



**Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación.**

Iguasnia Ureta, Angie Estefania y Parrales Loor, Andy Sebastian

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Neira Mosquera, Juan Alejandro, PhD.

24 de Febrero de 2023

## Reporte de verificación de contenido

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS**  
magister

## Iguasnia; Prrales\_Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos Fruta milagrosa (1)

**6%** Similitudes  
**< 1%** Texto entre comillas  
0% similitudes entre comillas  
0% Idioma no reconocido

Nombre del documento: Iguasnia; Prrales_Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos Fruta milagrosa (1).pdf	Depositante: MILTON VINICIO UDAY PATIÑO	Número de palabras: 18.054
ID del documento: d7209ce6db344d1a3458e759bf7378e379801849	Fecha de depósito: 21/2/2023	Número de caracteres: 133.969
Tamaño del documento original: 1.88 Mo	Tipo de carga: interface	
	fecha de fin de análisis: 21/2/2023	

Ubicación de las similitudes en el documento:

Firma:

Firma electrónica por  
**JUAN ALEJANDRO  
NEIRA MOSQUERA****PhD. Neira Mosquera, Juan Alejandro**

C. C.: 0501644470

**Director del Proyecto de Investigación**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación”** fue realizado por los señores **Iguasnia Ureta, Angie Estefania y PARRALES LOOR, Andy Sebastian**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 18 febrero del 2023**

Firma:



.....  
**PhD. Neira Mosquera, Juan Alejandro**

C. C.: 0501644470

**Director del Proyecto de Investigación**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Nosotros, **Iguasnia Ureta, Angie Estefania y Prrales Loor, Andy Sebastian**, con cédulas de ciudadanía N° 2300584535 y N° 1722237938, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación”** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 18 febrero del 2023**

Firmas

.....  
**Iguasnia Ureta, Angie Estefania**

C.C.: 2300584535

.....  
**Prrales Loor, Andy Sebastian**

C.C.: 1722237938



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de Publicación**

Nosotras, **Iguasnia Ureta, Angie Estefania y Parrales Loor, Andy Sebastian**, con cédulas de ciudadanía N° 2300584535 y N° 1722237938, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 18 febrero del 2023**

Firmas

.....  
**Iguasnia Ureta, Angie Estefania**

C.C.: 2300584535

.....  
**Parrales Loor, Andy Sebastian**

C.C.: 1722237938

### **Dedicatoria**

Este trabajo va dedicado a mi familia por ser mi principal motor que me impulsa a ser mejor cada día y esforzarme en el transcurso de mi vida. A mis hermanos, que han sido mi inspiración de crecimiento y que han estado a mi lado de la mano apoyándome en todo momento tanto en mi vida estudiantil como personal.

En especial a mi amado padre, que ha sabido brindarme su apoyo, consejos y ha sido una luz guía durante todo este camino, por enseñarme que con dedicación y esfuerzo se pueden cumplir los objetivos y metas planteadas, a más de ello, por haber estado incondicionalmente en cada una de las etapas que transcurrí durante mi formación académica.

Angie I.

A mi dulce madre que me ha inspirado con su fuerza y coraje, a mi hermana por siempre estar a mi lado y ser una fuente de inspiración constante; y a mi querido padre por brindarme el impulso y la fuerza necesaria para seguir mis sueños. En reconocimiento y gratitud por ser las personas más maravillosas que puedo tener en mi vida, les dedico este logro.

Sebastian P.

## Agradecimientos

En primer lugar, a Dios quien me dio salud, sabiduría y fortaleza todos los días de mi vida, quien me ama sin dudarlo y me ha protegido permitiéndome compartir junto a mis seres amados este momento trascendental en mi vida.

Principalmente a mi padre, a Fernanda Molina y a mis hermanos por su apoyo incondicional, además de siempre brindarme una mano en los momentos difíciles para poder continuar.

A mi compañero Sebas y mis amigos Fabian, Edwin, Oswaldo que fueron parte importante de este camino, brindándome su apoyo incondicional y creando grandes recuerdos los cuales llevaré en mi hasta que el Alzheimer lo permita.

A mis amigos que he conocido a lo largo de la carrera universitaria, gracias por estar desde el primer nivel compartiendo experiencias memorables, dándome consejos y por su cariño.

Agradezco a cada uno de mis docentes por sus enseñanzas dentro y fuera de las aulas de clases y demostrarme cómo debe ser un gran profesional.

A mi tutor y esposa, PhD. Juan Alejandro Neira y PhD. Sungey Sánchez por haber compartido sus conocimientos en mis años de estudios y sobre todo por la ayuda en el trabajo de titulación, desde luego, por ser una inspiración a seguir adelante y ser mejor cada día.

Al Ingeniero Jhoan Plua por dedicar su tiempo, paciencia y brindarnos su ayuda durante el trabajo de titulación.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi familia y a mis padres por su apoyo incondicional, en especial a mi madre Janeth Loor, padre Darwin Parrales y mi hermana Emily Parrales por la paciencia, apoyo y cariño que me brindaron durante todo mi proceso de formación.

Agradezco al Dr. Juan Neira y la Dra. Sungey Sanchez por su orientación, consejos y apoyo durante todo el proyecto. Agradezco también al Ing. Jhoan Plua debido a que, sin su experiencia y conocimientos, este proyecto no hubiera sido posible.

A mi compañera y amiga Angie por su trabajo conjunto, dedicación y motivación a lo largo de este proyecto; y a mis amigos que he conocido a lo largo de esta etapa, en especial Fabian, Edwin, Oswaldo con los cuales creé recuerdos memorables, y me brindaron su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A mi novia Kerly que supo estar presente en las situaciones donde me sentía más vulnerable, brindándome su apoyo y mostrándome el camino para seguir adelante.

A Valeria Tapia por su gran corazón y brindarme el apoyo necesario para poder obtener la materia prima y conseguir desarrollar este proyecto.

Han sido una fuente constante de apoyo, inspiración y motivación en cada paso que he dado en mi camino. Espero poder devolverles de alguna manera todo lo que han dado. Gracias por creer en mí, por alentarme en los momentos difíciles y por celebrar mis logros.

Les agradezco desde el fondo de mi corazón por ser una parte importante de mi vida y por ayudarme a crecer y avanzar. Sin duda, seguiré trabajando duro para honrar su confianza y para seguir contando con su apoyo en el futuro.

Sebastian P.

## Contenido del Índice

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	8
Contenido del Índice.....	10
Índice de tablas .....	16
Índice de figuras .....	18
Resumen .....	20
Abstract.....	21
Capítulo I.....	22
Introducción.....	22
Objetivos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos .....	23
Hipótesis .....	23
Hipótesis para Factor A (Métodos de extracción).....	23

Hipótesis Factor B (Métodos de conservación).....	24
Hipótesis interacción A*B (Métodos de extracción*Métodos de conservación) .....	24
Capítulo II.....	24
Revisión de literatura .....	24
Antecedentes .....	24
Fruta milagrosa ( <i>Synsepalum dulcificum</i> ) .....	25
Taxonomía.....	25
Distribución geográfica .....	26
Plantación.....	27
Propiedades del fruto milagroso.....	28
Características químicas.....	28
Composición de la pulpa de <i>Synsepalum dulcificum</i> .....	33
Compuestos bioactivos.....	33
Aplicaciones terapéuticas .....	36
Tipo de conservación.....	38
Capítulo III.....	39
Metodología.....	39
Lugar de investigación .....	39
Ubicación política .....	39
Ubicación geográfica .....	39

	12
Materiales .....	40
Extracción por Prensado en Frío.....	40
Extracción por Maceración .....	41
Extracción por método de Líquidos Presurizados (LP).....	41
Determinación de Acidez Titulable.....	42
Determinación de pH.....	42
Determinación de sólidos solubles (SS) .....	43
Determinación de Humedad .....	43
Determinación de flavonoides .....	44
Determinación de proteína bruta.....	44
Determinación de Fibra .....	45
Determinación de porcentaje de grasa u oleoresina por método Soxhlet.....	45
Métodos.....	46
Métodos de extracción .....	46
Extracción por método de Prensado en Frío.....	46
Extracción por método de Maceración.....	46
Extracción por método de Líquidos presurizados (LP).....	47
Métodos de conservación.....	47
Extracto fluido .....	47
Emulsión iónica.....	47

Diseño experimental.....	48
Niveles y factores del experimento .....	48
Tratamientos a comparar.....	48
Tipo de diseño experimental aplicado.....	49
Repeticiones .....	49
Análisis estadístico.....	49
Análisis funcional .....	49
Variables evaluadas .....	50
Determinación de Acidez Titulable.....	50
Determinación de pH.....	51
Determinación de Sólidos Solubles (SS).....	51
Determinación de Humedad .....	52
Determinación de flavonoides .....	52
Determinación de Proteína Bruta.....	54
Determinación de fibra .....	55
Determinación de grasa u oleorresina por método Soxhlet .....	56
Recuento microbiano en petrifilm™ .....	57
Capítulo IV.....	58
Análisis e interpretación de los resultados.....	58
Resultados.....	58

	14
Análisis de las características del fruto milagroso.....	58
Análisis de varianza para los ensayos fisicoquímicos .....	59
Análisis de varianza para el pH.....	59
Análisis de varianza para los Solidos Solubles (SS) .....	60
Análisis de varianza para la Absorbancia .....	60
Análisis de varianza para la Proteína Bruta (%).....	61
Análisis de varianza para la Acidez .....	61
Resultados del estudio de tres métodos de extracción (Factor A). Tukey $p < 0,05$ .....	62
Resultados del estudio de dos métodos de conservación (Factor B). Tukey $p < 0,05$ .....	64
Resultados de seis interacciones entre <i>Métodos de extracción</i> * <i>Métodos de conservación</i> * ( <i>AxB</i> ). Tukey $p < 0,05$ .....	66
Análisis microbiológico .....	70
Análisis de conglomerados .....	71
Análisis de componentes principales .....	72
Rendimiento mediante balance de materia .....	75
Resultados de la evaluación organoléptica de los tratamientos efectuados sobre el Fruto milagroso.	78
Resultados del análisis sensorial de los mejores tratamientos aplicando en el Fruto milagroso .....	84
Capítulo V.....	85
Discusión.....	85
Características fisicoquímicas del fruto milagroso.....	85
Compuestos activos del fruto milagroso .....	87

	15
Análisis microbiológico de tratamientos .....	87
Evaluación de propiedades organolépticas .....	88
Capítulo VI.....	88
Conclusiones y recomendaciones .....	88
Conclusiones .....	88
Características físico-químicas y compuestos bioactivos del fruto milagroso .....	88
Factor A (métodos de extracción) .....	88
Rendimiento mediante balance de materiales .....	89
Factor B (métodos de conservación) .....	89
Interacción AxB (métodos de extracción*métodos de conservación) .....	89
Análisis microbiológico .....	90
Evaluación de propiedades organolépticas.....	90
Recomendaciones .....	91
Capítulo VII.....	92
Bibliografía .....	92

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica de la planta <i>Synsepalum dulcificum</i> .....	25
<b>Tabla 2</b> Clasificación de los componentes bioactivos .....	33
<b>Tabla 3</b> Materiales utilizados en el método de extracción de Prensado en Frío .....	40
<b>Tabla 4</b> Materiales utilizados en el método de extracción por Maceración .....	41
<b>Tabla 5</b> Materiales utilizados en el método de extracción por Líquidos Presurizados (LP) .....	41
<b>Tabla 6</b> Materiales utilizados en el método conservación por extracto fluido. ....	41
<b>Tabla 7</b> Materiales utilizados en el método conservación por extracto fluido. ....	42
<b>Tabla 8</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de Acidez Titulable .....	42
<b>Tabla 9</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de pH .....	42
<b>Tabla 10</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de Sólidos Solubles (SS) .....	43
<b>Tabla 11</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de Humedad.....	43
<b>Tabla 12</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de flavonoides .....	44
<b>Tabla 13</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de proteína bruta .....	44
<b>Tabla 14</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de fibra.....	45
<b>Tabla 15</b> Materiales utilizados en el ensayo de determinación de porcentaje de grasa .....	45
<b>Tabla 16</b> Factores y niveles a probar en la determinación de características fisicoquímica y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa ( <i>Synsepalum dulcificum</i> ) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación. ....	48
<b>Tabla 17</b> Diseño de la investigación siendo un diseño bifactorial (AxB) donde El factor A contiene 3 tratamientos y el factor B 2 tratamientos .....	48
<b>Tabla 18</b> Determinación del error experimental en el diseño AxB.....	49
<b>Tabla 19</b> Resultados del análisis de las propiedades físico-químicas y compuestos activos del fruto milagroso .....	58

<b>Tabla 20</b> Análisis de varianza para el pH de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso .....	59
<b>Tabla 21</b> Análisis de varianza para los sólidos solubles de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso.....	60
<b>Tabla 22</b> Análisis de varianza para la absorbancia de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso .....	60
<b>Tabla 23</b> Análisis de varianza para la Proteína Bruta (%) de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso.....	61
<b>Tabla 24</b> Análisis de varianza para la Acidez de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso .....	61
<b>Tabla 25</b> Recuento de microorganismos aerobios mesófilos.....	70
<b>Tabla 26</b> Recuento de mohos y levaduras.....	70
<b>Tabla 27</b> Matriz de correlación de los componentes principales de los tratamientos efectuados .....	72
<b>Tabla 28</b> Porcentajes de la tabla de varianza total explicada.....	73
<b>Tabla 29</b> Valoraciones y aspectos a evaluar para las propiedades organolépticas de los tratamientos efectuados en el fruto milagroso .....	78
<b>Tabla 30</b> Análisis de varianza del sabor.....	79
<b>Tabla 31</b> Análisis de varianza del color.....	80
<b>Tabla 32</b> Análisis de varianza del olor .....	81
<b>Tabla 33</b> Análisis de varianza de la apariencia.....	82
<b>Tabla 34</b> Análisis de varianza de la efectividad en el cambio de sabor.....	83

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Partes de la baya de <i>Synsepalum dulcificum</i> : piel, pulpa y semilla .....	26
<b>Figura 2</b> Distribución geográfica de <i>Synsepalum dulcificum</i> .....	27
<b>Figura 3</b> Baya del fruto milagroso .....	28
<b>Figura 4</b> Estructura proteica de la glucoproteína miraculina encontrada dentro del fruto milagroso ( <i>Synsepalum dulcificum</i> ).....	30
<b>Figura 5</b> Modelo de mecanismo de acción de la miraculina .....	32
<b>Figura 6</b> Ubicación geográfica donde se realizó la investigación.....	39
<b>Figura 7</b> Prueba de significancia de Tukey para resultados de análisis bromatológicos (Factor A: Métodos de extracción).....	62
<b>Figura 8</b> Prueba de significancia Tukey para resultados de análisis bromatológicos (Factor B: Métodos de conservación) .....	64
<b>Figura 9</b> Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$ ) para resultados de análisis bromatológicos (Interacción AxB: Métodos de extracción*Métodos de conservación) .....	66
<b>Figura 10</b> Dendograma para los factores a estudiar .....	71
<b>Figura 11</b> Gráfico de sedimentación de los principales componentes.....	74
<b>Figura 12</b> Gráfico de componentes en espacio rotado utilizando Kaiser-varimax .....	75
<b>Figura 13</b> Balance de materia del método de extracción por prensado en frío .....	75
<b>Figura 14</b> Balance de materia del método de extracción por maceración.....	76
<b>Figura 15</b> Balance de materia del método de extracción por líquidos presurizados .....	77
<b>Figura 16</b> Prueba de significancia de Tukey para los resultados del sabor .....	79
<b>Figura 17</b> Prueba de significancia de Tukey para los resultados del color .....	80
<b>Figura 18</b> Prueba de significancia de Tukey para los resultados del olor .....	81
<b>Figura 19</b> Prueba de significancia de Tukey para los resultados de la apariencia .....	82

**Figura 20** Prueba de significancia de Tukey para los resultados de la efectividad en el cambio de sabor 83

**Figura 21** Comparación entre los mejores tratamientos del análisis sensorial (a0b0: prensado en frío + extracto) y a0b1: prensado en frío + emulsión iónica)..... 84

## Resumen

La especie *Synsepalum dulcificum* o comúnmente conocido como la fruta milagrosa es una baya que posee una glucoproteína llamada Miraculina y se caracteriza por su capacidad de modificar temporalmente los receptores del sabor en la lengua haciendo que los alimentos ácidos o amargos se perciban dulces, a pesar de dicha propiedad nos percatamos de que ha sido poco investigada. La presente investigación tiene como objetivo principal la determinación de sus características físico-químicas y compuestos bioactivos además de la viabilidad de la obtención de su extracto por medio de los métodos de prensado en frío, maceración y líquidos presurizados; además de su conservación por medio de extracto fluido y emulsión iónica en la cual se usó como material recubrimiento el alginato de sodio al 2% y una solución reticulante de cloruro de calcio al 11%. Se obtuvo que la fruta milagrosa presenta una humedad del 41,98%; el análisis de fibra reportó un 1,019% y una cantidad de oleorresina de 5,11%. Entre las propiedades químicas principales analizadas directamente en el fruto se obtuvo que presenta un pH de 3,68 y 10,5 °brix de sólidos solubles. En el análisis de flavonoides totales se obtuvo una concentración de 0,03 mg eq/g de materia seca. El mejor método de extracción aplicable para la fruta milagrosa fue el prensado en frío debido a presentó los mejores valores de pH con un 3,368 y porcentaje de proteína bruta de 2,350% además de que tuvo la mayor eficiencia en la extracción con un rendimiento del 72,13%. Junto a este, el extracto fluido fue el mejor método de conservación debido a que presentó los valores más altos en pH con 3,290; sólidos solubles con 17,7 °brix; absorbancia de 3,217 nm y proteína bruta de 3,006%. La combinación de estos dos métodos dio como resultado el mejor tratamiento para obtención y conservación del extracto de fruta milagrosa, lo cual se determinó por medio de una evaluación sensorial en la que obtuvo los mejores resultados en cuanto al sabor, color, olor, apariencia y efectividad en el cambio de sabor.

**Palabras claves:** Modificador del sabor, fruta milagrosa, miraculina, extracción, conservación.

### Abstract

The species *Synsepalum dulcificum* or commonly known as the miracle fruit is a berry that possesses a glycoprotein called Miraculin and is characterized by its ability to temporarily modify the taste receptors on the tongue making sour or bitter foods feel sweet, despite this property we realize that it has been little investigated. The main objective of this research is to determine its physicochemical characteristics and bioactive compounds, as well as the feasibility of obtaining its extract by cold pressing, maceration and pressurized liquid methods; in addition to its preservation by means of fluid extract and ionic emulsion in which sodium alginate at 2% and a cross-linking solution of calcium chloride at 11% were used as coating material. It was obtained that the miracle fruit has a moisture content of 41.98%; the fiber analysis reported 1.019% and an oleoresin content of 5.11%. Among the main chemical properties analyzed directly on the fruit, it was obtained that it has a pH of 3.68 and 10.5 °brix of soluble solids. In the analysis of total flavonoids, a concentration of 0.03 mg eq/g of dry matter was obtained. The best applicable extraction method for the miracle fruit was cold pressing because it presented the best pH values of 3.368 and crude protein percentage of 2.350%, in addition to having the highest extraction efficiency with a yield of 72.13%. Next to this, the fluid extract was the best preservation method because it presented the highest values in pH with 3.290; soluble solids with 17.7 °brix; absorbance of 3.217 nm and crude protein of 3.006%. The combination of these two methods resulted in the best treatment for obtaining and preserving the miracle fruit extract, which was determined by means of a sensory evaluation in which it obtained the best results in terms of flavor, color, odor, appearance and effectiveness in flavor change.

**Key words:** Flavor modifier, miracle fruit, miraculin, extraction, preservation.

## Capítulo I

### Introducción

Ecuador es un país con una mega diversidad, siendo una de ellas la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) la cual cuenta con propiedades beneficiosas para la salud ya que es totalmente natural. La fruta milagrosa es una especie vegetal que no muchas personas conocen, son ese tipo de modas asiáticas que suelen presentarse por algunos meses y luego desaparecer en el tiempo. Sin embargo, causa una gran curiosidad los efectos provocados al consumirla, ya que provoca que todos los alimentos ácidos se vuelvan dulces. Después de observar dichos efectos nos percatamos que podríamos sacarle más provecho a tan magnífica fruta, es por ello que nos propusimos darla a conocer en diferentes presentaciones dando lugar a este proyecto llamado “Determinación de las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación” con el fin de que sea utilizada como alternativa edulcorante natural para personas que sufren de enfermedades diabéticas, entre otras. El principal objetivo, o para nosotros el más importante fue determinar el método de extracción más eficiente para la obtención del extracto, y con ello llegaron los primeros problemas, la fruta al no ser muy conocida no existen mucha demanda y así mismo no hay muchas personas que la cosechan, por lo cual su valor es excesivamente elevado llegando a costar cada fruto 0,50 ctvs.

El caso novedoso de esta fruta es su capacidad de bloquear los sabores ácidos por la presencia de una glucoproteína llamada miraculina que actúa en las papilas gustativas dejando una sensación de dulzor en nuestra boca. De igual manera, esta glucoproteína que causa dichos efectos es muy sensible a la temperatura, por lo cual algunos tipos de extracciones no tenían el efecto deseado, y así fueron apareciendo una serie de inconvenientes, pero a pesar de las dificultades presentadas, logramos obtener el mejor método de extracción que mantuviera el efecto de la fruta.

## Objetivos

### Objetivo general

Determinar las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación.

### Objetivos específicos

- Estudiar las características fisicoquímicas y compuestos bioactivos de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*).
- Evaluar tres métodos de extracción: Prensado en Frío, Maceración y Extracción de líquidos presurizados (ELP), para la obtención de extractos de fruta milagrosa.
- Valorar distintos métodos de conservación: extracto fluido y emulsión iónica, en el acondicionamiento del extracto obtenido.
- Determinar mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos las características del extracto obtenido.
- Determinar rendimiento mediante balance de materiales

## Hipótesis

### Hipótesis para Factor A (Métodos de extracción)

**H0.** – Los métodos de extracción prensado en frío, maceración y líquidos presurizados no influyen en el rendimiento y en las variables evaluadas.

**Ha.** – Los métodos de extracción prensado en frío, maceración y líquidos presurizados si influyen en el rendimiento y en las variables evaluadas.

**Hipótesis Factor B (Métodos de conservación)**

**H0.** – Los métodos de conservación extracto fluido y emulsión iónica no influyen el acondicionamiento y en las variables evaluadas.

**Ha.** – Los métodos de conservación extracto fluido y emulsión iónica si influyen el acondicionamiento y en las variables evaluadas.

**Hipótesis interacción A\*B (Métodos de extracción\*Métodos de conservación)**

**H0.** – El efecto de las interacciones entre los factores métodos de extracción y método de conservación no influyen en las variables evaluadas.

**Ha.** – El efecto de las interacciones entre los factores métodos de extracción y método de conservación si influyen en las variables evaluadas.

**Capítulo II****Revisión de literatura****Antecedentes**

El explorador francés Chevrier des Marchis fue quien descubrió la fruta milagrosa pero no la registró, pero fue a mediados del siglo XIX cuando fue identificada y nombrada como *Synsepalum dulcificum*, perteneciente a la familia *Sapotaceae* y pariente del chicozapote (Rich, 2010). El Dr. Lloyd Beidler junto con el Dr. Kenzo Kurihara, aislaron el principio activo de esta baya llamada miraculina, la cual pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de tripsina, determinando que la miraculina provoca el efecto de modificación de sabor. Esta proteína tiene un peso molecular de 44/000 daltones, perteneciendo a un grupo prostético que incluye distintos azúcares que es capaz de activarse a pH ácidos presentando un dulzor de manera natural (Jouvin, 2016).

Los edulcorantes naturales han existido mucho tiempo atrás. Civilizaciones antiguas utilizaban hojas, raíces y frutos de varias especies vegetales para otorgar un sabor dulce a sus comidas. Hoy en día por medio de procesos químicos se ha conseguido obtener productos endulzantes de la caña de azúcar. No obstante, el consumo excesivo del azúcar refinado en varios productos de consumo diario ha sido el principal causante de problemas a la salud. Por dicho motivo, la población ha mostrado un gran interés en retomar el uso de ciertas partes de las plantas como una alternativa endulzante (Cevallos *et al.*, 2007).

### **Fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum*)**

#### ***Taxonomía***

El fruto milagroso es un arbusto piramidal perteneciente a la familia *Sapotaceae* de hoja perenne en forma oval y afilada que crece en regiones tropicales y subtropicales a una altura de no más de 5.5 metros, requiere de un suelo ácido con un pH entre 4,5-5,8 y se caracteriza por presentar un crecimiento lento y dividido en dos fases: primera fase con una duración de 4 años en la cual la planta alcanza los 50 cm de altura y la segunda fase en la que adquiere un crecimiento más rápido y empieza a producir bayas. Posee flores blancas pequeñas bisexuales las cuales son las responsables de dar lugar a frutos rojos de drupa que miden alrededor de 2 a 3 cm de largo (Menéndez, 2021).

#### **Tabla 1**

##### *Clasificación taxonómica de la planta Synsepalum dulcificum*

<b>Clasificación taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filo</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Ericales</i>

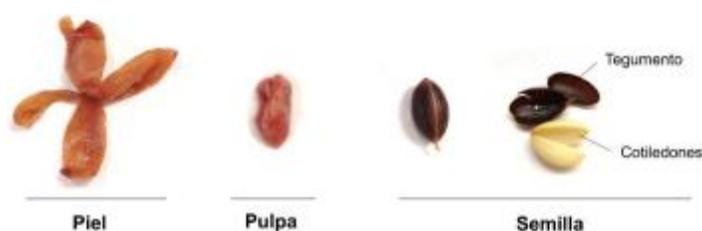
Clasificación taxonómica	
<b>Familia</b>	<i>Sapotaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Synsepalum</i>
<b>Especie</b>	<i>Synsepalum dulcificum</i>

*Nota.* Tomado de *Actividad biológica e inmunogénica de Synsepalum dulcificum para el desarrollo de alimentos funcionales* (p.28), por A. Menendez, 2021.

La baya se caracteriza por tener una cáscara gruesa y una gran semilla en su interior, de manera que su pulpa es muy escasa (**Figura 1**). La floración y fructificación se da de 2 a 3 veces por año, por lo general sucede en los meses de abril-mayo, julio-agosto y noviembre-octubre dando cantidades de frutos moderadas.

### Figura 1

*Partes de la baya de Synsepalum dulcificum: piel, pulpa y semilla*



*Nota.* El gráfico representa las partes del fruto milagroso. Tomado de *Actividad biológica e inmunogénica de Synsepalum dulcificum para el desarrollo de alimentos funcionales* (p.28), por A. Menendez, 2021.

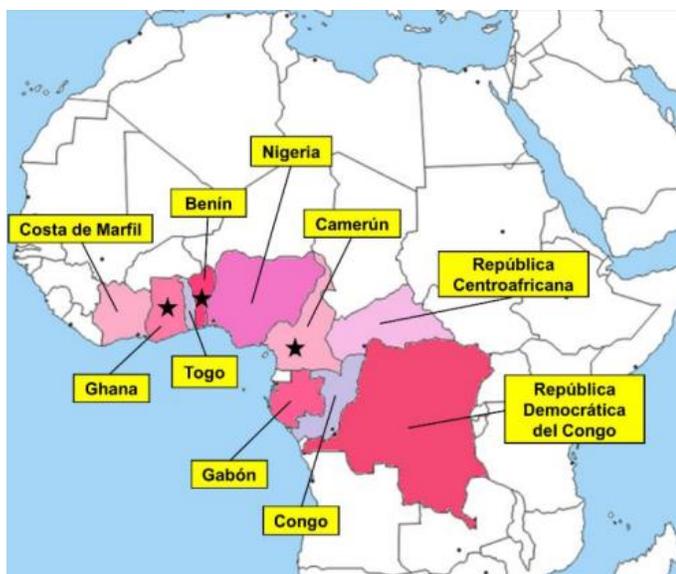
### Distribución geográfica

*Synsepalum dulcificum* es una planta autóctona del África occidental tropical, se ha distribuido ampliamente a lo largo de la costa del Golfo de Guinea. Esta especie se la puede encontrar de forma

natural en seis países africanos: Congo, Camerún, Nigeria, Ghana, Benín y Togo. La distribución geográfica de la especie se representa en la **figura 2**.

## Figura 2

*Distribución geográfica de Synsepalum dulcificum*



*Nota.* La estrella negra marca a aquellos países que presentan una mayor presencia de la planta.

Tomado de *Actividad biológica e inmunogénica de Synsepalum dulcificum para el desarrollo de alimentos funcionales* (p.28), por A. Menendez, 2021.

### **Plantación**

La germinación de *Synsepalum dulcificum* empieza en una turba ácida para luego ser plantada en un suelo negro con un pH de 6-7, con sombra parcial y con temperaturas cálidas por ser sensible al frío y esto trae como consecuencia un retardo en su crecimiento (Jouvin, 2016).

El suelo debe estar bien drenado con agua cada dos días y abonados. Como se mencionó anteriormente, esta planta tarda en desarrollarse entre tres y cuatro años para luego tener un

desarrollo más rápido, sin embargo, su cultivo inicia desde la semilla y para poder disfrutar de la primera cosecha, se debe esperar aproximadamente un año (Trees, 2014).

### Figura 3

*Baya del fruto milagroso*



*Nota.* Recolección las bayas del fruto milagroso previo a sus análisis. Elaboración propia

### Propiedades del fruto milagroso

#### *Características químicas*

**Acidez y pH.** El pH favorece a controlar la cantidad de microorganismos presentes en un alimento. Un pH bajo significa que el medio es ácido y algunos microorganismos no logran sobrevivir. Por otro lado, la acidez es la responsable de otorgar una sensación agradable o desagradable al paladar de las personas, si la acidez es mayor de 4g/L indica que el alimento va a tener un sabor demasiado ácido (Redagrícola, 2017).

La miraculina normalmente no es dulce a un pH de 7, pero a un pH más bajo se percibe dulce. Además, si la fruta es expuesta a un pH > 12 o <2,5 a una temperatura de 25 °C, la actividad modificadora de sabor de la miraculina se reduce, es por ello, que es recomendable mantener el pH a una temperatura de -14 °C y así la actividad de la glucoproteína se conservará en un tiempo estimado de tres meses.

**Humedad.** La humedad presente en un alimento es el indicador de estabilidad del mismo. La mayoría de alimentos tienen porcentajes de aguas ya definidos como el yogurt (80-90%), la leche (88%), carnes (60-75%) y productos secos (12%) (Córdor, 2019).

**Fibra.** La fibra está conformada por polisacáridos y representa cierta parte de los alimentos que no puede ser absorbida o digerida por el cuerpo humano, pero es indispensable en la dieta diaria siendo su consumo de 20-30 g/día. Sin embargo, existen dos tipos de fibra: fibra soluble que se encuentra principalmente en las pulpas, cáscara, hojas, frutos, vegetales y cebada y la fibra insoluble que se la encuentra en los cereales, trigo, legumbres, ciertos tipos de verduras y frutas. La fibra soluble favorece al crecimiento de la flora intestinal ya que es fermentada por bacterias presentes en el colon y al tener una elevada cantidad de agua, permite la formación de una solución viscosa en el intestino haciendo que la digestión sea más lenta. Por otro lado, la fibra insoluble ayuda con la absorción del agua, estimulando el tránsito intestinal favoreciendo su evacuación, es decir, previene el estreñimiento (Amadin, 2013).

**Grasa.** Las grasas o también llamados lípidos, son sustancias compuestas por triglicéridos lo que le da la propiedad de ser insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos como, por ejemplo, el metanol o cloroformo. Su fuente principal puede ser de origen animal o vegetal, siendo los más comunes el ácido oleico, linoleico, palmítico y esteárico (Gimondi, Mas & Mikels, 2007).

**Sólidos solubles.** El estado de madurez del fruto milagroso o, en otras palabras, el contenido de azúcares presentes se determina por medio de un refractómetro el cual permite la medición de los °Brix (Jouvin, 2016).

**Endulzante natural.** Los endulzantes naturales se dividen en los que contienen calorías como la miel, el jarabe de arce y la melaza y los que carecen de la misma como la estevia (Córdor, 2019).

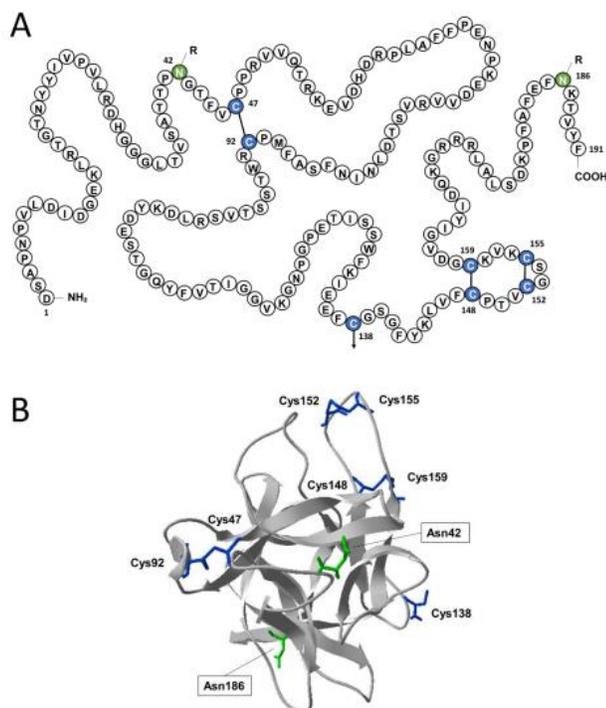
Antes de escoger un endulzante natural hay que considerar las calorías, el efecto que tiene el azúcar en la sangre, en la higiene bucal, entre otros beneficios. Igualmente, es importante tener en cuenta cuán natural es el endulzante como es en el caso de la estevia que proviene de la hoja de la planta de *Stevia* (Terán, 2015).

**Proteína.** Naturalmente, la fruta posee azúcares, lo cual le aporta un sabor dulzón característico. Esto no quiere decir que las bayas del fruto milagroso sean dulces por un contenido alto de azúcar, sino que se debe a que posee una glucoproteína llamada miraculina. Las glucoproteínas o también llamadas glicoproteínas, son redes de polipéptidos con cadenas laterales de sacáridos que se encuentran unidos entre sí por puentes disulfuro. Estas moléculas poseen un alto peso molecular produciendo reacciones anafilácticas severas, encontrándose en las membranas celulares como hormonas y anticuerpos.

**Miraculina.** El monómero de miraculina posee siete residuos de cisteína, de los cuales seis están involucrados en la adquisición de la estructura tridimensional mediante la formación de tres puentes disulfuro intracatenarios (Cys47-Cys92, Cys148-Cys159 y Cys152-Cys155, sin tener en cuenta el péptido señal) y una cisteína implicada en la dimerización de la proteína mediante un puente disulfuro intercatenario (Cys138, sin tener en cuenta el péptido señal) como se muestra en la **Figura 4A y B**. La zona glucídica representa un 13,9% del peso de la proteína y se encuentra conformada por dos cadenas de oligosacáridos unidas por enlaces N-glicosídicos a través de dos residuos de asparagina (Asn), Asn42 y Asn186 (Asn71 y Asn215, teniendo en cuenta el péptido señal).

#### **Figura 4**

*Estructura proteica de la glucoproteína miraculina encontrada dentro del fruto milagroso (Synsepalum dulcificum)*



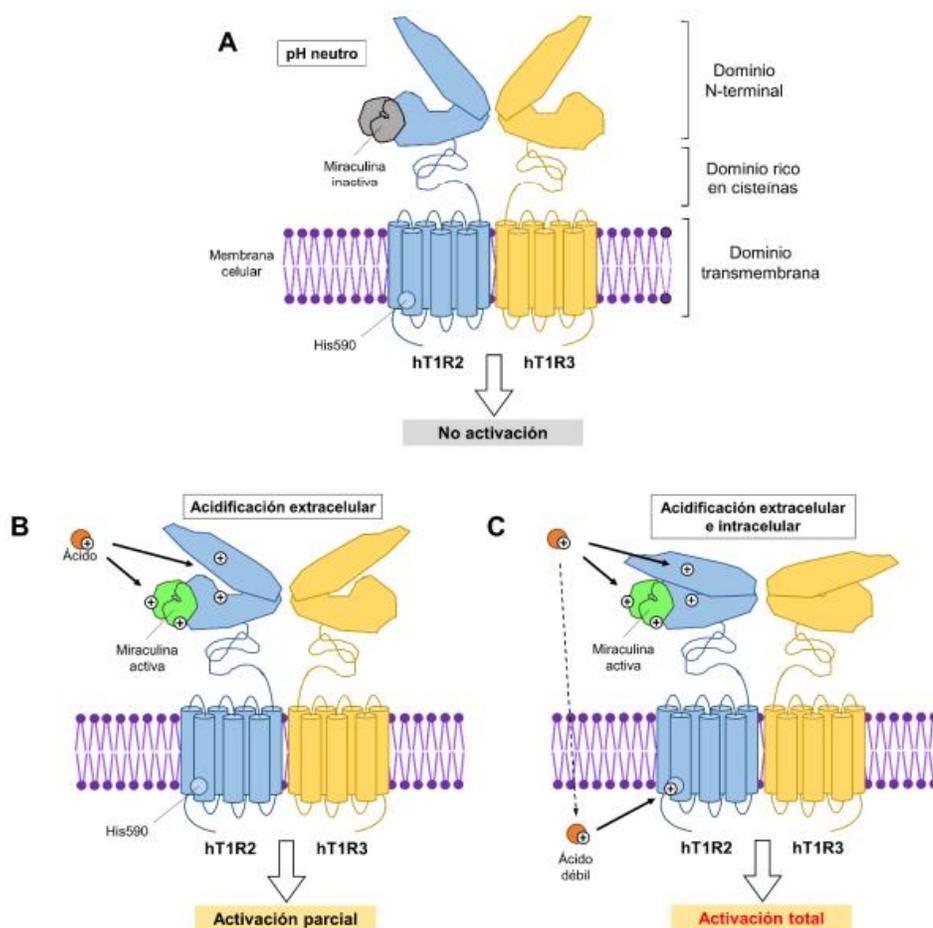
**Nota.** (A) Secuencia proteica sin incluir el péptido señal y (B) estructura tridimensional de la glucoproteína miraculina representada en *Swiss PDB Viewer*. Estructura obtenida de la base de datos SWISS-MODEL Repository (SMR) con el código C5NU63. Las asparaginas aparecen marcadas de color verde, implicadas en la unión a los oligosacáridos (Asn42 y Asn186) y las cisteínas que forman puentes disulfuro intramoleculares (Cys47 y 92, Cys148 y 159, Cys152 y 155) e intermoleculares (Cys138) de color azul. Tomado de *Actividad biológica e inmunogénica de *Synsepalum dulcificum* para el desarrollo de alimentos funcionales* (p.06), por A. Menendez, 2021.

**Mecanismo de acción.** La percepción del sabor dulce se encuentra mediada por los receptores del sabor tipo I (T1R), localizados en las papilas gustativas de la región apical de la lengua. El receptor del dulce está conformado por dos proteínas (hT1R2 y hT1R3). Según Sanematsu y colaboradores describen el mecanismo de acción de la miraculina cuando ingresa en la cavidad bucal como se muestra en la **Figura 5**. La miraculina activa los receptores del dulce (hT1R2 y hT1R3) de una manera dependiente del

pH (<6.5), debido a que no posee un sabor dulce por sí sola, sino que depende de la acidificación de la cavidad bucal para que ocurra el efecto edulcorante (Koizumi *et al.*, 2011).

**Figura 5**

*Modelo de mecanismo de acción de la miraculina*



**Nota:** (A) Una vez que la miraculina ingresa a la boca, se une al dominio N-terminal extracelular de la subunidad hT1R2 del receptor del dulce en su forma inactiva dado que el pH es neutro. (B) Cuando ocurre una bajada del pH por la ingesta de ácidos, se genera la activación parcial de la miraculina dando paso a una percepción moderada del sabor dulce, esto es gracias a que sucede una acidificación extracelular donde se protonan tanto la miraculina como la región extracelular de la subunidad hT1R2.

(C) Cuando se produce la acidificación intracelular por los ácidos débiles, se protona el residuo His590 del dominio transmembrana, conllevando a la activación total del receptor y a su vez una percepción del dulce más intensa. Tomado de *Actividad biológica e inmunogénica de Synsepalum dulcificum para el desarrollo de alimentos funcionales (p.09)*, por A. Menendez, 2021.

### **Composición de la pulpa de *Synsepalum dulcificum***

La pulpa es la parte comestible del fruto milagroso, siendo esta muy pequeña debido al gran tamaño de la semilla. Según Martínez *et al.* (2016), la cantidad de agua que posee la pulpa es del 65,33%, no contiene grasa y su contenido de azúcares es relativamente bajo por lo que se la considera para el tratamiento en pacientes con diabetes y obesidad. Esta baya posee un elevado contenido de fibra alimentaria (12,5 mg/100 g de peso fresco) y aporta vitaminas A y C. De igual manera, el contenido de compuestos fenólicos también es muy elevado, pero estos compuestos se concentran mayoritariamente en la cáscara (73,79 mg/g), mientras que en la pulpa su concentración es de 32,46 mg/g. Los principales compuestos fenólicos encontrados en esta baya son los flavonoides y antonianos, los cuales le contribuyen al fruto la capacidad antioxidante.

### **Compuestos bioactivos**

Los compuestos bioactivos son aquellas sustancias presentes en vegetales, aceites, frutas, pero con cantidades bajas. Cabe resaltar que estos compuestos bioactivos no son nutrientes, no obstante, son esenciales debido al efecto beneficioso sobre la salud de las personas ayudando a prevenir o reducir el riesgo de ciertas enfermedades. En su clasificación química se encuentran los polifenoles, carotenoides, lignanos, terpenos, flavonoides, antocianinas, entre otros (Córdor, 2019). En la **Tabla 2** se describe la clasificación de estos compuestos presentes en los alimentos.

### **Tabla 2**

*Clasificación de los componentes bioactivos*

Categoría	Subclase	Alimento	Color	
<b>Fenoles:</b> flavonoides, antocianinas, isoflavonas, ácidos gálicos	<b>Flavonoides</b>	Flavonas, isoflavonas	Papaya, melocotón, naranja	Naranja
		Antocianinas	Zanahoria, cebolla y frutos rojos	Morado azul
<b>Terpenos:</b> Carotenoides, limonoides	<b>Carotenoides</b>	Carotenos	Calabaza, zanahoria	Naranja
			Tomate, col, rábano, frutos rojos	Rojo
		Xantofilas	Lechuga, aguacate, manzana	Verde
<b>Tioles:</b> contienen azúfre	<b>Glucosinolatos</b>	Isocianatos y sulforafano	Brócoli, col, nabo	Verde
	<b>Súlfidos</b>		Ajo, cebollín, puerro	Blanco

Tomado de *Caracterización de compuestos bioactivos, físicos y químicos del fruto milagroso (Synsepalum Dulcificum) para aplicaciones agroindustriales* (p.20), Y. Córdor, 2019.

**Polifenoles.** Los polifenoles presentan una propiedad antioxidante, puesto que no son esenciales pues cumplen funciones importantes como la prevención de la diabetes, de enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Gracias a su propiedad antioxidante, los polifenoles protegen a las células del cuerpo de los radicales libres controlando la rapidez con la que envejecen. Además, son los encargados de otorgar colores llamativos a los vegetales, bayas y frutas, favoreciendo el sabor, amargura, aroma y estabilidad oxidativa. Dentro del cuerpo humano, los polifenoles contribuyen con reducir el envejecimiento, combatir células cancerosas, protección a la piel de los rayos ultravioleta, regulación de los niveles de azúcar en la sangre y protección del sistema cardiovascular (Mercola, 2015).

**Flavonoides.** Son pigmentos naturales presentes en vegetales, frutas y semillas que dan protección al organismo de los daños provocados por agentes oxidantes. Por lo general son

hidrosolubles, dando paso a la unión con azúcares que a su vez pueden ser metabolizados en el hígado y en el tracto intestinal. Los flavonoides tienen funciones importantes como, por ejemplo, inhibir la proliferación celular, poseen actividad anti alérgica y antibiótica, son antioxidantes y antiinflamatorios (Gil, 2010).

**Antocianinas.** Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles causantes del color rojo, azul o morado en las flores, los tallos, las hojas y los frutos. Generalmente, las antocianinas tienden a confundirse con los carotenoides debido a que ambos compuestos son los encargados de originar el color a las hojas y flores, pero su principal diferencia es que los carotenoides dan solamente el color rojo, anaranjado o amarillo y no son solubles, puesto que están unido las proteínas de los cloroplastos mientras que las antocianinas se encuentran unidas por un azúcar mediante un enlace glucosídico (Castañeda & Guerrero, 2015). Las principales funciones de las antocianinas benefician directamente a la planta debido a que les proporcionan protección contra los rayos UV, contaminación microbiana y viral y atracción de polinizadores (Córdor, 2019).

**Carotenoides.** Los carotenoides son un grupo de compuestos conocidos como fuente básica de pigmentos en las plantas donde predominan el color amarillo, anaranjado o rojo en tejidos no fotosintéticos y sintéticos. De los 750 tipos de carotenoides, los más estudiados son licopeno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ caroteno y xantofilas la luteína, zeaxantina y criptoxantina. Comúnmente se pueden obtener a partir de alimentos de origen animal pero también se encuentra en ciertas frutas como ésteres de ácidos grasos los cuales se disocia en el lumen intestinal. Según investigaciones realizadas por Gil 2010, determinó que el consumo elevado de carotenoides disminuye el riesgo de contraer ciertos tipos de cáncer y degeneración muscular. El carotenoide más estudiado en esta investigación fue el  $\beta$ -caroteno que además de ser un antioxidante y anticancerígeno, puede elevar la función inmunitaria (Córdor, 2019).

## Aplicaciones terapéuticas

Gracias a la capacidad transformadora que posee la fruta milagrosa, es posible su uso en el campo médico e industrial:

**Aplicación para la disgeusia.** La disgeusia es un trastorno del gusto, es decir, ocurre una percepción de sabor desagradable y persistente que en ocasiones se lo relaciona como de naturaleza metálica a corto o largo plazo. El origen de esta patología se deriva de infecciones del tracto respiratorio superior, oral y/o sinusal, de enfermedades como la diabetes, embarazos o por la ingesta de medicamentos como antiinflamatorios, diuréticos, antidiabéticos, anti parkinsonianos, anticonvulsivos, entre otros. Dicha patología se destaca por presentarse como efecto secundario en pacientes con cáncer que reciben tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia, cuya recuperación es lenta y gradual, tardando casi un año en recuperar los niveles normales de la percepción del sabor (Menéndez, 2021).

La industria farmacéutica no ha sido capaz de obtener un tratamiento o estrategia efectiva que no modifique su calidad de vida y hábitos alimenticios, pues es bien sabido que estos cambios conllevan consecuencias como la pérdida de peso o desnutrición del paciente. No obstante, se opta por la suplementación de micronutrientes como el hierro, ácido fólico y vitaminas, los cuales ayudan a contrarrestar el sabor metálico en la boca derivado de la quimioterapia (Menéndez, 2021).

Dentro de los tratamientos usados actualmente, destacan dos. El primer tratamiento consiste en el suplemento con zinc debido a que es un factor de la fosfatasa alcalina, siendo esta la enzima más abundante de las papilas gustativas. Varios estudios señalan la relación que existe entre la deficiencia de zinc y las alteraciones del gusto, puesto que genera cambios morfológicos y funcionales en las glándulas salivales produciendo disminución en el flujo salival y xerostomía (Howard, 2007). Sin embargo, el cuerpo humano contiene entre 1,5 y 2,5 g de este mineral y se recomienda ingerir de 12 a 15 mg/día, debido a que un exceso de zinc puede producir efectos biológicos a través de interacciones con el metabolismo ocasionando alteraciones gastrointestinales, afectar el sistema inmunitario y bajar los

niveles de HDL y de cobre (National Institutes of Health, 2022). Por otro lado, el segundo tratamiento utilizado actualmente es el fármaco Amifostina (Ethyol®). Es un agente citoprotector que favorece la eliminación de los radicales libres producidos por la quimioterapia y/o radioterapia. La investigación sugiere que puede mantener el flujo de saliva y mejorar la sequedad durante la radioterapia, pero también puede causar una variedad de efectos secundarios, como náuseas, vómitos y presión arterial baja (Menéndez, 2021).

**Aplicación para la diabetes.** La diabetes es una enfermedad crónica que resulta en niveles altos de azúcar en la sangre (hiperglucemia) debido a un desequilibrio en la insulina, la hormona que controla el azúcar en la sangre. Esto se debe principalmente a dos razones que definen dos tipos principales de diabetes: la primera y menos común causa es la síntesis de insulina muy baja o incluso nula, fenómeno conocido como diabetes tipo 1; mientras que la segunda, más común y fuertemente asociada con la obesidad, se debe a que el individuo desarrolla resistencia a la insulina, a esto se le llama tipo 2 diabetes. Dichos pacientes deben controlar minuciosamente la ingesta de azúcar en su dieta, ya que su consumo puede desregular fácilmente los niveles normales de azúcar en la sangre (Bustos-Saldaña et al., 2009; Borgnakke et al., 2018). Es por ello que el consumo de la baya milagrosa en la dieta de los pacientes diabéticos puede mejorar el manejo de esta enfermedad crónica al reducir la ingesta de azúcar y mejorar la alteración del gusto. Además, estudios recientes en ratones y ratas han demostrado que la baya mágica tiene un potencial antidiabético debido a que mejora la resistencia a la insulina (Chen, Liu, & Cheng, 2006) y provoca un efecto antihiperoglucémico (Obafemi, Olaleye, & Akinmoladun, 2019; Haddad et al., 2020). Esto podría posicionar a la baya milagrosa como un posible tratamiento para la diabetes, así como una forma de controlar la enfermedad.

**Aplicación como nuevo edulcorante natural.** Se ha demostrado que el consumo de azúcar y edulcorantes artificiales (aspartamo, sacarina, ciclamato) tiene efectos negativos para la salud y está asociado con un mayor riesgo de muerte. Específicamente, su consumo está fuertemente asociado con

la obesidad, la diabetes tipo 2 y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (Malik et al., 2010; Salgado et al., 2020). Para minimizar la ocurrencia de estas condiciones, la Organización Mundial de la Salud recomienda que la ingesta de azúcares libres sea inferior al 10% de la ingesta total de energía, equivalente a consumir hasta 25 g/día. Teniendo como ejemplo que una lata de Coca-Cola de 330 mL contiene un total de 35 g de azúcar, demuestra lo fácil que es superar los límites de salud antes mencionados. Por ello, es necesario buscar alternativas al azúcar y/o edulcorantes artificiales más saludables y es aquí donde el fruto milagroso puede jugar un papel muy importante, ya que es un edulcorante natural capaz de endulzar alimentos y bebidas de base ácida (Menéndez, 2021).

### **Tipo de conservación**

**Emulsión iónica.** También conocida como gelación iónica, es una técnica de encapsulación que utiliza materiales de recubrimiento, los cuales pueden ser gomas, carbohidratos, celulosas, lípidos, proteínas y materiales inorgánicos, y una solución reticulante como lo es el cloruro de calcio. Esta técnica se basa en producir gotas de una solución a partir de la mezcla entre el material de recubrimiento y el compuesto que se desea encapsular. El material de recubrimiento más usado es el alginato de sodio, debido a que este polímero es de fácil acceso, baja viscosidad y alta reactividad con los iones de calcio. El mecanismo de encapsulación externa se basa en generar gotas las cuales caen directo en un baño de iones de calcio, dando paso a unas cápsulas de gel de superficie rígida y núcleo blando. Su principal ventaja está en que no emplea altas temperaturas ni disolventes orgánicos (Ortiz et al., 2021).

## Capítulo III

### Metodología

#### Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” sede Santo Domingo.

#### Ubicación política

**País:** Ecuador

**Provincia:** Santo Domingo de los Tsáchilas

**Cantón:** Santo Domingo de los Colorados

**Parroquia:** Luz de América

**Dirección:** Santo Domingo, Av. Quevedo Km 24 margen izquierdo, Hacienda Zoila Luz

#### Ubicación geográfica

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Ciencias Químicas, laboratorio Biotecnología industrial y alimentaria y laboratorio de Bromatología y Microbiología en la universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” sede Santo Domingo.

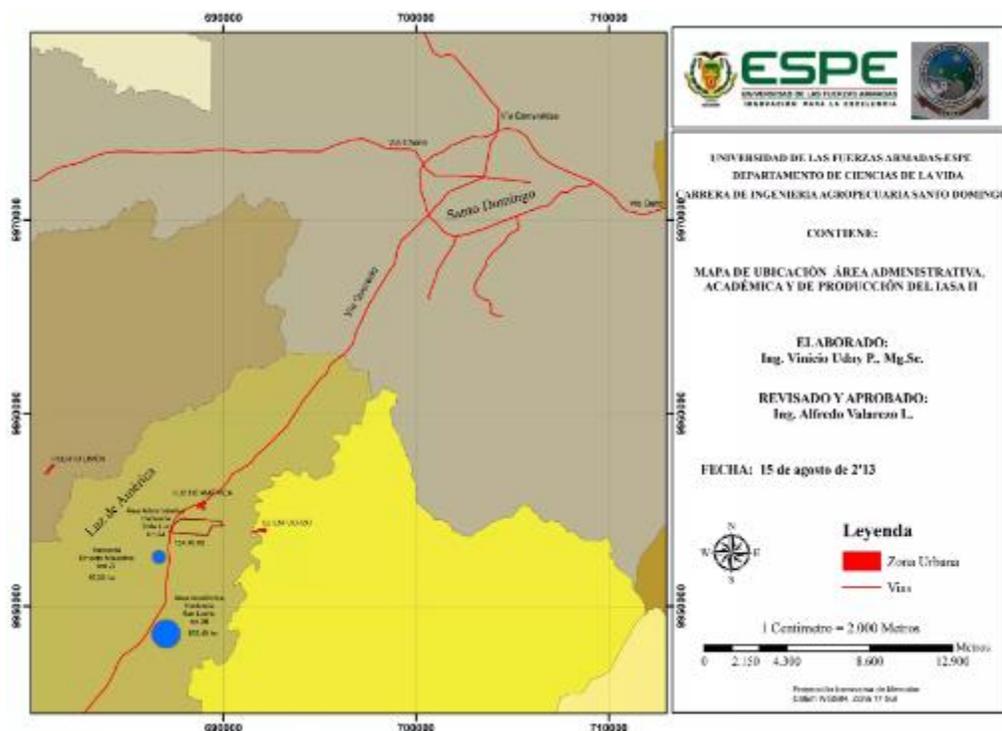
**Latitud:** 00° 24' 36"

**Longitud:** 79° 18' 43"

**Altitud:** 270 msnm

#### Figura 6

*Ubicación geográfica donde se realizó la investigación*



*Nota:* Mapa de la ubicación geográfica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Tomada de *Mapa ubicación espe santo domingo*, por V. Uday, 2014.

## Materiales

### *Extracción por Prensado en Frío*

**Tabla 3**

*Materiales utilizados en el método de extracción de Prensado en Frío*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestra
Extractor de jugos	Recipiente de vidrio estéril	Agua destilada	Muestra fresca de fruto milagroso
Congelador	Paño fino Espátula		

**Extracción por Maceración****Tabla 4***Materiales utilizados en el método de extracción por Maceración*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Balanza analítica	Frascos de vidrio ámbar estéril	Alcohol etílico al 70%	Muestra fresca de fruto milagroso
Estufa	Papel filtro		
Rotavapor			

**Extracción por método de Líquidos Presurizados (LP)****Tabla 5***Materiales utilizados en el método de extracción por Líquidos Presurizados (LP)*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Balanza analítica	Frascos de vidrio de tapa azul	Agua destilada	Muestra fresca de fruto milagroso
Autoclave	Papel filtro		

**Tabla 6***Materiales utilizados en el método conservación por extracto fluido.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
	Paño fino		Extracto de Fruto milagroso
	Recipiente de vidrio ámbar		

**Tabla 7**

*Materiales utilizados en el método conservación por extracto fluido.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Agitador magnético	Vaso de precipitación de 250 mL	Cloruro de calcio 11%	Extracto de Fruto milagroso
Pipeta automática	Espátula Recipiente de vidrio Puntas de pipeta	Alginato de sodio	

### ***Determinación de Acidez Titulable***

**Tabla 8**

*Materiales utilizados en el ensayo de determinación de Acidez Titulable*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Balanza analítica	Mortero	Solución 0,1 N de hidróxido de sodio	Extracto de fruto milagroso + método de conservación
Potenciómetro	Matraz Erlenmeyer de 250 mL		
Agitador magnético	Balón de aforo de 250 mL		
Baño maría	Embudo		
Equipo de titulación	Mortero		

### ***Determinación de pH***

**Tabla 9**

*Materiales utilizados en el ensayo de determinación de pH*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Potenciómetro	Matraz Erlenmeyer de 250 mL		Extracto de fruto milagroso + método de conservación
Baño María			

### ***Determinación de sólidos solubles (SS)***

**Tabla 10**

*Materiales utilizados en el ensayo de determinación de Sólidos Solubles (SS)*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Refractómetro	Matraz Erlenmeyer de 250 mL		Extracto de fruto milagroso + método de conservación
Baño María			

### ***Determinación de Humedad***

**Tabla 11**

*Materiales utilizados en el ensayo de determinación de Humedad*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Balanza analítica	Crisoles de porcelana		Muestra fresca de fruto milagroso
Estufa	Espátula		
Desecador	Pinza		

**Determinación de flavonoides****Tabla 12***Materiales utilizados en el ensayo de determinación de flavonoides*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Espectrofotómetro	Micropipeta	Nitrito de sodio al 5%	Muestra fresca de fruto milagroso
Baño maría	Espátula	Hidróxido de Sodio 1 N	
Agitador vortex		Cloruro de aluminio al 10%	
Centrífuga		Acetona	
Balanza analítica		Ácido Fórmico	
Baño ultrasónico			

**Determinación de proteína bruta****Tabla 13***Materiales utilizados en el ensayo de determinación de proteína bruta*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Balanza analítica	Matraz Erlenmeyer de 250 mL	Ácido sulfúrico concentrado 96%	Extracto de fruto milagroso + método de conservación
Equipo digestor	Tubos de destilación	Solución de hidróxido de sodio al 35%	
Sorbona o extractor de humos	Gotero	Solución de Ácido Bórico al 2%	
Agitador magnético	Mortero	Solución de Ácido Clorhídrico 0,1 N	
Equipo de titulación		Tabletas catalizadoras	

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestra
Equipo de destilación		Indicador Kjeldahl	

### ***Determinación de Fibra***

**Tabla 14**

*Materiales utilizados en el ensayo de determinación de fibra*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestra
Balanza analítica	Crisoles porosos	Ácido sulfúrico 0,128 M	Extracto de fruto milagroso + método de conservación
Bomba de vacío	Mortero	Hidróxido de Sodio 0,223 M	
Estufa	Picetas	Octanol	
Mufla	Pipetas	Acetona	
Desecador	Probeta de 100 mL		
	Matraz Kitasato		
	Algodón de vidrio		

### ***Determinación de porcentaje de grasa u oleorresina por método Soxhlet***

**Tabla 15**

*Materiales utilizados en el ensayo de determinación de porcentaje de grasa*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestra
Balanza analítica	Vasos Beaker para grasa	Éter de petróleo	Extracto de fruto milagroso + método de conservación
Estufa	Dedales de extracción	Éter Etílico	

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestra
Equipo Goldfish	Porta Dedales		
Desecador	Vasos de para recuperación del solvente		
	Pinza universal		
	Algodón		

## Métodos

### Métodos de extracción

#### *Extracción por método de Prensado en Frío*

**Preparación de la muestra.** Para la preparación de la muestra se limpió, lavó y desinfectó el fruto. Luego se almacenó en refrigeración a una temperatura de - 15 °C

**Procedimiento.** Se utilizó un extractor de jugos Oster de 1,25 L. Luego de almacenar la muestra durante 24 horas a - 15 °C, se colocaron 100 gr de Fruta congelada en el equipo y se añadieron 100 mL de agua destilada. Luego filtramos con un paño fino limpio el extracto obtenido y se mantuvo en refrigeración a 5 °C.

#### *Extracción por método de Maceración*

**Preparación de la muestra.** Se limpió, lavó y desinfectó. Se pesaron 50 g de la fruta y se secaron en la estufa por 24 h a 60 °C.

**Procedimiento.** Se molió la fruta seca y se colocó dentro de un recipiente de vidrio ámbar estéril, se añadió alcohol etílico al 70 % hasta cubrir totalmente la fruta. Se agitó el frasco 3 veces al día durante un periodo de 7 días. Luego de pasado el periodo, se filtró el contenido utilizando una tela estéril y un papel filtro. Por último, se evaporó el contenido alcohólico filtrado utilizando un rotavapor a 270 ámbar de presión, a 40 °C y 100 rpm.

### ***Extracción por método de Líquidos presurizados (LP)***

**Preparación de la muestra.** Para la preparación de la muestra se limpió, lavó y desinfectó el fruto.

**Procedimiento.** Se pesaron 70 gr de material fresco, se colocaron dentro de una botella de tapa azul de vidrio, resistente al calor y la presión; y se añadieron 100 mL de agua destilada. Se colocó la botella dentro del autoclave manteniendo una temperatura de 100 °C durante 30 min a 60 bar de presión. Se dejó enfriar el extracto y se filtró con la ayuda de una tela estéril y papel filtro.

### **Métodos de conservación**

#### ***Extracto fluido***

**Preparación de la muestra.** Se tomaron los extractos obtenidos por métodos de extracción y dejaron a temperatura.

**Procedimiento.** Se filtró nuevamente la muestra extraída y se colocó dentro de un gotero de vidrio ámbar.

#### ***Emulsión iónica***

**Preparación de la muestra.** Se tomaron los extractos obtenidos por métodos de extracción y dejaron a temperatura.

**Procedimiento.** Se elaboró 100 mL de solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 11%. Se añadió la solución a un vaso de precipitación y se la colocó en un plato de agitación. Se tomaron 50 mL del extracto de fruto milagroso y se añadieron 1 gr de alginato de sodio con el objetivo de tener una solución al 2%. Se recortó la punta de una pipeta automática para aumentar el tamaño de las esferas de emulsión iónica que se obtuvo. Se tomaron 750  $\mu\text{L}$  del extracto con el alginato de sodio y de manera rápida se dejó caer en la solución de cloruro de calcio al 11% mientras que se mantenía en constante

agitación. Una vez formadas las esferificaciones se lavaron con agua destilada y almacenaron en un recipiente de vidrio.

### Diseño experimental

#### *Niveles y factores del experimento*

**Tabla 16**

*Factores y niveles a probar en la determinación de características fisicoquímica y compuestos bioactivos del fruto milagroso (Synsepalum dulcificum) para la obtención de extractos, considerando distintos métodos de extracción y conservación.*

<b>Factores</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
Métodos de extracción (A)	a0	Prensado en frío
	a1	Maceración
	a2	Líquidos presurizados
Métodos de conservación (B)	b0	Extracto fluido
	b1	Emulsión iónica

#### *Tratamientos a comparar*

**Tabla 17**

*Diseño de la investigación siendo un diseño bifactorial (AxB) donde El factor A contiene 3 tratamientos y el factor B 2 tratamientos*

<b>N°</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>
T1	a0b0	Prensado en frío + extracto fluido
T2	a0b1	Prensado en frío + emulsión iónica
T3	a1b0	Maceración + extracto fluido
T4	a1b1	Maceración + emulsión iónica

N°	Materiales/insumos	Reactivos
T5	a2b0	Líquidos presurizados + extracto fluido
T6	a2b1	Líquidos presurizados + emulsión iónica

### ***Tipo de diseño experimental aplicado***

En el presente estudio se aplicó un análisis estadístico con un ANOVA DBCA (Diseño de bloques completos al azar) con un arreglo factorial AxB (3x2)

### ***Repeticiones***

El diseño experimental se realizó utilizando 3 réplicas por cada tratamiento obteniendo un total de 18 unidades experimentales.

### ***Análisis estadístico***

**Tabla 18**

*Determinación del error experimental en el diseño AxB*

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Método de extracción	a-1	2
Método de conservación	b-1	1
Método de extracción x método de conservación	(a-1)(b-1)	2
Réplicas	r-1	2
Error experimental	gt-Σgl	10
Total		17

### ***Análisis funcional***

Para evaluar la diferencia significativa entre las variables presentadas se aplicó una prueba de significancia de Tukey ( $p < 0,05$ )

## **Variables evaluadas**

### ***Determinación de Acidez Titulable***

Se determinaron la acidez las muestras utilizando la norma INEN 0381:1985

**Preparación de la muestra. *Productos líquidos o fácilmente filtrables.*** Se mezcló convenientemente la muestra y filtró utilizando papel filtro. Se colocaron 25 mL del líquido filtrado en un matraz volumétrico de 250 mL y se aforó con agua destilada perfectamente hervida, mezclando perfectamente la solución (INEN, 1985).

***Productos densos o difíciles de filtrar.*** Se trituró la muestra en un mortero, en esta parte en lugar de triturar, se la aplastó en el vaso de precipitación con agua destilada debido a que es una emulsión iónica. Se transfirió la muestra a un vaso de precipitación colocando 25 mL de agua destilada caliente para luego llevar a hervir durante 3 minutos, se transfirió el contenido a un matraz volumétrico de 250 mL y se aforó con agua destilada. Por último, se mezcló y filtró la muestra (INEN, 1985).

**Procedimiento.** Para la determinación de la acidez se realizó por duplicado la misma prueba, se comprobó la correcta calibración del potenciómetro. Se lavó el electrodo de vidrio varias veces con agua destilada hasta obtener una lectura aproximada de 6. Colocamos en un matraz Erlenmeyer de 25 a 100 mL de la muestra preparada, en el caso del extracto fluido se colocaron 50 mL y en las emulsiones iónicas se colocaron 25 mL debido a la cantidad que se disponía de las mismas. Con cuidado y lentamente se añadió hidróxido de sodio 0,1 N agitando constantemente registrando los datos del pH cada 0,5 mL hasta alcanzar un pH de 8,3 aproximadamente. Finalmente, se realizó la interpolación de los datos, para establecer el volumen exacto de solución 0,1 N de hidróxido de sodio añadido, correspondiente al pH 8,1 (INEN, 1985). Para la determinación de la acidez titulable se utilizó la siguiente fórmula:

$$Acidez = \frac{(V1 \times N1 \times M)10}{V2}$$

Donde:

A = g de ácido en 1000 mL de producto

V1 = mL de NaOH utilizados en la titulación

N1 = Normalidad de la solución de NaOH

M = Peso molecular del ácido considerado como referencia

### ***Determinación de pH***

**Preparación de la muestra.** Se realizó la determinación del pH por medio del método potenciométrico, para ello se lavó, limpió y desinfectó la muestra; luego se realizó la obtención del extracto por medio de los diferentes métodos de extracción. Para las muestras con el método de conservación de emulsión iónica, tomaron 10 gr de la muestra y se hirvió en agua destilada durante 3 min para luego realizar las lecturas en el potenciómetro.

**Procedimiento.** Se calibró el potenciómetro a pH 7 sumergiéndose en una solución buffer. Se lavó el potenciómetro con agua destilada y se secó. Se insertó el electrodo dentro del extracto y se registró su valor de pH. Se realizaron lecturas por duplicado para cada muestra

### ***Determinación de Sólidos Solubles (SS)***

**Preparación de la muestra.** Se determinaron los grados brix por medio del uso de un refractómetro. Para ello se limpió, lavó y desinfectó; luego se obtuvo el extracto mediante los distintos métodos de extracción y se mantuvo a una temperatura aproximada de 25 °C

**Procedimiento.** Se limpió correctamente el refractómetro con agua destilada y algodón, luego se tomaron 3 mL de la muestra aproximadamente y se colocaron en el lente del refractómetro. Se cerró

la cubierta del lente y se procedió a observar los grados brix de la muestra. Esto se realizó por duplicado para cada tratamiento

### ***Determinación de Humedad***

Se determinaron los porcentajes de humedad las muestras utilizando la norma INEN 1676:2013

**Preparación de la muestra.** Para la preparación de la muestra se limpió, lavó y desinfectó; luego se la mantuvo a una temperatura aproximada de 25 °C

**Procedimiento.** Se calentó el crisol de porcelana durante 30 min en la estufa, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego pesar los crisoles. Se homogeneizó la muestra, se pesaron 2 gr de muestra y se colocaron en los crisoles. Se colocaron en la estufa a 130 °C por 2 h. Se dejaron enfriar los crisoles en el desecador por media hora y se pesó cada uno de ellos con una balanza de precisión. Se realizó este ensayo por duplicado (INEN, 2013). Para la determinación de Humedad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Donde:

W0 = Peso de la muestra en gr

W1 = Peso del crisol más la muestra después del secado

W2 = Peso de la muestra antes del secado

### ***Determinación de flavonoides***

Se realizó la determinación de la concentración de flavonoides totales en base al método descrito por Popa, Radu y Jean- François (2020).

**Preparación de la muestra.** Se pesaron 0,3 gr de la muestra liofilizada en 3 tubos de ensayo. Luego se añadió 5 mL de la solución extractora que se compone de acetona:agua destilada: Ac. Fórmico en relación 70:30:0.1. Tapamos y agitamos los tubos en el vortex durante 5 min. Luego se llevaron las muestras al ultrasonido durante 10 minutos y se colocaron las muestras a la centrifuga durante 10 min y se pasó únicamente la parte líquida a un balón de aforo de 25 mL, se repitieron los lavados en los mismos tubos unas 3 veces más y se aforó con agua destilada.

**Procedimiento.** Se tomó 1 mL de la muestra diluida y se añadieron 4 mL de agua bidestilada, se procedió a mezclar. Luego se añadieron 0,3 mL de nitrito de sodio al 5%, agitamos en el vortex durante 5 minutos, añadimos 0,3 mL de cloruro de aluminio al 10% y esperamos 5 min. Se adicionaron 2 mL de NaOH 1N, la solución cambió de amarillo a rosado; se aforó con agua destilada hasta 10 mL y se mezcló la muestra. Llevamos las muestras al espectrofotómetro y medimos la absorbancia con una longitud de onda de 490 nm (Popa, Radu & Jean- François, 2020). Para la determinación del contenido total de flavonoides se utilizó la siguiente fórmula:

$$TFC = \frac{C \times DF \times V}{M}$$

Donde:

TFC = Contenido total de flavonoides (mg EQ / g de muestra seca)

C = Concentración de Quercetina (mg EQ / mL)

DF = Factor de dilución

V = Volumen de la extracción

M = Masa de la muestra utilizada para la extracción

### ***Determinación de Proteína Bruta***

Se determinaron los porcentajes de las muestras utilizando la norma INEN 16 con muestra de extracto fluido y emulsión iónica.

**Preparación de la muestra.** Para la preparación de la muestra primero se limpió, lavó y desinfectó. Luego mediante cada uno de los métodos de extracción y conservación se obtuvieron los tratamientos a los cuales se les realizó el ensayo.

**Digestión.** Se pesaron aproximadamente 0,3 gr de muestra y se colocaron en el microtubo digestor, se añadió una tableta catalizadora Kjeldahl y 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Luego se colocaron los tubos de digestión con las muestras en el digestor Kjeldahl con el colector de humos encendido, se realizó la digestión a una temperatura de 420 °C durante 40 min. Pasado el tiempo se dejó enfriar la muestra a 200 °C para finalmente sacar la muestra del digestor y dejarlas enfriar un tiempo más (INEN, 1983).

**Destilación.** En cada tubo digestor se agregaron 10 mL de agua destilada, se colocaron el tubo digestor y el matraz de recepción con 50 mL de ácido Bórico al 2% en el sistema de destilación. Se encendió el equipo de destilación Kjeldahl y se adicionaron 30 mL de NaOH al 40% supervisando que exista un flujo normal de agua, se recogieron aproximadamente 200 mL de la muestra destilada, se apagaron los sistemas y retiraron los accesorios (INEN, 1983).

**Titulación.** En un vaso de precipitados se colocaron volúmenes 1;1 del reactivo A y B respectivamente para elaborar el indicador, añadimos 3 gotas del indicador en el matraz con el destilado para luego realizar la titulación con ácido clorhídrico 0,1 N utilizando un plato agitador hasta que la solución se tornó un rosa transparente. Se registraron los volúmenes consumidos (INEN, 1983). Para determinar el porcentaje de proteína se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%PB = \frac{(VHCL - Vb) \times 1,401 \times NHCL \times F}{gr \text{ de muestra}}$$

Donde:

1,401 = Peso atómico del nitrógeno

NHCl = Normalidad del ácido Clorhídrico 0,1 N

F= Factor de conversión (6,25)

VHCl = Volumen de ácido Clorhídrico consumido en la titulación

Vb = Volumen del blanco

### ***Determinación de fibra***

Para la determinación de fibra presente en la baya se usó la norma INEN 522:2013

**Preparación de la muestra.** Para la preparación de la muestra primero se limpió, lavó y desinfectó; luego se molió la muestra hasta obtener un tamaño de 1mm.

**Procedimiento de extracción de Fibra.** Se colocaron en cada uno de los crisoles algodón de vidrio intentando cubrir el interior del crisol y evitando que salga del límite del crisol. Se pesaron y colocaron 2 gr de la muestra en cada crisol poroso y se introdujeron en el Dosi-Fiber (INEN, 2013).

**Hidrólisis ácida en caliente.** Se aseguró de que las válvulas estuvieran en la posición “cerrada”, se añadieron de 100 a 150 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en cada columna y 3 gotas de octanol (antiespumante). Abrimos el circuito de refrigeración y activamos las resistencias calefactoras al 90%. Esperamos a que hierva y reducimos el potencial al 30%; dejamos hervir por 30 min. Se detuvo la calefacción y abrimos el circuito de vacío, se puso los mandos de la válvula en posición en “Adsorción”). Lavamos con agua destilada caliente y filtramos, realizamos este lavado dos veces. Para el proceso de hidrólisis básica en caliente se realizó el mismo procedimiento utilizando NaOH (INEN, 2013).

**Extracción en frío con acetona.** Este proceso no se realiza en el equipo Dosi-Fiber. Se preparó un matraz Kitasato con un equipo de vacío. Situamos el crisol en la entrada del Kitasato y añadimos acetona a la vez que el equipo de vacío estaba vacío, absorbiendo la acetona hacia el frasco. Se repitió el proceso unas 3 veces. Luego se dejó secar en la estufa a 150 °C durante una hora y se dejó enfriar en el desecador. Se pesaron los crisoles en una balanza analítica (INEN, 2013). Para determinar el porcentaje de fibra se utilizó la siguiente ecuación

$$\%Fibra\ bruta = \frac{w1 - w2}{w0} \times 100$$

Donde

W0 = Peso de la muestra

W1 = Peso del crisol + Muestra seca

W2 = Peso del crisol + Muestra calcinada

#### ***Determinación de grasa u oleoresina por método Soxhlet***

Para la determinación de grasa total, se basó en el procedimiento de la norma INEN 541:1980

**Preparación de la muestra.** Para la preparación de la muestra primero se limpió, lavó y desinfectó para luego dejarla secar 12 h a 100 °C hasta eliminar toda la humedad. Luego con un mortero se molió la muestra hasta que las partículas tuvieran un tamaño aproximado de 1 mm (INEN, 1980).

**Procedimiento.** La determinación de grasa total se realizó por duplicado. Se lavó y secó cuidadosamente el matraz de extracción en la estufa a 103 °C durante 30 minutos y se dejó en el desecador para luego pesarlos vacíos individualmente. Se pesaron aproximadamente 9 gr de la muestra seca y se envolvieron con papel filtro de forma que no se perdiera la muestra, luego se colocaron dentro de los cartuchos de extracción, se colocó algodón en la parte superior de los cartuchos y se introdujeron

en el equipo extractor. Se agregaron en el extractor Soxhelt 50 mL de éter de petróleo por cada matraz de extracción, se conectaron los matraces al extractor y se encendió el equipo. Se dejó efectuar la extracción de 3 a 4 horas. Una vez terminada la extracción, se retiraron los cartuchos y los matraces del equipo. Para eliminar los restos de éter de petróleo, se colocaron 30 minutos en la estufa a una temperatura de 100 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se pesaron los matraces en una balanza analítica. Se realizó el mismo ensayo utilizando Éter Etílico (INEN, 1980). Para determinar el contenido de grasa se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%Grasa = \frac{M1 - M2}{M} \times 100$$

Donde:

G = Cantidad de grasa en el alimento

M1 = Masa del matraz de extracción con la materia grasa extraída

M2 = Masa del matraz de extracción vacío

M = Masa del material seco tomada para el ensayo

### ***Recuento microbiano en petrifilm™***

El recuento de colonias de microorganismo se realizó con los tratamientos obtenidos. En la cámara de flujo laminar se realizaron diluciones seriadas hasta el factor de dilución de  $10^{-3}$  con agua de peptona. Se colocaron 3 tubos con 9 mL de agua de peptona en cada uno y se realizaron las diluciones seriadas. Se colocó 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en petrifilms aerobios, mohos y levaduras realizando 2 repeticiones por cada dilución. Se llevaron a incubar a 38 °C durante 48 h en el caso de los petrifilms para microorganismos aerobios; y a 25 °C durante 72 horas para los petrifilms de mohos y levaduras. Se realizó el conteo de colonias y se utilizó la siguiente fórmula para el conteo microbiano.

$$\left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}\right) = \frac{n * f}{v}$$

Donde:

n= número de colonias por placa

f= factor de dilución

v= volumen inoculado en la placa

## Capítulo IV

### Análisis e interpretación de los resultados

#### Resultados

#### Análisis de las características del fruto milagroso

Tabla 19

*Resultados del análisis de las propiedades físico-químicas y compuestos activos del fruto milagroso*

Propiedades	Muestra	Resultados
Humedad	Muestra fresca de fruto milagroso	41,98%
Fibra	Muestra liofilizada de fruto milagroso	1,019 %
Oleoresina	Semilla de fruto milagroso	5,11%
pH	Muestra fresca de fruto milagroso	3,68
Solidos solubles	Muestra fresca de fruto milagroso	10,5 °brix
Flavonoides	Muestra liofilizada de fruto milagroso	0,03 mg eq/g m. seca

Se observa en la **tabla 19** los resultados obtenidos a partir del análisis de fruto milagroso en los parámetros de humedad, fibra, flavonoides, oleorresina, pH y sólidos solubles. El valor de la humedad dio como resultado 41,98%, para el parámetro de fibra dio como resultado 1,019%. En el caso del porcentaje de grasa u oleorresina dio como resultado 5,11% de porcentaje de grasa. El pH del fruto en fresco fue de 3,68 y los sólidos solubles fue de 10,5 °brix. Se realizó el análisis de compuestos bioactivos, en este caso flavonoides, tomando en cuenta una curva de calibración de catequina dio como resultado 0,069 mg eq/ g de materia seca.

### **Análisis de varianza para los ensayos fisicoquímicos**

#### ***Análisis de varianza para el pH***

**Tabla 20**

*Análisis de varianza para el pH de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso*

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:M. extracción	0,3801	2	0,19005	19,78	<b>0,0003</b>
B:M. conservación	0,00293889	1	0,00293889	0,31	0,5924
C:Réplica	0,0169	2	0,00845	0,88	0,4449
INTERACCIONES					
AB	0,164811	2	0,0824056	8,57	<b>0,0068</b>
RESIDUOS	0,0961	10	0,00961		
TOTAL (CORREGIDO)	0,66085	17			

*Nota:* valor  $p < 0,05$

En la **Tabla 20** se observa el análisis de varianza para el pH en los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso. Se observa que existe diferencia significativa en el factor A (métodos de extracción); y en la interacción A\*B. Asimismo, se observa que no existió diferencia significativa en cuanto al factor B (métodos de conservación); y en las réplicas, eso implica que existió normalidad en la toma de datos.

### **Análisis de varianza para los Sólidos Solubles (SS)**

**Tabla 21**

*Análisis de varianza para los sólidos solubles de los métodos de extracción y conservación del fruto*

*milagroso*

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:M. extracción	3635,7	2	1817,85	465,85	0,0000
B:M. conservación	95,22	1	95,22	24,40	0,0006
C:Réplica	1,08444	2	0,542222	0,14	0,8719
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	93,63	2	46,815	12,00	0,0022
RESIDUOS	39,0222	10	3,90222		
TOTAL (CORREGIDO)	3864,66	17			

En la **Tabla 21** se observa el análisis de varianza para sólidos solubles en los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso. Se observa que existe diferencia significativa en el factor A (métodos de extracción); factor B (métodos de conservación); y en la interacción A\*B, lo que denota que tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el los °brix. Existió normalidad en la toma de datos.

### **Análisis de varianza para la Absorbancia**

**Tabla 22**

*Análisis de varianza para la absorbancia de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso*

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:M. extracción	8,30094	2	4,15047	47385,78	0,0000
B:M. conservación	5,10082	1	5,10082	58235,90	0,0000
C:Réplica	7,77778E-7	2	3,88889E-7	0,00	0,9956
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,272233	2	0,136116	1554,04	0,0000
RESIDUOS	0,000875889	10	0,000875889		

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
TOTAL (CORREGIDO)	13,6749	17			

En la **Tabla 22** se observa el análisis de varianza para absorbancia en los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso. Se observa que existe diferencia significativa en el factor A (métodos de extracción); factor B (métodos de conservación); y en la interacción A\*B. Además, No existió diferencia significativa en las réplicas, lo que implica que existió una normalidad en la toma de datos.

### ***Análisis de varianza para la Proteína Bruta (%)***

**Tabla 23**

*Análisis de varianza para la Proteína Bruta (%) de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso*

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:M. extracción	6,62127	2	3,31063	251,12	0,0000
B:M. conservación	38,7203	1	38,7203	2937,00	0,0000
C: Réplica	0,000638896	2	0,000319448	0,02	0,9761
INTERACCIONES					
AB	7,32024	2	3,66012	277,63	0,0000
RESIDUOS	0,131836	10	0,0131836		
TOTAL (CORREGIDO)	52,7943	17			

En la **Tabla 23** se observa el análisis de varianza para la proteína bruta en los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso. El factor A (métodos de extracción); factor B (métodos de conservación); y la interacción A\*B, tienen un efecto estadísticamente significativo. Se muestra que no hubo diferencia significativa en cuanto a réplicas, es decir, que existió normalidad en la toma de datos.

### ***Análisis de varianza para la Acidez***

**Tabla 24**

*Análisis de varianza para la Acidez de los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso*

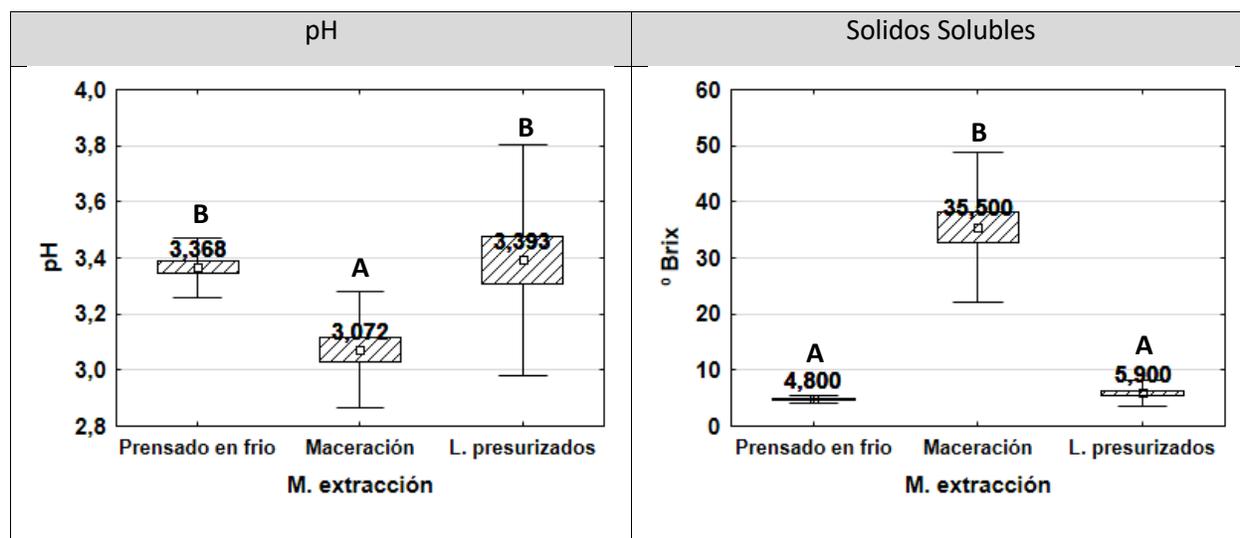
<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:M. extracción	0,00001103	2	0,00000551502	107,83	<b>0,0000</b>
B:M. conservación	0,000141512	1	0,000141512	2766,85	<b>0,0000</b>
C:Réplica	4,14411E-7	2	2,07206E-7	4,05	0,0514
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,00000193124	2	9,65622E-7	18,88	<b>0,0004</b>
RESIDUOS	5,11456E-7	10	5,11456E-8		
TOTAL (CORREGIDO)	0,000155399	17			

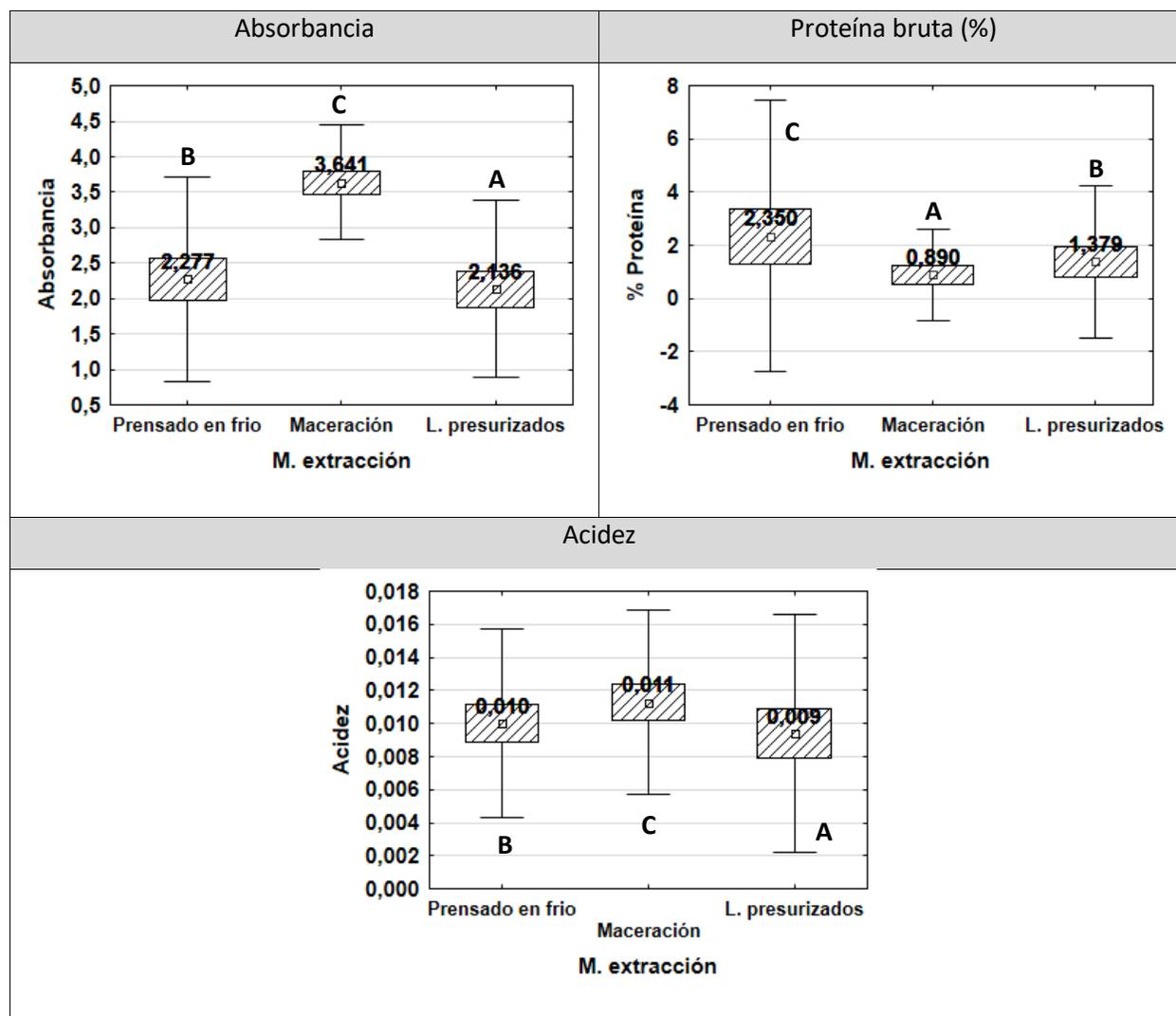
En la **Tabla 24** se observa el análisis de varianza para la acidez en los métodos de extracción y conservación del fruto milagroso. Se muestra que existe diferencia significativa en el factor A (métodos de extracción); factor B (métodos de conservación); y la interacción A\*B. Además, en las réplicas no existió diferencia significativa, lo que quiere decir que existió normalidad en la toma de datos.

**Resultados del estudio de tres métodos de extracción (Factor A). Tukey  $p < 0,05$ .**

**Figura 7**

*Prueba de significancia de Tukey para resultados de análisis bromatológicos (Factor A: Métodos de extracción)*





**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En la **Figura 7** en cuanto a pH se observa 2 grupos independientes: con valor más alto el grupo B (**a0**: prensado en frío 3,368 pH; **a2** L. presurizados 3,393 pH) y valores inferiores en el grupo A (**a1**: maceración 3,072 pH).

Con respecto a los sólidos solubles se observan 2 grupos independientes: el grupo B (**a1**: maceración 35,500 °brix) con el valor más y el grupo A (**a0**: prensado en frío 4,800 °brix; **a2**: L. presurizados 5,900 °brix) con el más bajo.

En la absorbancia se observan 3 grupos independientes: los valores más altos en el grupo C (**a1**: maceración 3,641 abs) y los más bajos en el grupo A (**a2**: L. presurizados 2,136 abs).

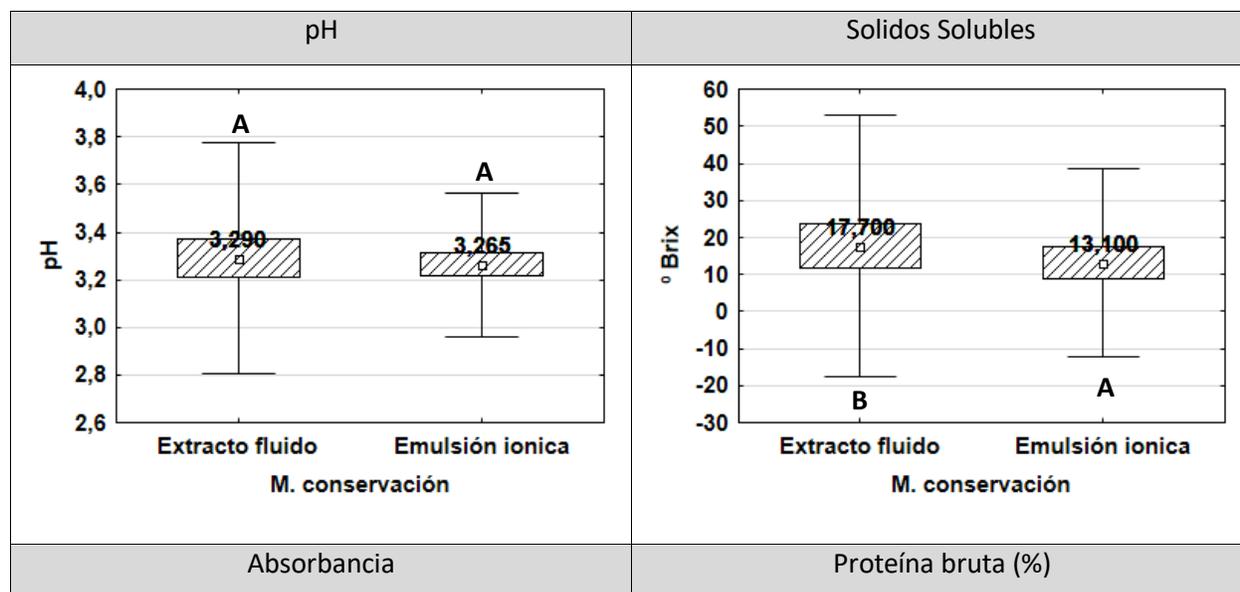
En la variable de porcentaje de proteína bruta se observan 3 grupos independientes: el valor más alto en el grupo C (**a0**: prensado en frío: 2,350 %) y el valor más bajo lo obtuvo A: (**a1**: maceración 0,890 %).

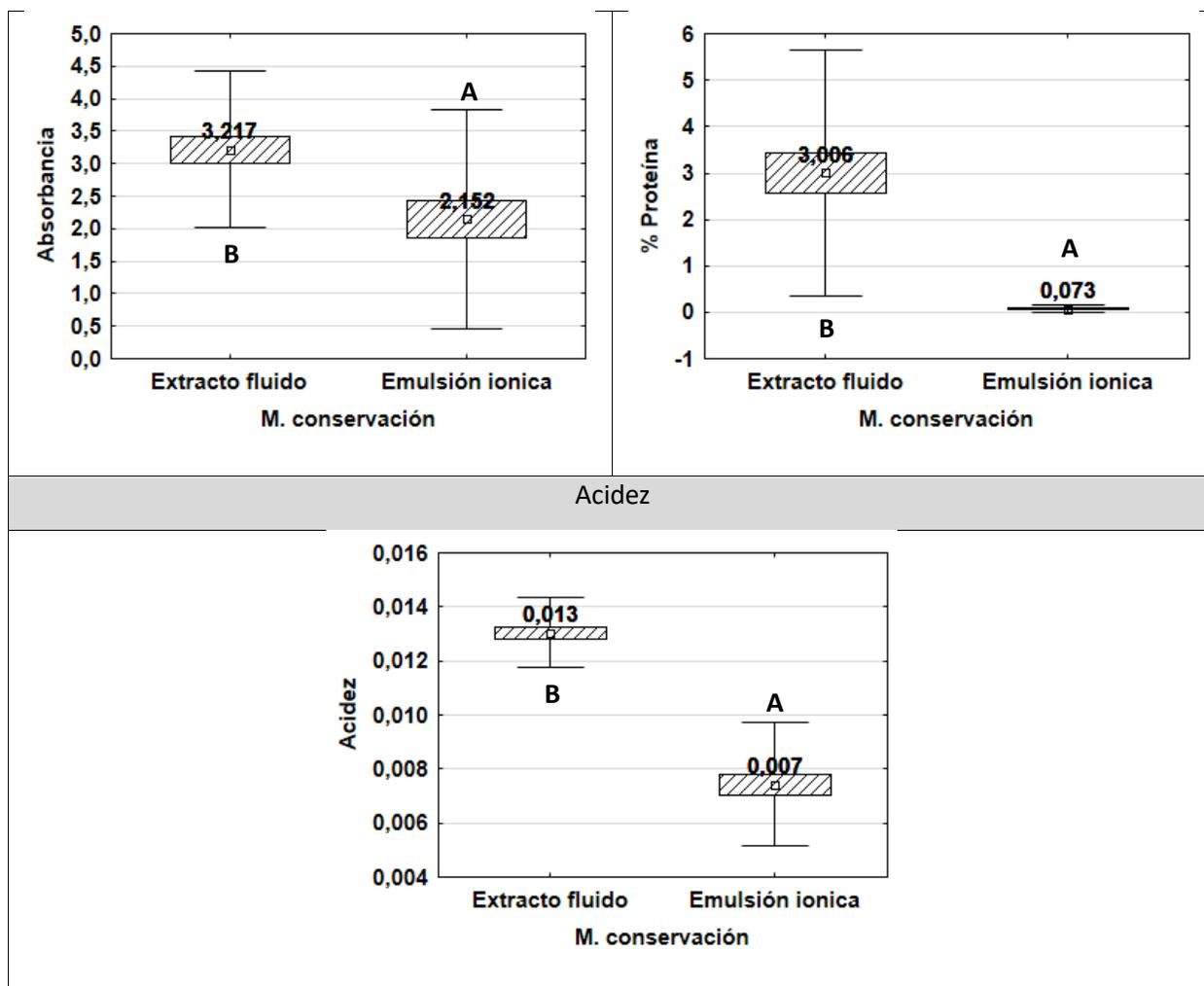
En el caso de la acidez se observan 3 grupos independientes: el grupo c (**a1**: maceración 0,011) con valores más altos que el grupo A (**a2**: L. presurizados 0,009).

**Resultados del estudio de dos métodos de conservación (Factor B). Tukey  $p < 0,05$ .**

**Figura 8**

*Prueba de significancia Tukey para resultados de análisis bromatológicos (Factor B: Métodos de conservación)*





**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En la **figura 8** referente al pH se observa 1 grupo independiente: el grupo A (**b0**: extracto fluido: 3,290 pH; **b1**: emulsión iónica 3,265 pH)

Con lo que respecta a solidos solubles se observó 2 grupos independientes: el valor más alto en el grupo B (**b0**: extracto fluido 17,700 °brix) mientras que el más bajo en el grupo A (**b1**: emulsión iónica 13,100 °brix).

En la absorbancia se observó 2 grupos independientes: el grupo B (**b0**: extracto fluido 3,217) con el valor más alto y el grupo A (**b1**: emulsión iónica 2,152) con el valor más bajo.

Para el porcentaje de proteína bruta se observan 2 grupos independientes: el valor más alto en el grupo B (**b0**: extracto fluido 3,006) a comparación del grupo A (**b1**: emulsión iónica 0,073).

En la acidez se observan 2 grupos independientes: el grupo B (**b0**: extracto fluido 0,013) con un valor más alto que el grupo A (**b1**: emulsión iónica 0,007).

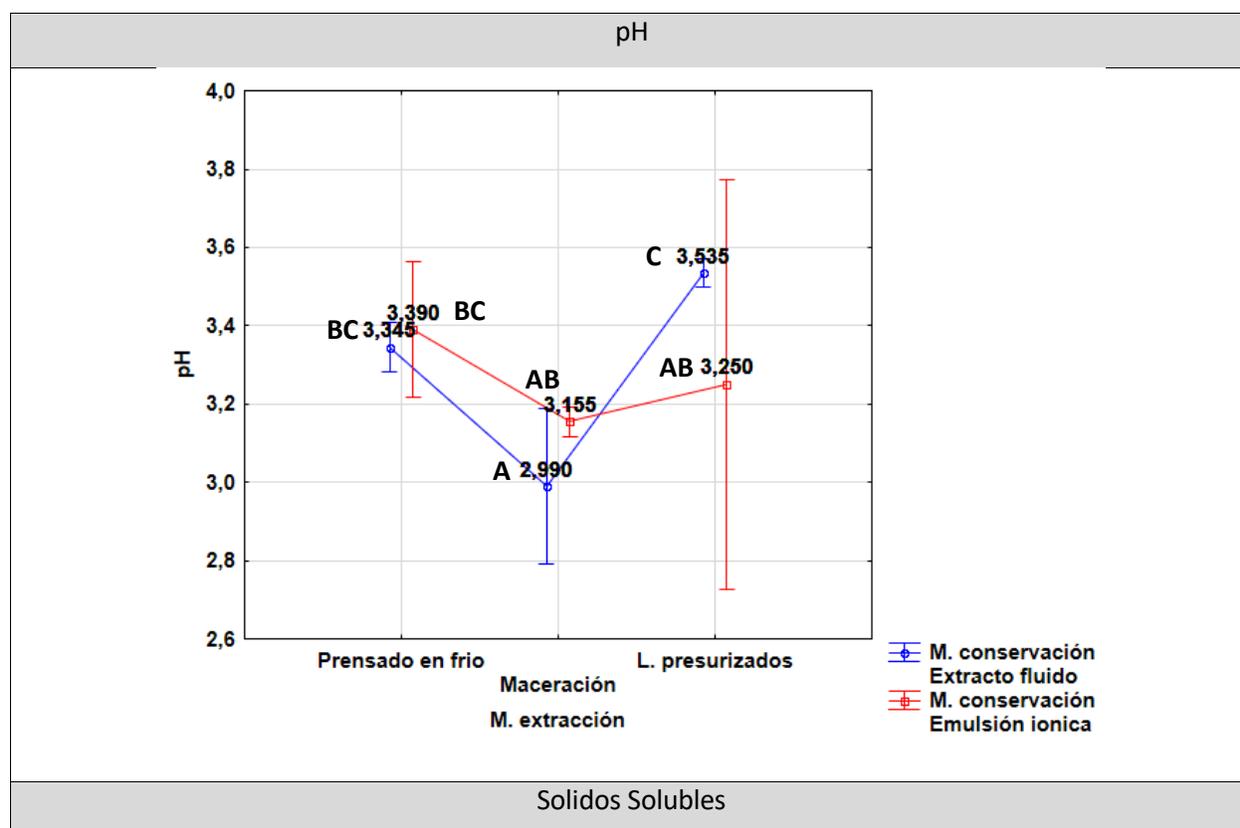
**Resultados de seis interacciones entre *Métodos de extracción*\**Métodos de conservación*\* (AxB). Tukey**

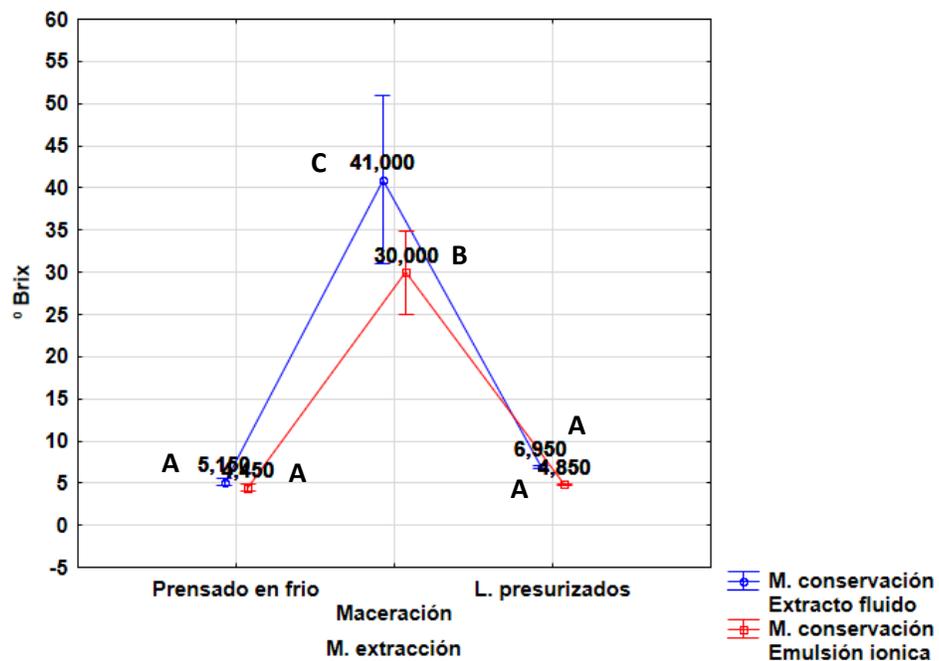
***p*<0,05**

**Figura 9**

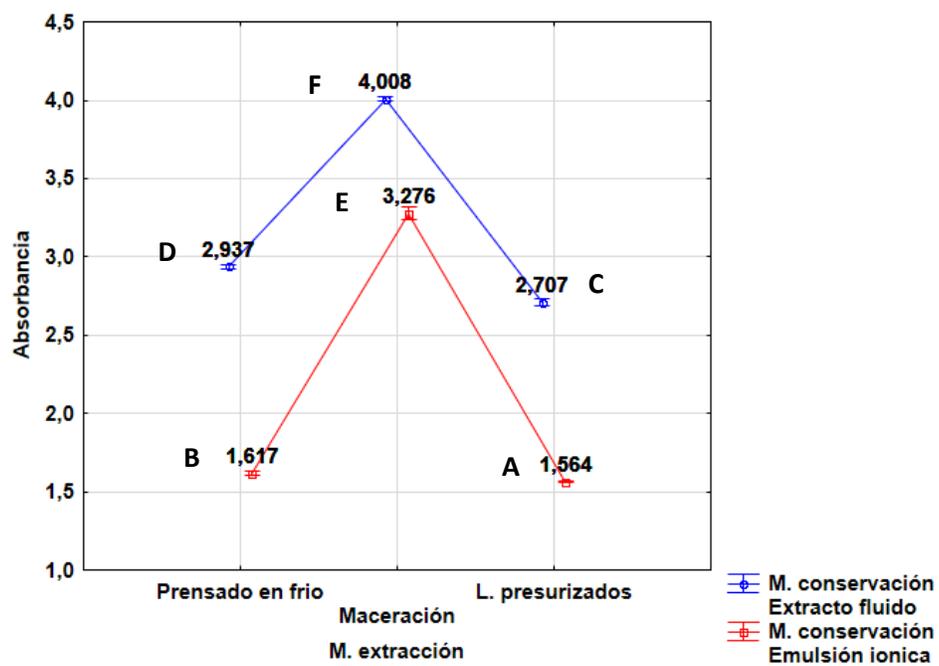
*Prueba de significación (Tukey *p*<0,05) para resultados de análisis bromatológicos (Interacción AxB:*

*Métodos de extracción\*Métodos de conservación)*

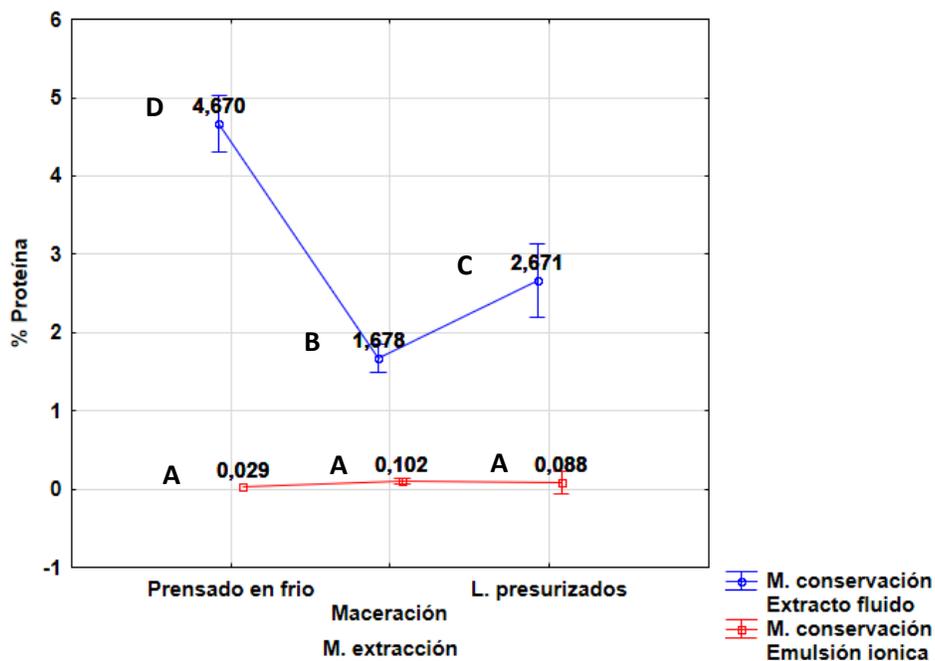




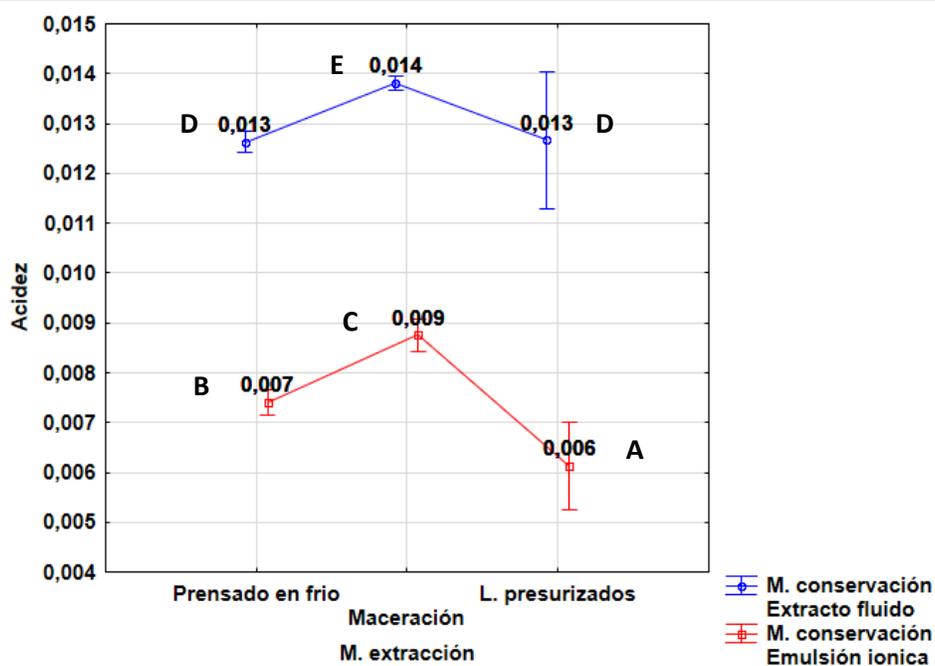
## Absorbancia



## Proteína



## Acidez



Autores: Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En la **Figura 9** en cuanto al pH se observan 6 grupos independientes: se determinó que el grupo C (**a2b0**: L. presurizados + extracto fluido 3,535 pH) obtuvo los valores mientras que el grupo A (**a1b0**: maceración + extracto fluido 2,990) los valores más bajos.

En cuanto a los resultados para los sólidos solubles observan 3 grupos independientes: el grupo C (**a1b0** maceración + extracto fluido 41,000 °brix) con el valor más alto y el grupo A (**a0b0**: prensado en frío + extracto fluido 5,150 °brix; **a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica 4,150 °brix; **a2b0**: L. presurizados + extracto fluido 6,950 °brix; **a2b1**: L. presurizados + emulsión iónica 4,850 °brix) con los valores más bajos.

Con respecto a los resultados para la absorbancia se observan 6 grupos independientes: el grupo F (**a1b0**: maceración + extracto fluido 4,008 abs) con valores más altos que el grupo A (**a2b1**: L. presurizados + emulsión iónica) con los valores más bajos.

En los resultados de la proteína bruta se observan 4 grupos independientes: los valores más altos encontrados en el grupo D (**a0b0**: prensado en frío + líquidos presurizados 4,670 %) y los más bajos en el grupo A (**a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica 0,029 %; **a1b1**: maceración + emulsión iónica 0,102 %; **a2b1**: L. presurizados + emulsión iónica 0,088 %).

Para los resultados obtenidos sobre la acidez se observan 5 grupos independientes: el grupo E (**a1b0**: maceración + extracto fluido 0,014) obtuvo los valores más altos mientras que el grupo A (**a2b1**: L. presurizados + emulsión iónica 0,006) los valores más bajos.

## Análisis microbiológico

**Tabla 25**

*Recuento de microorganismos aerobios mesófilos.*

Tratamiento	UFC/mL
a0b0	2,00E-03
a0b1	0,00E+00
a1b0	6,00E-03
a1b1	1,00E-03
a2b0	3,00E-03
a2b1	5,00E-03

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

La **tabla 25** indica el número de microorganismos presentes en los diferentes tratamientos a los cuales se sometió el extracto de *Synsepalum dulcificum*, cabe recalcar que el conteo se lo realizó con el factor de dilución 2 y factor de dilución 3. Por medio del conteo se pudo determinar que el tratamiento **a0b1** (prensado en frío + emulsión iónica) tuvo el menor valor de contaminación el cual corresponde a  $0,00 \times 10^{-3}$  UFC/mL, mientras que el tratamiento **a1b0** (maceración + extracto fluido) obtuvo el mayor valor de contaminación con un  $6,00 \times 10^{-3}$  UFC/mL.

**Tabla 26**

*Recuento de mohos y levaduras.*

Tratamiento	UFC/mL
a0b0	1,00E-03

Tratamiento	UFC/mL
a0b1	3,00E-03
a1b0	1,00E-03
a1b1	4,00E-03
a2b0	1,00E-03
a2b1	2,00E-03

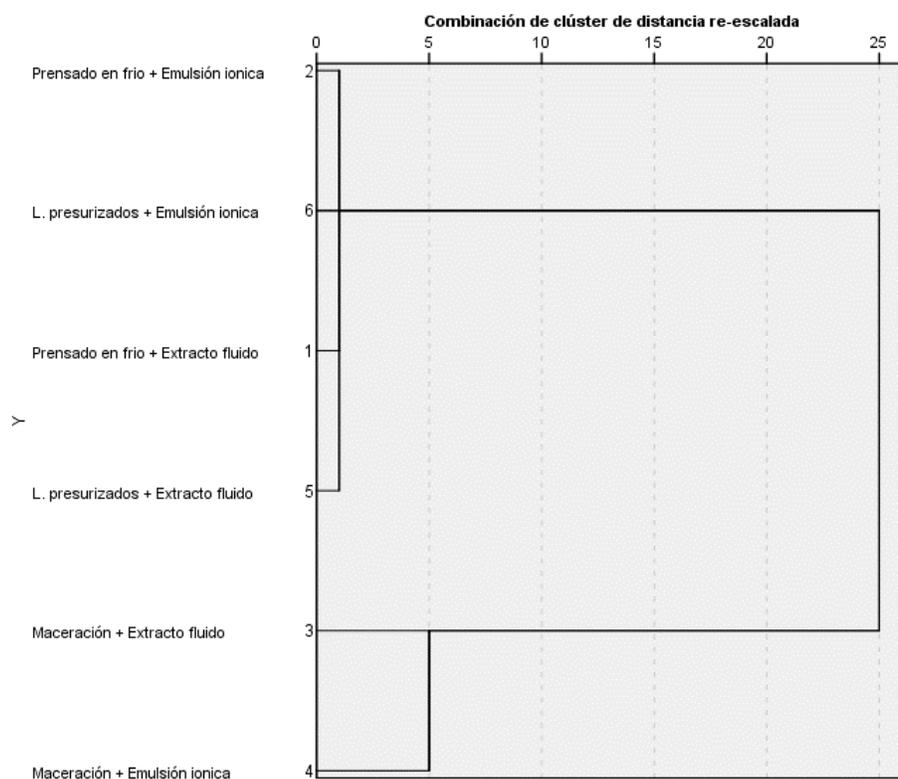
**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En la **tabla 26** se detalla los resultados obtenidos del crecimiento microbiano de mohos y levaduras después de realizar los diferentes métodos de extracción y conservación. Se determina que el tratamiento con mayor contaminación fue **a1b1** (maceración + emulsión iónica) ya que presentó 4,00 x10<sup>-3</sup> UFC/mL. Por otro lado, los demás tratamientos obtuvieron valores bajos de contaminación, siendo este un indicador de que tanto los métodos de extracción como los métodos de conservación se realizaron en condiciones de asepsia controlada.

### **Análisis de conglomerados**

#### **Figura 10**

*Dendrograma de vecinos más cercanos para los factores a estudiar*



En la **figura 10** se observa los tratamientos estudiados evaluando cada una de las variables (pH, sólidos solubles, absorbancia, proteína bruta y acidez) donde se agruparon de acuerdo a la similitud en los resultados, obteniendo 2 agrupaciones: 1 (**a0b0**: prensado en frío + extracto fluido; **a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica; **a2b0**: L. presurizados + extracto fluido; **a2b1**: líquidos presurizados + emulsión iónica) y 2 (**a1b0**: maceración + extracto fluido y **a1b1**: maceración + emulsión iónica). Se observó una diferencia < 1% en los tratamientos del grupo 1. Por otra parte, en el grupo 2 los tratamientos presentan similitud con una diferencia del 5%.

### Análisis de componentes principales

#### Tabla 27

*Matriz de correlación de los componentes principales de los tratamientos efectuados*

Componentes	pH	° Brix	Absorbancia	% Proteína	Acidez
pH	1,000	-,860	-,585	,276	-,120
° Brix	-,860	1,000	,827	-,190	,382
Absorbancia	-,585	,827	1,000	,377	,792
% Proteína	,276	-,190	,377	1,000	,765
Acidez	-,120	,382	,792	,765	1,000

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En la **tabla 27** se detallan las variables que interaccionan en mayor medida, la variable de °brix y pH tienen una relación inversamente proporcional con un valor de correlación de (-0,860); la absorbancia con °brix y acidez tienen una relación directamente proporcional presentando un valor de correlación de (0,827) y (0,792) respectivamente; de igual manera existe una relación directamente proporcional entre acidez y proteína con un valor de correlación de (0,765).

Se redujeron la matriz de componentes a 2 componentes principales, es decir, los que tendrían mayor interacción con las otras variables. En la **tabla 28** se observa que los componentes 1 y 2 son los que mantienen mayor correlación con las variables evaluadas. Se observa que la absorbancia y los °brix son las variables que más se relacionan con las demás variables dentro del componente 1 con un valor promedio de 0,980 y 0,871 respectivamente. En el componente 2 la proteína es la que más se relaciona con las demás variables teniendo un valor promedio de 0,915.

### Tabla 28

*Porcentajes de la tabla de varianza total explicada*

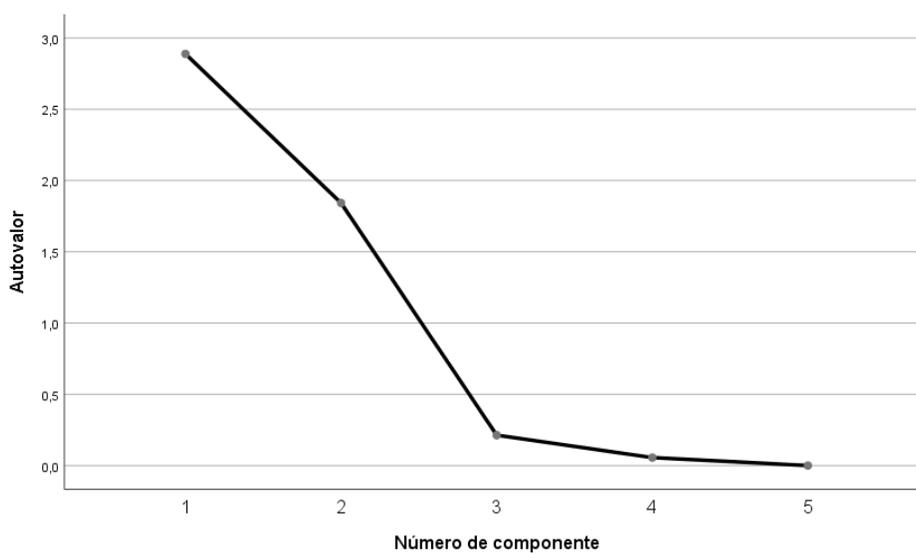
Componentes		Total	% de varianza	% acumulado
pH	1	2,888	57,763	57,763
° Brix	2	1,842	36,845	94,608
Absorbancia	3	,213	4,268	98,876
% Proteína	4	,056	1,124	100,000
Acidez	5	1,649E-7	3,299E-6	100,000

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

Se puede observar en la **Tabla 29** los porcentajes de varianza de los componentes teniendo como principales el componente 1 (pH) y el componente 2 (°brix) los cuales tienen mayor porcentaje de varianza con 57,763 % y 36,85 % respectivamente.

**Figura 11**

*Gráfico de sedimentación de los principales componentes*

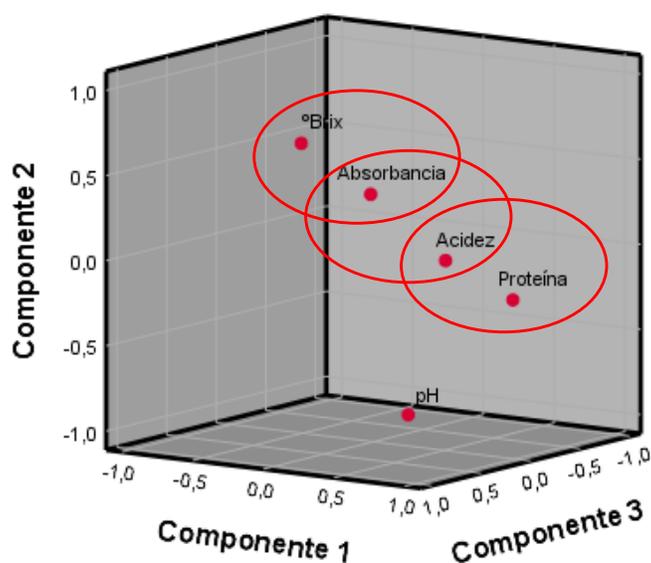


Se observa en la **figura 11** el gráfico de sedimentación de los grupos principales que indica su nivel de variabilidad entre los mismos. Se puede identificar que el grupo 1 y 2 fueron los que tuvieron

mayor variabilidad por la pendiente que muestran, esto quiere decir que las variables dentro de estos grupos tienen valores altos de correlación, mientras que los grupos 3, 4 y 5 son los que menos interactúan con las variables, por lo cual la pendiente es mínima.

**Figura 12**

*Gráfico de componentes en espacio rotado utilizando Kaiser-varimax*

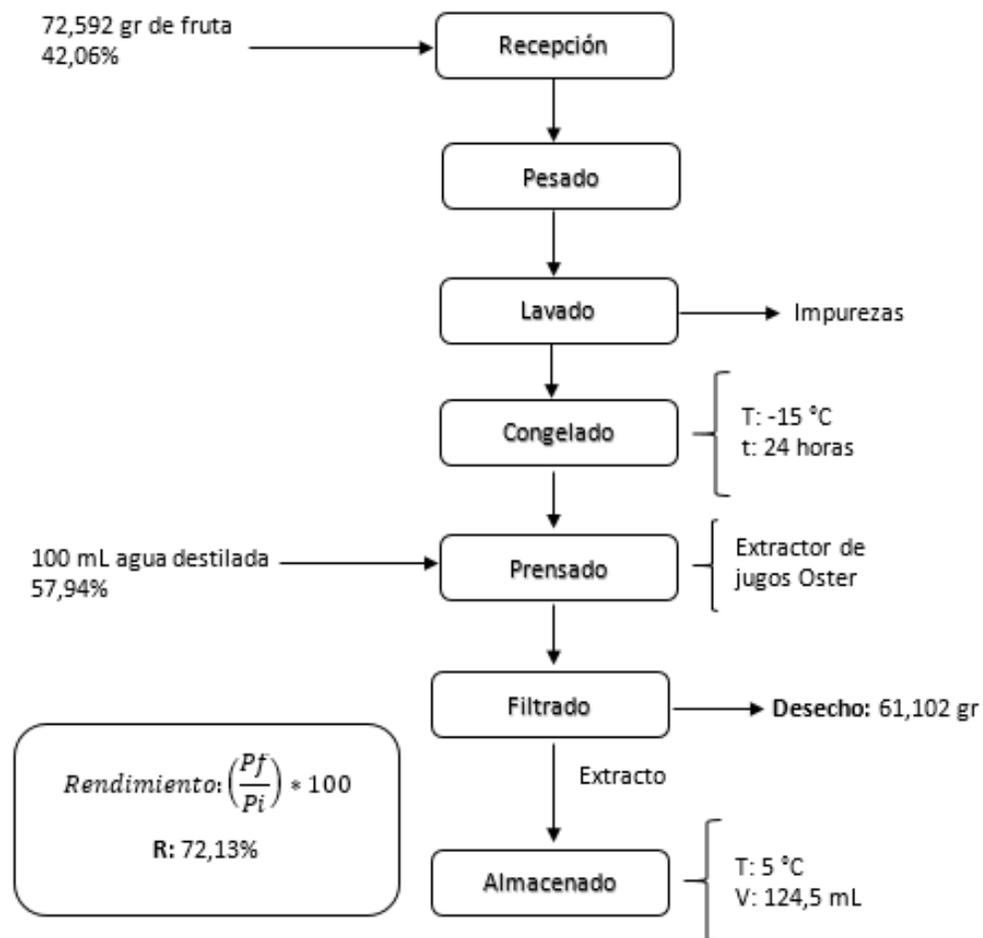


En la **figura 12** se observa el nivel de cercanía que existe entre las variables evaluadas, conformando dos grupos donde se observa que los °brix y la absorbancia son directamente proporcionales debido a su cercanía en el gráfico, así como la acidez y proteína. Así mismo se observa que existe una relación inversamente proporcional entre el pH y los °brix.

### **Rendimiento mediante balance de materia**

**Figura 13**

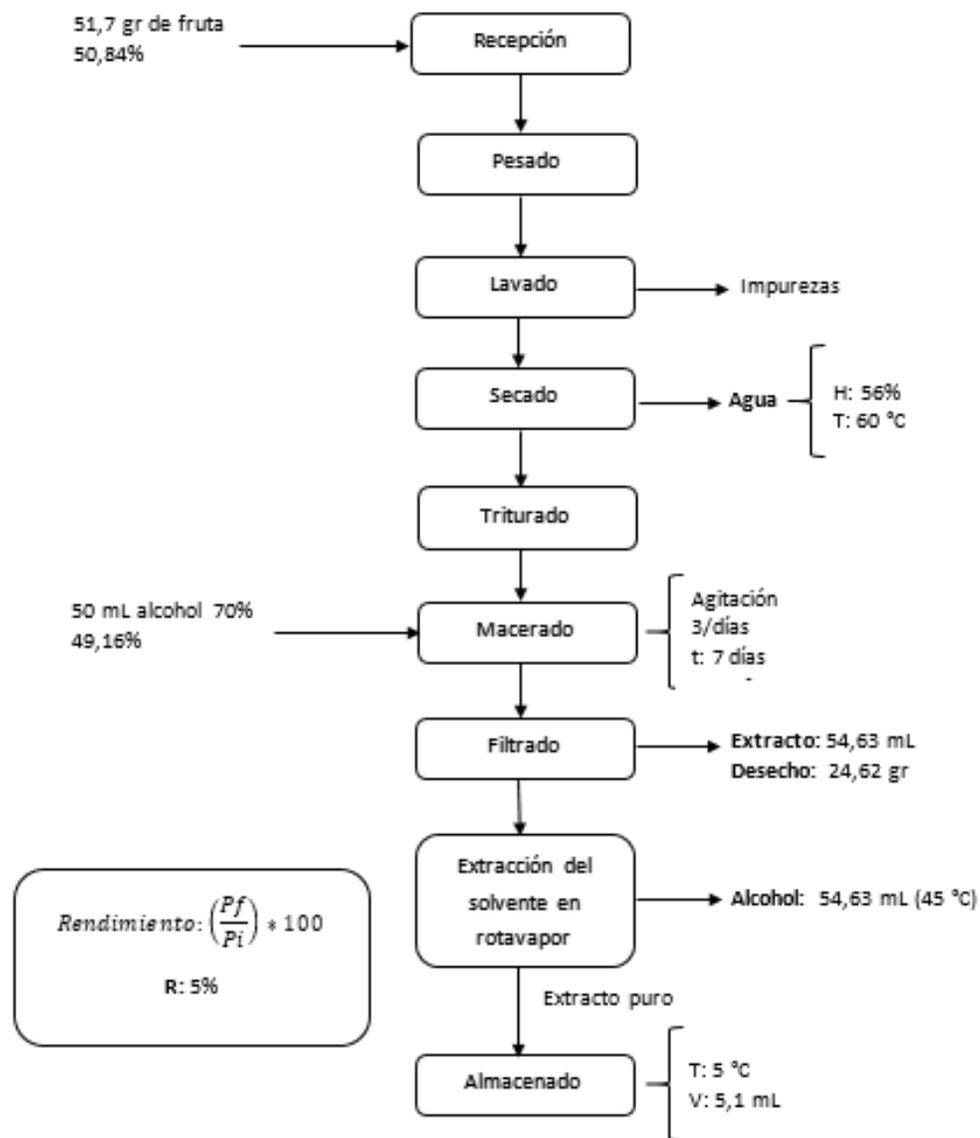
*Balance de materia del método de extracción por prensado en frío*



**Autores:** Iguasnia, A; Pinales, A. 2023

**Figura 14**

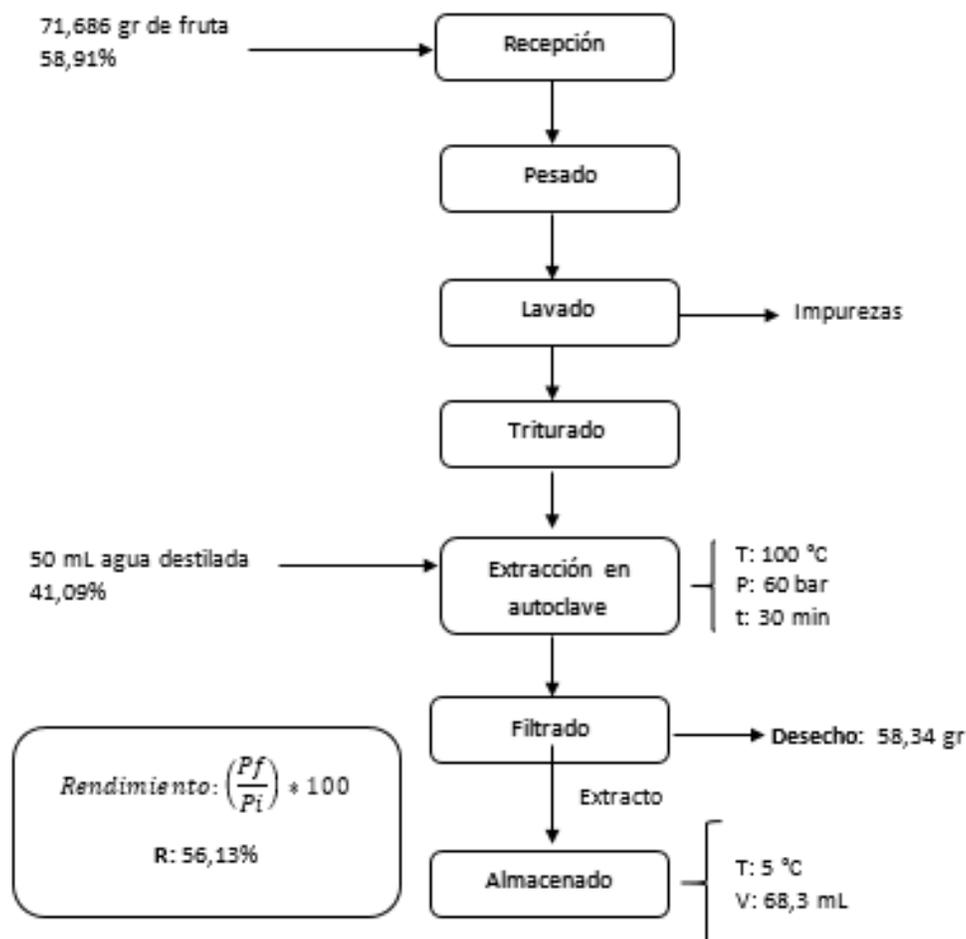
*Balance de materia del método de extracción por maceración*



**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

**Figura 15**

*Balace de materia del método de extracción por líquidos presurizados*



**Autores:** Iguasnia, A; Pinales, A. 2023

### Resultados de la evaluación organoléptica de los tratamientos efectuados sobre el Fruto milagroso

**Tabla 29**

*Valoraciones y aspectos a evaluar para las propiedades organolépticas de los tratamientos efectuados en el fruto milagroso*

Valoración	Sabor	Color	Olor	Apariencia	Cambio de sabor
1	Desabrido	Rosa	Muy Bajo	No me gusta	No
2	Salado	Rojo claro	Bajo	Poco agradable	No

Valoración	Sabor	Color	Olor	Apariencia	Cambio de sabor
3	Amargo	Rojo	Medio	Regular	Ligero cambio
4	Dulce	Rojo oscuro	Intenso	Agradable	Si
5	Ácido	Morado	Muy intenso	Muy Agradable	Si

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En la **tabla 30** se muestran los aspectos que se consideraron para evaluar las propiedades organolépticas de las interacciones efectuadas entre los tratamientos (interacción AxB: **a0b0** prensado en frío + extracto; **a0b1** prensado en frío + emulsión iónica; **a1b0** maceración + extracto fluido; **a1b1** maceración + emulsión iónica; **a2b0** L. presurizados + extracto fluido; **a2b1** L. presurizados + emulsión iónica) tomando 10 jueces por cada tratamiento.

**Tabla 30**

*Análisis de varianza del sabor*

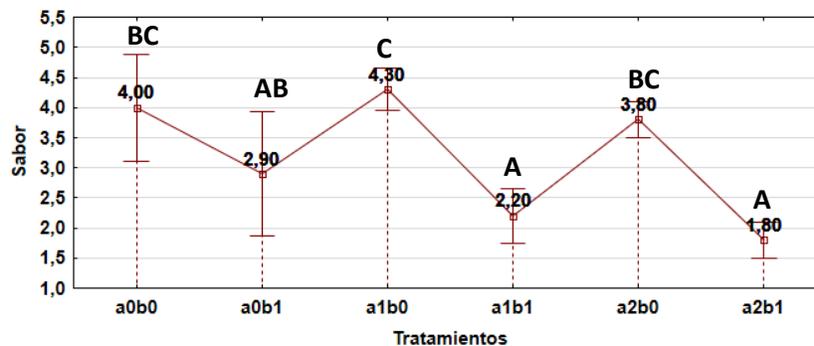
Fuente	SC	Gl	CM	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamientos	52,5333	5	10,5067	11,98	0,0000
B:Réplica	2,33333	9	0,259259	0,30	0,9723
RESIDUOS	39,4667	45	0,877037		
TOTAL (CORREGIDO)	94,3333	59			

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En cuanto a los resultados en el análisis de varianza sobre el sabor se observa en la **tabla 31** que los tratamientos tienen diferencia significativa con un valor-P menor al 0,05 y no existe diferencia entre réplicas.

**Figura 16**

*Prueba de significancia de Tukey para los resultados del sabor*



En la **figura 16** respecto al sabor se observan 4 grupos independientes: el grupo BC (**a0b0**: prensado en frío + extracto fluido 4,00; **a2b0**: L. presurizados + extracto fluido 3,80) obtuvo la mejor calificación para un sabor dulce mientras que el grupo A (**a1b1**: maceración + emulsión iónica 2,20; **a2b1**: L. presurizados + emulsión iónica 1,80) la peor calificación teniendo un sabor salado.

**Tabla 31**

*Análisis de varianza del color*

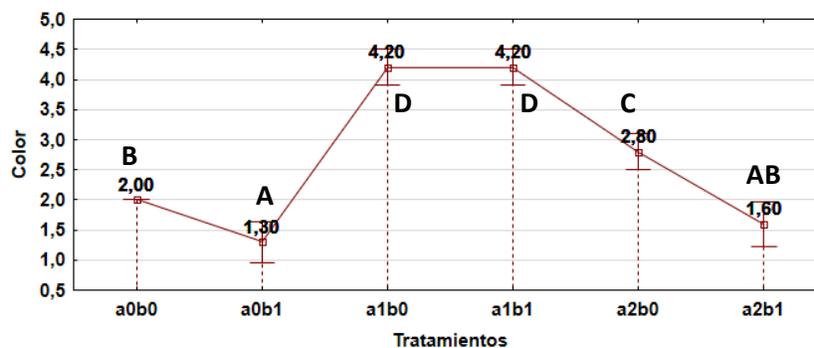
<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tratamientos	81,6833	5	16,3367	86,66	<b>0,0000</b>
B:Réplicas	0,816667	9	0,0907407	0,48	0,8794
RESIDUOS	8,48333	45	0,188519		
TOTAL (CORREGIDO)	90,9833	59			

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En cuanto a los resultados en el análisis de varianza sobre el color se observa en la **tabla 32** que los tratamientos tienen diferencia significativa con un valor-P menor al 0,05 y no existe diferencia entre réplicas.

**Figura 17**

*Prueba de significancia de Tukey para los resultados del color*



En la **figura 17** respecto al color se observan 5 grupos independientes: grupo C (**a2b0**: L. presurizados + extracto fluido 2,80) obtuvo la mejor calificación presentando un color rojo mientras que el grupo A (**a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica 1,30) la peor calificación presentando un color rosa.

**Tabla 32**

*Análisis de varianza del olor*

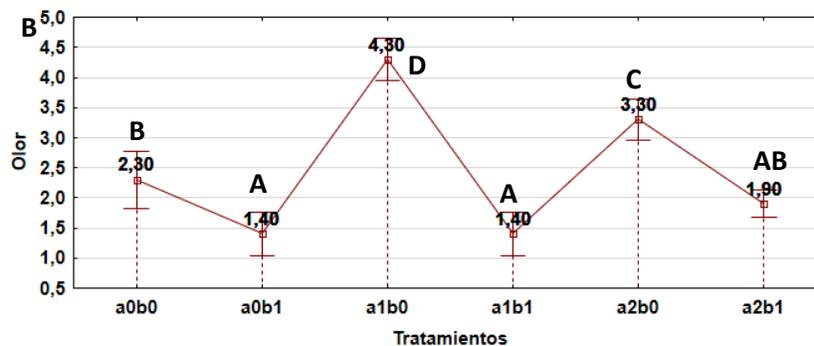
<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>GI</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tratamientos	66,7333	5	13,3467	50,33	<b>0,0000</b>
B:Réplicas	2,06667	9	0,22963	0,87	0,5617
RESIDUOS	11,9333	45	0,265185		
TOTAL (CORREGIDO)	80,7333	59			

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En cuanto a los resultados en el análisis de varianza sobre el olor se observa en la **tabla 33** que los tratamientos tienen diferencia significativa con un valor-P menor al 0,05 y no existe diferencia entre réplicas.

**Figura 18**

*Prueba de significancia de Tukey para los resultados del olor*



En la **figura 18** se observan 5 grupos independientes: el grupo D (**a1b0**: maceración + extracto fluido 4,30) obtuvo la mejor calificación percibiendo un olor intenso mientras que el grupo A (**a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica 1,40; **a1b1**: maceración + emulsión iónica 1,40) la peor calificación percibiendo un olor bajo.

**Tabla 33**

*Análisis de varianza de la apariencia*

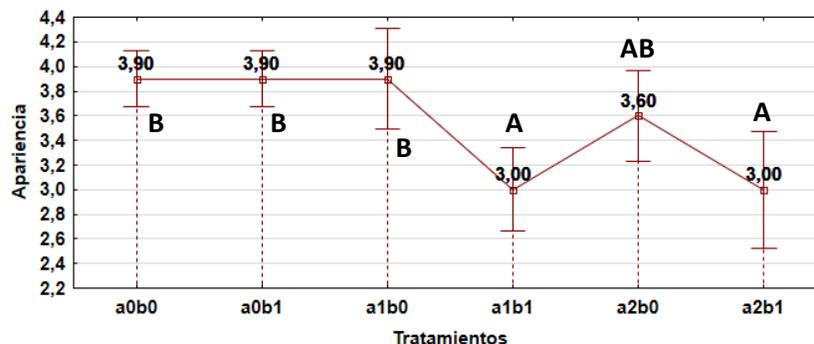
<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tratamientos	9,75	5	1,95	7,69	<b>0,0000</b>
B:Réplicas	1,68333	9	0,187037	0,74	0,6729
RESIDUOS	11,4167	45	0,253704		
TOTAL (CORREGIDO)	22,85	59			

**Autores:** Iguasnia, A; Parrales, A. 2023

En cuanto a los resultados en el análisis de varianza sobre la apariencia se observa en la **tabla 34** que los tratamientos tienen diferencia significativa con un valor-P menor al 0,05 y no existe diferencia entre réplicas.

**Figura 19**

*Prueba de significancia de Tukey para los resultados de la apariencia*



En la **figura 19** respecto a la apariencia se observan 3 grupos independientes: el grupo B (**a0b0**: prensado en frío + extracto 3,90; **a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica 3,90; **a1b0**: maceración + extracto fluido 3,90) obteniendo las mejores calificaciones con una apariencia agradable mientras que el grupo A (**a1b1**: maceración + emulsión iónica 3,00; **a2b1** L. presurizados + emulsión iónica 3,00) la peor calificación mostrando una apariencia regular.

**Tabla 34**

*Análisis de varianza de la efectividad en el cambio de sabor*

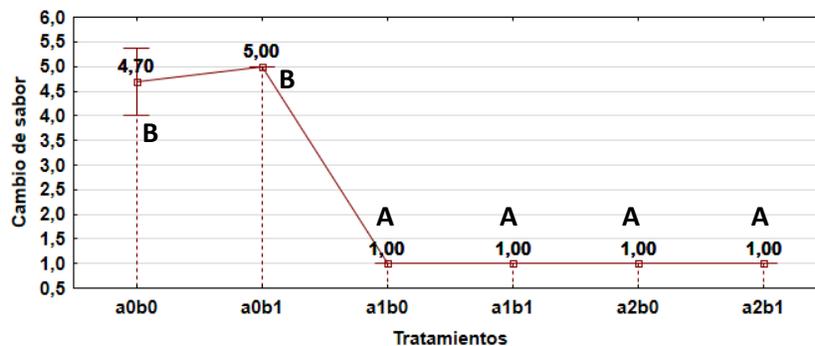
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tratamientos	198,083	5	39,6167	264,11	<b>0,0000</b>
B:Réplicas	1,35	9	0,15	1,00	0,4540
RESIDUOS	6,75	45	0,15		
TOTAL (CORREGIDO)	206,183	59			

**Autores:** Iguasnia, A; Prrales, A. 2023

En cuanto a los resultados en el análisis de varianza sobre la apariencia se observa en la **tabla 35** que los tratamientos tienen diferencia significativa con un valor-P menor al 0,05 y no existe diferencia entre réplicas.

**Figura 20**

*Prueba de significancia de Tukey para los resultados de la efectividad en el cambio de sabor*

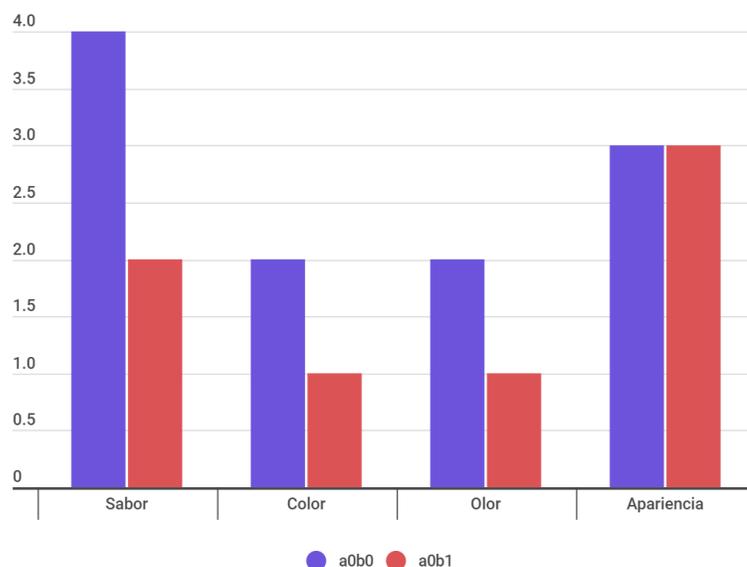


En la **figura 20** se observan 2 grupos independientes: el grupo B (**a0b0**: prensado en frío + extracto fluido 4,70; **a0b1**: prensado en frío + emulsión iónica 5,00) obtuvieron las mejores calificaciones mostrando que hubo efectividad en el cambio de sabor mientras que el grupo A (**a1b0**: maceración + extracto fluido 1,00; **a1b1**: maceración + emulsión iónica 1,00; **a2b0**: L. presurizados + extracto fluido 1,00; **a2b1**: L. presurizados + emulsión iónica 1,00) las peores calificaciones mostrando que no mantuvieron el efecto.

### Resultados del análisis sensorial de los mejores tratamientos aplicando en el Fruto milagroso

#### Figura 21

*Comparación entre los mejores tratamientos del análisis sensorial (a0b0: prensado en frío + extracto) y a0b1: prensado en frío + emulsión iónica)*



En la **figura 21** respecto a los tratamientos que mantuvieron la efectividad en el cambio del sabor, se observa mejores resultados en **a0b0** (prensado en frío + extracto fluido) en comparación **a0b1** (prensado en frío + emulsión iónica) que obtuvo peores resultados.

## Capítulo V

### Discusión

#### Características fisicoquímicas del fruto milagroso

La determinación del porcentaje de fibra presente en la baya del fruto milagroso usando el método Weende, dio como resultado 1,025% en base seca, a comparación con otro estudio que realizaron solamente en la semilla de la baya, dio como resultado un porcentaje de 0,66% de fibra según Olaitan, 2015 es considerable. Un estudio realizado en la Universidad de las Américas (Cóndor, 2019), usaron la pulpa y cáscara, obtuvieron un porcentaje de fibra del 3%. No obstante, se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos varían en comparación a otras investigaciones debido a que en la presente investigación utilizamos una muestra liofilizada del fruto. Además, la parte analizada del fruto influyó en los resultados finales.

El porcentaje de humedad presente en la baya fue del 41,98%, sometiendo la muestra fresca a una temperatura de 130 °C por 2 h. En comparación con el estudio realizado por (Njoku & Ekwueme, 2014), la humedad promedio fue 65.33% sometiendo la muestra a una temperatura de 110 °C durante 12 h. Asimismo, (Jouvin, 2016) sometió su muestra a 58 °C por 24 h, obteniendo una humedad promedio del 72%. Estos datos pueden variar según la temperatura y el tiempo de secado empleados. No obstante, el contenido de humedad presente en las frutas se considera como un indicador de la actividad del agua, que a su vez facilita el desarrollo de microorganismos e igualmente un contenido alto de humedad genera un corto plazo de vida útil de la fruta.

El valor promedio obtenido en la medición de pH fue de 3,68, el cual a comparación con otros estudios (Cóndor, 2019) no muestra tanta diferencia ya que su resultado fue del 3,81. Por otro lado, en la investigación de Jouvin (2016), su pH fue de 4. Los valores del pH pueden variar debido a varios factores como el tipo de solvente (agua, alcohol, etanol) o el método de obtención de la solución a evaluar. El valor del pH representa la medición de la actividad de los iones de hidrogeno, cuya función en la proteína es exhibir su dulzor dependiendo de él.

El porcentaje de grasa obtenido en la muestra analizada fue del 5,11%, en la que se utilizó todo el fruto seco, que a diferencia de otros investigadores (He et al., 2016) obtuvieron 0% de grasa ya que usaron netamente la pulpa de la baya. Otro estudio realizado por (Njoku & Ekwueme, 2014) reporta 3,26% de grasa en peso seco, usando el fruto entero. Cabe recalcar que el porcentaje de grasa total depende de que parte de la baya se va a utilizar para su análisis.

El resultado promedio de sólidos solubles obtenido fue de 10,5 °brix. Los resultados de (Vallejo et al., 2020), el contenido de sólidos solubles fue de 10,78 °brix. Según Hints (2017), la presencia de azúcar se relaciona con ciertas características de la fruta como, por ejemplo, la maduración. Los carbohidratos se van acumulando en forma de almidón a medida que la fruta madura y este almidón se

convierte en azúcar, lo que conlleva a determinar que esta característica podría ser otro parámetro para medir el grado de madurez de los frutos.

### **Compuestos activos del fruto milagroso**

La determinación de flavonoides dio como resultado un promedio de 0,03 mg eq/g m. seca usando como muestra la fruta entera liofilizada, mientras que otro estudio Hints (2017) realizó la cuantificación de flavonoides usando el extracto y tuvo como resultado 0,13 mg eq/g m. seca. Por otro lado, el estudio de (Córdor, 2019) tuvo un resultado de 12 mg eq/g m. seca usando como muestra la cáscara y pulpa. Los datos varían debido a la muestra utilizada.

### **Análisis microbiológico de tratamientos**

Respecto al recuento microbiológico de los diferentes tratamientos, los valores de contaminación varían dentro de un rango del  $1,00E-3$  hasta  $6,00E-3$ , siendo estos resultados aceptables según la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humana MINSa apartado 15.1, menciona que la carga microbiana por parte de bacterias aerobias mesófilas corresponde a una categoría 2, es decir, un alimento contaminado por dichos microorganismos no representan un riesgo directo en la salud del consumidor, al contrario, se los asocia con la vida útil de los alimentos. No obstante, no se puede descartar la presencia de un microorganismo patógeno puesto que la mayoría son mesófilos. Asimismo, los mohos y levaduras son microorganismos de categoría 2, debido a que su presencia es considerado de bajo riesgo aunque, en el apartado 15.1 para alimentos sin tratamiento térmico como ocurre en los tratamientos de prensado en frío, no es necesario un análisis microbiológico ya que no se cuenta con una referencia establecida de un límite aceptable, no obstante, fue de gran importancia realizar este análisis ya que la presencia de mohos y levaduras en un producto representa una posible intoxicación por micotoxinas al consumidor y puede ocasionar alergias.

## **Evaluación de propiedades organolépticas**

Las propiedades organolépticas evaluadas muestran que el mejor tratamiento fue la extracción por prensado en frío más conservación por extracto fluido, en las cuales se determinó que el tratamiento tuvo un sabor dulce, color rojo claro, olor leve, apariencia agradable y que presentaba la propiedad de modificación del sabor en la mayoría de jueces, otros investigadores como Vallejo, Arias & Brito (2020) obtuvieron resultados similares con la fruta entera determinando que la fruta presentaba una intensidad de color rojo regular, un olor ligeramente frutal, un sabor dulce y una textura firme. Cabe recordar que las muestras de ambas evaluaciones fueron totalmente distintas. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares en el color, olor y sabor por lo cual se puede decir que se mantienen sus propiedades principales aún después de aplicar los métodos de extracción y conservación.

## **Capítulo VI**

### **Conclusiones y recomendaciones**

#### **Conclusiones**

#### ***Características físico-químicas y compuestos bioactivos del fruto milagroso***

En el presente estudio se determinaron las propiedades físico químicas del fruto milagroso para obtener mayor conocimiento sobre sus características principales, observándose así que el fruto milagroso contiene 41,98 % humedad; 1,019% de fibra; 5,11% oleorresina o grasa; un promedio de pH de 3,68 y 10,5 °brix en el ámbito de sólidos solubles. Se determinó también la concentración de un compuesto activo, siendo estos flavonoides con un resultado 0,03 mg eq/g de materia seca utilizando como referencia una curva de calibración hecha a partir de concentraciones conocidas de catequina.

#### ***Factor A (métodos de extracción)***

Referente a los métodos de extracción aplicados al fruto milagroso se pudo determinar que el método de extracción de prensado en frío mantuvo mejores resultados en cuanto al pH con un valor de

(3,368) y al porcentaje de proteína bruta con un valor de (2,350%), lo cual representa un valor alto de proteína para una fruta. Por otra parte, el método de extracción por maceración obtuvo mejores resultados en relación a los sólidos solubles obteniendo un valor de (35,5 °brix), una absorbancia de (3,641 nm) y un mayor grado de acidez con un valor de (0,011). Por lo analizado se concluyó que se acepta la hipótesis alternativa y se dice que los métodos de extracción prensado en frío, maceración y líquidos presurizados si influyen en las variables evaluadas.

### ***Rendimiento mediante balance de materiales***

En base a los resultados obtenidos en el balance de materia se puede determinar que el método de extracción más eficiente fue el prensado en frío (**a0**) con un rendimiento del 72,13% además de conservar la propiedad modificadora del sabor, mientras que el método con menor eficiencia fue la extracción por maceración (**a1**) con un rendimiento de tan solo el 5%. Por lo tanto, el mejor método para de extracción es el prensado en frío.

### ***Factor B (métodos de conservación)***

Con respecto a los métodos de conservación aplicados en los extractos del fruto milagroso se obtuvieron que el mejor método de conservación fue el de extracto fluido debido a que presentó mejores resultados en cuanto al pH con un valor de (3,290); los sólidos solubles con un valor de (17,7 °brix); una absorbancia de 3,217 nm, un porcentaje de proteína bruta de (3,006%) y un valor de acidez de (0,013). Por los resultados obtenidos se concluyó que se acepta la hipótesis alternativa y se dice que los métodos de conservación extracto fluido y emulsión iónica si influyen el acondicionamiento y en las variables evaluadas.

### ***Interacción AxB (métodos de extracción\*métodos de conservación)***

Gracias a los resultados obtenidos a partir de las interacciones entre el factor A y el factor B se pudo determinar que el mejor tratamiento fue extracción por maceración junto con la conservación en

extracto fluido (**a1b0**) para los sólidos solubles dando como resultado un valor de (41 °brix); absorbancia con un valor de (4,008) y acidez con un valor de (0,014). Mientras que el mismo método de extracción junto con el método de conservación de emulsión iónica (**a1b1**) dio mejores resultados para el porcentaje de proteína con un valor de (4,670%). Por tal razón se concluyó que se acepta la hipótesis alternativa y se dice que el efecto de las interacciones entre los factores métodos de extracción y método de conservación si influyen en las variables evaluadas.

### ***Análisis microbiológico***

En cuanto al recuento del crecimiento microbiano tanto para microorganismos aerobios mesófilos como para el recuento del crecimiento de mohos y levaduras se obtuvieron valores menores a  $7,00E-3$ , los resultados se encontraron por debajo del índice permitido según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-5:2006. Por lo tanto, se puede afirmar que los tratamientos son aptos para su aplicación a nivel industrial y no afectarían a la salud del consumidor.

### ***Evaluación de propiedades organolépticas***

En lo que respecta a la evaluación de las propiedades organoléptica de los tratamientos efectuados se pudo establecer en base a los resultados que los mejores tratamientos fueron el método de extracción por prensado en frío más conservación por extracto fluido (**a0b0**) debido a que se determinó que tuvo un sabor dulce, color rojo claro, olor leve, apariencia agradable y si tuvo efectividad en la modificación del sabor; y el método de extracción por prensado en frío más conservación por emulsión iónica (**a0b1**) debido a que se determinó que tuvo un sabor amargo, rosa, olor casi imperceptible, apariencia agradable y si tuvo efectividad en la modificación del sabor. Se realizó una comparación entre ambos tratamientos y se determinó que el tratamiento de método de extracción por prensado en frío más conservación por extracto fluido (**a0b0**) fue el que mayor aceptación tuvo.

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos en esta investigación se concluyó que el mejor tratamiento para la obtención del extracto de fruto milagroso y su conservación fue el prensado en frío más extracto fluido debido a que mantuvo buenas propiedades físico-químicas y microbiológicas; la extracción por prensado en frío fue el método que mayor rendimiento obtuvo; este tratamiento fue el que mayor aceptación obtuvo en base a sus propiedades organolépticas y fue el mejor tratamiento que conservó la propiedad modificadora del sabor.

### **Recomendaciones**

En el presente estudio se debe tomar en cuenta que tanto como el pH y sólidos solubles son las variables que más influyen en los métodos de extracción y conservación. Por lo tanto, el método de prensado en frío en conjunto con el método de conservación de extracto fluido son los que contribuyen con la correlación que presentan estos componentes.

Gracias a la evaluación sensorial se sugiere que el método de extracción mediante prensado en frío es el más viable debido que al ser termolábil la glucoproteína, este método mantiene la actividad enzimática. Además, el método de conservación recomendable es el extracto fluido preservado en refrigeración a una temperatura alrededor de 4-5 °C, gracias a que este mantiene las características fisicoquímicas de la fruta, no obstante, no es recomendable someter al extracto a congelación puesto que comienza a presentar la formación de un precipitado durante el descongelamiento, dando como resultado una separación de fases.

Ya que la actividad de modificación del sabor se encuentra solamente en la pulpa, pues tanto la cáscara como la semilla serían desperdicios, es por esto que se recomienda realizar estudios enfocados en la obtención del aceite de la semilla, gracias a que es la parte más grande de la baya y se le podría dar un valor agregado. Además, cabe recalcar que el costo de esta fruta es muy elevado por su poca producción en el país, dando otra razón más por la cual se debería aprovechar esta fruta totalmente.

Como otro método de conservación se podría mencionar el liofilizado de la fruta e igualmente la técnica de criogenizado, usando nitrógeno líquido a presión atmosférica con una temperatura menor a -196 °C.

## Capítulo VII

### Bibliografía

- Amadin. (2013). Alimentación y salud. Recuperado el 15 de Enero del 2023 de <http://amandin.com/que-es-la-fibra-y-que-aporta-a-nuestro-organismo/>
- Borgnakke, W. S., Genco, R. J., Eke, P. I., & Taylor, G. W. (2018). Oral Health and Diabetes. In Diabetes in America. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33651538>
- Bustos-Saldaña, R., Alfaro-Rodríguez, M., De La, M., Solís-Ruiz, L., Trujillo-Hernández, B., Pacheco-Carrasco, M., ... Celis-De La Rosa, J. (2009). Disminución de la sensibilidad gustativa en diabéticos tipo 2 con hiperglucemia. In Rev Med Inst Mex Seguro Soc (Vol. 47).
- Carvajal Contreras, T. M. (07 de junio de 2021). Identificación de la carga microbiana presente en las bebidas aromáticas a base de sábila comercializadas en el Distrito Metropolitano de Quito. Obtenido de Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24722/3/UCE-FCQ-CQA-CARVAJAL%20TANIA.pdf>
- Castañeda , A., & Guerrero, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. Universidad de las Américas Puebla. Recuperado el 10 de Enero del 2023 de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchezet-al-2015.pdf>
- Chen, C. C., Liu, I. M., & Cheng, J. T. (2006). Improvement of insulin resistance by miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) in fructose-rich chow-fed rats. *Phytotherapy Research*, 20(11), 987-992. <https://doi.org/10.1002/ptr.1919>

- Cevallos, L., Andrade, S., Singh, B., & Arce, J. (15 de junio de 2007). Estudio de la fruta milagrosa (*Synsepalum dulcificum* Daniell) como posible edulcorante natural. *Tierra tropical*, III (1), 71-80.
- Cóndor, Y. (2019). Caracterización de compuestos bioactivos, físicos y químicos del fruto milagroso (*Synsepalum Dulcificum*) para aplicaciones agroindustriales. Quito: Universidad de las Américas
- Gil, Á. (2010). Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva. Madrid, España: Médica Panamericana.
- Gimondi, M., Mas, E., & Mikkels, K. (2007). Fundamentos de bioquímica. España: Editorial Médica Panamericana S.A
- Haddad, S. G., Mohammad, M., Raafat, K., & Saleh, F. A. (2020). Antihyperglycemic and hepatoprotective properties of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) compared to aspartame in alloxan-induced diabetic mice. *Journal of Integrative Medicine*, 18(6), 514-521.  
<https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.09.001>
- Hints, H. (2017). Química en la fruta. Recuperado el 20 de febrero del 2023 de  
<https://www.hannachile.com/blog/post/qu%C3%ADmica-en-la-fruta>
- Howard Mora, M., (2007). El cinc y los trastornos del gusto. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, (9), 7-13.
- INEN. (1980). Determinación de la materia grasa. En Norma Técnica Ecuatoriana (541:1980). Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado 24 de enero de 2023, de  
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/541.pdf>
- INEN. (1983). Determinación de proteínas. En Norma Técnica Ecuatoriana (16). Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado 24 de enero de 2023, de  
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/16.pdf>
- INEN. (1985). Conservas vegetales, determinación de acidez titulable por método potenciométrico de referencia. En Norma Técnica Ecuatoriana (381:1985). Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Recuperado 24 de enero de 2023, de

<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.pdf>

INEN. (2013). Determinación de la humedad o pérdida por calentamiento. método gravimétrico. En Norma Técnica Ecuatoriana (1676:2013). Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado 24 de enero de 2023, de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1676-1R.pdf>

INEN. (2013). Determinación de la fibra cruda. En Norma Técnica Ecuatoriana (522:2013). Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado 24 de enero de 2023, de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/522-1R.pdf>

Jouvin, A. R. (Agosto de 2016). "Determinación de la glucoproteína y sus propiedades en la fruta milagrosa. Recuperado el 19 de febrero del 2023 de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18113/1/401-1211%20%20Determinacion%20de%20la%20glucoproteina%20y%20sus%20propiedades.pdf>

Koizumi, A., Tsuchiya, A., Nakajima, K. I., Ito, K., Terada, T., Shimizu-Ibuka, A., ... Abe, K. (2011). Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16819–16824. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016644108>

Malik, V. S., Popkin, B. M., Bray, G. A., Després, J. P., & Hu, F. B. (2010). Sugar-Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease Risk. *Circulation*, 121(11), 1356-1364. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.109.876185>

Martínez, C., Periago, J., & Navarro, I. (2016). Revelando el secreto de la fruta milagrosa. Recuperado el 6 de Enero del 2023 de [http://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC\\_2016\\_4\\_04.pdf](http://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC_2016_4_04.pdf)

Menéndez Rey, A. (2021). Actividad biológica e inmunogénica de *Synsepalum dulcificum* para el desarrollo de alimentos funcionales. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID.

<https://doi.org/10.20868/upm.thesis.70139>

Mercola. (2015). Recuperado 6 de Enero del 2023 de

<https://articulos.mercola.com/sitios/articulos/archivo/2015/12/14/beneficios-delos-polifenoles.aspx>

NIH-National Institutes of Health. (2022, 4 octubre). Office of Dietary Supplements - Zinc. Recuperado 22 de enero de 2023, de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-DatosEnEspanol/>

Njoku, O., & Ekwueme, F. (2014). Proximate and micronutrient analyses of *Synsepalum dulcificum* pulp.

Recuperado el 19 de febrero del 2023 de <http://www.stuartxchange.org/MiracleFruit>

Obafemi, T. O., Olaleye, M. T., & Akinmoladun, A. C. (2019). Antidiabetic property of miracle fruit plant (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) leaf extracts in fructose-fed streptozotocin-injected rats via anti-inflammatory activity and inhibition of carbohydrate metabolizing enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, 244, 112124.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112124>

Olaitan, J. (Marzo de 2015). Composición proximal y mineral de la semilla de *Synsepalum Dulcificum*.

Recuperado el 19 de febrero del 2023 de

[https://www.researchgate.net/publication/332072410\\_Proximate\\_and\\_Mineral\\_Composition\\_of\\_Synsepalum\\_Dulcificum\\_Seed](https://www.researchgate.net/publication/332072410_Proximate_and_Mineral_Composition_of_Synsepalum_Dulcificum_Seed)

Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., & Gallegos-Infante, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación

iónica: una revisión sistemática. *Tecnológicas*, 24(52), e1962.

<https://doi.org/10.22430/22565337.1962>

Popa, G., Toma, R., & Boé, J. F. (2021). Experimental approaches targeting the biochemical and antioxidant potential of *Synsepalum dulcificum* dried fruits. *Romanian Biotechnological Letters*, 26(1), 2230-2235. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.1/2230.2235>

Redagícola. (2017). Recuperado el 28 de Mayo del 2019 de <http://www.redagricola.com/cl/acidez-la-fruta/>

Rich, A. (2010). Recuperado 6 de Enero del 2023 de [www.deepdyve.com/lp/elsevier/antioxidantrich-phytochemicals-in-miracle-berry-synsepalum-dulcificumxZkZG1exTK?articleList=%2Fsearch%3Fquery%3Dsynsepalum%2Bdulcificum](http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/antioxidantrich-phytochemicals-in-miracle-berry-synsepalum-dulcificumxZkZG1exTK?articleList=%2Fsearch%3Fquery%3Dsynsepalum%2Bdulcificum)

Salgado, M. V., Penko, J., Fernandez, A., Konfino, J., Coxson, P. G., Bibbins-Domingo, K., & Mejia, R. (2020). Projected impact of a reduction in sugar-sweetened beverage consumption on diabetes and cardiovascular disease in Argentina: A modeling study. *PLOS Medicine*, 17(7), e1003224. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003224>

Sanematsu, K., Kitagawa, M., Yoshida, R., Nirasawa, S., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2016). Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep22807>

Terán, J. (2015). Transformación de la baya roja (*Synsepalum dulcificum*) y su aplicación alimentaria para mejorar la salud humana. *Mikarimin. Revista Científica Multidisciplinaria*, 11 - 22.

Trees, P. F. (2014). Obtenido de <http://www.miraclefruit.info/>

Uday, V. (s. f.). *Mapa ubicación espe santo domingo*. <https://www.slideshare.net/VinicioUday/mapa-ubicacin-espe-santo-domingo>

Yañez, A. (2015). Gastroactitud. Esperando a la fruta milagrosa, la miraculina. Recuperado el 15 de Enero del 2023 de <https://www.gastroactitud.com/pista/esperando-a-la-fruta-milagrosa-lamiraculina/>

Valderrama, T. (s.f.). Determinación de Humedad en Frutas. Recuperado el 18 de Enero del 2023 de

<https://es.scribd.com/document/361404024/Determinacion-de-Humedad-enFrutas>

Vallejo, S., Arias, F., & Brito, H. (2020). Extracción de proteína de *Synsepalum dulcificum*. En Proceeding Book VII International Congress Application, transport and fluid storage in industrial process, hydrocarbons and environment (7.a ed., pp. 46-61). GIAD – Grupo de Investigación Ambiental y

Desarrollo de la ESPOCH. <http://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion->

[publicaciones/public/docs/books/2021-03-03-153443-](http://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion-publicaciones/public/docs/books/2021-03-03-153443-)

[PROCEEDING%20BOOK%20VII%20ICATFS%202020%20PUBLICACIONES.pdf](http://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion-publicaciones/public/docs/books/2021-03-03-153443-PROCEEDING%20BOOK%20VII%20ICATFS%202020%20PUBLICACIONES.pdf)