitoquímica - Maceración cloroformo-metanol 1:1 (Réplica 1)	62
Figura A9. Reacciones de caracterización fitoquímica - Maceración con etanol al 70% (Réplica 1).....	62
Figura A10. Reacciones de caracterización fitoquímica - Ultrasonido cloroformo-metanol 1:1 (Réplica 2)	63
Figura A11. Reacciones de caracterización fitoquímica - Ultrasonido con etanol al 70% (Réplica 2).....	63
Tabla A3. Resultados de las reacciones de caracterización fitoquímica por triplicado	64
Figura A12. Código del ANOVA del rendimiento de extracción usando Google Colab	65
Figura A13. Código del ANOVA del proceso de extracción usando Google Colab	66

Tabla A4. Representación de las fases móviles para el análisis de las gráficas obtenidas del ANOVA	75
Figura A14. CFT de la maceración con cloroformo-metanol 1:1	75
Figura A15. CFT de la maceración con etanol al 70%	76
Figura A16. CFT de ultrasonido con cloroformo-metanol 1:1	76
Figura A17. CFT de ultrasonido con etanol al 70%.....	77
Figura A18. Concentración promedio de polifenoles totales por réplica y método.....	77

Capítulo 1

1.1. Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad que afecta negativamente el modo en que el cuerpo usa la glucosa como fuente de energía provocando un aumento en las concentraciones de azúcar en la sangre si no se trata (OMS, 2023). La DTM2 es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, y Ecuador no está exento. Según el Ministerio de Salud Pública (MSP), la diabetes en el país ha aumentado en los últimos años, perjudicando principalmente a la población mayor de 20 años, convirtiéndose en una de las principales causas de mortalidad y discapacidad. A nivel mundial, la Federación Internacional de Diabetes (FID) estima que 537 millones de personas viven con diabetes, proyectando que esta cifra alcance los 643 millones para el 2030 y los 783 millones para el 2045. Este rápido crecimiento se caracteriza por factores como el sedentarismo, la mala alimentación y la aceleración del desarrollo poblacional (H. Sun et al., 2022).

En Ecuador, el impacto de la diabetes en zonas urbanas es grave, donde los estilos de vida poco saludables, la alimentación carente de valor nutricional y la falta de acceso a programas de prevención complican la situación. Un estudio desarrollado por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) en 2022 indicó que, en el país, aproximadamente el 5,3% de las muertes están relacionadas con complicaciones derivadas de la diabetes mellitus ocupando un tercer lugar, siendo el COVID-19 y las enfermedades isquémicas del corazón las que lideran la lista ubicándose como el primer y segundo lugar respectivamente (INEC, 2022).

Esta enfermedad no solo afecta la calidad de vida de los pacientes, sino que también representa un alto costo económico para el sistema de salud pública. Según un análisis del MSP, el gasto promedio anual para un paciente con DMT2 sin complicaciones es de \$826 dólares

anuales lo que para una expectativa de vida muy ajustada serían \$27.600 dólares, mientras que para un paciente que experimente las patologías crónicas de la diabetes tiene un costo de \$296 mil dólares para toda la vida (costo por esperanza de vida) y alrededor de \$22.520 dólares anuales (Acosta, 2017).

El desafío del control de la diabetes en Ecuador se debe a la limitación en el acceso a tratamientos farmacológicos eficaces y asequibles. La metformina, por su efectividad en la reducción de la glucosa en sangre, es uno de los fármacos más habituales para tratar la diabetes tipo 2, especialmente por su bajo costo. Sin embargo, es importante destacar que, según investigaciones previas, el consumo a largo plazo de metformina puede acarrear ciertos riesgos no deseados, entre ellos se encuentran la acidosis láctica y la deficiencia de vitamina B12 (De Jager et al., 2010). Por tales motivos, surge la necesidad de encontrar otras opciones terapéuticas confiables y perdurables, como las de origen natural, que permitirían disminuir los efectos colaterales de las terapias actuales y el problema en cuanto a la adhesión a los tratamientos tradicionales.

Entre estas alternativas, los compuestos naturales se han vuelto cruciales, especialmente aquellos con actividad antihiper glucemiante y antioxidante. Estudios anteriores en modelos animales, como ratones o ratas, han comprobado que los extractos de *Momordica charantia* pueden reducir los niveles de azúcar en la sangre al modular las vías metabólicas que tienen relación con la secreción de insulina y la captación de glucosa en los tejidos periféricos que son los tejidos que no incluyen al sistema nervioso central como los músculos, el tejido adiposo, el hígado, y otros tejidos involucrados en el metabolismo y el almacenamiento de energía (K. Sun et al., 2023).

1.2.Descripción del Problema

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica que afecta a millones de personas en todo el mundo, y Ecuador no es una excepción. La prevalencia de la diabetes en el país está en constante aumento, lo que la convierte en un importante problema de salud pública. La hiperglucemia, característica de la diabetes, puede desencadenar graves complicaciones de salud si no se controla adecuadamente, impactando negativamente la calidad de vida de los pacientes y generando una carga considerable para el sistema de salud, las personas con diabetes enfrentan dificultades para mantener niveles adecuados de glucemia, especialmente después de las comidas, debido al impacto de las costumbres locales.

La *Momordica charantia*, conocida como cundeamor en Ecuador, se presenta como una alternativa prometedora dado que contiene una variedad de compuestos bioactivos con propiedades hipoglucemiantes comprobadas en estudios científicos. Entre estos compuestos se encuentran péptidos, alcaloides, charantia, triterpenos y polifenoles, este estudio se centralizará en la cuantificación de polifenos (lavonoides y fenoles).

A pesar del potencial de la *Momordica charantia*, las investigaciones sobre su uso como tratamiento para la diabetes se han centrado principalmente en variedades que crecen fuera de Ecuador. Esto representa una oportunidad para investigar la variedad ecuatoriana de *Momordica charantia* y evaluar su potencial terapéutico específico, considerando que factores como las condiciones agroecológicas pueden influir en la composición fitoquímica de la planta y, por ende, en su actividad biológica.

En este contexto, este estudio se enfoca en el desarrollo de una metodología estandarizada para la extracción y caracterización de los metabolitos bioactivos de la *Momordica*

charantia ecuatoriana. El objetivo principal es obtener extractos enriquecidos con propiedades hipoglucemiantes que puedan constituir una alternativa terapéutica viable y accesible para el control de la diabetes en Ecuador.

La investigación se llevará a cabo considerando las restricciones existentes, como la disponibilidad limitada de la planta en Ecuador, ya que no se cultiva y solo se encuentra en forma silvestre. La sostenibilidad ambiental se abordará mediante la recolección responsable de la planta, asegurando que no se impacte negativamente el ecosistema local. Finalmente, se buscará que las técnicas de extracción sean económicamente viables para que los productos derivados sean accesibles para la población.

1.3. Justificación del Problema

El creciente número de casos de diabetes mellitus tipo 2 a nivel mundial representa un importante desafío de salud pública. Esta enfermedad crónica afecta a millones de personas y está asociada a complicaciones graves, como enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal y trastornos neurológicos en gran parte debido al inadecuado control de los niveles de glucosa en sangre. En las últimas décadas, los índices de diabetes han mostrado un preocupante aumento, posicionándose como una de las principales causas de mortalidad global (Arif et al., 2021), representando una carga económica considerable para los sistemas de salud por los costos asociados a su tratamiento y manejo. Esta tendencia subraya la urgencia de desarrollar tratamientos terapéuticos más seguros, eficaces y accesibles para mejorar el control glucémico y reducir las complicaciones derivadas de la diabetes.

A pesar de la disponibilidad de tratamientos farmacológicos como la metformina, existen desafíos importantes en el manejo de esta enfermedad. La metformina, aunque eficaz para controlar la glucemia, puede causar efectos secundarios gastrointestinales como diarrea, náuseas y dolor abdominal, lo que puede llevar a algunos pacientes a abandonar el tratamiento. Además, su uso prolongado puede provocar deficiencia de vitamina B12, lo que aumenta el riesgo de complicaciones neurológicas.

Dentro de las alternativas terapéuticas emergentes, *Momordica charantia* también conocida como Cundeamor es una planta ampliamente estudiada en regiones de Asia, ha demostrado un considerable potencial hipoglucemiante y farmacológico en el tratamiento de la diabetes. Estudios recientes han mostrado resultados prometedores en cuanto a su capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre (K. Sun et al., 2023). Sin embargo, la investigación sobre esta planta en Ecuador, específicamente en lo que respecta a su variedad local, es escasa. Esto representa una significativa brecha en el conocimiento científico y una oportunidad para explorar su potencial terapéutico en el contexto ecuatoriano, donde las condiciones agroecológicas podrían influir en la composición fitoquímica y, por ende, en su actividad biológica, adicionalmente, a pesar de ser una especie invasora se ha demostrado que posee un gran potencial en el escalamiento de su cultivo. Dado el impacto de las costumbres locales, muchas personas diagnosticadas o con predisposición a desarrollar síndromes metabólicos enfrentan dificultades para mantener niveles adecuados de glucemia después de las comidas. Por tanto, es crucial diseñar productos con actividad antioxidante y antihiperoglucemiante que complementen las estrategias clínicas y nutricionales existentes (April-Lalonde et al., 2023).

Este estudio se enmarca en los campos de la biomedicina y la farmacología, con un enfoque particular en la salud humana y el desarrollo de terapias alternativas basadas en productos naturales. El propósito principal es establecer un diseño experimental que permita replicar y modelar la extracción y caracterización de los metabolitos bioactivos de *Momordica charantia* de Ecuador, para obtener fracciones enriquecidas con compuestos potencialmente antidiabéticos. La caracterización fitoquímica detallada de estos metabolitos será esencial para identificar aquellos con actividad hipoglucemiante, tal como se ha sugerido en investigaciones previas sobre otras variedades (Fuquene, 2018). Se espera que los resultados de este estudio contribuyan al desarrollo de la industria farmacéutica nacional y a la mejora de la calidad de vida de los pacientes con diabetes en Ecuador.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar un diseño experimental reproducible y escalable de la extracción y caracterización de metabolitos bioactivos de la variedad ecuatoriana de *Momordica charantia*, para la obtención de extractos enriquecidos con posibles propiedades antihiperoglucemiantes en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en Ecuador mediante la aplicación de técnicas de extracción convencionales y no convencionales y el modelado en Aspen Plus.

1.4.2. Objetivos específicos

- Emplear técnicas de extracción convencionales y no convencionales para la obtención de extractos y fracciones enriquecidas en metabolitos secundarios de la fruta de la *Momordica charantia*.

- Evaluar la capacidad antioxidante y la fitoquímica de los extractos y fracciones obtenidos de *Momordica charantia* mediante técnicas de caracterización fitoquímica.
- Modelar el proceso de extracción de las fracciones ricas en los metabolitos de interés mediante el programa de simulación Aspen Plus.

1.5. Marco Teórico

1.5.1. *Diabetes mellitus tipo 2*

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica global que afecta a millones de personas, y su prevalencia está en constante aumento. Esta enfermedad se caracteriza por la incapacidad del cuerpo para regular adecuadamente los niveles de glucosa en sangre, lo que resulta en hiperglucemia (Espinosa et al., 2017). Si no se controla, la hiperglucemia puede conducir a complicaciones graves como enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal y trastornos neurológicos.

El tratamiento actual de la diabetes se basa en gran medida en fármacos sintéticos como la metformina, pero estos tratamientos pueden tener limitaciones, incluyendo efectos secundarios indeseables, pérdida de eficacia con el tiempo y costos elevados. La búsqueda de alternativas terapéuticas más seguras, eficaces y accesibles ha llevado a un creciente interés en los compuestos naturales derivados de plantas, especialmente aquellos con una larga historia de uso en la medicina tradicional (J Alfaro et al., 2000).

1.5.2. *Momordica charantia*

La *Momordica charantia*, también conocida como melón amargo o cundeamor, es una planta tropical perteneciente a la familia Cucurbitácea, conocida por su sabor amargo, se ha

utilizado tradicionalmente en varias culturas para tratar la diabetes, lo consumen crudo, frito o encurtido. Existen dos variedades: el melón amargo chino, con frutos verdes con sabor amargo que al madurar su cáscara se vuelve naranja y sabor dulce y el melón amargo hindú, de color verde oscuro y con sabor amargo fuerte que al madurar se endulza. (Thakur et al., 2015).

Diversos estudios científicos han corroborado su potencial hipoglucemiante, atribuyéndolo a la presencia de una amplia gama de metabolitos bioactivos en sus frutos, hojas y semillas. (Ospina & Serrano, 1995).

1.5.3. Taxonomía y morfología

Según (Barraza F, 2015), la taxonomía y morfología de *Momordica charantia* se describen en la Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía y Morfología de la Momordica charantia

Reino:	Plantae
Subreino:	Tranqueobionta (plantas vasculares)
División:	Magnoliophyta (plantas con flores)
Súper División:	Spermatophyta (plantas con semillas)
Clase:	Magnolipsida (dicotiledóneas)
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Vioales
Familia:	Cucurbitaceae
Género:	<i>Momordica</i>
Especie:	<i>Charantia L</i>
Nombre Científico:	<i>Momordica charantia</i>
Nombre Común:	Melón amargo, Cundeamor, entre otros.

Fuente: (Barraza F, 2015)

1.5.4. Metabolitos Bioactivos y su Actividad Hipoglucemiante

Momordica charantia posee una amplia gama de metabolitos bioactivos, incluyen alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas, polifenoles y esteroides, entre otros, que contribuyen a su efecto hipoglucemiante. Entre ellos, los alcaloides son compuestos con varias actividades biológicas, destacan por su capacidad para retardar la digestión de carbohidratos, lo que disminuye la velocidad a la que la glucosa ingresa al torrente sanguíneo. Los flavonoides, tienen una gran capacidad antioxidante, protegen las células del páncreas que producen insulina, favoreciendo su buen funcionamiento. Otros compuestos, como los terpenoides en especial la charantina, estimulan la liberación de insulina y aumenta la respuesta de los tejidos a esta hormona, facilitando el control de la glucosa. Las saponinas también son importantes en la reducción de la absorción de glucosa en el intestino y genera la secreción de insulina. De igual manera, los polifenoles, tienen propiedades antioxidantes, protegen las células y promueven la sensibilidad a la insulina. Finalmente, los esteroides, han demostrado tener una mayor aceptación del cuerpo a la insulina, facilitando así un control de los niveles de glucosa en los tejidos. (Andrade et al., 2012)

1.5.5. Métodos de Extracción y Caracterización Fitoquímica

Para aislar y caracterizar los metabolitos bioactivos de *Momordica charantia*, se emplean diversas técnicas de extracción, tanto convencionales como no convencionales. La maceración es un método convencional, requiere la extracción de los compuestos bioactivos utilizando solventes como metanol, cloroformo, etanol y agua. En cambio, las técnicas no convencionales, como la extracción por ultrasonido o microondas, son más eficientes y rápidos.

1.5.6. Relevancia del Estudio en el Contexto Ecuatoriano

Momordica charantia ecuatoriana, a pesar de ser utilizado tradicionalmente en varias culturas no ha sido estudiada a profundidad, esto genera una oportunidad para investigar científicamente su composición fitoquímica y su potencial terapéutico, tomando en cuenta que esta se ve afectada debido a las variaciones climáticas de su ecosistema.

En Ecuador, la MC es utilizada en ciertas regiones de manera artesanal en infusiones o como té, pero aún no se han realizado análisis exhaustivos de ella, generando así una oportunidad para desarrollar un análisis de la fitoquímica de la planta y su potencial antidiabético, considerando que esta puede haber sido alterada debido a las variaciones climáticas a comparación de la procedencia de la planta.

El desarrollo de una metodología estandarizada para la extracción y caracterización de los metabolitos bioactivos de *Momordica charantia* ecuatoriana es crucial para sentar las bases para futuros estudios clínicos. Estos estudios podrían determinar la eficacia y seguridad de la planta como tratamiento alternativo para la diabetes en la población ecuatoriana, contribuyendo a mejorar la salud y el bienestar de las personas que viven con esta enfermedad.

Este proyecto de investigación se alinea con los crecientes esfuerzos globales para explorar el potencial terapéutico de las plantas medicinales. Al centrarse en la *Momordica charantia* ecuatoriana, este estudio no solo contribuirá al conocimiento científico sobre esta planta, sino que también podría tener un impacto significativo en el desarrollo de un tratamiento natural, accesible y eficaz para la diabetes en Ecuador.

Capítulo 2

2.1. Metodología

2.1.1. Ubicación de la investigación

El estudio se realizó en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, altitud aproximada de 97 metros sobre el nivel del mar, temperatura promedio de 27°C y humedad relativa de 65-75 %.

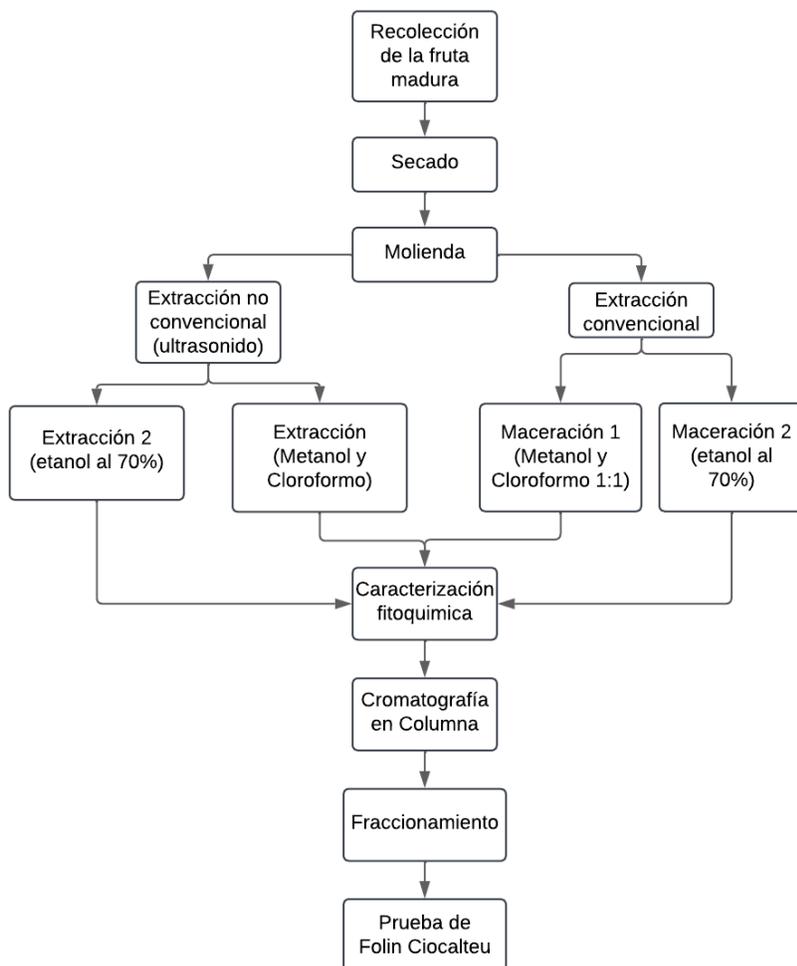
La cosecha del material vegetal de *Momordica charantia* provino principalmente de Santo Domingo y Guayas, estas son provincias costeras del Ecuador. Santo Domingo cuenta con un clima tropical, una temperatura promedio de 23.3°C y humedad relativa de 87.3%, mientras que Guayas presenta una temperatura promedio anual de 25°C y humedad relativa de 77,8%.

2.1.2. Duración

Este proyecto de investigación se desarrolló durante un período aproximado de cinco meses (septiembre-enero), contados desde su aprobación, durante el II PAO 2024. El muestreo de la primera fase comenzó el 18 de septiembre del 2024 y finalizó el 30 de septiembre, para la segunda fase el muestreo inició el 12 de noviembre y concluyó el 10 de diciembre del 2024.

2.1.3. Diagrama del proceso

La Figura 1 muestra los pasos involucrados en el proceso experimental, que va desde la etapa del tratamiento físico de la materia prima, continuando por el proceso químico que incluye el uso de solventes polares y no polares para las extracciones y, posteriormente, concluye con una caracterización fitoquímica como método cualitativo y finalizando con el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles.

Figura 1*Diagrama del proceso experimental*

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. Materiales

Filtro, agitadores de vidrio, espátulas, vidrio reloj, vasos de precipitación, recipientes de aluminio, frasco de vidrio, embudos Buchner, matraces Kitasato, embudos de decantación, tubos

de ensayo, pipetas volumétricas, peras, algodón, arena, columnas cromatográficas, balones de destilación, papel aluminio y matraces aforados.

2.2.2. Equipos

En el Laboratorio de Síntesis y Caracterización Química, se dispuso de una balanza analítica (Radwag), licuadora (Oster), molino manual (Corona), bomba de vacío (Gast), estufa (Barstead), Baño ultrasónico digital pro+ y un espectrofotómetro (Thermo scientific).

En el Laboratorio de Análisis Químico e Instrumental se utilizó un rotavaporador (Buchi) y un Vortex mixer (Fisher scientific).

2.2.3. Reactivos

Metanol, cloroformo, etanol al 70%, ácido clorhídrico al 1%, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético concentrado, ácido gálico, reactivo de Kellér-kilani, reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer, reactivo de Wagner, reactivo de Hager, reactivo de Folin-Ciocalteu, extracto de Ixora, hidróxido de sodio al 10 y 5%, amoníaco al 2%, tricloruro de hierro al 5%, silica gel, carbonato de sodio y agua.

2.3. Tratamiento de materia prima

2.3.1. Recolección de la fruta de *Momordica charantia*

Se cosechó manualmente 5 kg de la fruta madura de *Momordica charantia* y se la colocó sobre papel absorbente para evitar que los líquidos de la fruta se concentren, fermenten y terminen degradando la materia vegetal (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Figura 2

Referencia al tamaño de la fruta de *Momordica charantia* con una moneda de \$0,25



2.3.2. Secado

Al material vegetal recolectado en estado maduro se limpió retirando los tallos, hojas e impurezas. Luego, fue separada en corteza, semillas y puestas colocándolas en papel aluminio para llevarlas al secador de bandejas a una temperatura de 40 °C por 15 horas (Figura 3). Las semillas fueron secadas por segunda vez siguiendo las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Se registraron los pesos antes y después del secado para la determinación de la humedad usando la siguiente ecuación:

$$\%Humedad = \frac{Materia\ vegetal\ húmeda\ [g] - Materia\ vegetal\ seca[g]}{Materia\ vegetal\ húmeda\ [g]} \times 100 \quad (1)$$

$$\%Humedad\ total = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (2)$$

Siendo N el número de bandejas por cada parte de la materia vegetal.

La corteza seca se la almacenó en fundas etiquetadas y las semillas se las colocó en un recipiente de aluminio para la siguiente etapa.

Figura 3

Secado de la corteza y semilla de Momordica charantia



2.3.3. Molienda

El material vegetal seco fue pulverizado. La corteza fue procesada con una licuadora, logrando un polvo muy fino (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y para las semillas se utilizó un molino manual, obteniendo una consistencia pastosa (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Por consiguiente, se registró el peso de las partes ya molidas y pulverizadas usando una balanza analítica.

2.3.4. Tamiz

La corteza pulverizada fue colocada en tamices (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) con la finalidad de homogenizar el tamaño de las partículas. En caso de haber materia vegetal con un tamaño superior al deseado, este se trituró de nuevo en la licuadora y se volvió a tamizar.

2.4.Extracción Convencional

2.4.1. *Extracción por maceración*

Se realizó una maceración utilizando 523,06 gramos de material orgánico seco y 1 litro de una mezcla de metanol y cloroformo (1:1) hasta completar 3 extracciones (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Posteriormente, se cambió el solvente a etanol al 70% para una segunda maceración, utilizando el material orgánico seco sobrante hasta completar las 3 extracciones. (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

En ambos casos el procedimiento es el mismo, se dejó reposar la mezcla por 24 horas, seguido de filtración al vacío, recolectando cada extracto y repitiendo el proceso tres veces. Al finalizar, la materia orgánica filtrada de la primera maceración se secó en una estufa a 40 °C durante 6 horas para eliminar posibles restos de solventes y se realizó el cambio con el solvente correspondiente (etanol 70%) a la segunda maceración.

2.5.Extracción no convencional

2.5.1. *Extracción por ultrasonido*

Se realizaron extracciones por ultrasonido por triplicado, utilizando dos solventes diferentes en función de la polaridad. La primera extracción, se utilizaron 87.5 gramos de material orgánico seco y 175 ml de una mezcla de metanol y cloroformo (1:1), sometiendo la mezcla a un baño ultrasónico durante 30 minutos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Luego se filtró al vacío y la materia orgánica se secó en una estufa a 40°C durante 4 horas, repitiendo este procedimiento dos veces más, recolectando los extractos en cada etapa. La

segunda extracción se utilizó el material orgánico seco de la primera extracción con 175 ml de etanol al 70% como solvente, siguiendo el mismo procedimiento de la primera extracción.

2.6. Técnicas

2.6.1. Filtración al vacío

Se realizó filtración al vacío en cada etapa de cada maceración; para ello se utilizó un embudo Büchner, papel filtro, un matraz Kitasato y una bomba de vacío (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los extractos filtrados fueron medidos con una probeta y almacenados en refrigeración para su posterior evaporación, y los sólidos retenidos fueron pesados.

2.6.2. Concentración

Luego se tomó los extractos y se los colocó, uno a la vez, en un balón de fondo redondo de acuerdo con el volumen de cada extracto en el rota-evaporador a una temperatura en baño maría de 40°C, debido a que los flavonoides son compuestos fundamentales de los polifenoles totales y se empiezan a degradar a partir de esta temperatura. Se ajustó una revolución de 40-60 RPM, con control manual de la presión hasta extraer todo el solvente obteniendo un sólido (Figura 4).

Figura 4*Equipo Evaporador rotatorio o rota-evaporador***2.7. Caracterización fitoquímica cualitativa**

Para cada prueba se utilizaron 500 uL de extracto concentrado (1g/10mL) en un tubo de ensayo y se realizaron las siguientes pruebas:

2.7.1. Prueba para detección de alcaloides

- Reactivo de Dragendorff. Se agregó 1,5 ml de HCl al 1% y 3 gotas de reactivo de Dragendorff, la aparición de un precipitado de color rojo anaranjado indicó la presencia de alcaloides.
- Reactivo de Mayer. Se agregó 1,5 ml de etanol y 3 gotas del reactivo de Mayer, la aparición de un precipitado de color crema indica la presencia de alcaloides.
- Reactivo de Wagner. Se añadieron 2 gotas del reactivo de Wagner, la aparición de un precipitado marrón rojizo o coloración en la interfase indica un resultado positivo.
- Reactivo de Hager. Se añadieron 2 gotas del reactivo de Hager, el precipitado o coloración amarilla indica la presencia de alcaloides.

2.7.2. Prueba para detección de fenoles (Flavonoides, taninos)

- Prueba de NaOH-ácido. Se agregó 1,5 ml de etanol y luego 3 gotas de solución de NaOH al 10%. Una coloración amarilla o anaranjada indicó la presencia de flavonoides. Para confirmar se añadió 5 gotas de ácido clorhídrico diluido (HCl) al 1% a la mezcla, hasta que el pH volvió a ser neutro o ligeramente ácido pH (6-7). La desaparición del color confirmó la presencia de flavonoides.
- Test de FeCl₃. Se agregó 1 ml de FeCl₃ al 5%. Un color verde oscuro, negro o azul sugirió la presencia de compuestos fenólicos.
- Prueba de Ixora (flavonoides). Se añadió 2 gotas del extracto de Ixora al tubo de ensayo. El cambio de color a amarillo, anaranjado o rojo indicó un resultado positivo.

2.7.3. Prueba para detección de terpenoides

- Prueba de Salkowski: Se añadió 0,5ml de cloroformo a la muestra. Luego, se agregó cuidadosamente 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Una coloración marrón rojiza en la interfaz indicó la presencia de terpenoides.

2.7.4. Prueba para detección de saponinas

- Prueba de la espuma. Se añadió 1,5 ml de agua destilada, luego se lo agitó vigorosamente durante 3 minutos. La formación de espuma, que persiste al calentar en baño maría, indicó la presencia de saponinas.

2.7.5. Prueba para detección de esteroides

- Prueba de Liebermann-Burchard. Se añadió 0,5 ml de ácido acético a la muestra. Por consiguiente, se enfrió la solución con hielo y se agregó cuidadosamente 0,5ml de

H₂SO₄ concentrado. El desarrollo de color de violeta a azul o verde azulado indica la presencia de un anillo esteroideo, es decir, la porción aglicona de los glucósidos cardíacos.

2.7.6. Prueba para detección de glucósidos antraquinónicos

- Reacción con hidróxido de sodio y amoníaco: Se agregó 0,4ml de hidróxido de sodio al 5% y 0,4ml de amoníaco al 2%. La coloración rojiza indicó un resultado positivo y la coloración verde, un resultado negativo.

2.7.7. Prueba para detección de glucósidos cardiotónicos

- Reacción de Kellér-Kilani: Se añadió 0,5ml del reactivo Kellér-Kilani a cada extracto. La aparición de un anillo marrón o rojizo en la interfase indicó un resultado positivo.

2.8. Cromatografía en columna

2.8.1. Técnica de slurry

A cada extracto se realizó cromatografía en columna utilizando sílica (SiO₂) como fase estacionaria y mezclas de cloroformo, metanol y agua como eluyentes en diferentes proporciones (Tabla 2). Se utilizaron columnas cromatográficas de 1,0 cm de diámetro y longitud de 30cm (Figura 5). Primero se compactó una pequeña cantidad de algodón en el fondo de la columna, luego se preparó una suspensión de 4g de sílica con 10ml de cloroformo, se retiró el excedente del diluyente sin secar la sílica, seguido se colocó una capa de arena de 3 mm y 500 µl del extracto (100 mg/ml).

Se abrió la llave de paso hasta visualizar que el extracto alcanzó la interfase entre la arena y la sílica gel. Posteriormente iniciamos el proceso de separación con los solventes de menor polaridad; colocándolos cuidadosamente por la pared interna de la columna para no dañar la capa de arena. Se controló el flujo del solvente hasta que alcanzó la interfase entre la arena y la sílica gel, se procedió a colocar el próximo solvente y retirar el volumen del eluyente presente en la sílica gel. Por cada fase móvil se obtuvo una fracción recolectada en un tubo de ensayo y finalmente colocada en un balón para su concentración en el rotavapor, obteniendo un total de 8 fracciones por cada extracto, colocando el sólido en tubos Eppendorf. (M. Kamiński et al., 1982)

Figura 5

Elaboración de columna cromatográfica



Tabla 2

Fases móviles de cromatografía en columna

Fase móvil	Proporción
Cloroformo	100

Cloroformo: Metanol	70:30
Cloroformo: Metanol	50:50
Cloroformo: Metanol	30:70
Metanol: Agua	70:30
Metanol: Agua	50:50
Metanol: Agua	30:70
Agua	100

2.9. Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se realizó la curva de calibración, agregando a cada disolución de agua y ácido gálico 250 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, luego se agitó por 5 min y agregó 750 μ L de Na₂CO₃ al 20%, se agitó con el uso de un vortex, luego se dejó reposar las muestras en oscuridad y refrigeración. Por consiguiente, se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro a 760nm obteniendo la ecuación de la curva de calibración siguiendo la siguiente estructura:

$$y = bx + a \quad (3)$$

Donde:

a, b = se obtiene de la curva de calibración del ácido gálico

y = absorbancia

x = Concentración de fenoles (ug/ml) o Equivalente de ácido gálico

Para la cuantificación de polifenoles, se disolvieron las muestras colocadas en tubos Eppendorf hasta 1ml, de las cuales se tomaron alícuotas de 667 μ L de cada fracción y se colocaron en tubos de ensayo con 333 μ LL de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se dejó reposar por 5 minutos y luego se adicionó 1000 μ L de carbonato sódico (Na₂CO₃) al 20%, se agitó en un

vortex por 5 minutos a velocidad con un nivel de 8 y se dejó reposar por 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para finalmente leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 760nm. (García Martínez Eva et al., n.d.).

Además, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de polifenoles totales utilizando la ecuación (4):

$$CFT = \frac{GAE \times V \times FD}{W} \quad (4)$$

Donde:

CFT = Contenido fenólico total equivalente de ácido gálico (GAE/g)

GAE = Equivalente de ácido gálico (ug/ml)

V = volumen de la muestra (ml)

FD = Factor de dilución

W = Peso de la muestra (g)

La curva de calibración del ácido gálico se preparó mediante diluciones sucesivas de una solución estándar de 100 µg/ml, obteniendo concentraciones finales en el rango de 0 a 20 µg/ml. Para cada dilución, se utilizó un volumen específico de la solución estándar en el rango de 0 a 200µL. A cada mezcla se añadieron 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) y 500 µL de Na₂CO₃ al 20% y se completó un volumen total de 2 ml con agua destilada (García Martínez Eva et al., n.d.), asegurando la misma proporción de reactivos en todas las muestras.

2.10. Diseño experimental

El diseño experimental es un diseño factorial completamente aleatorizado, en el cual se evaluarán dos factores: el tipo de extracción y el tipo de solvente, ambos con dos niveles. Los niveles del factor de extracción son maceración y ultrasonido, mientras que para el factor de solvente se utilizarán cloroformo:metanol (1:1) y etanol:agua (7:3). La combinación de los niveles de ambos factores genera un total de 4 tratamientos experimentales, cada uno con 3 réplicas, lo que resulta en 12 experimentos en total (Tabla 3). Las muestras serán procesadas de manera aleatoria para minimizar sesgos y garantizar la validez de los resultados.

Tabla 3

Descripción del diseño experimental

Experimento	Factor A Método de extracción	Factor B Solvente	Réplica
1	Maceración	Cloroformo-metanol 1:1	1
2	Maceración	Cloroformo-metanol 1:1	2
3	Maceración	Cloroformo-metanol 1:1	3
4	Maceración	Etanol-agua 7:3	1
5	Maceración	Etanol-agua 7:3	2
6	Maceración	Etanol-agua 7:3	3
7	Ultrasonido	Cloroformo--metanol 1:1	1
8	Ultrasonido	Cloroformo-metanol 1:1	2
9	Ultrasonido	Cloroformo-metanol 1:1	3
10	Ultrasonido	Etanol-agua 7:3	1
11	Ultrasonido	Etanol-agua 7:3	2
12	Ultrasonido	Etanol-agua 7:3	3

Con este diseño experimental se buscó evaluar cómo la cantidad de polifenoles extraídos en mg de equivalente de ácido acético por gramo de muestra se ven influenciados por el tipo de solvente y el método de extracción. En la Tabla 4 se muestran las variables que forman parte de la fase experimental.

Tabla 4

Tipos de variables del proceso experimental

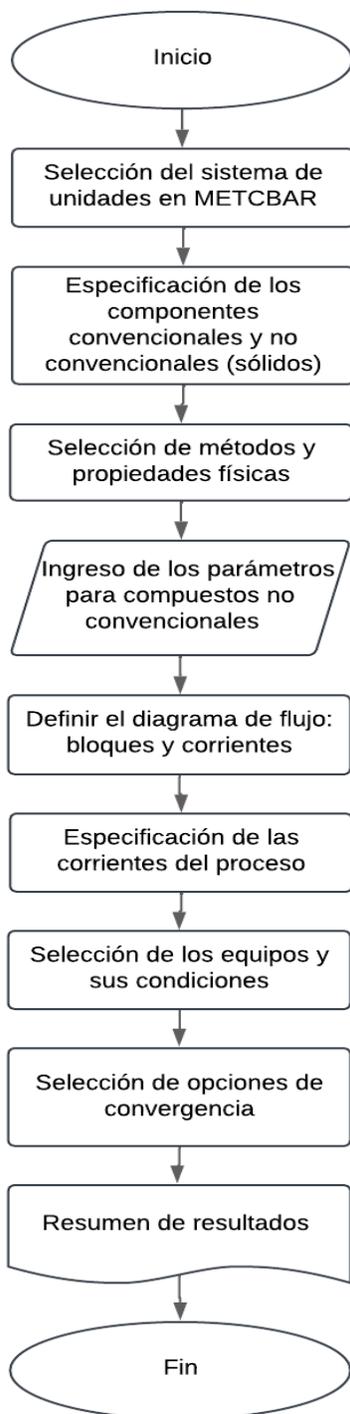
Tipo de variable	Variable	Características
Independiente	Tipo de extracción	Maceración y ultrasonido Polaridad alta (cloroformo)
	Tipo de solvente	Polaridad media (etanol) Polaridad baja (metanol- agua)
Dependiente	Contenido de polifenoles (mg GAE/g)	Determinado como equivalentes de ácido gálico (GAE)
	Presencia de metabolitos secundarios	Positivo o negativo
Controlada	Temperatura	Max. 40°C
	Relación muestra 1g: solvente 10ml	1:2

2.10.1. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de evaluar el efecto principal de los métodos y solventes utilizados en la extracción de polifenoles presentes en la fruta de *Momordica charantia*, así como su interacción, se analizó si su combinación influye significativamente en los resultados. Además, se generaron gráficos de interacción para visualizar cómo varía la concentración de polifenoles dependiendo del método y el solvente utilizado, considerando las tres réplicas.

2.10.2. Simulación del proceso

La simulación del proceso se realizó utilizando el software Aspen Plus, empleando un enfoque de modelaje continuo para representar las etapas de extracción de los metabolitos bioactivos de MC. El modelaje incluyó la identificación y simulación detallada de las etapas clave, como el secado, triturado, mezcla de solventes y materia prima, la evaporación y la separación de componentes, además del ajuste de las condiciones operativas (Figura 6). A los equipos se los identificó con la letra “B” y a las corrientes con la letra “S”. La configuración de unidades para el proceso fue METCBAR seleccionando como fases válidas vapor-líquido. El método termodinámico empleado fue el IDEAL para los componentes seleccionados que se mencionan en el siguiente apartado.

Figura 6*Flujograma del proceso*

2.10.3. Ingreso de compuestos

En la simulación se identificaron los componentes a ser usados en el proceso de simulación que son el cloroformo, metanol, etanol, agua, aire (para el proceso de secado) y el ácido gálico en representación a los polifenoles todos identificados como Convencionales, es decir que sus propiedades fisicoquímicas y sus interacciones con otros componentes son especificadas por el simulador y el método seleccionado. Además, se ingresó un componente No convencional denominado como SOLID en representación a la biomasa a ser tratada, para este elemento se ingresaron las propiedades que fueron HCOALGEN y DNSTYGEN teniendo como atributos de los componentes a GENANAL, PROXANAL, ULTANAL y SULFANAL; para completar los atributos se ingresaron valores de humedad, densidad, valor calorífico, tamaño de partícula.

2.10.4. Condiciones necesarias para los equipos de la simulación

- **Secador:** Se utilizó un secador continuo de tipo Shortcut, utilizando aire como medio gaseoso para extraer la humedad del material sólido. El equipo operó con dos corrientes de ingreso: una para el flujo del sólido húmedo y otra el flujo del aire caliente, con presión de 1 atm que permite su secado.

Para configurar su funcionamiento, se ingresaron parámetros experimentales como el porcentaje de humedad promedio de las cáscaras y semillas del 72% con un tiempo de residencia de los sólidos de 24h y la temperatura de secado de 40°C.
- **Molienda:** Se realizó siguiendo el método de selección de equipo escogiendo así el molino giratorio como el equipo más adecuado. La función seleccionada para este tipo de

molino fue US Bureau of Mines. Además, se configuró el tamaño máximo de partícula de salida de 2mm siendo este parámetro obtenido experimentalmente y presión de 1 atm.

- **Mezclador (Maceración):** Se utilizó un tanque con dos corrientes de entrada, una correspondiente a la materia prima (SOLID) y la otra a los solventes (etanol-agua 7:3), implementando condiciones meticulosamente controladas, ajustando parámetros experimentales como tiempo de residencia de 24h, temperatura de 30°C, presión de 1atm.
- **Filtro:** Se seleccionó un equipo de filtración rotatorio modelo “Solids separator”. Se ingresó valores obtenidos de la fase experimental de la fracción de líquido en el líquido saliente de 0,7 y la fracción de sólido para el sólido saliente que fue de 0,9 a una presión de 1 bar.
- **Evaporador:** Para la fase de evaporación al vacío se utilizó un separador flash a una temperatura de 40°C y una presión de 0,05bar para la evaporación de agua y etanol de los extractos.
- **Separador:** Se empleó un equipo de separación de fases con dos corrientes de entrada, el concentrado y otra del solvente de fase móvil (cloroformo-metanol 5:5). Se ingresó valores de fracción de separación para una de las corrientes de salida que fue de 0,4 para el cloroformo y 0,4 para el metanol indicando que solo una parte del extracto con polifenoles se separó con la fase móvil mencionada.

La simulación tiene como propósito evaluar como influyeron las condiciones del proceso en los resultados de la extracción, identificando parámetros importantes como la temperatura y el tipo de solvente en cada etapa del proceso. Con esto, se evaluó la viabilidad técnica y las interacciones entre las variables de diseño, destacando la importancia de los métodos de

extracción y los solventes utilizados. Además, la simulación integró la información experimental con predicciones, facilitando futuras adaptaciones del proceso.

Capítulo 3

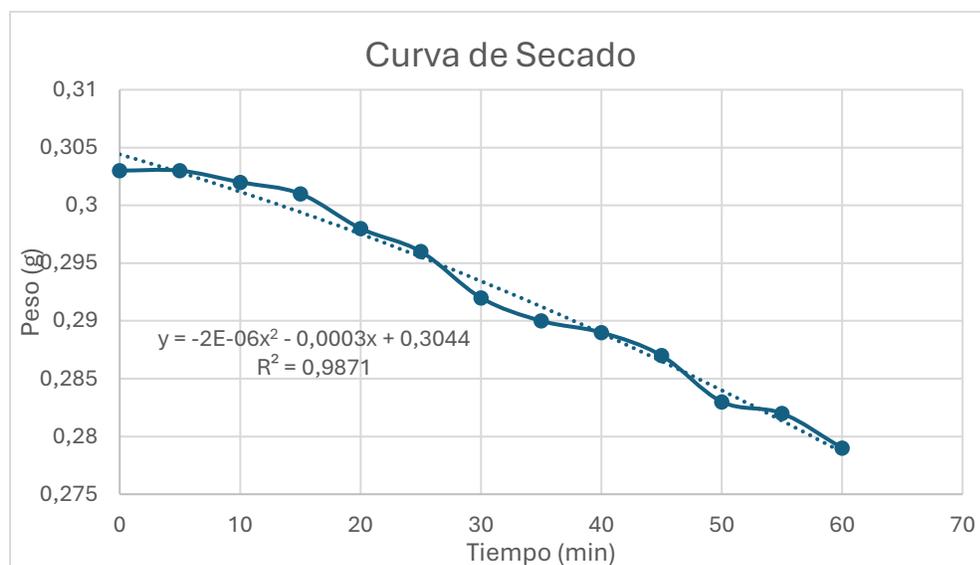
3.1. Resultados y análisis

3.1.1. Tratamiento de materia prima

Las cáscaras y semillas de MC se secaron a 40°C durante 15 y 30 horas, respectivamente, mostrando porcentajes de humedad del 89% en las cáscaras y 52% en las semillas, obteniendo la curva de secado presente en la Figura 7. Una vez secas, se obtuvo un tamaño de partícula entre 180µm y 2mm. Este rango de tamaños es adecuado para optimizar la transferencia de masa durante las extracciones, ya que permite una mejor interacción del disolvente con la biomasa. Al final del proceso, se mezclaron tanto las cáscaras como las semillas, obteniendo una sola biomasa para la extracción.

Figura 7

Curva de secado de la fruta



3.1.2. Extracciones

Se llevó a cabo dos tipos de extracciones: convencional por maceración y no convencional por ultrasonido utilizando cloroformo: metanol (1:1) y etanol al 70 %, cuyos extractos fueron concentrados a 40°C en un rotavapor y una revolución de 40-60 RPM, obteniendo así los datos recopilados en la Tabla 5. Los resultados indicaron que la maceración con cloroformo: metanol alcanzó un rendimiento promedio del 16.6%, siendo el más alto entre los tratamientos. La maceración con etanol al 70% presentó un rendimiento intermedio del 10,7% mientras que el ultrasonido, aunque más rápido, logró menores rendimientos, especialmente con cloroformo:metanol. Estas diferencias se atribuyen principalmente al tiempo de contacto entre el material y el solvente, destacando la maceración como la técnica más eficiente para extracciones prolongadas.

Los resultados indicaron que la maceración con cloroformo: metanol alcanzó un rendimiento promedio del 16,6 %, siendo el más alto entre los tratamientos. La maceración con etanol al 70 % presentó un rendimiento intermedio del 10,7 %, mientras que el ultrasonido, aunque más rápido, logró menores rendimientos, especialmente con cloroformo: metanol. Estas diferencias se atribuyen principalmente al tiempo de contacto entre el material y el solvente, destacando la maceración como la técnica más eficiente para extracciones prolongadas.

Tabla 5*Datos de extractos obtenidos*

Tipo de extracción	Solventes	# Réplica	Materia orgánica (g)	Solvente (ml)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Promedio
Convencional	Cloroformo -Metanol 1:1	1	500	1000	98,2064	19,6413	15,9470
		2	87,5	175	13,4685	15,3926	
		3	87,5	175	11,2063	12,8072	
	Etanol 70%	1	500	1000	53,3964	10,6793	10,4323
		2	87,5	175	8,9109	10,1839	
		3	87,5	175	9,1295	10,4337	
No convencional	Cloroformo -Metanol 1:1	1	87,5	175	2,4780	2,8320	2,5294
		2	87,5	175	1,9367	2,2134	
		3	87,5	175	2,2251	2,5430	
	Etanol 70%	1	87,5	175	7,2855	8,3263	9,4493
		2	87,5	175	8,5229	9,7405	
		3	87,5	175	8,2681	9,4493	

3.1.3. Caracterización fitoquímica cualitativa

La caracterización fitoquímica cualitativa de los extractos reveló la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, fenoles, terpenoides, saponinas, esteroides y glucósidos. Los resultados se evaluaron mediante pruebas estándar, las cuales se resumen en la Tabla 14, donde se representan los resultados positivos con un “+” y las negativas con un “-”. Se determinó de forma cualitativa que, los extractos obtenidos con etanol al 70 % por extracción convencional destacaron por su alta diversidad de metabolitos, mostrando resultados positivos en casi todas las pruebas realizadas, lo que indica su capacidad para extraer compuestos bioactivos de polaridad media. En contraste, los extractos obtenidos con cloroformo:metanol (1:1) presentaron una menor variedad de metabolitos secundarios, demostrando la influencia del solvente utilizado en la extracción.

Adicionalmente, las figuras **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ilustran los resultados, resaltando la importancia de seleccionar solventes adecuados para maximizar la diversidad de compuestos extraídos y mejorar el proceso de extracción en función de los objetivos de investigación. Este estudio demostró que los flavonoides son componentes fundamentales representando alrededor del 60% de los polifenoles totales, aportando de manera notable a las propiedades antioxidantes y antihiperoglucemiantes del extracto, lo que resalta su importancia como indicadores de la calidad bioactiva de los extractos (Alina Petre et al., 2023).

3.1.4. Cromatografía en columna

La investigación utilizó la cromatografía en columna como método para separar compuestos, implementando un gradiente de polaridad con múltiples fases móviles. Este procedimiento permitió diferenciar los metabolitos según su afinidad hacia la fase estacionaria, concentrando posteriormente las fracciones en un equipo rotavapor.

La Tabla 6 registró el peso de cada fracción evaporada, considerando tres réplicas para cada solvente y método de extracción. El análisis reveló que la extracción no convencional con etanol al 70%, particularmente en la fase móvil de agua, obtuvo los pesos más significativos, con un promedio de 0,0399g entre sus réplicas.

Este resultado se atribuye a la mayor afinidad de los metabolitos bioactivos de polaridad media-alta hacia fases móviles más polares. Las variaciones en los pesos de las fracciones pueden explicarse por factores como la precisión en la preparación de las fases móviles.

La aplicación de diversas proporciones de fases móviles posibilitó la separación de compuestos en función de su polaridad y la eficiencia superior detectada con el solvente etanol al 70%, en combinación con fases móviles más polares subraya su aptitud para lograr metabolitos secundarios bioactivos de interés.

Tabla 6

Resultados de cromatografía en columna

Método de extracción	Solventes	Fase móvil	R1 (g)	R2 (g)	R3 (g)	Promedio
Extracción Convencional (maceración)	C-M 1:1	Cloroformo	0,0532	0,0081	0,0097	0,0237
		C-M (7:3)	0,0274	0,0479	0,0264	0,0339
		C-M (5:5)	0,0094	0,0058	0,0110	0,0087
		C-M (3:7)	0,0144	0,0050	0,0020	0,0071
		M-A (7:3)	0,0058	0,0060	0,0182	0,0100
		M-A (5:5)	0,0024	0,0023	0,0218	0,0088
		M-A (3:7)	0,0071	0,0026	0,0018	0,0038
		Agua	0,0420	0,0069	0,0016	0,0168
	E-A 7:3	Cloroformo	0,0121	0,0006	0,0014	0,0047
		C-M (7:3)	0,0024	0,0010	0,0032	0,0022
		C-M (5:5)	0,0060	0,0032	0,0049	0,0047
		C-M (3:7)	0,0023	0,0016	0,0047	0,0029
		M-A (7:3)	0,0045	0,0039	0,0021	0,0035
		M-A (5:5)	0,0465	0,0022	0,0035	0,0174
		M-A (3:7)	0,0082	0,0078	0,0065	0,0075
Agua		0,0175	0,0392	0,0431	0,0333	
Extracción no convencional (ultrasonido)	C-M 1:1	Cloroformo	0,0188	0,0167	0,0457	0,0271
		C-M (7:3)	0,0046	0,0203	0,0523	0,0257
		C-M (5:5)	0,0088	0,0009	0,0077	0,0058
		C-M (3:7)	0,0018	0,0031	0,0028	0,0026
		M-A (7:3)	0,0040	0,0011	0,0162	0,0071
		M-A (5:5)	0,0037	0,0083	0,0023	0,0048
		M-A (3:7)	0,0071	0,0017	0,0016	0,0035
		Agua	0,0082	0,0074	0,0028	0,0061
	E-A	Cloroformo	0,0037	0,0061	0,0006	0,0035

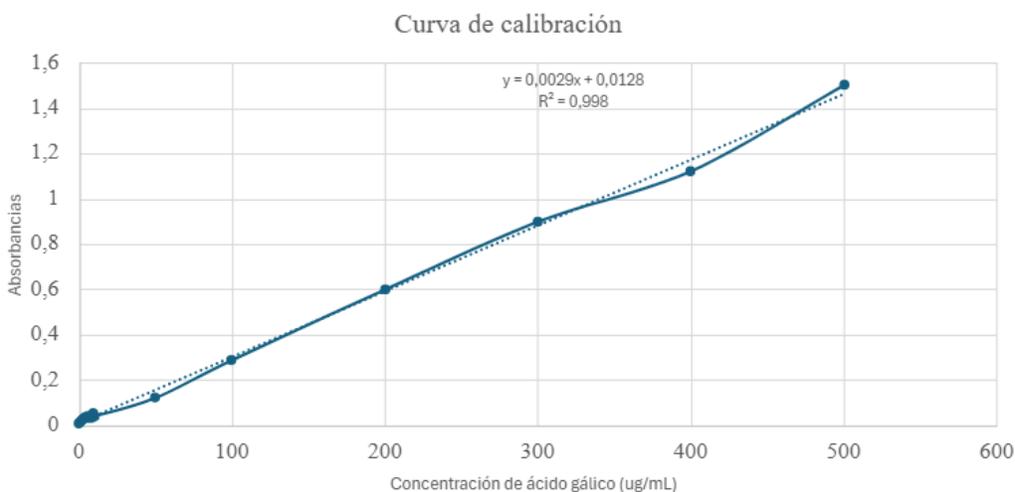
7:3	C-M (7:3)	0,0018	0,0080	0,0032	0,0043
	C-M (5:5)	0,0012	0,0001	0,0018	0,0010
	C-M (3:7)	0,0006	0,0005	0,0085	0,0032
	M-A (7:3)	0,0082	0,0039	0,0015	0,0045
	M-A (5:5)	0,0057	0,0003	0,0045	0,0035
	M-A (3:7)	0,0060	0,0064	0,0069	0,0064
	Agua	0,0377	0,0376	0,0443	0,0399

3.1.5. Cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para determinar la cantidad de polifenoles totales, se elaboró la curva de calibración del ácido gálico siguiendo la metodología descrita anteriormente. Las lecturas de absorbancia a 760nm que se ven reflejadas en la Tabla 7, generando así la Figura 8 de la cual se derivó la ecuación de la curva de calibración.

Figura 8

Curva de calibración de ácido gálico



Ecuación de la curva de calibración

$$y = 0,0029x + 0,0128 \quad (5)$$

Las muestras fueron preparadas siguiendo la metodología descrita por Folin-Ciocalteu. Se tomó una alícuota de cada fracción, la cual se le colocó el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se añadió carbonato sódico al 20% y tras un periodo de reposo en la oscuridad se leyó las absorbancias a 760nm utilizando un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia obtenidos se encuentran en la Tabla 7, junto con los valores de polifenoles totales para cada fracción.

Además, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de polifenoles totales utilizando la siguiente formula:

$$CFT = \frac{GAE \times V \times FD}{W} \quad (6)$$

Donde:

CFT = Contenido fenólico total equivalente de ácido gálico (GAE/g)

GAE = Equivalente de ácido gálico (ug/ml)

V = volumen de la muestra (ml)

FD = Factor de dilución

W = Peso de la muestra (g)

Posteriormente se realizaron las lecturas de absorbancia de cada fracción obtenida por gradiente de polaridad, a partir del extracto producido con diferentes solventes y método de extracción. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 7

Resultados de cuantificación de polifenoles por cada fracción

Método de extracción	Fase móvil	R1		R2		R3	
		Absorbancia	CFT (mg EAG/g)	Absorbancia	CFT (mg EAG/g)	Absorbancia	CFT (mg EAG/g)
Maceración C-M 1:01	Cloroformo	0,1300	4,5557	0,0985	5,4724	0,0630	2,6755
	C-M (7:3)	1,3200	61,6606	0,9540	40,6333	1,5400	59,8134
	C-M (5:5)	0,7910	85,5992	0,6080	79,5797	0,7695	71,1274
	C-M (3:7)	0,7700	109,7440	0,5430	137,0522	0,3640	136,1733
	M-A (7:3)	0,3160	27,0257	0,4880	40,9450	0,8540	23,8948
	M-A (5:5)	0,0790	14,2601	0,1190	23,8711	0,4930	11,3879
	M-A (3:7)	0,8400	90,3482	0,6520	127,0983	0,3690	102,3052
	Agua	0,3070	69,1347	0,8970	66,2487	0,3960	73,3733
Maceración E-A 7:03	Cloroformo	0,0244	5,7114	0,0290	13,9585	0,1690	14,1671
	C-M (7:3)	0,0273	112,0991	0,0661	110,2208	1,1300	180,4917
	C-M (5:5)	0,6340	154,3989	1,3000	350,2423	1,5100	236,9470
	C-M (3:7)	0,1430	84,1390	0,4160	160,3442	0,7430	80,3193
	M-A (7:3)	1,1500	130,6473	0,6740	117,8721	2,5000	194,8242
	M-A (5:5)	0,2710	48,5400	0,4950	113,3132	1,1900	173,8835
	M-A (3:7)	1,6600	103,8505	1,1700	90,6443	1,4000	110,3321
	Agua	1,7870	78,6198	1,8860	61,7610	1,6380	58,4826
Ultrasonido C-M 1:01	Cloroformo	0,1820	12,1491	0,4390	13,1939	1,0600	13,6369
	C-M (7:3)	0,1801	18,8024	0,1710	12,1465	0,1990	12,3413
	C-M (5:5)	0,7910	68,5766	0,0682	47,7348	1,0600	70,3097
	C-M (3:7)	0,3460	143,5489	0,4330	140,1524	0,4340	77,7690
	M-A (7:3)	0,8290	105,4904	0,3430	155,1889	1,3100	118,3465
	M-A (5:5)	0,3400	45,7181	0,5190	32,3082	0,2700	57,8122
	M-A (3:7)	0,6300	44,9411	0,1410	38,9866	0,2800	86,3361
	Agua	0,1300	27,5411	0,3700	24,9549	0,3340	59,3053
Ultrasonido E-A 7:03	Cloroformo	0,1080	19,9527	0,1910	22,6540	0,0863	23,7489
	C-M (7:3)	0,1400	73,0669	0,5420	52,6130	0,3440	80,2616
	C-M (5:5)	0,0950	106,2400	0,0300	88,9211	0,3310	91,3911
	C-M (3:7)	0,2560	188,5954	0,7210	183,0636	0,8620	67,5418
	M-A (7:3)	0,5000	114,4882	2,5000	273,5829	0,8150	276,4824
	M-A (5:5)	0,3700	32,3976	0,0520	50,6643	0,2440	26,5614

M-A (3:7)	1,1900	101,4320	0,1530	90,6013	1,7800	123,4611
Agua	1,3000	35,3029	0,7980	21,1424	1,7620	30,6199

El análisis de absorbancias y valores de polifenoles totales reveló que la extracción convencional por maceración utilizando etanol al 70% como solvente y cloroformo:metanol (5:5) como fase móvil resultó ser la combinación más beneficiosa. Esta metodología presentó los valores más altos de Contenido de Fenoles Totales (CFT) en dos de tres réplicas, mostrando una notable consistencia en los resultados.

Para las extracciones no convencionales por ultrasonido, los niveles de CFT fueron inferiores, lo que podría deberse a una reducida extracción inicial de compuestos fenólicos o a una selectividad inferior del ultrasonido para estos metabolitos secundarios específicos.

3.1.6. *Análisis estadístico de ANOVA*

El presente estudio analizó la concentración de polifenoles totales (CFT) mediante cuatro métodos de extracción diferentes. Las figuras **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** incluidas en el apéndice A, revelan variaciones significativas en la concentración de polifenoles. Los resultados destacaron la maceración etanol-agua como el método más eficiente, con un promedio de CFT de 116.075 mg GAE/g.

Por otro lado, los métodos de extracción basados en ultrasonido mostraron una menor eficiencia en la extracción de polifenoles, sugiriendo una selectividad hacia otros metabolitos. La

cromatografía reveló variaciones significativas en la concentración de polifenoles entre las fracciones, indicando una separación efectiva.

Adicionalmente, la combinación más destacada fue la de maceración con etanol-agua en la fracción F3 (C-M 5:5), alcanzando un valor promedio de CFT de 247.196 mg GAE/g. Estos resultados se representan en la

Figura 9 y se resumen en la Tabla 8, evidenciando la influencia del método de extracción en la obtención de compuestos fenólicos.

Adicionalmente, las variaciones observadas entre réplicas podrían suscitar interrogantes respecto a si estas se originan debido a las diferentes cantidades de materia orgánica inicial utilizadas (500 g vs 87.5 g). Sin embargo, el análisis estadístico ANOVA ($F = 3.4346$, $p = 0.0935$) demostró que no hay suficiente evidencia estadística para asegurar que esta variación en la cantidad inicial no es la causa de las diferencias observadas. Por lo tanto, las variaciones entre réplicas pueden atribuirse también a otros factores, como las diferencias en la afinidad de los compuestos fenólicos hacia las fases móviles, la eficacia del procedimiento de extracción, a las variaciones que iba presentando la concentración de los solventes de cada fase móvil debido a la evaporación de estos mientras se realizaba la cromatografía en columna y a la variedad inicial en el volumen de fase móvil usado para cada extracto.

Tabla 8

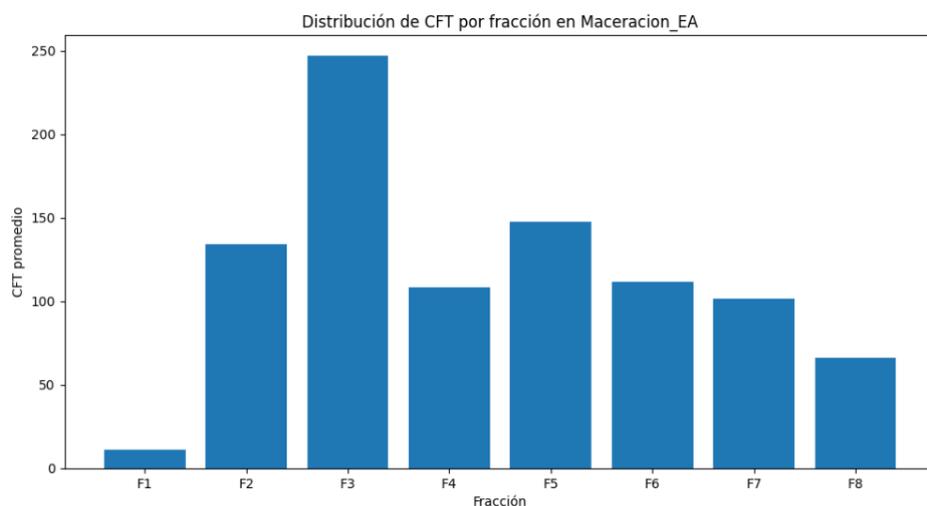
Mejor combinación Método-Solvente - Fracción

Método	Solvente	Fracción	Concentración promedio por método de CFT	CFT promedio por fracción
---------------	-----------------	-----------------	-----------------------------------------------------	--------------------------------------

Maceración	E-A	F3	116.075	247.196
------------	-----	----	---------	---------

Figura 9

Distribución de CFT por fracción en Maceración Etanol-Agua



El análisis ANOVA factorial reveló resultados significativos en la extracción de polifenoles de *Momordica charantia*. El método de extracción, con un valor F de 1.1897 y p-valor de 0.2782, por sí solo, no tiene un efecto significativo en la concentración de polifenoles totales extraídos, ya que el p-valor es mayor que el nivel de significancia de 0.05.

Esto se refuerza con la prueba de Tukey HSD confirmó diferencias significativas entre los solventes cloroformo-metanol (C-M) y etanol-agua (E-A), siendo este último el que obtiene los mejores resultados. En contraste, el tipo de solvente influyó significativamente, con un valor F de 11.8860 y p-valor de 0.0009, lo que indica que la elección del solvente es un factor determinante en el proceso de extracción.

La hipótesis nula fue rechazada, confirmando la significancia de la diferencia, con un p-valor ajustado de 0.0009, inferior al nivel de significancia de 0.05. Estos resultados reafirman que el solvente etanol-agua es el más eficiente para la extracción de polifenoles.

Por otro lado, la interacción entre el método y el solvente no resultó significativa ($F=0.8747$, $p=0.3521$), sugiriendo que ambos factores podrían actuar de manera independiente. El análisis entre grupos mostró diferencias significativas ($F=4.6501$, $p=0.0045$), evidenciando variaciones entre los grupos experimentales.

Los resultados detallados se resumen en la Tabla 9, destacando la importancia del solvente en la extracción efectiva de polifenoles.

Tabla 9

Resultados de la ANOVA factorial

Fuente de variación	SS	df	MS	F	p-valor
Método	4508.8700	1	4508.8683	1.1897	0.2782
Solvente	45046.2000	1	45046.2157	11.8860	0.0009
Método x solvente	3315.0600	1	3315.0559	0.8747	0.3521
Entre grupos	52870.1000	3	17623.3799	4.6501	0.0045
Error	348668.0000	92	3789.8647		
Total	401538.0000	95			

Debido a que el análisis ANOVA reveló que el solvente tiene un mayor efecto significativo, se realizaron comparaciones post hoc para el solvente mediante la prueba de

comparación múltiple de medias de Tukey (HSD, Honestly Significant Difference). Esta prueba reveló diferencias significativas en la extracción de polifenoles entre los solventes cloroformo-metanol (C-M) y etanol-agua (E-A). La comparación mostró una diferencia promedio de 43.3235 mg GAE/g, con un intervalo de confianza entre 18.3643 y 68.2827.

Los resultados detallados se presentan en las Tabla 10 y Tabla 11, destacando la maceración con etanol-agua en la fracción F3 como la combinación más efectiva. El análisis confirma que la selección del solvente es un factor crucial en la extracción de metabolitos bioactivos.

Tabla 10

Comparación múltiple de medias de Tukey HSD

Grupo 1	Grupo 2	Meandiff	p-adj	Lower	Upper	reject
C-M	E-A	43.3235	0.0009	18.3643	68.2827	True

Tabla 11

Conclusiones del ANOVA

Aspecto	Resultado
Efecto Global	Significativo
Mejor método	Maceración_EA
Mejor Fracción	F3
Valor F crítico ($\alpha=0.05$)	2.7036

3.1.7. Modelado y simulación

La simulación del proceso de extracción de polifenoles a partir de *Momordica charantia* permitió evaluar la viabilidad técnica y operacional de diferentes equipos que podrían ser utilizados en un escalamiento industrial. Basándonos en los valores experimentales obtenidos en las etapas iniciales, como las condiciones de secado, maceración y concentración, se realizó una modelación integral del flujo de trabajo desde la materia prima hasta la obtención del extracto enriquecido en polifenoles.

3.1.7.1. Secado

El análisis del secado mostró que un secador de bandejas de aire caliente sería adecuado para reducir el contenido de humedad del material vegetal, con temperaturas moderadas que aseguran la preservación de los polifenoles. La simulación indicó que un equipo de este tipo, operando a 40 °C, podría procesar eficientemente lotes de gran volumen en tiempos razonables, asegurando un contenido de humedad residual óptimo para el triturado y la maceración.

3.1.7.2. Triturado

Los resultados mostraron que un molino de cuchillas giratorio sería adecuado para este tipo de materia en comparación con alternativas como molinos de martillos, ya que permite obtener un tamaño de partícula uniforme y adecuado para la extracción. Esta homogeneidad maximiza la superficie de contacto entre el solvente y la matriz vegetal.

3.1.7.3. Maceración

La simulación destacó la importancia de un tanque de agitación para realizar la extracción sólido-líquido. Se encontró que una relación sólida/líquido de 1:1 y un solvente hidroalcohólico

(etanol-agua 7:3) optimizaban la extracción de polifenoles. La integración de este equipo permitiría manejar volúmenes significativos, manteniendo la homogeneidad y evitando la sedimentación del material vegetal durante el proceso. Este enfoque garantiza una extracción reproducible y consistente.

3.1.7.4. Filtración

Los resultados indicaron que un filtro prensa sería el equipo ideal para separar el extracto líquido del residuo sólido en un proceso escalado. Este equipo no solo asegura una alta eficiencia de separación, sino que también facilita la recuperación de solvente retenido en el sólido, lo que puede ser reciclado en etapas posteriores del proceso.

3.1.7.5. Concentración del Extracto

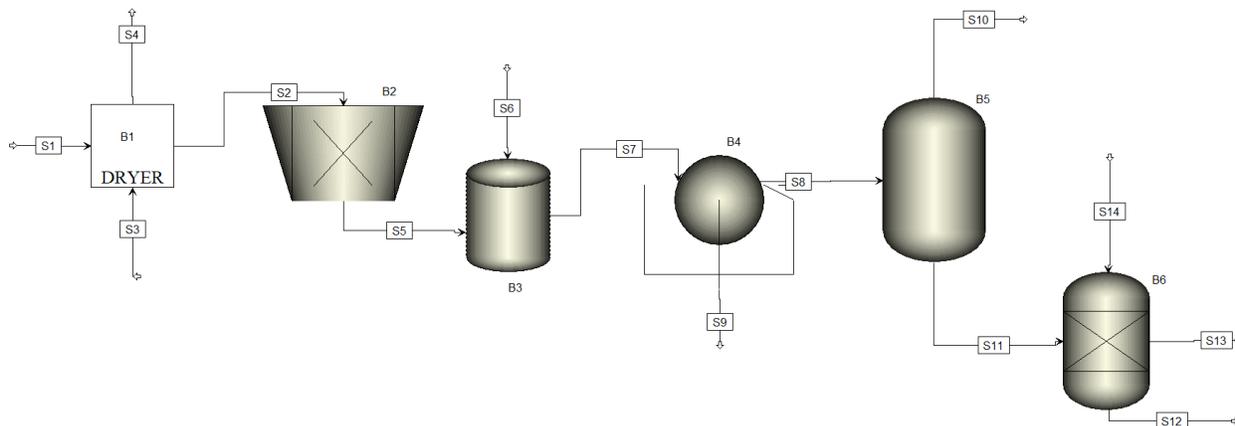
La simulación de esta etapa evidenció que un evaporador al vacío (columna de dos etapas) sería imprescindible para concentrar el extracto sin comprometer la integridad de los polifenoles. Operando a temperaturas inferiores a 40 °C y a presiones absolutas cercanas a 0.0787 bar, el evaporador logró reducir el volumen del extracto en un 96%, incrementando la concentración de polifenoles hasta niveles óptimos para su posterior purificación.

3.1.7.6. Separación de la Fracción Enriquecida

Esta etapa se la simuló con un equipo de separación de fases sólido-líquido para obtener una fracción altamente enriquecida en polifenoles. Aunque este método es más costoso, la simulación demostró que en un proceso de escalado podría sustituirse por técnicas de membranas para una purificación más económica, aunque con menor pureza final.

Figura 10

Simulación del proceso de extracción en Aspen Plus

**Tabla 12**

Identificación de los equipos

Identificación	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Equipos	Secador de 24 bandejas con flujo de aire caliente	Triturador de cuchilla giratorio	Tanque de agitación	Filtro giratorio	Evaporador al vacío	Separador por fracciones

Tabla 13

Identificación de las corrientes

Identificación	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Corrientes	Fruta húmeda	Fruta seca	Entrada Aire caliente	Salida Aire caliente	Fruta triturada Máx. 2mm	Solventes Etanol:agua 7:3	Mezcla solvente-sólidos
Identificación	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
Corrientes	Extracto líquido	Sólidos	Solvente evaporado	Extracto concentrado	Extracto con polifenoles	Sólidos no separados	Fase móvil

3.1.8. Análisis económico

Tabla 14

Precio estimado de los equipos para escalar el proceso de extracción

Equipo	Marca y modelo	Precio (USD)	Referencia
Secador de 24 bandejas con flujo de aire caliente	WKS-24 trays Dehydrator	\$ 3,000-3,500	(Foshan Ike Science & Technology, 2025)
Triturador de cuchilla giratorio	BEYOND	\$ 7,000-10,000	(Shanghai Beyond Machinery, 2025)
Tanque de agitación	EW-MIX101	\$800-1,000	(Wuxi Ewater Water Treatment, 2025)
Filtro giratorio	RBWL	\$1,500-2,500	(Shandong Better Environmental Protection Technology, 2025)
Evaporador al vacío	LENO LN T-16009	\$3,000-4,000	(Wenzhou Leno Machinery, 2025)
Separador de fracciones	PURUI	\$10,000-30,000	(Nantong Purui Technical Instrument, 2025)
Total		\$25,300-51,000	

Este análisis económico superficial proporciona una visión general de la inversión requerida para adquirir los equipos principales en el escalamiento del proceso de extracción de polifenoles con un valor mínimo estimado de \$25,300 y un máximo de \$51,000.

Capítulo 4

4.1. Conclusiones y recomendaciones

4.1.1. Conclusiones

El diseño experimental desarrollado demostró ser eficaz en la extracción de metabolitos bioactivos con propiedades antihiper glucemiantes. Los extractos obtenidos mediante maceración mostraron un mejor rendimiento, con valores entre 10-20% y un valor máximo de 19,6413% al emplear cloroformo-metanol como solvente, frente al método de ultrasonido cuyos valores de rendimiento fueron menores entre 2-10%. Adicionalmente, el proceso diseñado es adaptable a una mayor escala de producción, lo que facilita su aplicación en el desarrollo de productos funcionales como suplementos dietéticos, bebidas terapéuticas y formulaciones farmacéuticas, promoviendo su inclusión en estrategias de control de síndromes metabólicos en Ecuador.

La implementación de técnicas de extracción convencionales (maceración) y no convencionales (ultrasonido) permitió obtener extractos y fracciones enriquecidas en metabolitos secundarios bioactivos, en especial polifenoles, de la fruta de MC. Se observó que la extracción por maceración, utilizando cloroformo-metanol como solvente, mostró un rendimiento promedio de 15,9470% entre las tres réplicas realizadas, siendo la primera réplica la que obtuvo un valor superior de 19,6413%. En comparación con el ultrasonido utilizando los mismos solventes, mostró un rendimiento inferior. Estos resultados indican que, bajo las condiciones de extracción evaluadas, la maceración favorece la recuperación de metabolitos bioactivos.

Los análisis fitoquímicos de los extractos mostraron la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, glucósidos cardiogénicos y esteroides en los extractos obtenidos mediante maceración y ultrasonido con etanol-agua 7:3; mientras que los extractos obtenidos con

cloroformo: metanol (1:1) mediante ambos métodos se evidenció la presencia de alcaloides, fenoles, terpenoides, esteroides y glucósidos antracénicos. Los análisis cuantitativos de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu de las fracciones recopiladas por cromatografía en columna revelaron una alta concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales están directamente correlacionados con su capacidad antioxidante. Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna usando cloroformo-metanol (5:5) como fase móvil, a partir del extracto concentrado de maceración con E-A (7:3), tuvo un mayor contenido de polifenoles, alcanzando un valor de 350,2423 mgGAE/g muestra, superando los valores obtenidos por otros métodos y fases móviles.

El modelado del proceso de extracción en Aspen Plus permitió simular las condiciones experimentales de la obtención de fracciones enriquecidas en polifenoles. El análisis del modelo indicó que un tiempo de extracción de 24h y una temperatura de 30°C optimizan la recuperación de metabolitos bioactivos, con una eficiencia promedio del 10,1839%. Además, el modelo es escalable y adaptable a procesos industriales usando un factor de escala de 10, asegurando la reproducibilidad del del diseño experimental. Según el análisis económico, el costo estimado de inversión para los equipos requeridos (secador de bandejas con flujo de aire caliente, triturador de cuchilla giratorio, tanque de agitación, filtro, evaporador al vacío, adsorbedor) asciende a aproximadamente \$26,000-52,000 USD para un sistema con capacidad de procesamiento de 50 kg/día. Este análisis sugiere que el proceso es económicamente viable en aplicaciones a pequeña y mediana escala, con potencial para ser ampliado en función de la demanda.

4.1.2. Recomendaciones

Se sugiere realizar un análisis cualitativo de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna con gradiente de polaridad que presentaron una coloración específica, mediante espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear (RMN), para identificar la presencia de compuestos puros y los grupos de metabolitos a los que pertenecen, de manera que se debería asegurar que las fracciones obtenidas se encuentren libre de impurezas para los análisis.

Se recomienda evaluar condiciones experimentales alternativas a las realizadas en este proyecto, variando la relación y el tipo de solventes usados, enfocándose en optimizar el proceso de extracción. Otros factores importantes que se pueden considerar modificar para futuras pruebas son la temperatura de extracción, la cual podría ser mayor que 30°C, y el tiempo de extracción, con el fin de maximizar la recuperación de metabolitos bioactivos.

Se recomienda desarrollar investigaciones en modelos celulares y animales para confirmar la actividad biológica de los extractos y fracciones enriquecidas con polifenoles, así como evaluar toxicidad de los compuestos aislados, reforzando de esta manera su posible uso en el tratamiento de la diabetes, además, de su actividad antioxidante y antihiper glucemiante.

Se sugiere llevar a cabo estudios acerca de la estabilidad de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de almacenamiento, como temperatura, luz y humedad, para evaluar su integridad química y funcional a lo largo del tiempo. Con el fin de establecer su viabilidad a largo plazo como productos funcionales y garantizar su efectividad en aplicaciones a largo plazo.

Referencias

- Acosta, W. (2017). *Se estima que el costo de un paciente con diabetes con complicaciones asciende a 22 mil dólares anuales*. <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/-cu-nto-cuesta-la-atenci-n-de-los-pacientes-con-diabetes-tipo-2--91250>
- Alina Petre, MS, & RD. (2023, October 23). *¿Qué son los polifenoles? Tipos, beneficios y fuentes alimenticias*.
- Andrade, S., Duque, D., & Jaramillo, D. (2012). *Momordica Charantia como alternativa terapéutica en la medicina veterinaria*.
- April-Lalonde, G., Deaconu, A., Cole, D. C., & Batal, M. (2023). Traditional Food Consumption in Andean Ecuador and Associated Consumer Characteristics, Shopping and Eating Habits. *Ecology of Food and Nutrition*, 62(5–6), 308–333. <https://doi.org/10.1080/03670244.2023.2264197>
- Arif, R., Ahmad, S., Mustafa, G., Mahrosh, H. S., Ali, M., Tahir Ul Qamar, M., & Dar, H. R. (2021). Molecular Docking and Simulation Studies of Antidiabetic Agents Devised from Hypoglycemic Polypeptide-P of *Momordica charantia*. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5561129>
- Barraza F. (2015). *Physical characteristics and germination of bitter gourd (Momordica charantia) seeds*. *Revista Indian Journal of Research*. 3–5.
- De Jager, J., Kooy, A., Lehert, P., Wulffelé, M. G., Van der Kolk, J., Bets, D., Verburg, J., Donker, A. J. M., & Stehouwer, C. D. A. (2010). Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 340, 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.c2181>
- Espinosa, V., Cornejo, F., Granja, P., Calle, J., & Gordón, M. (2017). *Diabetes mellitus tipo 2*. www.msp.gob.ec
- Fuquene, G. P. B. (2018). *Contribución al estudio fitoquímico de partes aéreas de la especie Momordica Charantia (Cucurbitaceae) y evaluación*.
- García Martínez Eva, Fernández Segovia Isabel, & Fuentes López Ana. (n.d.). *Determinación de Polifenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu*. 6–8.
- INEC. (2022). *Estadísticas Vitales. Registro Estadístico de Defunciones de 2021*.
- J Alfaro, A Simal, & F Botella. (2000). Tratamiento de la diabetes mellitus. In *Inf Ter Sist Nac Salud* (Vol. 24). <http://www.msc.es/farmacia/infmedic>

- M. Kamiński, J. Klawiter, & S. Kowalsczyk. (1982). *Investigation of the relationship between packing methods and efficiency of preparative columns : II. Characteristics of the slurry method of packing chromatographic columns.* 243, 225–244.
- OMS. (2023). *Diabetes*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Ospina, F., & Serrano, R. (1995). *Plantas usadas como antidiabeticas en la medicina popular Colombiana.*
- Sun, H., Saedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2021.109119>
- Sun, K., Ding, M., Fu, C., Li, P., Li, T., Fang, L., Xu, J., & Zhao, Y. (2023). Effects of dietary wild bitter melon (*Momordica charantia* var. abbreviate Ser.) extract on glucose and lipid metabolism in HFD/STZ-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 306. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116154>
- Thakur, G., Bag, M., Sanodiya, B., Bhadauriya, P., Debnath, M., Prasad, G., & Bysen, P. (2015). *Momordica balsamina a medicinal and nutraceutical plant for health care management.* *Current Pharmaceutica Biotechnology*. 667–682.
- Foshan Ike Science & Technology. (2025). *Small fruit dehydrator machine IKE bay leaf fish drying machine price.* Alibaba.com. <https://airsource.en.alibaba.com/index.html?spm=a2700.details.0.0.6d4238eaeFHJ5q&from=detail&productId=60472408550>
- Shanghai Beyond Machinery. (2025). *Rotary Crusher Of Fruits Snd Vegetables/fruit Mill Crusher.* Wwww.alibaba.com. https://www.alibaba.com/product-detail/Rotary-hammer-crusher-of-fruits-snd_1700001061942.html?spm=a2700.galleryofferlist.wending_right.i8.6b3913a0FSqTVx
- Wuxi Ewater Water Treatment. (2025). *Industrial Electric Chemical Tank Agitator Mixer With Stainless Steel Tank For Liquid.* Wwww.alibaba.com. https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-Electric-Chemical-Tank-Agitator-Mixer_1600109689141.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.6a3013a0hKwNMV

Wenzhou Leno Machinery. (2025). *Small Vacuum Evaporating Alcohol Recovery Evaporation Concentrator*. Wwww.alibaba.com. https://www.alibaba.com/product-detail/Small-Vacuum-Evaporating-Alcohol-Recovery-Evaporation_1600664811873.html?spm=a2700.galleryofferlist.p_offer.d_title.1dd713a0zS8npJ&s=p

Nantong Purui Technical Instrument. (2025). *Glass Packed Column With High Quality For Chemical Production*. Wwww.alibaba.com. https://www.alibaba.com/product-detail/Glass-Packed-Column-with-High-Quality_60289386915.html?spm=a2700.7724857.0.0.4b7c54244t2WoG

Shandong Better Environmental Protection Technology. (2025). *Filtration Machine Rotating Drum Industrial*. Wwww.alibaba.com. https://www.alibaba.com/product-detail/50-500-Cbm-hr-Filtration-Machine_60182272019.html?spm=a2700.galleryofferlist.wending_right.i6.681313a0Kctak3

Apéndice A

Figura A1

Pulverizado de la corteza seca



Figura A2

Molienda de las semillas secas



Figura A3

Tamizado de la corteza seca

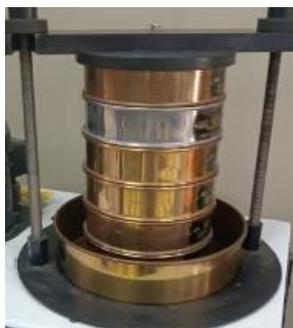


Figura A4

Primera maceración con cloroformo-metanol 1:1

**Figura A5**

Segunda maceración con etanol al 70%

**Figura A6**

Extracción por ultrasonido (Réplicas 1 y 2)



Figura A7*Filtración al vacío de la maceración (Réplicas 2 y 3)***Tabla A1***Datos de la curva de calibración del ácido gálico*

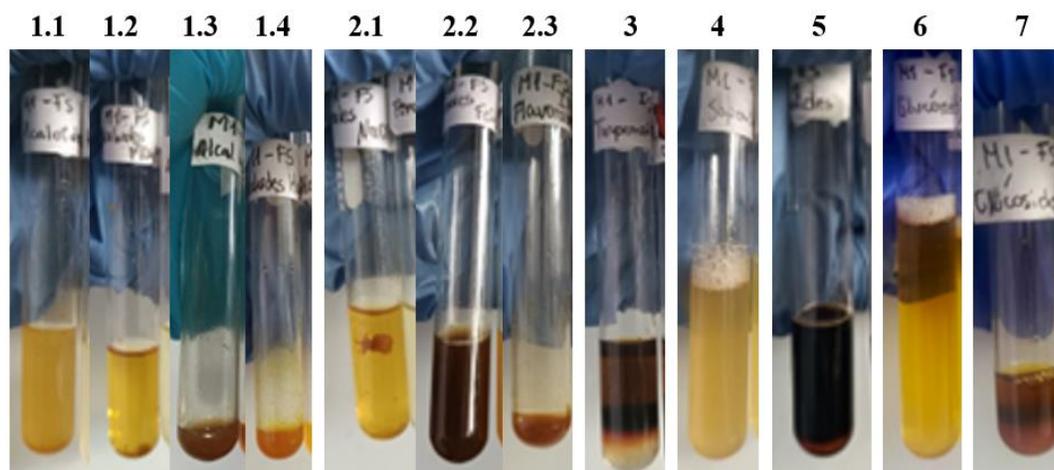
Concentración de ácido gálico (ug/ml)	Absorbancia
0	0,010
1	0,016
2	0,022
3	0,028
4	0,036
5	0,033
6	0,042
7	0,031
8	0,036
9	0,055
10	0,040
50	0,120
100	0,287
200	0,598
300	0,898
400	1,120
500	1,500

Tabla A2*Referencia para los resultados de las pruebas de caracterización fitoquímica*

Identificador	Pruebas de Caracterización fitoquímica
1	Alcaloides
1.1	Reactivo de Dragendorff
1.2	Reactivo de Mayer
1.3	Reactivo de Wagner
1.4	Reactivo de Hager
2	Flavonoides, Taninos
2.1	Prueba de NaOH-ácido
2.2	Test de FeCl ₃
2.3	Prueba de Ixora
3	Terpenoides
4	Saponinas (Prueba de espuma)
5	Esteroides (Prueba de Libermann-Burchard)
6	Glucósidos antracénicos (Reacción con hidróxido de sodio y amoniac)
7	Glucósidos cardiogénicos (Reacción de Kellér-kiliani)

Figura A8

Reacciones de caracterización fitoquímica - Maceración cloroformo-metanol 1:1 (Réplica 1)

**Figura A9**

Reacciones de caracterización fitoquímica - Maceración con etanol al 70% (Réplica 1)

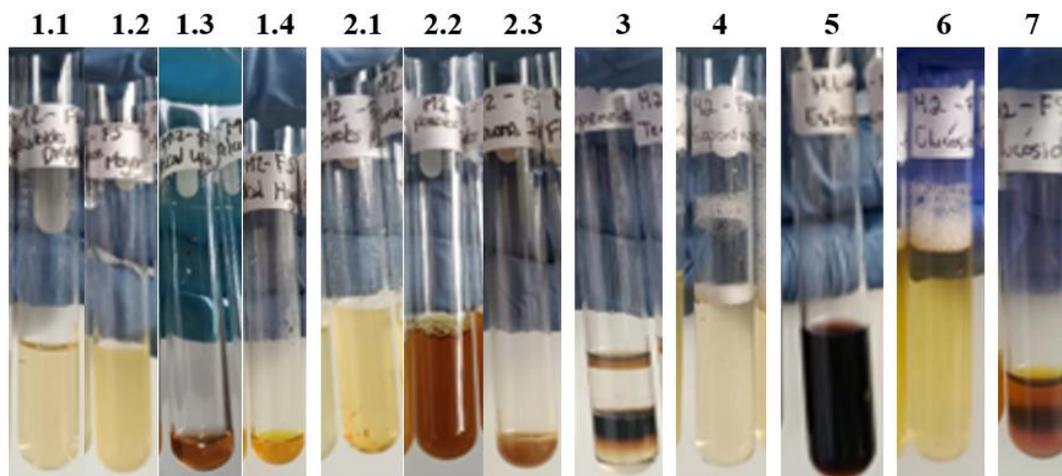
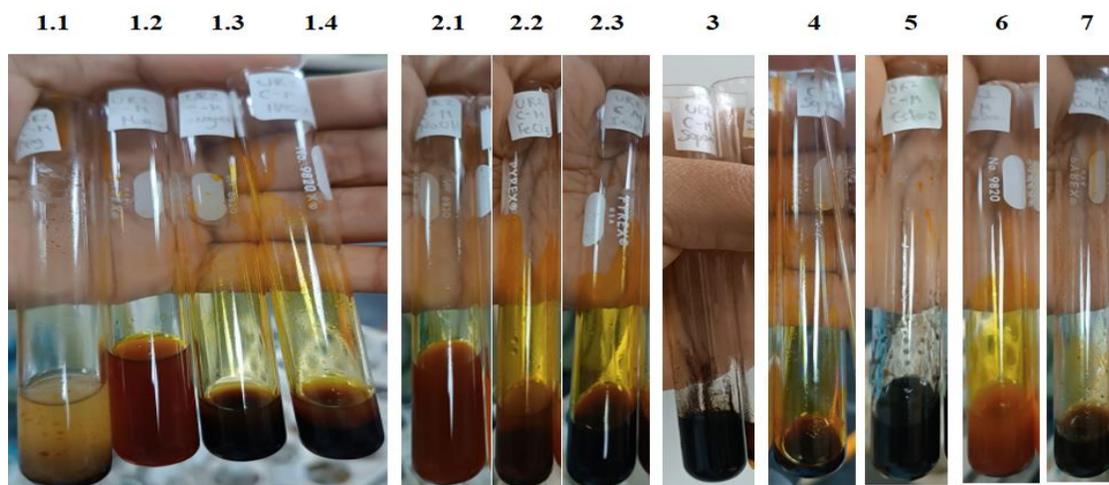


Figura A10

Reacciones de caracterización fitoquímica - Ultrasonido cloroformo-metanol 1:1 (Réplica 2)

**Figura A11**

Reacciones de caracterización fitoquímica - Ultrasonido con etanol al 70% (Réplica 2)

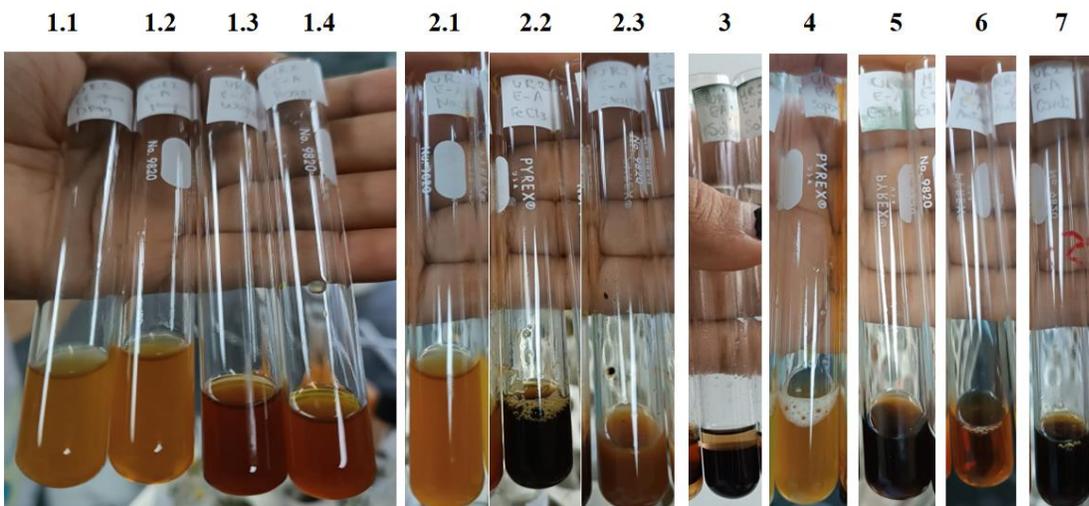


Tabla A3*Resultados de las reacciones de caracterización fitoquímica por triplicado*

Metabolitos secundarios	Pruebas	Extracción convencional Maceración						Extracción no convencional Ultrasonido					
		Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
		C-M 1:1	E-A 7:3	C-M 1:1	E-A 7:3	C-M 1:1	E-A 7:3	C-M 1:1	E-A 7:3	C-M 1:1	E-A 7:3	C-M 1:1	E-A 7:3
Alcaloides	Prueba de Dragendorff	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Prueba de Mayer	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Prueba de Wagner	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Prueba de Hager	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Fenoles (Flavonoides, taninos)	Prueba de NaOH	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Prueba de FeCl ₃	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Extracto de Ixora (flavonoides)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Terpenoides	Prueba de Salkowski	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Saponinas	Prueba de espuma	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Esteroides	Prueba de Liebermann-Burchard	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucósidos antracénicos	Reacción con NaOH y NH ₃	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Glucósidos cardiogénicos	Reacción de Keller-Kilani	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

*(-) Resultado negativo, (+) Resultado positivo.

Figura A12

Código del ANOVA del rendimiento de extracción usando Google Colab

```

import pandas as pd
import numpy as np
from scipy import stats
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

# Crear el DataFrame con los datos
data = {
    'Tipo_extraccion': ['Convencional', 'Convencional', 'Convencional',
                       'Convencional', 'Convencional', 'Convencional',
                       'No convencional', 'No convencional', 'No convencional',
                       'No convencional', 'No convencional', 'No convencional'],
    'Solvente': ['Cloroformo-Metanol 1:1', 'Cloroformo-Metanol 1:1', 'Cloroformo-Metanol 1:1',
                 'Etanol 70%', 'Etanol 70%', 'Etanol 70%',
                 'Cloroformo-Metanol 1:1', 'Cloroformo-Metanol 1:1', 'Cloroformo-Metanol 1:1',
                 'Etanol 70%', 'Etanol 70%', 'Etanol 70%'],
    'Materia_organica': [500, 87.5, 87.5, 500, 87.5, 87.5, 87.5, 87.5, 87.5, 87.5, 87.5, 87.5],
    'Rendimiento': [19.6413, 15.3926, 12.8072, 10.6793, 10.1839, 10.4337,
                    2.8320, 2.2134, 2.5430, 8.3263, 9.7405, 9.4493]
}
df = pd.DataFrame(data)

# 1. ANOVA de un factor para comparar rendimientos entre grupos de materia orgánica
grupos_materia = [grupo for _, grupo in df.groupby('Materia_organica')['Rendimiento']]
f_stat, p_value = stats.f_oneway(*grupos_materia)

print("=== ANOVA: Efecto de la cantidad de materia orgánica ===")
print(f"Estadístico F: {f_stat:.4f}")
print(f"Valor p: {p_value:.4f}")

```

=== ANOVA: Efecto de la cantidad de materia orgánica ===
 Estadístico F: 3.4346
 Valor p: 0.0935

Figura A13

Código del ANOVA del proceso de extracción usando Google Colab

```
[7] import pandas as pd
import numpy as np
import seaborn as sns
import matplotlib.pyplot as plt
from statsmodels.stats.anova import AnovaRM
from statsmodels.stats.multicomp import pairwise_tukeyhsd
import scipy.stats as stats
from tabulate import tabulate
from scipy import stats

# Datos organizados por método y réplica
data_by_method = {
    "Maceracion_CM": [
        [4.5557, 61.6606, 85.5992, 109.7440, 27.0257, 14.2601, 90.3482, 69.1347], # R1
        [5.4724, 40.6333, 79.5797, 137.0522, 40.9450, 23.8711, 127.0983, 66.2487], # R2
        [2.6755, 59.8134, 71.1274, 136.1733, 23.8948, 11.3879, 102.3052, 73.3733], # R3
    ],
    "Maceracion_EA": [
        [5.7114, 112.0991, 154.3989, 84.1390, 130.6473, 48.5400, 103.8505, 78.6198], # R1
        [13.9585, 110.2208, 350.2423, 160.3442, 117.8721, 113.3132, 90.6443, 61.7610], # R2
        [14.1671, 180.4917, 236.9470, 80.3193, 194.8242, 173.8835, 110.3321, 58.4826], # R3
    ],
    "Ultrasonido_CM": [
        [1.9469, 18.8024, 68.5766, 143.5489, 105.4904, 45.7181, 44.9411, 27.5411], # R1
        [13.1939, 12.1465, 47.7348, 140.1524, 155.1889, 32.3082, 38.9866, 24.9549], # R2
        [13.6369, 12.3413, 70.3097, 77.7690, 118.3465, 57.8122, 86.3361, 59.3053], # R3
    ],
    "Ultrasonido_EA": [
        [19.9527, 73.0669, 106.2400, 188.5954, 114.4882, 32.3976, 101.4320, 35.3029], # R1
        [22.6540, 52.6130, 88.9211, 183.0636, 273.5829, 50.6643, 90.6013, 21.1424], # R2
        [23.7489, 80.2616, 91.3911, 67.5418, 276.4824, 26.5614, 123.4611, 30.6199], # R3
    ],
}
```

```
# Crear DataFrame con todas las réplicas
fracciones = [f"F{i}" for i in range(1, 9)]
data_list = []

for metodo, replicas in data_by_method.items():
    for i, replica in enumerate(replicas, 1):
        for j, valor in enumerate(replica):
            data_list.append({
                'Metodo': metodo,
                'Replica': f'R{i}',
                'Fraccion': f'F{j+1}',
                'CFT': valor
            })

df = pd.DataFrame(data_list)

# Configurar colores para las réplicas
colors = ['#1f77b4', '#ff7f0e', '#2ca02c']

# Crear las 4 gráficas separadas
fig, axes = plt.subplots(2, 2, figsize=(20, 15))
fig.suptitle('Análisis de CFT por Método, Solvente y Réplica', fontsize=16, y=0.99)

# 1. Maceración con Cloroformo-Metanol
data_mac_cm = df[df['Metodo'] == 'Maceracion_CM']
sns.barplot(x='Fraccion', y='CFT', hue='Replica', data=data_mac_cm,
            palette=colors, ax=axes[0,0])
axes[0,0].set_title('Maceración con Cloroformo-Metanol')
axes[0,0].set_ylabel('CFT')
axes[0,0].tick_params(axis='x', rotation=45)
```

```

# 2. Maceración con Etanol-Agua
data_mac_ea = df[df['Metodo'] == 'Maceracion_EA']
sns.barplot(x='Fraccion', y='CFT', hue='Replica', data=data_mac_ea,
            palette=colors, ax=axes[0,1])
axes[0,1].set_title('Maceración con Etanol-Agua')
axes[0,1].set_ylabel('CFT')
axes[0,1].tick_params(axis='x', rotation=45)

# 3. Ultrasonido con Cloroformo-Metanol
data_ult_cm = df[df['Metodo'] == 'Ultrasonido_CM']
sns.barplot(x='Fraccion', y='CFT', hue='Replica', data=data_ult_cm,
            palette=colors, ax=axes[1,0])
axes[1,0].set_title('Ultrasonido con Cloroformo-Metanol')
axes[1,0].set_ylabel('CFT')
axes[1,0].tick_params(axis='x', rotation=45)

# 4. Ultrasonido con Etanol-Agua
data_ult_ea = df[df['Metodo'] == 'Ultrasonido_EA']
sns.barplot(x='Fraccion', y='CFT', hue='Replica', data=data_ult_ea,
            palette=colors, ax=axes[1,1])
axes[1,1].set_title('Ultrasonido con Etanol-Agua')
axes[1,1].set_ylabel('CFT')
axes[1,1].tick_params(axis='x', rotation=45)

# Ajustar el diseño
plt.tight_layout()
plt.show()

# Gráfica adicional de promedios
plt.figure(figsize=(10, 6))
averages = {method: np.mean(data_by_method[method], axis=1) for method in data_by_method.keys()}
df_averages = pd.DataFrame(averages)
df_averages.index = [f"Replica {i+1}" for i in range(3)]

for method in df_averages.columns:
    plt.plot(df_averages.index, df_averages[method], marker='o', label=method)

plt.title("Concentración promedio de polifenoles por réplica y método")
plt.xlabel("Réplicas")
plt.ylabel("Concentración promedio de polifenoles")
plt.legend()
plt.grid(True)
plt.show()

# Encontrar la combinación más favorable con detalle por fracción
def analyze_best_combinations(data):
    # Análisis por método
    method_means = {}
    method_fraction_means = {}

    for method in data_by_method.keys():
        # Promedio general por método
        values = np.array(data_by_method[method]).flatten()
        method_means[method] = np.mean(values)

        # Promedio por fracción
        fractions_mean = np.mean(data_by_method[method], axis=0)
        method_fraction_means[method] = {f"F{i+1}": val for i, val in enumerate(fractions_mean)}

    # Encontrar mejor método
    best_method = max(method_means.items(), key=lambda x: x[1])

    # Encontrar mejor fracción para cada método
    best_fractions = {}
    for method in method_fraction_means:
        best_fraction = max(method_fraction_means[method].items(), key=lambda x: x[1])
        best_fractions[method] = best_fraction

```

```

# Encontrar la mejor combinación absoluta
best_combination = {
    'method': None,
    'fraction': None,
    'value': float('-inf')
}

for method, fractions in method_fraction_means.items():
    for fraction, value in fractions.items():
        if value > best_combination['value']:
            best_combination['method'] = method
            best_combination['fraction'] = fraction
            best_combination['value'] = value

# Presentar resultados
print("\n=== Análisis de mejores combinaciones ===")

```

```

# Mejor combinación absoluta
best_combo_results = [
    ["Método", "Fracción", "CFT promedio"],
    [
        best_combination['method'],
        best_combination['fraction'],
        f"{best_combination['value']:.4f}"
    ]
]

print("\nMejor combinación método-fracción:")
print(tabulate(best_combo_results, headers="firstrow", tablefmt="grid"))

# Visualizar distribución por fracción para el mejor método
plt.figure(figsize=(12, 6))
best_method_fractions = method_fraction_means[best_combination['method']]
plt.bar(best_method_fractions.keys(), best_method_fractions.values())
plt.title(f"Distribución de CFT por fracción en {best_combination['method']}")
plt.xlabel("Fracción")
plt.ylabel("CFT promedio")
plt.show()

return best_combination, method_fraction_means

# Ejecutar el análisis
best_combo, fraction_means = analyze_best_combinations(data_by_method)

```

```

# Análisis ANOVA completo
# Encontrar la combinación más favorable
def calculate_method_means(data):
    method_means = {}
    for method in data_by_method.keys():
        # Calcular el promedio de todas las réplicas y fracciones
        values = np.array(data_by_method[method]).flatten()
        method_means[method] = np.mean(values)
    return method_means

method_means = calculate_method_means(data_by_method)
best_method = max(method_means.items(), key=lambda x: x[1])

print("\n=== Mejor método (promedio general) ===")
method_results = [
    ["Método", "Concentración promedio de CFT"],
    [best_method[0], f"{best_method[1]:.4f}"]
]

print(tabulate(method_results, headers="firstrow", tablefmt="grid"))

# Análisis ANOVA completo
def calculate_anova_stats(df):
    # Preparar datos para ANOVA
    groups = [group['CFT'].values for name, group in df.groupby('Metodo')]

    # Calcular ANOVA
    f_stat, p_val = stats.f_oneway(*groups)

```

```

# Calcular sumas de cuadrados
grand_mean = df['CFT'].mean()
ss_total = sum((df['CFT'] - grand_mean) ** 2)

# SS entre grupos (factor)
ss_factor = sum(len(g) * ((np.mean(g) - grand_mean) ** 2) for g in groups)

# SS dentro de grupos (error)
ss_error = ss_total - ss_factor

# Grados de libertad
df_factor = len(groups) - 1
df_error = len(df['CFT']) - len(groups)
df_total = len(df['CFT']) - 1

# Cuadrados medios
ms_factor = ss_factor / df_factor
ms_error = ss_error / df_error

return {
    'SS_Factor': ss_factor,
    'SS_Error': ss_error,
    'SS_Total': ss_total,
    'df_Factor': df_factor,
    'df_Error': df_error,
    'df_Total': df_total,
    'MS_Factor': ms_factor,
    'MS_Error': ms_error,
    'F_stat': f_stat,
    'p_value': p_val
}

def calculate_anova_stats(df):
    # Preparar datos para ANOVA
    groups = [group['CFT'].values for name, group in df.groupby('Metodo')]

```

```

# Calcular ANOVA
f_stat, p_val = stats.f_oneway(*groups)

# Calcular sumas de cuadrados
grand_mean = df['CFT'].mean()
ss_total = sum((df['CFT'] - grand_mean) ** 2)

# SS entre grupos (factor)
ss_factor = sum(len(g) * ((np.mean(g) - grand_mean) ** 2) for g in groups)

# SS dentro de grupos (error)
ss_error = ss_total - ss_factor

# Grados de libertad
df_factor = len(groups) - 1
df_error = len(df['CFT']) - len(groups)
df_total = len(df['CFT']) - 1

# Cuadrados medios
ms_factor = ss_factor / df_factor
ms_error = ss_error / df_error

return {
    'SS_Factor': ss_factor,
    'SS_Error': ss_error,
    'SS_Total': ss_total,
    'df_Factor': df_factor,
    'df_Error': df_error,
    'df_Total': df_total,

```

```

        'MS_Factor': ms_factor,
        'MS_Error': ms_error,
        'F_stat': f_stat,
        'p_value': p_val
    }

def calculate_factorial_anova(df):
    """
    Calcula ANOVA factorial de dos vías con interacción
    """
    # Crear factores
    metodo_levels = ['Maceracion', 'Ultrasonido']
    solvente_levels = ['CM', 'EA']

    # Preparar datos para análisis
    df['Metodo_Base'] = df['Metodo'].apply(lambda x: x.split('_')[0])
    df['Solvente_Base'] = df['Metodo'].apply(lambda x: x.split('_')[1])

    # Calcular sumas de cuadrados
    grand_mean = df['CFT'].mean()
    ss_total = sum((df['CFT'] - grand_mean) ** 2)

    # SS para Método
    ss_metodo = sum(len(group) * ((group['CFT'].mean() - grand_mean) ** 2)
                    for _, group in df.groupby('Metodo_Base'))

    # SS para Solvente
    ss_solvente = sum(len(group) * ((group['CFT'].mean() - grand_mean) ** 2)
                      for _, group in df.groupby('Solvente_Base'))

    # SS para interacción
    ss_interaction = sum(len(group) * ((group['CFT'].mean() - grand_mean) ** 2)
                         for _, group in df.groupby(['Metodo_Base', 'Solvente_Base']))
    ss_interaction = ss_interaction - ss_metodo - ss_solvente

    # SS para error
    ss_error = ss_total - ss_metodo - ss_solvente - ss_interaction

    # Grados de libertad
    df_metodo = len(metodo_levels) - 1
    df_solvente = len(solvente_levels) - 1
    df_interaction = df_metodo * df_solvente
    df_error = len(df) - (len(metodo_levels) * len(solvente_levels))
    df_total = len(df) - 1

    # Cuadrados medios
    ms_metodo = ss_metodo / df_metodo
    ms_solvente = ss_solvente / df_solvente
    ms_interaction = ss_interaction / df_interaction
    ms_error = ss_error / df_error

    # Estadísticos F
    f_metodo = ms_metodo / ms_error
    f_solvente = ms_solvente / ms_error
    f_interaction = ms_interaction / ms_error

    # p-valores
    p_metodo = 1 - stats.f.cdf(f_metodo, df_metodo, df_error)
    p_solvente = 1 - stats.f.cdf(f_solvente, df_solvente, df_error)
    p_interaction = 1 - stats.f.cdf(f_interaction, df_interaction, df_error)

    return {
        'Metodo': {
            'SS': ss_metodo, 'df': df_metodo, 'MS': ms_metodo,
            'F': f_metodo, 'p': p_metodo
        },
        'Solvente': {
            'SS': ss_solvente, 'df': df_solvente, 'MS': ms_solvente,
            'F': f_solvente, 'p': p_solvente
        },
    },

```

```

        'Interaccion': {
            'SS': ss_interaction, 'df': df_interaction, 'MS': ms_interaction,
            'F': f_interaction, 'p': p_interaction
        },
        'Error': {
            'SS': ss_error, 'df': df_error, 'MS': ms_error
        },
        'Total': {
            'SS': ss_total, 'df': df_total
        }
    }
}

```

```
# Realizar ANOVA factorial
```

```

results = calculate_factorial_anova(df)
anova_results = calculate_anova_stats(df)

```

```
# Presentar resultados en tabla
```

```
print("\n=== Resultados del ANOVA Factorial ===")
```

```

anova_table = [
    ["Fuente de Variación", "SS", "df", "MS", "F", "p-valor"],
    ["Método", f"{results['Metodo']['SS']:.4f}",
     str(results['Metodo']['df']),
     f"{results['Metodo']['MS']:.4f}",
     f"{results['Metodo']['F']:.4f}",
     f"{results['Metodo']['p']:.4f}"],
    [f"{results['Metodo']['p']:.4f}"],
    ["Solvente", f"{results['Solvente']['SS']:.4f}",
     str(results['Solvente']['df']),
     f"{results['Solvente']['MS']:.4f}",
     f"{results['Solvente']['F']:.4f}",
     f"{results['Solvente']['p']:.4f}"],
    [f"{results['Solvente']['p']:.4f}"],
    ["Método × Solvente", f"{results['Interaccion']['SS']:.4f}",
     str(results['Interaccion']['df']),
     f"{results['Interaccion']['MS']:.4f}",
     f"{results['Interaccion']['F']:.4f}",
     f"{results['Interaccion']['p']:.4f}"],
    [f"{results['Interaccion']['p']:.4f}"],
    ["Entre grupos", f"{anova_results['SS_Factor']:.4f}",
     str(anova_results['df_Factor']),
     f"{anova_results['MS_Factor']:.4f}",
     f"{anova_results['F_stat']:.4f}",
     f"{anova_results['p_value']:.4f}"],
    ["Error", f"{results['Error']['SS']:.4f}",
     str(results['Error']['df']),
     f"{results['Error']['MS']:.4f}",
     "", ""],
    ["Total", f"{results['Total']['SS']:.4f}",
     str(results['Total']['df']),
     "", "", ""]
]
print(tabulate(anova_table, headers="firstrow", tablefmt="grid"))

```

```
# Verificar necesidad de pruebas post-hoc
```

```
alpha = 0.05
```

```
print("\n=== Evaluación de Efectos Significativos ===")
```

```
significant_effects = []
```

```

if results['Metodo']['p'] < alpha:
    significant_effects.append("Método")
if results['Solvente']['p'] < alpha:
    significant_effects.append("Solvente")
if results['Interaccion']['p'] < alpha:
    significant_effects.append("Interacción Método por Solvente")

```

```
# Realizar pruebas post-hoc si es necesario
```

```

if significant_effects:
    print("\nEfectos significativos encontrados:")
    for effect in significant_effects:
        print(f"- {effect}")

```

```
print("\n=== Análisis Post-hoc ===")
```

```

# Si hay efecto principal del método
if "Método" in significant_effects:
    print("\nComparaciones post-hoc para Método:")
    metodo_data = {
        'Maceracion': df[df['Metodo_Base'] == 'Maceracion']['CFT'],
        'Ultrasonido': df[df['Metodo_Base'] == 'Ultrasonido']['CFT']
    }
    tukey_metodo = pairwise_tukeyhsd(df['CFT'], df['Metodo_Base'])
    print(tukey_metodo)

# Si hay efecto principal del solvente
if "Solvente" in significant_effects:
    print("\nComparaciones post-hoc para Solvente:")
    solvente_data = {
        'CM': df[df['Solvente_Base'] == 'CM']['CFT'],
        'EA': df[df['Solvente_Base'] == 'EA']['CFT']
    }
    tukey_solvente = pairwise_tukeyhsd(df['CFT'], df['Solvente_Base'])
    print(tukey_solvente)

# Si hay interacción significativa
if "Interacción Método x Solvente" in significant_effects:
    print("\nAnálisis de efectos simples para la interacción:")
    # Comparar solventes dentro de cada método
    for metodo in ['Maceracion', 'Ultrasonido']:
        data_metodo = df[df['Metodo_Base'] == metodo]
        t_stat, p_val = stats.ttest_ind(
            data_metodo[data_metodo['Solvente_Base'] == 'CM']['CFT'],
            data_metodo[data_metodo['Solvente_Base'] == 'EA']['CFT']
        )
        print(f"\nEfecto del solvente en {metodo}:")
        print(f"t-statistic: {t_stat:.4f}")
        print(f"p-value: {p_val:.4f}")
else:
    print("\nNo se encontraron efectos significativos. No se requieren pruebas post-hoc.")

# Agregar conclusiones basadas en los resultados
print("\n=== Conclusiones ===")
conclusions = []
conclusions.append(["Efecto global",
    "Significativo" if anova_results['p_value'] < 0.05 else "No significativo"])
conclusions.append(["Mejor método", best_method[0]])
conclusions.append(["Mejor fracción", f"{best_combo['fraction']}"])
conclusions.append(["Valor F crítico ( $\alpha=0.05$ )",
    f"{stats.f.ppf(0.95, anova_results['df_Factor'], anova_results['df_Error']):.4f}"])

print(tabulate(conclusions, headers=["Aspecto", "Resultado"], tablefmt="grid"))

def calculate_factorial_anova(df):
    """
    Calcula ANOVA factorial de dos vías con interacción
    """
    # Crear factores
    metodo_levels = ['Maceracion', 'Ultrasonido']
    solvente_levels = ['CM', 'EA']

    # Preparar datos para análisis
    df['Metodo_Base'] = df['Metodo'].apply(lambda x: x.split('_')[0])
    df['Solvente_Base'] = df['Metodo'].apply(lambda x: x.split('_')[1])

    # Calcular sumas de cuadrados
    grand_mean = df['CFT'].mean()
    ss_total = sum((df['CFT'] - grand_mean) ** 2)

    # SS para Método
    ss_metodo = sum(len(group) * ((group['CFT'].mean() - grand_mean) ** 2)
        for _, group in df.groupby('Metodo_Base'))

```

```

# SS para Solvente
ss_solvente = sum(len(group) * ((group['CFT'].mean() - grand_mean) ** 2)
                  for _, group in df.groupby('Solvente_Base'))

# SS para interacción
ss_interaction = sum(len(group) * ((group['CFT'].mean() - grand_mean) ** 2)
                    for _, group in df.groupby(['Metodo_Base', 'Solvente_Base']))
ss_interaction = ss_interaction - ss_metodo - ss_solvente

# SS para error
ss_error = ss_total - ss_metodo - ss_solvente - ss_interaction

# Grados de libertad
df_metodo = len(metodo_levels) - 1
df_solvente = len(solvente_levels) - 1
df_interaction = df_metodo * df_solvente
df_error = len(df) - (len(metodo_levels) * len(solvente_levels))
df_total = len(df) - 1

# Cuadrados medios
ms_metodo = ss_metodo / df_metodo
ms_solvente = ss_solvente / df_solvente
ms_interaction = ss_interaction / df_interaction
ms_error = ss_error / df_error

# Estadísticos F
f_metodo = ms_metodo / ms_error
f_solvente = ms_solvente / ms_error
f_interaction = ms_interaction / ms_error

# p-valores
p_metodo = 1 - stats.f.cdf(f_metodo, df_metodo, df_error)
p_solvente = 1 - stats.f.cdf(f_solvente, df_solvente, df_error)
p_interaction = 1 - stats.f.cdf(f_interaction, df_interaction, df_error)

return {
    'Metodo': {
        'SS': ss_metodo, 'df': df_metodo, 'MS': ms_metodo,
        'F': f_metodo, 'p': p_metodo
    },
    'Solvente': {
        'SS': ss_solvente, 'df': df_solvente, 'MS': ms_solvente,
        'F': f_solvente, 'p': p_solvente
    },
    'Interaccion': {
        'SS': ss_interaction, 'df': df_interaction, 'MS': ms_interaction,
        'F': f_interaction, 'p': p_interaction
    },
    'Error': {
        'SS': ss_error, 'df': df_error, 'MS': ms_error
    },
    'Total': {
        'SS': ss_total, 'df': df_total
    }
}

```

```
=== Mejor método (promedio general) ===
```

```

+-----+-----+
| Método      | Concentración promedio de CFT |
+-----+-----+
| Maceracion_EA | 116.075 |
+-----+-----+

```

```
=== Análisis de mejores combinaciones ===
```

```
Mejor combinación método-fracción:
```

```

+-----+-----+-----+
| Método      | Fracción  | CFT promedio |
+-----+-----+-----+
| Maceracion_EA | F3        | 247.196 |
+-----+-----+-----+

```

Tabla A4

Representación de las fases móviles para el análisis de las gráficas obtenidas del ANOVA

Fase móvil	Representación
Cloroformo	F1
C-M (7:3)	F2
C-M (5:5)	F3
C-M (3:7)	F4
M-A (7:3)	F5
M-A (5:5)	F6
M-A (3:7)	F7
Agua	F8

Figura A14

CFT de la maceración con cloroformo-metanol 1:1

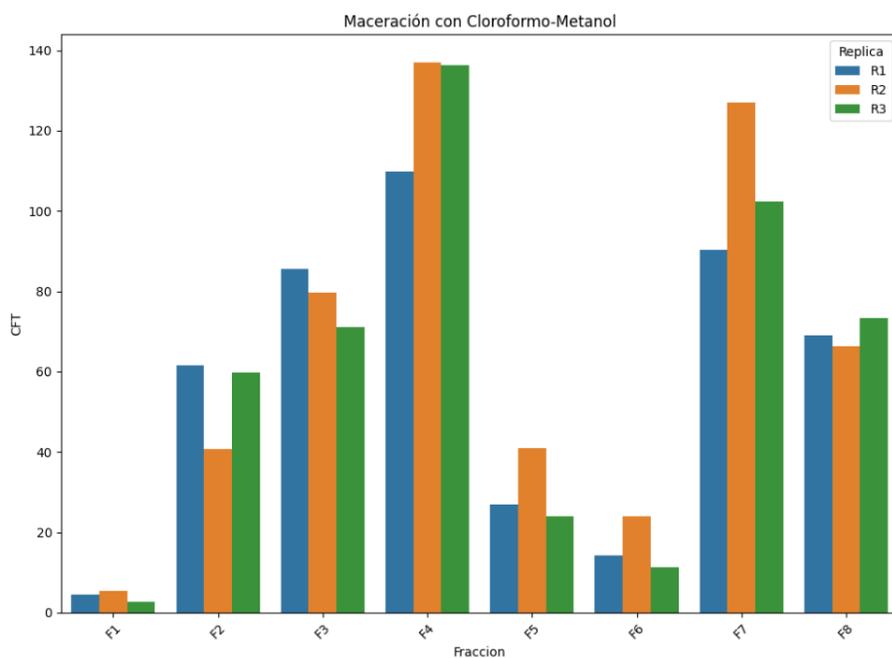


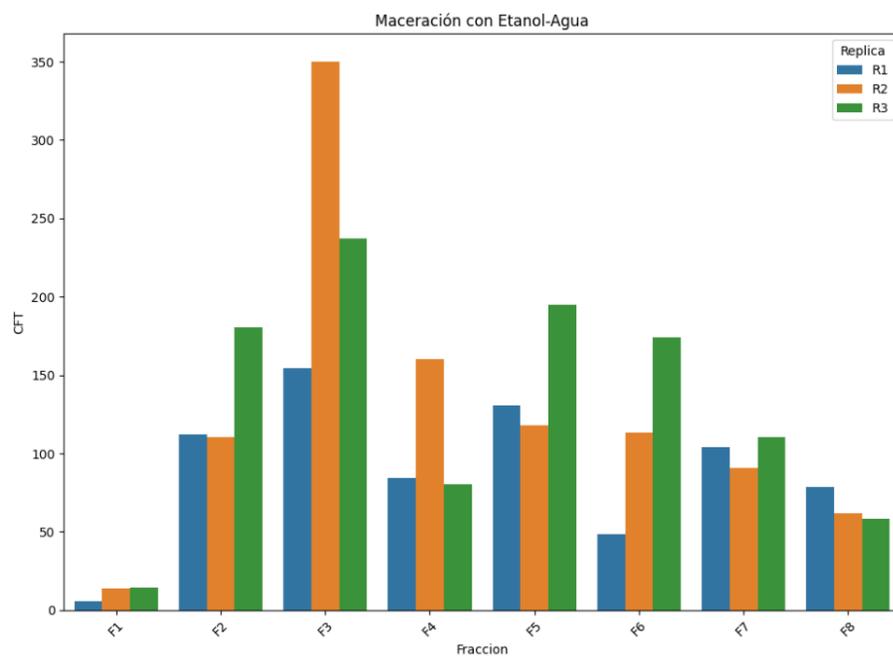
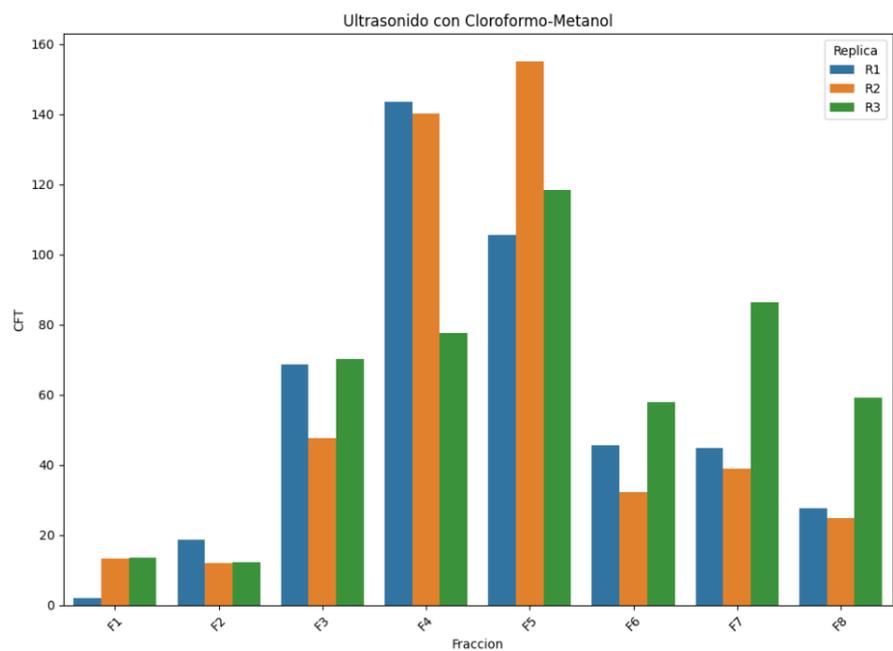
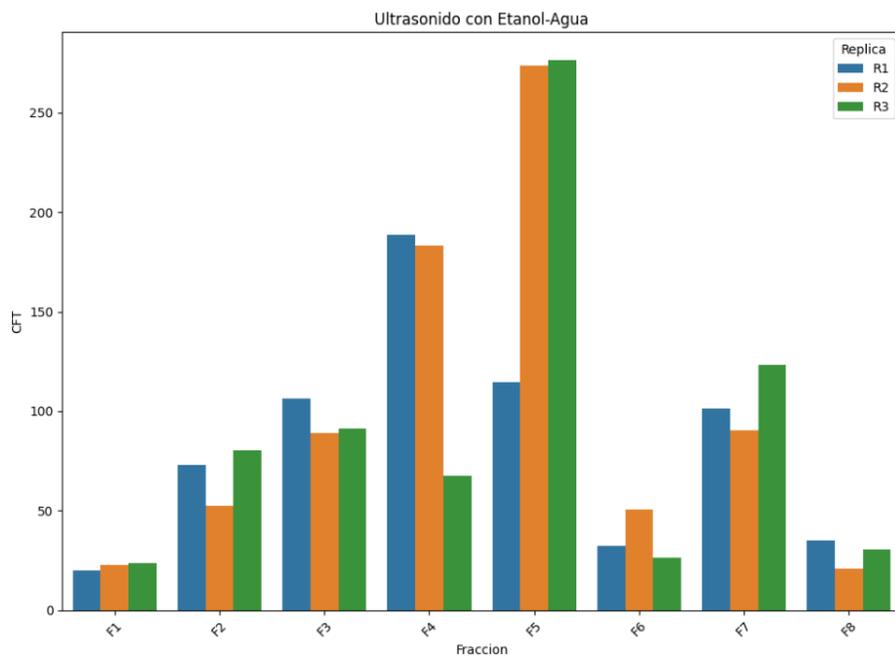
Figura A15*CFT de la maceración con etanol al 70%***Figura A16***CFT de ultrasonido con cloroformo-metanol 1:1*

Figura A17*CFT de ultrasonido con etanol al 70%***Figura A18***Concentración promedio de polifenoles totales por réplica y método*