



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

**Efecto de la adición del extracto hidroetanólico de  
semilla de unguurahui (*Oenocarpus bataua* Mart.) en  
forma libre y microencapsulado sobre la calidad de la  
galleta**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

**AUTOR**

Nahum CAPILO HERRERA

Katherine Kelly NAVARRO VALDEZ

**ASESOR**

Oscar SANTISTEBAN ROJAS

Lima, Perú

2019

## DEDICATORIA

*A Dios, por ser mi guía y la fuente que me llena de fe, paz y amor. Gracias por haberme dado las fuerzas necesarias para poder terminar este trabajo de investigación, cumpliendo tu propósito y servirte así en otra área de mi vida.*

*A mis padres, Jesús e Irene, y a mi tío Juan, por todo su apoyo, comprensión y amor incondicional durante todo este tiempo, llenándome de valor y esperanza. Gracias por esos momentos que desde la infancia he vivido con ustedes y de los cuales serán mi mayor recuerdo en esta vida, los amo.*

*A mi hermano Javier, por todos tus consejos y apoyo que me ayudaron en muchas ocasiones a enrumbarme y seguir mi camino. Por esas travesuras de niños que recordaré con mucho cariño. A mi hermana Celeste, mujer esforzada y valiente, de quien tengo el anhelo de que algún día sea yo quien lea su tesis.*

*Y a mi mejor amiga de este mundo mundial, Kathy, gracias por todo este tiempo que pasamos juntos, correteando de un lugar a otro en búsqueda de puertas, que gracias a Dios, fueron abiertas y permitieron culminar este sueño que un día emprendimos juntos... “Más valen dos que uno, porque obtienen más fruto de su esfuerzo. Si caen, el uno levanta al otro”.*

***Nahum***

*A mi Dios. Mi fuerza viene de ti, tu Espíritu me reconforta, me alienta a seguir, me consuela y vuelve a animarme, tu perfecto amor me sostiene y me da la confianza y esperanza suficiente para saber que, a pesar de la adversidad, tú estás conmigo, que donde estoy no es mi destino, es solo el camino, que preciso de fe para llamar a las cosas que no son como si fueran y empezar a alinear mi mente y corazón a tu voluntad. Durante este tiempo de elaboración de tesis, tuviste como objetivos formar mi carácter, paciencia y humildad, y hoy puedo reconocer que contigo soy mejor. Ninguna puerta hubieras abierto, si no hubiera sido para mi crecimiento. Me enseñaste que, pare de reclamar y empiece a adorar; que todo lo que haga, lo haga como para ti y no como para agradar a los hombres; y que no me canse de hacer el bien, que a su debido tiempo cosecharé numerosas bendiciones si no me doy por vencida. Ordenaste mis tiempos y probaste mi corazón, querías un*

*servicio de excelencia en la iglesia, sin que dejara de avanzar la tesis, porque ambos son parte de tus planes para conmigo. Te doy las gracias porque tengo la convicción de que este paso en mi vida profesional no hubiera tenido sentido si no lo hubiera dado contigo, porque este título implica el dar un mayor y mejor servicio de calidad a otros como consecuencia de un mayor conocimiento adquirido. ¡Dios, eres bueno en todo tiempo!, ¡en todo tiempo, eres bueno, Dios!*

*He decidido no rendirme porque tú no te rendirás conmigo. Si el miedo me rodea, tu nombre clamaré, como el salmista diré: “Jehová es mi luz y mi salvación; ¿de quién temeré? Jehová es la fortaleza de mi vida; ¿de quién he de atemorizarme?”, y sé que tú me guardarás. Cuando mi mente me diga que no soy lo suficientemente buena, tú me dirás: “Bástate mi gracia; porque mi poder se perfecciona en la debilidad”. Cuando me sienta escasa de ideas, me recordarás este proverbio: “¡Pues el Señor concede sabiduría! De su boca provienen el saber y el entendimiento”. Cuando mis fuerzas se agoten, me recordarás: “Mi presencia irá contigo, y te daré descanso”. Cuando la desesperación me nuble, sienta desánimo y el proceso parezca interminable, traerás a mi mente este salmo: “Esfuézate, y aliéntese tu corazón. Sí, espera en Jehová”, y me diré: “El Señor es mi fuerza y mi escudo; mi corazón en él confía; de él recibo ayuda. Mi corazón salta de alegría, y con cánticos le daré gracias”, y cambiarás mi lamento en gozo, como solo tú sabes hacerlo. Cuando de pronto olvide tu propósito en mí, me reafirmarás: “He aquí, yo estoy contigo, y te guardaré por dondequiera que fueres, y volveré a traerte a esta tierra; porque no te dejaré hasta que haya hecho lo que he dicho”. Definitivamente, tus promesas me mantienen de pie. Toda la gloria sea para ti, amado Dios.*

*También quisiera dedicar esta tesis a mi madre Amanda y mi hermana Emily por todo el amor, comprensión y apoyo incondicional, y a la memoria de mi padre Javier, porque siempre creyó en mí y me motivó con su ejemplo a seguir adelante.*

*No podría terminar la dedicatoria sin hacer mención a mi mejor amigo de este mundo mundial, Nahum, porque aprendimos juntos a enfrentar el proceso de la tesis y hoy nos toca disfrutar el logro de haberla culminado. Tu amistad me hace mejor persona y me ayuda a crecer.*

**Kathy**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a **Dios**, quien hace realidad este sueño profesional que tanto habíamos anhelado y nos sorprende con sus bendiciones, su misericordia, su gracia y su favor.

A nuestro estimado asesor, el **Q.F. Oscar Pedro Santisteban Rojas**, por su dirección, apoyo, motivación, exigencia y contribuciones durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Jorge Ernesto Guevara Vásquez**, director de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial, por brindarnos el acceso a las instalaciones, equipos y materiales del laboratorio de Investigación y Desarrollo, por sus constantes revisiones al proyecto de tesis y por apoyarnos en los inicios de la presente tesis.

Al **Ing. Oscar Crisóstomo Gordillo**, por las veces que nos brindó su ayuda cuando surgían dudas y contribuyó con sus aportes durante el desarrollo de la tesis, en especial, por su gran empeño en la enseñanza del manejo de los softwares estadísticos y del análisis estadístico de los datos.

Al **Ing. Carlos Suca Apaza**, por su apoyo incondicional y orientación en el análisis proximal de las galletas.

Al **Ing. Leoncio Reyna Mariñas**, por su apoyo incondicional al darnos el acceso a las instalaciones, equipos y materiales de la Planta Piloto de la Facultad de Química e Ingeniería Química para el desarrollo de la presente tesis.

A **los demás docentes y personal de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial - UNMSM**, por su gran dedicación, conocimientos impartidos y su apoyo durante nuestros estudios universitarios.

Al **Mg. Domingo Iparraguirre León**, docente de la Facultad de Ciencias Biológicas, porque aun casi sin conocernos, nos regaló parte de su tiempo, nos orientó y brindó sabios consejos en la realización del proyecto de tesis y en la elaboración y ejecución inicial de la presente tesis, en especial, en el secado de la materia prima y proceso de extracción. Su excelente servicio nos motivó y conllevó a entablar una sincera amistad, aprecio y admiración hacia su persona.

Al **Dr. Julio Santiago Contreras** y a su equipo de investigación, en especial a la **Quím. Marlene Velásquez**, del laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Química e Ingeniería Química – UNMSM, por ser ejemplos de dedicación y empeño en las actividades de investigación, por la paciencia, confianza, orientación y apoyo brindado durante los experimentos realizados en la presente tesis.

A la **Mg. Elizabeth Deza Marti**, por su pronto apoyo y amabilidad al proporcionarnos los materiales que necesitábamos para los análisis instrumentales de la presente tesis.

Al **Ing. Teófilo Meneses Solis**, gracias al gran apoyo brindado y al carisma que le caracteriza hizo más llevadero el complicado proceso de la primera parte experimental de la tesis.

A la **Mg. María Rosario Calixto Cotos** y **Dra. Mónica Retuerto Figueroa**, por brindarnos su apoyo, consejos y acceso a las instalaciones del laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para la realización de la marcha fitoquímica del extracto hidroetanólico.

A la **bachiller Esperanza Salazar Ramires**, por su sincera amistad y apoyo incondicional en la recolección y envío de la materia prima.

A **nuestras familias**, principalmente a nuestros amados padres y hermanos, modelos de perseverancia, motivación y gran amor; entre ellos, a **Irene Herrera** y **Jesús Capillo**, y a **Javier Navarro†** y **Amanda Valdez**, sabemos que comparten nuestra alegría por un sueño más cumplido en nuestras vidas.

A **nuestros amigos**, por sus palabras de ánimo durante la realización de esta tesis, en especial, al **Ing. Marin Perez**, por su calidad humana, sabiduría, enorme comprensión, empatía y apoyo en la redacción de la última parte de la tesis.

Muchas gracias.

*“El Señor afirma los pasos del hombre  
cuando le agrada su modo de vivir;  
podrá tropezar, pero no caerá,  
porque el Señor lo sostiene de la mano”*  
**Salmos 37:23-24 (NVI)**

*“Deja en manos de Dios todo lo que haces,  
y tus proyectos se harán realidad”*  
**Proverbios 16:3 (TLA)**

**#VoyADisfrutarLaTesis**  
**#LoMejorEstaPorVenir**

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>13</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>17</b>
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
4.1.1. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS .....	18
4.1.2. ANTECEDENTES DE APLICACIÓN EN MATRICES ALIMENTARIAS .....	18
<b>4.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
4.2.1. PROCESO DE OXIDACIÓN.....	21
4.2.1.1. Oxidación en los alimentos .....	21
4.2.1.2. Estrés oxidativo en el organismo.....	22
4.2.2. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES .....	24
4.2.2.1. Antioxidantes.....	24
4.2.2.2. Importancia de los antioxidantes .....	25
4.2.2.2.1. <i>Rol de los antioxidantes en los alimentos</i> .....	25
4.2.2.2.2. <i>Rol de los antioxidantes en la salud</i> .....	26
4.2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	27
4.2.3.1. Tipos de antioxidantes según su mecanismo de acción.....	27
4.2.3.1.1. <i>Antioxidantes primarios</i> .....	27
4.2.3.1.2. <i>Antioxidantes secundarios</i> .....	28
4.2.3.2. Tipos de antioxidantes según su origen.....	29
4.2.3.2.1. <i>Antioxidantes sintéticos</i> .....	29

4.2.3.2.2.	<i>Antioxidantes naturales</i> .....	31
4.2.4.	COMPUESTOS FENÓLICOS.....	34
4.2.4.1.	Compuestos fenólicos en las plantas.....	34
4.2.4.2.	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	35
4.2.4.2.1.	<i>Ácidos fenólicos</i> .....	35
4.2.4.2.2.	<i>Flavonoides</i> .....	36
4.2.4.2.3.	<i>Lignanos y estilbenos</i> .....	39
4.2.4.3.	Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	40
4.2.4.4.	Residuos alimentarios como fuentes naturales de compuestos fenólicos.....	40
4.2.5.	UNGURAHUI.....	43
4.2.5.1.	Nombres comunes.....	43
4.2.5.2.	Descripción botánica.....	43
4.2.5.3.	Aspectos geográficos y climatológicos.....	45
4.2.5.4.	Usos tradicionales.....	45
4.2.5.4.1.	<i>Uso alimentario/ nutricional</i> .....	45
4.2.5.4.2.	<i>Uso medicinal /estético</i> .....	46
4.2.5.4.3.	<i>Uso en construcción/ artesanía</i> .....	47
4.2.5.5.	Potencial fenólico en la pulpa y semilla del fruto.....	47
4.2.6.	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	48
4.2.6.1.	Métodos de extracción convencionales.....	48
4.2.6.2.	Métodos de extracción no convencionales.....	49
4.2.6.2.1.	<i>Extracción asistida por ultrasonido (EAU)</i> .....	49
4.2.7.	METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR).....	51
4.2.7.1.	Definición.....	51
4.2.7.2.	Representación matemática.....	52
4.2.7.3.	Fases de la metodología.....	53
4.2.7.4.	Diseño Central Compuesto.....	53
4.2.7.5.	Extracción de compuestos de interés mediante la MSR.....	54
4.2.8.	MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	55
4.2.8.1.	Método del DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).....	55
4.2.8.2.	Método de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) o del fosfomolibdeno.....	56
4.2.8.3.	Determinación del contenido fenólico total por Folin-Ciocalteu.....	57
4.2.9.	MICROENCAPSULACIÓN.....	57
4.2.9.1.	Importancia de la microencapsulación.....	58



4.2.9.2.	Caracterización de las microcápsulas.....	58
4.2.9.3.	Microencapsulación mediante secado por aspersión .....	59
4.2.9.3.1.	<i>Descripción del proceso</i> .....	60
4.2.9.3.2.	<i>Maltodextrina como material encapsulante</i> .....	61
4.2.9.4.	Microencapsulación de compuestos fenólicos .....	62
4.2.10.	ALIMENTOS FUNCIONALES .....	62
4.2.10.1.	Situación de los alimentos funcionales.....	63
4.2.10.2.	Galletas .....	66
4.2.10.2.1.	<i>Clasificación</i> .....	67
4.2.10.2.2.	<i>Materias primas y su función en la elaboración de galletas</i> .....	67
4.2.10.2.3.	<i>Galletas enriquecidas</i> .....	68
4.2.10.3.	Caracterización en las galletas .....	69
4.2.10.3.1.	<i>Análisis de color</i> .....	69
4.2.10.3.2.	<i>Análisis sensorial</i> .....	70
4.2.10.3.3.	<i>Análisis proximal</i> .....	72
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>73</b>
<b>5.1.</b>	<b>LUGAR DE EJECUCIÓN</b> .....	<b>73</b>
<b>5.2.</b>	<b>MATERIALES Y EQUIPOS</b> .....	<b>73</b>
5.2.1.	REACTIVOS QUÍMICOS .....	73
5.2.2.	MATERIALES DE VIDRIO Y AFINES.....	73
5.2.3.	OTROS MATERIALES .....	74
5.2.4.	INSUMOS.....	74
5.2.5.	INSTRUMENTOS Y EQUIPOS .....	74
<b>5.3.</b>	<b>MATERIA PRIMA</b> .....	<b>75</b>
<b>5.4.</b>	<b>ENSAYOS PRELIMINARES</b> .....	<b>76</b>
5.4.1.	DETERMINACIÓN DE pH.....	76
5.4.2.	MARCHA DE SOLUBILIDAD .....	76
5.4.3.	MARCHA FITOQUÍMICA .....	77
<b>5.5.</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA SEMILLA DE UNGURAHUI</b> .....	<b>80</b>
5.5.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	80
5.5.2.	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS .....	82
5.5.3.	ANÁLISIS FENÓLICO Y ANTIOXIDANTE DE LOS EU.....	83
5.5.3.1.	Preparación de las muestras .....	83

5.5.3.2.	Determinación del contenido fenólico total (CFT).....	83
5.5.3.3.	Determinación de la capacidad antioxidante .....	84
5.5.3.3.1.	<i>Método de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) o del fosfomolibdeno</i> .....	84
5.5.3.3.2.	<i>Método del DPPH</i> .....	85
5.5.4.	OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO .....	86
<b>5.6.</b>	<b>MICROENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE UNGURAHUI.....</b>	<b>87</b>
5.6.1.	ANÁLISIS DE BARRIDO ESPECTRAL.....	88
5.6.2.	RENDIMIENTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN.....	88
5.6.3.	EFICIENCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN .....	89
5.6.4.	CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS EXTRACTOS.....	89
5.6.5.	ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS.....	89
5.6.6.	ANÁLISIS FENÓLICO Y ANTIOXIDANTE DE LAS MICROCÁPSULAS.....	90
5.6.7.	ANÁLISIS DE ESTABILIDAD FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	90
<b>5.7.</b>	<b>ELABORACIÓN DE GALLETAS ENRIQUECIDAS CON EXTRACTOS DE SEMILLA DE UNGURAHUI .....</b>	<b>91</b>
5.7.1.	FORMULACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE LAS GALLETAS ENRIQUECIDAS.....	91
5.7.2.	PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS GALLETAS ENRIQUECIDAS.....	92
5.7.3.	ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD .....	93
5.7.3.1.	Análisis de CFT de las galletas.....	93
5.7.3.2.	Medición del color de las galletas.....	93
5.7.3.3.	Análisis químico proximal de las galletas .....	94
5.7.3.4.	Análisis sensorial de las galletas .....	94
<b>5.8.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>96</b>
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>97</b>
<b>6.1.</b>	<b>ENSAYOS PRELIMINARES .....</b>	<b>97</b>
6.1.1.	DETERMINACIÓN DE pH.....	97
6.1.2.	MARCHA DE SOLUBILIDAD .....	97
6.1.3.	MARCHA FITOQUÍMICA .....	98
<b>6.2.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>100</b>
6.2.1.	ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	100
<b>6.3.</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>101</b>
6.3.1.	AJUSTE DE LOS MODELOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	101
6.3.2.	ANÁLISIS DE LOS MODELOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	105

6.3.2.1.	Rendimiento de extracción.....	105
6.3.2.2.	Contenido fenólico total.....	107
6.3.2.3.	Método de la capacidad antioxidante total (CAT) o del fosfomolibdeno.....	109
6.3.2.4.	Método del DPPH.....	111
6.3.3.	CORRELACIÓN ENTRE CFT Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	112
6.3.4.	OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO.....	113
<b>6.4.</b>	<b>MICROENCAPSULACIÓN.....</b>	<b>116</b>
6.4.1.	ANÁLISIS DE BARRIDO ESPECTRAL.....	116
6.4.2.	RENDIMIENTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN (RM).....	117
6.4.3.	EFICIENCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN (EM).....	118
6.4.4.	CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS EXTRACTOS.....	118
6.4.5.	ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS.....	118
6.4.6.	ANÁLISIS FENÓLICO Y ANTIOXIDANTE DE LAS MICROCÁPSULAS.....	121
6.4.7.	ESTABILIDAD FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS (EUL Y EUM) DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	122
<b>6.5.</b>	<b>INCORPORACIÓN DE LOS EXTRACTOS EN LAS GALLETAS.....</b>	<b>124</b>
6.5.1.	EFFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LA GALLETA.....	124
6.5.1.1.	Efecto sobre el contenido fenólico total (CFT).....	124
6.5.1.2.	Efecto sobre el color.....	126
6.5.1.3.	Efecto sobre la composición proximal.....	127
6.5.1.4.	Efecto sobre los atributos sensoriales.....	129
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>132</b>
<b>IX.</b>	<b>LISTA DE REFERENCIAS.....</b>	<b>133</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>172</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **AAR:** Actividad antioxidante relativa.
- **Ab<sub>S<sub>prom</sub></sub>:** Absorbancia promedio.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AMF:** Ácido molibdofosfórico.
- **AOAC:** Asociación de Químicos Analíticos Oficiales.
- **ATP:** Adenosín trifosfato.
- **BHA:** Butilhidroxianisol.
- **BHT:** Butilhidroxitolueno.
- **CAT:** Capacidad antioxidante total.
- **CFS<sub>M</sub>:** Contenido fenólico superficial de las microcápsulas.
- **CFT:** Contenido fenólico total.
- **CFT<sub>M</sub>:** Contenido fenólico total de las microcápsulas.
- **C.V:** Coeficiente de variación.
- **DCC:** Diseño central compuesto.
- **DCCO:** Diseño central compuesto ortogonal.
- **DPPH:** 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo.
- **EAA:** Equivalente de ácido ascórbico.
- **EAG:** Equivalente de ácido gálico.
- **EAU:** Extracción asistida por ultrasonido.
- **ED:** Equivalente dextrosa.
- **EM:** Eficiencia de la microencapsulación.
- **EROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- **EtOH:** Etanol.
- **EU:** Extractos de semilla de unguirahui.
- **EUL:** Extracto de semilla de unguirahui libre.
- **EUL<sub>M</sub>:** Extracto de semilla de unguirahui libre, bajo condiciones de atomización, sin maltodextrina.
- **EUM:** Extracto de semilla de unguirahui microencapsulado.
- **FAO:** Organización para la Alimentación y la Agricultura (sigla en inglés).

- **FM:** Fosfomolibdeno
- **F-C:** Folin-Ciocalteu
- **FRAP:** Poder antioxidante reductor del hierro (sigla en inglés).
- **G-C:** Galleta control
- **G-EUL:** Galleta con extracto de semilla de ungurahui libre
- **G-EUM:** Galleta con extracto de semilla de ungurahui microencapsulado
- **GP:** Galato de propilo
- **HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución (sigla en inglés).
- **I.C:** Intervalo de confianza
- **LOF:** Falta de ajuste
- **MSR:** Metodología de Superficie de Respuesta
- **PA:** Precisión adecuada
- **RM:** Rendimiento de la microencapsulación
- **pH:** Potencial de hidrógeno
- **R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación
- **SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido (sigla en inglés).
- **TBC:** Tuberculosis
- **TBHQ:** Terbutil hidroquinona
- **TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente de Trolox (sigla en inglés).
- **UV-vis.:** Ultravioleta- visible

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales frente a los sintéticos.....	33
<b>Tabla 2.</b> Compuestos fenólicos en residuos de diversas frutas.....	42
<b>Tabla 3.</b> Composición fenólica del extracto de pulpa de ungurahui.....	48
<b>Tabla 4.</b> Alimentos funcionales con ingredientes peruanos en su formulación.....	64
<b>Tabla 5.</b> Declaraciones alimentarias en la etiqueta de los productos funcionales más vendidos a nivel mundial en el 2009.....	65
<b>Tabla 6.</b> Alimentos enriquecidos con extractos vegetales.....	66
<b>Tabla 7.</b> Clasificación de las pruebas sensoriales.....	71
<b>Tabla 8.</b> Factores y niveles del Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO).....	80
<b>Tabla 9.</b> Diseño experimental de las condiciones de extracción obtenidas con el Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO).....	81
<b>Tabla 10.</b> Formulación de las galletas enriquecidas.....	92
<b>Tabla 11.</b> Marcha de solubilidad del extracto hidroetanólico de semilla de ungurahui.....	98
<b>Tabla 12.</b> Marcha fitoquímica del extracto hidroetanólico de semilla de ungurahui.....	99
<b>Tabla 13.</b> Rendimiento de la extracción, contenido fenólico total y capacidad antioxidante de los extractos de semilla de ungurahui (EU) aplicando el DCCO.....	102
<b>Tabla 14.</b> Análisis de regresión múltiple de los modelos polinomiales de las variables de respuesta.....	103
<b>Tabla 15.</b> Valores optimizados de los factores de extracción.....	113
<b>Tabla 16.</b> Validación de los modelos de Superficie de Respuesta.....	115
<b>Tabla 17.</b> Caracterización organoléptica de los extractos.....	118
<b>Tabla 18.</b> Contenido fenólico total y capacidad antioxidante (por DPPH) del EUM y su comparación con el EUL.....	122
<b>Tabla 19.</b> Contenido fenólico total por paquete de galleta antes y después del horneado.....	125
<b>Tabla 20.</b> Medición del color de las galletas.....	127
<b>Tabla 21.</b> Análisis químico proximal de las galletas.....	128
<b>Tabla 22.</b> Aceptabilidad sensorial de las galletas.....	130

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fuentes de radicales libres.....	22
<b>Figura 2.</b> Alteración de la membrana celular por radicales libres.....	23
<b>Figura 3.</b> Neutralización de un radical libre por un antioxidante.....	24
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción del BHA.....	29
<b>Figura 5.</b> Estructura química del grupo fenol.....	34
<b>Figura 6.</b> Estructura química de los ácidos fenólicos.....	36
<b>Figura 7.</b> Estructura química de los flavonoides.....	37
<b>Figura 8.</b> Palmera de unguurahui.....	44
<b>Figura 9.</b> Racimo de unguurahui con frutos maduros suspendidos.....	44
<b>Figura 10.</b> Fruto de unguurahui con la señalización de sus partes.....	45
<b>Figura 11.</b> Cavitación producida por la EAU.....	50
<b>Figura 12.</b> Colapso de burbujas por cavitación y liberación de compuestos de interés.....	50
<b>Figura 13.</b> Superficie 3D y de contorno de la MSR.....	53
<b>Figura 14.</b> Diseño central compuesto de dos factores.....	54
<b>Figura 15.</b> Estructura del DPPH al reaccionar con un antioxidante.....	56
<b>Figura 16.</b> Reacción estequiométrica del ensayo del fosfomolibdeno.....	57
<b>Figura 17.</b> Morfología de diferentes tipos de microcápsulas.....	59
<b>Figura 18.</b> Equipo de secado por aspersión tipo laboratorio.....	60
<b>Figura 19.</b> Evolución del mercado de los ingredientes alimentarios y su previsión al 2020.....	63
<b>Figura 20.</b> Espacio de color CIE L*a*b*.....	70
<b>Figura 21.</b> Flujo de operaciones para la obtención del polvo fino de semilla de unguurahui.....	75
<b>Figura 22.</b> Flujo de operaciones para la obtención y análisis del extracto de semilla de unguurahui libre (EUL).....	87
<b>Figura 23.</b> Flujo de operaciones para la obtención y análisis del extracto de semilla de unguurahui microencapsulado (EUM).....	91
<b>Figura 24.</b> Flujo de operaciones para la obtención y análisis de las galletas enriquecidas.....	95
<b>Figura 25.</b> Correlación entre los valores estimados y observados de las variables de respuesta...	104
<b>Figura 26.</b> Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol (X <sub>1</sub> , %) y tiempo de extracción (X <sub>2</sub> , min) sobre el rendimiento de extracción.....	107
<b>Figura 27.</b> Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol (X <sub>1</sub> , %) y tiempo de	

extracción ( $X_2$ , min) sobre el contenido fenólico total.....	109
<b>Figura 28.</b> Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol ( $X_1$ , %) y tiempo de agitación ( $X_2$ , min) sobre la capacidad antioxidante medida por el método CAT.....	110
<b>Figura 29.</b> Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol ( $X_1$ , %) y tiempo de extracción ( $X_2$ , min) sobre la capacidad antioxidante medida por el método DPPH.....	112
<b>Figura 30.</b> Correlación entre el CFT y la capacidad antioxidante de los 10 EU.....	113
<b>Figura 31.</b> Deseabilidad de las condiciones óptimas de la extracción.....	114
<b>Figura 32.</b> Barrido espectral de los extractos hidroetanólicos de semilla de ungurahui.....	116
<b>Figura 33.</b> Morfología de los extractos a diferentes ampliaciones.....	120
<b>Figura 34.</b> Curva de distribución del tamaño de partícula.....	120
<b>Figura 35.</b> Evaluación de la estabilidad de compuestos fenólicos en los extractos almacenados..	124
<b>Figura 36.</b> Color de las galletas horneadas.....	127
<b>Figura 37.</b> Atributos sensoriales de las galletas.....	130
<b>Figura 38.</b> Obtención del polvo fino de semilla de ungurahui.....	178
<b>Figura 39.</b> pH y prueba de solubilidad.....	179
<b>Figura 40.</b> Marcha fitoquímica.....	181
<b>Figura 41.</b> Obtención de los extractos de semilla de ungurahui (EU).....	184
<b>Figura 42.</b> Obtención del extracto de semilla de ungurahui libre (EUL).....	185
<b>Figura 43.</b> Obtención del extracto de semilla de ungurahui microencapsulado (EUM).....	187
<b>Figura 44.</b> Elaboración de galletas enriquecidas (G-EUL y G-EUM) y G-C.....	188
<b>Figura 45.</b> Análisis del contenido fenólico total (CFT) por el método de Folin-Ciocalteu.....	189
<b>Figura 46.</b> Análisis de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....	190
<b>Figura 47.</b> Análisis de la capacidad antioxidante por el método CAT.....	192
<b>Figura 48.</b> Análisis de morfología y tamaño de EUL y EUM.....	193
<b>Figura 49.</b> Desengrase de galletas para extracción y posterior análisis de CFT.....	194
<b>Figura 50.</b> Análisis proximal de las galletas (G-EUL, G-EUM y G-C).....	196
<b>Figura 51.</b> Análisis sensorial de las galletas (G-EUL, G-EUM y G-C).....	197



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b><u>Anexo I.</u></b> Análisis taxonómico del <i>Oenocarpus bataua</i> Mart.....	172
<b><u>Anexo II.</u></b> Análisis de capacidad antioxidante de los EU por el método DPPH.....	173
<b><u>Anexo III.</u></b> Análisis de capacidad antioxidante de los EU por el método CAT.....	174
<b><u>Anexo IV.</u></b> Análisis de proteínas de G-C horneada.....	175
<b><u>Anexo V.</u></b> Análisis de proteínas de G-EUL horneada.....	176
<b><u>Anexo VI.</u></b> Análisis de proteínas de G-EUM horneada.....	177
<b><u>Anexo VII.</u></b> Galería de figuras.....	178
<b><u>Anexo VIII.</u></b> Ficha técnica de la maltodextrina.....	198
<b><u>Anexo IX.</u></b> Formato del cuestionario para la prueba hedónica (análisis sensorial).....	199
<b><u>Anexo X.</u></b> Datos para la curva de calibración de ácido gálico a 760 nm.....	199
<b><u>Anexo XI.</u></b> Datos para la curva de calibración de ácido ascórbico a 695 nm.....	200
<b><u>Anexo XII.</u></b> Porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa con respecto al ácido ascórbico (% AAR) del extracto de semilla de ungurahui a 10 ppm (mg/L).....	200
<b><u>Anexo XIII.</u></b> Pesos de la semilla de ungurahui en sus etapas de procesamiento.....	200
<b><u>Anexo XIV.</u></b> Determinación del CFT en g. de polvo fino, semilla y fruto.....	201
<b><u>Anexo XV.</u></b> Determinación de la cantidad de EUL y EUM por unidad de galleta.....	201

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la adición del extracto hidroetanólico de semilla de unguirahui (*Oenocarpus bataua* Mart.) en forma libre y microencapsulado sobre la calidad de la galleta. El fruto fue adquirido en la ciudad de Pucallpa. La semilla seca y pulverizada fue utilizada como soluto en las extracciones hidroetanólicas. Se realizaron análisis preliminares de pH, marcha fitoquímica y solubilidad al extracto, el cual presentó pH casi neutro, compuestos fenólicos con predominio de flavonoides y taninos, de mediana y alta polaridad.

La extracción fue optimizada mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), usando el Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO), con dos factores: concentración de etanol (48.44 - 91.56 %) y tiempo de extracción (13.83 - 46.17 min), sobre cuatro variables de respuesta: rendimiento, contenido fenólico total (CFT) y capacidad antioxidante por CAT y DPPH. Los extractos secos fueron analizados. Los resultados mostraron que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la capacidad antioxidante. Las condiciones óptimas de extracción, 48.44% de etanol y 13.83 min, maximizaron simultáneamente todas las variables y fueron aplicadas experimentalmente para validar el modelo y obtener el extracto de semilla de unguirahui libre (EUL).

El EUL fue microencapsulado con maltodextrina por secado por aspersión. Luego de la encapsulación, se evidenció que la temperatura de secado no afectó al extracto de semilla de unguirahui microencapsulado (EUM), ya que se conservó su CFT y su capacidad antioxidante. Se obtuvieron rendimiento (84.16%) y eficiencia (83.96%) relativamente altos, y las microcápsulas presentaron tamaño homogéneo y abolladuras superficiales, pero sin rupturas, preservando la capacidad antioxidante del extracto. Tras 180 días de almacenamiento, el CFT del EUM, a diferencia del EUL, se mantuvo estable debido al efecto protector de la maltodextrina.

El EUL y EUM fueron incorporados en galletas, a las cuales se realizaron pruebas de calidad. Después del horneado, el CFT de la galleta enriquecida con EUL (G-EUL), a diferencia de aquella con EUM (G-EUM), presentó significativa degradación fenólica; sin embargo, ambas galletas tuvieron CFT similar ( $\approx 70$  mg EAG/paquete). En el análisis sensorial, G-EUL presentó mejor color y apariencia; sin embargo, la textura, sabor y olor de G-EUM resultaron más atractivos, además de su menor contenido de grasa luego del horneado según el análisis proximal. Por lo tanto, EUL y EUM poseen compuestos fenólicos que los potencializa como ingredientes naturales con poder antioxidante para el enriquecimiento de galletas, las cuales, al ser consumidas presentan mayor aceptabilidad que una galleta no enriquecida y de igual formulación.

**Palabras claves:** *Oenocarpus bataua*, extracción de compuestos fenólicos, microencapsulación, galleta enriquecida, antioxidante natural.

## SUMMARY

The objective of this work is to evaluate the effect of the addition of hydroethanolic unguurahui seed extract (*Oenocarpus bataua* Mart.) in free and microencapsulated form on cookie quality. The fruit was acquired in Pucallpa city. Dried and powdered seed was used as solute in hydroethanolic extractions. Preliminary analyzes of pH, phytochemical screening and solubility were made to the extract, which presented almost neutral pH, phenolic compounds with predominance of flavonoids and tannins, of medium and high polarity.

Extraction was optimized by Response Surface Methodology (MSR), using the Orthogonal Composite Central Design (DCCO), with two factors: ethanol concentration (48.44 - 91.56 %) and extraction time (13.83 - 46.17 min), on four response variables: yield, total phenolic content (CFT) and antioxidant capacity by CAT and DPPH. The dried extracts were analyzed. The results showed that phenolic compounds are the main responsible for the antioxidant capacity. The optimal extraction conditions, 48.44% ethanol and 13.83 min, simultaneously maximized all the variables and were applied experimentally to validate the model and obtain the free unguurahui seed extract (EUL).

EUL was microencapsulated with maltodextrin by spray drying. After the encapsulation, it was evidenced that drying temperature did not affect the microencapsulated unguurahui seed extract (EUM), due to CFT and antioxidant capacity were retained. Yield (84.16%) and efficiency (83.96%) were relatively high, and the microcapsules presented homogeneous size and superficial dents, but without ruptures, preserving the extract antioxidant capacity. After 180 days of storage, EUM's CFT, unlike EUL's, remained stable due to the protective effect of maltodextrin.

EUL and EUM were incorporated into cookies, to which quality tests were carried out. After baking, cookie's CFT enriched with EUL (G-EUL), unlike the one with EUM (G-EUM), presented significant phenolic degradation; however, both cookies had similar CFT ( $\approx 70$  mg EAG / pack). In the sensory analysis, G-EUL presented better color and appearance; however, G-EUM's texture, taste and odor were more attractive, in addition to its lower fat content after baking, according to the proximal analysis. Therefore, EUL and EUM have phenolic compounds that potentiate them as natural ingredients with antioxidant power for the enrichment of cookies, which, when consumed, present greater acceptability than a non-enriched cookie of the same formulation.

**Key words:** *Oenocarpus bataua*, extraction of phenolic compounds, microencapsulation, enriched cookie, natural antioxidant.

## I. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son de considerable interés y han recibido más atención en los últimos años debido a sus funciones bioactivas que incluyen propiedades antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias y antimutagénicas (Peng et al., 2010; Skowrya, 2014). En efecto, diversos estudios han demostrado consistentemente que el consumo de alimentos derivados de plantas ricas en polifenoles tiene un efecto protector contra el estrés oxidativo, ya que previenen las reacciones de oxidación que pueden producir radicales libres, pero para hacerlo, ellos mismos deben oxidarse, disminuyendo de esta manera el riesgo de enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades degenerativas (Vasconcelos, Garcia-Diaz, Jimenez y Silva, 2013; Watson, Preedy y Zibadi, 2014; Marquardt y Watson, 2014; González y González, 2010). Debido a la preocupación creciente por parte de los consumidores sobre la necesidad de mantener la salud corporal y el bienestar general, las industrias están interesadas en evitar el potencial daño de los aditivos alimentarios sintéticos y en desarrollar nuevos alimentos funcionales que contengan ingredientes que promuevan la salud (Barreiro y Ferreira, 2014). Entre los componentes bioactivos, los antioxidantes fenólicos han sido vistos como una clase importante de ingredientes alimentarios, ya sea como aditivos alimentarios o como ingredientes novedosos para darles valor agregado a los productos y para introducir beneficios adicionales a la salud (Peng et al., 2010).

Entre los productos con valor agregado, se encuentran aquellos desarrollados a partir de los residuos generados por las industrias de procesamiento de alimentos y agrícolas (Balasundram, Sundram y Samman, 2006). Entre los residuos, se encuentran semillas, cáscaras, tallos y hojas de plantas que contienen una cantidad sustancial de compuestos fenólicos e incluso, muchas veces, en cantidades mayores que las porciones comestibles (Soong y Barlow, 2004; González y González, 2010); por lo tanto, pueden usarse como fuentes baratas de antioxidantes naturales para aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias (Natukunda, Muyonga y Mukisa, 2015). Las semillas de frutas contienen una variedad de compuestos fitoquímicos activos, especialmente constituyentes fenólicos, flavonoides, antocianinas, vitamina C y carotenoides que, gracias a su alta actividad antioxidante, influyen positivamente en la salud humana (Shi, Yu, Pohorly y Kakuda, 2003; Jing et al., 2012; Ghafoor, Choi, Jeon y Jo, 2009). Por lo tanto, una forma creativa de lograr aumentar la ingesta de antioxidantes en la dieta humana es mediante el enriquecimiento de productos alimenticios con semillas ricas en fitoquímicos. En la región amazónica, entre la diversidad de

palmeras que presentan amplias posibilidades de ser explotadas comercialmente y con frutos ricos en antioxidantes naturales que pueden ser empleados en la industria alimentaria, se destaca el unguirahui (*Oenocarpus bataua* M.) (Amazonas, 2008). La semilla del unguirahui es un residuo en la obtención de la pulpa y aceite del fruto, con muy poca, pero relevante información bibliográfica sobre su poder antioxidante (Hidalgo, Nunomura y Nunomura, 2016) y que tiene el potencial de proporcionar antioxidantes de bajo costo, además de ser una alternativa económica para las comunidades nativas y para la conservación de los bosques de Pucallpa.

Para realizar la extracción de compuestos fenólicos de fuentes vegetales en el menor tiempo, mínima cantidad de solvente y mayor rendimiento posible es recomendable aplicar la técnica de extracción asistida por ultrasonido (EAU), debido a que es rápida y eficaz (Dranca y Oroian, 2016; Larrea, 2012). Además, si esta técnica es optimizada, se logra extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos de una muestra. Para este propósito, se utiliza la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), que permite obtener las mejores condiciones de los factores para alcanzar la mayor respuesta posible a partir de una cantidad reducida de experimentos, lo que resulta en una ventaja económica frente a los métodos clásicos de experimentación (Gimeno, 2015). Al momento de analizar las respuestas de la extracción, como la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de un material vegetal o producto, existen numerosos métodos disponibles; entre ellos, el método del DPPH y del fosfomolibdeno permiten conocer la capacidad antioxidante; mientras que el método Folin-Ciocalteu, el contenido fenólico total. Estos métodos de análisis han venido demostrando resultados bastante confiables y reproducibles en los últimos años (Larrea, 2012; Belizario y Cahuama, 2014; Montes De Oca, 2014).

Por otro lado, durante el procesamiento de los alimentos, especialmente los que son sometidos a tratamiento térmico, durante el almacenamiento, distribución y/o consumo, los componentes alimentarios, especialmente, los aditivos fenólicos son vulnerables a la degradación o destrucción por exposición al entorno ambiental adverso, pudiendo desencadenar alteraciones significativas en sus capacidades antioxidantes y causando la reducción de su funcionalidad y disponibilidad; además, algunos de ellos tienen sabor desagradable cuando se encuentran en su forma natural en los alimentos (Garti y McClements, 2012; Peng et al., 2010). Ante esto, hay una necesidad de protegerlos sin comprometer las propiedades sensoriales de los alimentos, y es la encapsulación de los polifenoles la que ayudaría a solucionar esta necesidad. La microencapsulación del compuesto bioactivo con un biopolímero lo protege del estrés físico y químico, es un proceso de atrapamiento,

envoltura e inmovilización del compuesto activo dentro de un material más estable, que puede ser liberado a velocidad controlada y bajo condiciones específicas. Entre los métodos de microencapsulación, el secado por aspersión o *spray drying* es la técnica más comúnmente utilizada en la industria alimentaria (Shahidi y Han, 1993). Implica la atomización de un producto líquido en una corriente de gas caliente y dentro de una cámara de secado para obtener instantáneamente un polvo a base de microesferas o microcápsulas. Este proceso necesita de un encapsulante adecuado y uno bastante conocido por formar película con facilidad, poseer baja densidad aparente, excelente sensación en la boca y formar una barrera al oxígeno es la maltodextrina (Ezhilarasi, Indrani, Jena y Anandharamakrishnan, 2013; Pasrija, Ezhilarasi, Indrani y Anandharamakrishnan, 2015; Garti y McClements, 2012; Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley y Saurel, 2007).

La incorporación de compuestos bioactivos microencapsulados en los alimentos es esencial para aumentar su ingesta y permitir el desarrollo de nuevos alimentos funcionales; sin embargo, los efectos de estos compuestos sobre la calidad del producto ha sido evaluado solamente en algunos estudios (Ezhilarasi et al., 2013; Pasrija et al., 2015). Las galletas son productos de panadería ampliamente consumidos, de bajo costo y larga vida útil, que en los últimos años han sido seleccionadas como un modelo alimenticio adecuado en una variedad de estudios que buscan examinar los antioxidantes de los polifenoles en el procesamiento térmico (Umesha, Manohar, Indiramma, Akshitha y Naidu, 2015; Petrović, Loncarevic, Šaponjac, Pajin y Zaric, 2016; Natukunda et al., 2015; Tumbas Šaponjac et al., 2016) Así que, las galletas se consideran apropiadas para incorporar microencapsulados durante su preparación.

Por lo tanto, en esta tesis se evaluó el efecto de la adición del extracto hidroetanólico de semilla de unguirahui (*Oenocarpus bataua* Mart.) en forma libre y microencapsulado sobre la calidad de la galleta.

## II. HIPÓTESIS

La adición de los extractos hidroetanólicos de semilla de ungurahui (*Oenocarpus bataua* Mart.) en forma libre y microencapsulado, mejora significativamente la calidad de la galleta con respecto al control (galleta sin adición de extractos).

## III. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición del extracto hidroetanólico de semilla de ungurahui (*Oenocarpus bataua* Mart.) en forma libre y microencapsulado sobre la calidad de la galleta.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Realizar las pruebas preliminares (determinación de pH, marcha de solubilidad y marcha fitoquímica) al extracto hidroetanólico de semilla de ungurahui.
- 3.2.2. Determinar las condiciones óptimas de tiempo de extracción y concentración de etanol que maximicen simultáneamente las variables de respuesta (rendimiento, contenido fenólico total (CFT) y capacidad antioxidante por DPPH y CAT) mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).
- 3.2.3. Evaluar la correlación entre el CFT y la capacidad antioxidante de los extractos de semilla de ungurahui (EU).
- 3.2.4. Microencapsular el extracto de semilla de ungurahui libre (EUL) mediante secado por aspersión, y evaluar el efecto protector de la maltodextrina mediante el análisis de barrido espectral, CFT y capacidad antioxidante del extracto de semilla de ungurahui microencapsulado (EUM).
- 3.2.5. Comparar las características organolépticas, morfología y tamaño de partícula y estabilidad fenólica durante el almacenamiento entre el EUL y EUM.
- 3.2.6. Elaborar las galletas enriquecidas con EUL (G-EUL) Y EUM (G-EUM) y evaluar las características de calidad (CFT, medición del color, análisis proximal y análisis sensorial) de las mismas.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1. ANTECEDENTES

#### 4.1.1. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

Hidalgo et al. (2016) en su artículo titulado “Plantas Oleaginosas Amazônicas: Química e Atividade Antioxidante de Patauá (*Oenocarpus bataua* Mart.)”, realizaron la extracción metanólica de pulpa y semilla secas de 20 frutos de patauá, por separado, con hexano y metanol para la realización de los ensayos antioxidantes y aislamiento fitoquímico. El extracto metanólico de semillas presentó un elevado contenido de fenoles totales y mayor actividad antioxidante que el de pulpas, ya que presentó una mayor capacidad reductora de Fe (III) y una menor concentración capaz de secuestrar el 50% de radicales de DPPH. El valor de secuestro de radicales de DPPH presentado por el extracto de semillas fue comparable al observado para el patrón de quercetina (CS50 = 6,5 µg / ml), indicando la significativa actividad para esa parte de los frutos. Estos resultados mostraron el gran potencial del patauá para producir productos nutraceuticos.

Rezaire et al. (2014), a través del artículo “Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): Chemical and biological antioxidant activity – Phytochemical composition”, determinaron la actividad antioxidante del fruto de esta palma y su composición de polifenoles usando como referencia al *Euterpe oleracea* (açai). Los resultados mostraron que el fruto de unguurahui tenía una capacidad antioxidante más fuerte que el açai en las pruebas TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox) y FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro), y se observó una actividad similar mediante el método de DPPH. La composición polifenólica, determinada por HPLC/MS, implicó la presencia de antocianinas, taninos condensados, estilbenos y ácidos fenólicos, que son bastante conocidos por sus actividades biológicas. Estos resultados presentan al unguurahui como un nuevo recurso amazónico para alimentos.

#### 4.1.2. ANTECEDENTES DE APLICACIÓN EN MATRICES ALIMENTARIAS

Tumbas Šaponjac et al (2016), en su artículo “Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies”, extrajeron los compuestos bioactivos del orujo de cereza, los encapsularon en suero (WE) y proteína de soya (SE) e incorporaron en galletas, reemplazando el 10% (WE10 y SE10) y el 15% (WE15 y SE15) de la harina. Después de 4 meses de almacenamiento, no hubo pérdida de polifenoles, mientras que la actividad antioxidante disminuyó



ligeramente. Los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) de las galletas se vieron influenciados por el color de los encapsulados. Los resultados también mostraron que las galletas tenían cualidades sensoriales aceptables. Se concluyó que los bioactivos encapsulados de orujo de cereza influyeron positivamente en las características de las galletas fortificadas, siendo una forma prometedora para el desarrollo funcional de alimentos debido al contenido de antioxidantes y la estabilidad de almacenamiento que brinda la encapsulación.

Caleja et al (2016), en su artículo “Cottage cheeses functionalized with fennel and chamomile extracts: Comparative performance between free and microencapsulated forms”, incorporaron extractos acuosos de hinojo y manzanilla, libre y microencapsulado, en el requesón. Los requesones enriquecidos con extractos microencapsulados mostraron, después del séptimo día, una mayor actividad antioxidante que estudios previos donde solo se incorporó el extracto libre, logrando una bioactividad extendida. Por lo tanto, se concluyó que el requesón fue enriquecido efectivamente sin causar variaciones considerables en los valores nutricionales y de color, o en los perfiles de ácidos grasos.

Pasrija et al. (2015), en su artículo “Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality” incorporaron extracto libre y extractos microencapsulados con maltodextrina, por atomización y liofilización, de té verde en la preparación del pan con el objetivo de evaluar las características de calidad en el producto final. Los resultados revelaron que el extracto libre y los encapsulados de té verde incorporados al pan conservaron su calidad en términos de volumen y consistencia de la miga y fueron casi similar al control. Por otra parte, no hubo mucha diferencia significativa en el contenido fenólico total del extracto libre y los microencapsulados de té verde incorporados a los panes durante la cocción. Sin embargo, el color y el sabor de los panes con extracto encapsulado fue ligeramente mejor (estadísticamente insignificante) que el pan con extracto libre. Se concluye que la fortificación del pan con polifenoles, como, por ejemplo, del té verde, puede conservar las características de calidad del pan junto con la funcionalidad. Esto ayuda a complementar la ingesta de polifenoles y reducir las enfermedades degenerativas.

Ribeiro et al. (2015), en su artículo “Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients”, trabajaron con extractos hidroalcohólicos de dos especies de hongos, *Suillus luteus* (Sl) y *Coprinopsis atramentaria* (Ca), por su efecto antioxidante sinérgico y su viabilidad como ingredientes alimentarios funcionales probados por incorporación en el requesón. Las microcápsulas con Sl: Ca (1: 1) y con extracto libre

(en la misma proporción) se incorporaron al requesón. Los resultados mostraron que, en comparación con la forma libre, los extractos encapsulados se volvieron más efectivos ya que la actividad antioxidante se conservó a lo largo del tiempo. Ambas muestras de requesón enriquecidas mantuvieron sus propiedades nutricionales en comparación con la muestra control; además, no se notaron modificaciones de color.

Çam, İçyer y Erdoğan (2013), en su artículo “Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development”, evaluaron el efecto de la adición de un extracto acuoso óptimo de cáscara de granada a 0.5 y 1.0% (p/p), microencapsulado con maltodextrina en relación 1:1, 1:3, 1:6 y 1:10 (p/p) en las propiedades funcionales del helado. Los resultados mostraron una mejora significativa de las actividades inhibitoras de antioxidantes de los helados enriquecidos en comparación con la muestra control, siendo las microcápsulas de relación 1:1 y 1:3 (p/p) de extracto: maltodextrina las que tuvieron mayor contenido fenólico. Más del 75% de los panelistas aceptaron los helados enriquecidos en la evaluación sensorial, pudiendo ser introducidos al público en general como potenciales alimentos funcionales.

Sun-Waterhouse et al. (2009), en su artículo “Kiwifruit-based polyphenols and related antioxidants for functional foods: kiwifruit extract-enhanced gluten-free bread”, investigaron la producción de pan sin gluten mejorado con polifenoles y antioxidantes derivados de un extracto acuoso de puré de kiwi verde-maduro previamente seleccionado por tener buenas cantidades de contenido fenólico y de vitamina C, y buena estabilidad de almacenamiento. El pan resultante mejorado con extracto de kiwi fue aceptable para el panel de degustación, con una textura más suave que el pan simple sin gluten. Por lo tanto, el extracto acuoso de puré de kiwi tiene potencial como ingrediente funcional, debido a la posibilidad de proporcionar componentes beneficiosos para la salud como polifenoles y antioxidantes en la formulación de alimentos de consumo popular, siendo un enfoque novedoso en el uso de bioactivos de fruta destinados a usuarios finales.

## 4.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.2.1. PROCESO DE OXIDACIÓN

Los radicales libres son grupos de átomos que se caracterizan por tener un electrón no apareado en el último orbital, por ello son muy reactivos (inestables) y reaccionan fácilmente con otras sustancias para alcanzar su estabilidad (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballos y Méndez, 2010). El oxígeno es la molécula más importante en la generación de radicales libres, siendo los principales radicales derivados de este: el superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo ( $OH^-$ ) y los radicales generados durante la peroxidación lipídica (peroxilo ( $ROO^-$ ), alcoxi ( $RO^-$ ) e hidroperóxido ( $-ROOH$ )). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), si bien no es un radical libre en sí, tiene la facilidad de formarlos cuando las condiciones le son favorables (Gutiérrez y Morales, 2004). Estos radicales poseen una alta toxicidad y tienen la capacidad de alterar el comportamiento de diversas biomoléculas, provocando daño a nivel celular y tisular (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000).

#### 4.2.1.1. Oxidación en los alimentos

El deterioro oxidativo en los alimentos, especialmente los ricos en grasas, está influenciado principalmente por las reacciones con el oxígeno molecular a través de un mecanismo autocatalítico (descomposición de hidroperóxidos o catálisis metálica) y por las reacciones fotoquímicas donde participan los pigmentos a través de la oxidación de componentes fotosensibles (Nawar, 1996). Los hidroperóxidos, productos iniciales de la peroxidación lipídica, son insípidos e inodoros; sin embargo, en presencia de calor, iones metálicos y/o luz, pueden descomponerse en compuestos que contribuyen a la rancidez, la generación de malos olores y sabores desagradables en los alimentos (Brewer, 2011). Entre los compuestos oxidados por descomposición de los hidroperóxidos tenemos a las cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad, que determinan el nivel de rancidez en los alimentos (Rojano, Gaviria y Sáez, 2008).

Los alimentos deshidratados (cereales, galletas, leche en polvo, huevos en polvo, etc.), productos fritos, carnes, aceites, y otros como el té, café o el jugo de naranja son susceptibles a la oxidación por los iones metálicos (Kanner, 2010), ya que estos se encargan de catalizar la oxidación de lípidos, compuestos fenólicos y otros compuestos reductores que están presentes en los alimentos. Se cree que estos metales cambian su estado de oxidación para interactuar con los hidroperóxidos.

#### 4.2.1.2. Estrés oxidativo en el organismo

En condiciones de metabolismo normal, la formación continua de especies reactivas de oxígeno (EROS) y de otros radicales libres es importante para las funciones fisiológicas normales, ya que están implicados en muchas reacciones químicas esenciales, como la generación de ATP, en diversos procesos catabólicos y anabólicos y en los ciclos redox celulares (Rahal et al., 2014). Alrededor del 95 al 98% del oxígeno consumido durante la respiración celular es para la producción de energía, y el restante (2 a 5% del oxígeno metabolizado) produce EROS (Aparecida, 2014). Sin embargo, si se producen más radicales libres de los que el cuerpo necesita, o si los métodos que utiliza el cuerpo para manejar los radicales libres resultan inadecuados, se está frente a un problema de estrés oxidativo (Youngson, 1994; Rahal et al., 2014).

El estrés oxidativo se origina por hábitos considerados inapropiados (consumo de alcohol, drogas, tabaquismo, dieta inadecuada, comida altamente procesada, ejercicio físico exhaustivo o extremo, exposición a la radiación no ionizante ultravioleta y otras ondas cortas); condiciones ambientales inapropiadas (temperatura elevada y contaminación ambiental); envejecimiento y estados psicológicos que provocan estrés emocional (ansiedad, fisiopatologías, anemia) que inactivan enzimas antioxidantes, contribuyendo así a disminuir el sistema de defensa antioxidante del organismo (De Oliveira et al., 2009a; Landete et al., 2013; Rahal et al., 2014) (Figura 1).

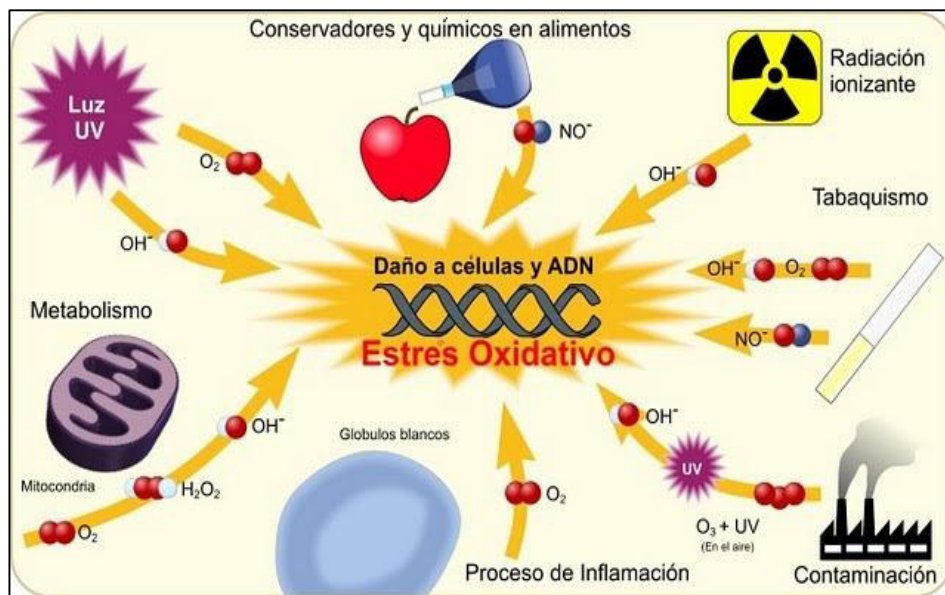


Figura 1. Fuentes de radicales libres

Fuente: Gregori, 2017

Este desequilibrio cambia el ambiente reductor que normalmente las enzimas, gracias a su aporte constante de energía metabólica, mantienen dentro de las células. Las alteraciones de este estado redox normal pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN, ocasionando una muerte celular progresiva (Landete et al., 2013; Kanner, 2010). Tanto el oxígeno como los radicales libres son más solubles en la bicapa lipídica que en la parte acuosa, por ello tienden a concentrarse en el interior de la fase orgánica de la membrana (Figura 2).

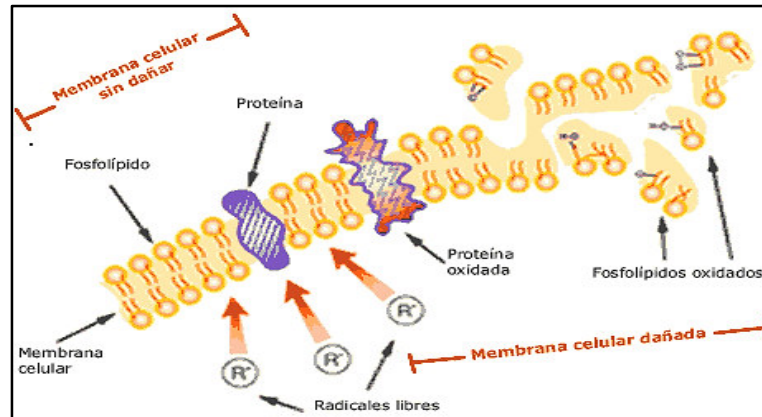


Figura 2. Alteración de la membrana celular por radicales libres

Fuente: Bolaños, 2013

El proceso de oxidación que se da en los lípidos se denomina peroxidación lipídica, debido principalmente a una serie de reacciones entre los ácidos grasos insaturados y los radicales libres (Rojano, 1997). Este proceso de autooxidación incluye tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Chan, 2015). En la primera etapa, el lípido (RH) en presencia de cualquier iniciador (radicales, metales, luz, calor, etc) origina al radical lipídico ( $R^{\cdot}$ ). Este radical reacciona con el oxígeno para formar radicales peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ) que tienen la capacidad de sustraer un átomo de hidrógeno de otras moléculas lipídicas para formar un nuevo radical lipídico y a los hidroperóxidos ( $ROOH$ ), de esta manera se produce la etapa de propagación. Los hidroperóxidos se fragmentan y dan origen a otros radicales libres, como los alcoxi ( $RO^{\cdot}$ ). El proceso termina cuando dos especies radicales se unen entre sí para formar una especie estable no radical ( $R:R$ ,  $ROOR$ ). Las reacciones de los radicales libres sobre la membrana pueden terminar alterándola o causando lisis celular (Pamplona, 2008; Rojano, Gaviria y Sáez, 2008).

Tanto en las proteínas como carbohidratos, los radicales libres pueden inducir fragmentación con la

pérdida de la función de estas moléculas (González-Torres et al., 2000). El daño causado por el radical libre a las enzimas azufradas y otras proteínas culmina en inactivación, desnaturalización y entrecruzamiento de las cadenas peptídicas (Landete et al., 2013). La oxidación de aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, histidina y metionina resulta en la modificación de sus grupos R y la formación de grupos carbonilos (Venereo, 2002). El daño oxidativo a los carbohidratos puede alterar respuestas hormonales y de neurotransmisores asociados al receptor celular. Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los epóxidos que se unen a ellos, ocurriendo pérdida de expresión, fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos, etc. El daño posterior del ADN, que puede incluir la inactivación o pérdida de algunos genes supresores de tumores, puede causar una mutación que puede ser carcinogénica (Venereo, 2002; Landete et al., 2013).

#### 4.2.2. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

##### 4.2.2.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias, también consideradas “moléculas suicidas” que, en concentraciones relativamente bajas con respecto al sustrato oxidable (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, o moléculas de ADN), retrasan o previenen significativamente la oxidación de este (Venereo, 2002; Tucker y Pigott, 2003; Díaz, Escobar y Pizarro, 2013), ya que se oxidan al neutralizar a los radicales libres, mediante uno o varios de los siguientes procedimientos: (1) secuestrando especies que inician la peroxidación, (2) quelando iones metálicos y haciéndolos incapaces de generar especies reactivas o descomponer peróxidos lipídicos, (3) extinguiendo superóxidos ( $O_2^-$ ) y previniendo así la formación de peróxidos ( $O_2^=$ ), (4) rompiendo la reacción en cadena autooxidativa, y/o (5) reduciendo las concentraciones de  $O_2$  localizadas (Figura 3). De esta forma, los antioxidantes inhiben la formación o interrumpen la propagación de los radicales libres, convirtiéndolos en especies estables (Lobo, Patil, Phatak y Chandra, 2010; Brewer, 2011).

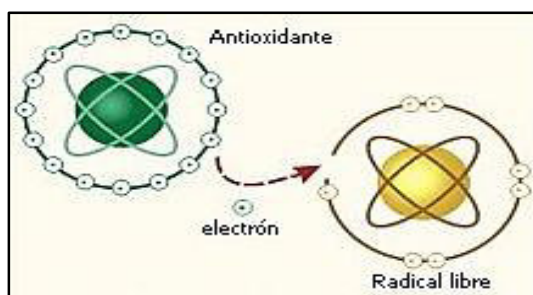


Figura 3. Neutralización de un radical libre por un antioxidante.

Fuente: García, 2012.

Los grupos enzimáticos y no enzimáticos propios del organismo, también conocidos como “**antioxidantes endógenos**” tratan de mantener el cuerpo en homeostasis al reaccionar rápidamente con los radicales libres del oxígeno en una zona específica de la célula (membrana plasmática, líquido extracelular e intracelular) (Camps, Ruffino, Majul y Joison, 2010). Entre los antioxidantes endógenos destacan el superóxido dismutasa, el glutatión peroxidasa, la catalasa, el glutatión, el ácido tióctico, entre otros (Dabrowski, Konturek, Konturek y Gabryelewicz, 1999; Criado y Moya, 2009). Por otro lado, los “**antioxidantes exógenos**”, son aquellas sustancias como la vitamina A, E, C, carotenoides, flavonoides, minerales, entre otros, que ingerimos en la dieta y son los de mayor interés para el sector farmacéutico y alimentario, ya que su ingesta puede neutralizar los radicales libres y ayudar a disminuir la incidencia del daño inducido por el estrés oxidativo (Sen y Chakraborty, 2011; Sánchez, 2013), ofreciendo bondades prometedoras para la salud, además del interés creciente de la industria alimentaria en ampliar la gama de antioxidantes naturales que ayuden a prevenir la oxidación en los alimentos.

#### 4.2.2.2. Importancia de los antioxidantes

##### 4.2.2.2.1. *Rol de los antioxidantes en los alimentos*

La función de los antioxidantes en los alimentos no solo está relacionada con su actividad de eliminación de radicales libres (por ejemplo, inhibir la formación de hidroperóxidos) sino también con su ubicación física (por ejemplo, el compuesto se concentra donde las reacciones oxidativas son más frecuentes) y con su capacidad de participar en otras vías oxidantes (por ejemplo, inactivación de metales y regeneración de antioxidantes endógenos) (Branen, Davidson, Salminen y Thorngate, 2001; Alamed, Chaiyasit, McClements y Decker, 2009).

Los extractos vegetales contienen una variedad de compuestos naturales, pero ciertos principios activos son responsables de su capacidad antioxidante (Nanditha y Prabhasankar, 2008). Al agregarlos en la formulación de alimentos procesados, estos últimos se convierten en alimentos funcionales o enriquecidos que proporcionan múltiples beneficios para la salud (Pasrija et al., 2015).

Recientemente, muchos estudios epidemiológicos han sugerido que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, tienen efectos protectores contra diversas enfermedades, y esta protección se ha atribuido en parte a la presencia de varios componentes, como vitaminas, flavonoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Moo-huchin et al., 2014).

Los antioxidantes como aditivos alimentarios, entre ellos, vitamina A, vitamina E, vitamina C, galatos y muchos compuestos polifenólicos como flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas, isocatequinas, epicatequinas y ácidos fenólicos como el ácido hidrocínámico, ácido hidrobenczoico, ácido gálico, ácido elágico, etc., han cobrado importancia como fitoquímicos antioxidantes (Mehta y Gowder, 2015) y desempeñan un papel importante para garantizar que los productos alimenticios conserven su sabor y color y permanezcan comestibles durante un período más prolongado. Su uso es particularmente importante para evitar la oxidación de los productos o enriquecerlos. Otra razón importante es que ciertas vitaminas y varios aminoácidos pueden ser destruidos fácilmente por la exposición al aire, y los antioxidantes sirven para protegerlos (Thorat et al., 2013).

Como consecuencia, los antioxidantes fenólicos añadidos a productos alimentarios mejoran sus características organolépticas (Caleja et al., 2016; Çam et al., 2013), les dan más valor agregado, alargan su vida útil (Tumbas Šaponjac et al., 2016) y mantienen su valor nutricional (Ribeiro et al., 2015), convirtiéndose en sustancias atractivas que diferencian y vuelven único al producto que los contiene frente a otros de la competencia y frente al consumidor.

#### 4.2.2.2.2. *Rol de los antioxidantes en la salud*

Una producción anormal de radicales libres en el organismo puede producir desde la disminución de la funcionalidad de algunas células, —con lo que aumenta el riesgo de envejecer—, hasta alteraciones genéticas de determinadas células —con lo que aumenta el riesgo de cáncer—. Además, los radicales libres y otras especies reactivas se han asociado con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, parkinson, alzheimer), trastornos gastrointestinales, enfermedades oculares, osteoporosis, infertilidad y diabetes *mellitus* (Halliwell, 2001; Andrade y Fasolo, 2014; Tomás-Barberán, 2003; Sen y Chakraborty, 2011). Por ello, la utilización de sustancias antioxidantes tiene por finalidad mantener el equilibrio corporal mediante la protección de las biomoléculas frente a la oxidación (Huang, Ou y Prior, 2005) y contribuir eficazmente a reducir su efecto perjudicial (Martínez-Navarrete, Camacho y Martínez, 2008). Los antioxidantes pueden funcionar como moduladores inmunes y pueden usarse para el tratamiento preventivo o terapia de ciertas enfermedades junto con la terapia principal (Sen y Chakraborty, 2011).

La eficacia de los antioxidantes en la salud depende de cuestiones genéticas (enzimas) y de la



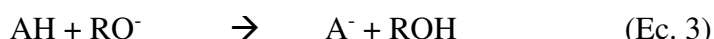
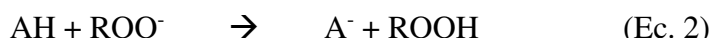
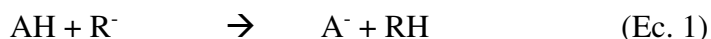
nutrición (vitaminas y otros captadores no vitamínicos de la dieta, como los polifenoles) (Martínez-Navarrete et al., 2008). Debido a que nuestras defensas endógenas antioxidantes no parecen ser completamente efectivas contra la susceptibilidad frente al estrés oxidativo, parece razonable proponer una dieta rica en antioxidantes o, como ya se está experimentando, una suplementación exógena de antioxidantes (Elejalde, 2001). El consumo de antioxidantes exógenos puede ayudar directamente a inhibir las reacciones de radicales libres, prevenir la peroxidación de lípidos y elevar el sistema antioxidante endógeno, manteniendo el cuerpo libre de enfermedades (Sen y Chakraborty, 2011).

#### 4.2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

##### 4.2.3.1. Tipos de antioxidantes según su mecanismo de acción

###### 4.2.3.1.1. Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios son principalmente compuestos fenólicos (A:H) que pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón al radical libre, convirtiéndolo así en un producto estable. Son capaces de inhibir la etapa de iniciación al reaccionar con un radical lipídico ( $R^\cdot$ ) o inhibir la etapa de propagación al reaccionar con los radicales peróxidos de los lípidos ( $ROO^\cdot$  y  $RO^\cdot$ ). (Armenteros, Ventanas, Morcuende, Estevéz y Ventanas, 2012).



Asimismo, como consecuencia de estas reacciones, el antioxidante se oxida formando un radical libre estable ( $A^\cdot$ ) que no propaga la reacción de oxidación. Este radical antioxidante puede interferir aún más en las reacciones de propagación al formar compuestos con los radicales peroxilo o alcoxi (Nanditha y Prabhasankar, 2008; Armenteros et al., 2012).



Los principales antioxidantes primarios son de tipo sintético, como el BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), TBHQ (ter-butilhidroxiquinona) y los galatos de butilo, propilo o

dodecilo (Gil, 2010; Ardiles y Mozo, 2017), aunque también podrían incluirse dentro de este grupo a los compuestos de fuente vegetal: carotenoides, tocoferoles, ácidos fenólicos y flavonoides (Chan, 2015), los cuales pueden ser clasificados como antioxidantes primarios y/o sinergistas (Ardiles y Mozo, 2017). Las enzimas endógenas como la *superóxido-dismutasa* (SOD), *catalasa* y *glutación peroxidasa* (GPx) también son consideradas antioxidantes primarios (UNAM, 2009; Feduchi, 2010).

#### 4.2.3.1.2. *Antioxidantes secundarios*

Los antioxidantes secundarios, conocidos como preventivos, reducen la velocidad de oxidación de los lípidos a través de varios mecanismos; sin embargo, no influyen sobre el radical libre para que este se vuelva más estable. La quelación y desactivación de un metal prooxidante, la donación de un hidrógeno a un hidroperóxido sin formar especies radicales, la desactivación del oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), la absorción de la radiación ultravioleta o la eliminación de oxígeno son acciones realizadas por los antioxidantes secundarios. El ascorbil palmitato, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido ascórbico y la lecitina son los más comunes y usados (Rojano, 1997; Terán, 2014).

- a) *Quelantes de metales*: Interactúan con los metales y los oxidan, estabilizándolos y reduciendo de esta manera su potencial oxidativo. El ácido cítrico, el ácido fosfórico, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y el ácido ascórbico son ejemplos de quelantes de metales que reducen la oxidación del aceite de forma indirecta (Chan, 2015).
- b) *Eliminadores de oxígeno*: La eliminación de moléculas de oxígeno también genera actividad antioxidante. Por ejemplo, el ácido ascórbico presenta comportamiento de agente reductor y eliminador de oxígeno; asimismo, el oxígeno, en especial el de tipo singlete, puede ser atrapado por aminoácidos, péptidos, proteínas, ascorbatos y compuestos fenólicos (Chan, 2015).

Cuando los antioxidantes secundarios activan a los antioxidantes primarios causan sinergismo, ya que actúan como donantes de hidrógeno al radical *fenoxi*, regenerando así al antioxidante primario, es decir, los antioxidantes fenólicos se pueden usar a niveles más bajos si un sinergista se incorpora simultáneamente en el producto alimenticio (Nanditha y Prabhasankar, 2008). A este grupo de sinergistas pertenecen los sulfitos, ácido ascórbico, ascorbil palmitato y ácido eritórbico.

#### 4.2.3.2. Tipos de antioxidantes según su origen

##### 4.2.3.2.1. Antioxidantes sintéticos

Estos antioxidantes son obtenidos por vías químicas *in vitro*. Entre los antioxidantes sintéticos se encuentran aquellos análogos a los naturales (ácido ascórbico, tocoferoles, carotenos, etc.), como también otros que no tienen análogos en el medio natural; entre ellos, el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP) y ter-butil hidroquinona (TBHQ) son los más empleados para la preservación de los alimentos (Ariel, 2014).

- a) Butil-hidroxianisol (BHA- E 320): Este antioxidante es altamente soluble en grasas, mas no en agua. Resulta muy eficaz en la fritura de grasas porque soporta altas temperaturas, evitando su degradación o evaporación. Se utiliza para brindar protección a las grasas que se encuentran en productos de repostería y en alimentos preparados en general, ya sean dulces o salados, conservándolos por más tiempo. Suele ser usado en combinación con otros antioxidantes, especialmente con el BHT, ya que potencia su efecto antioxidante (Muñoz, 2008). En la figura 4, se observa el mecanismo de acción del BHA que consiste en la eliminación de radicales libres como los peroxilos presentes en una matriz alimentaria, ejerciendo actividad antioxidante al romper la cadena durante la autooxidación de los lípidos (Shahidi y Zhong, 2005).

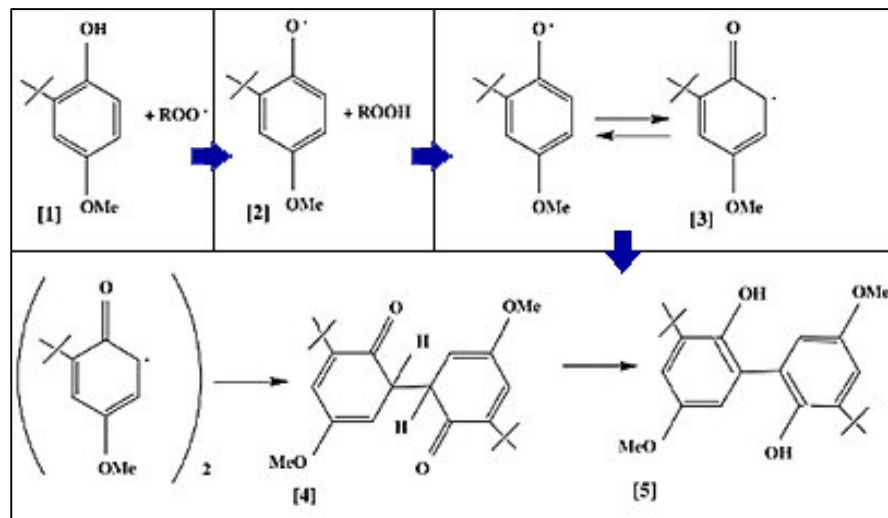


Figura 4. Mecanismo de acción del BHA (compuesto [1])

Fuente. Kadoma, Ito, Yokoe y Fujisawa, 2008

Sin embargo, el BHA es considerado como "Probablemente carcinógeno para el ser humano" en

la clasificación para los aditivos alimentarios establecida por la Food and Drug Administration (FDA) (2018a), debido a los estudios científicos que han demostrado que el BHA exhibe actividad promotora de tumores en animales de laboratorio. Por ejemplo, se encontró que es citotóxico y carcinogénico en el estómago y vejiga urinaria del ratón, en el estómago y esófago de ratas, ratones, hámsters y cerdos (Kadoma et al., 2008). Asimismo, es causante de irritación a la piel, alergias e hiperactividad en humanos (Muñoz, 2008).

Su uso está autorizado en la mayoría de países (en Estados Unidos, su nivel máximo de uso establecido por la FDA es 0.02% y por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) es 0.01% en peso de grasa, y Europa permite su uso, junto con el BHT, hasta 0.02% en peso de grasa), excepto en Japón, donde está prohibido desde 1958 y en Australia, donde no se permite su consumo a niños (Shahidi y Zhong, 2005; FDA, 2018b; FDA, 2018c; Ayuso, 2015).

- b) Butil-hidroxitolueno (BHT- E 321): Este antioxidante solamente es soluble en grasas y se utiliza siempre mezclado con el BHA, tiene sus mismas aplicaciones, y, en general, las mismas limitaciones legales (Muñoz, 2008; Ibáñez, Torre y Irigoyen, 2003). El BHT es de menor costo que el BHA, pero es inestable cuando es sometido a procesos de calentamiento como pasteurización u horneado.

Se ha probado que causó tumores cancerosos en ratas de laboratorio, causó daño pulmonar e incrementó la incidencia de tumores hepáticos en ratones. y que puede aumentar el colesterol en la sangre, causa alergias, urticaria, hemorragias y daños al hígado en altas concentraciones en el ser humano (Muñoz, 2008; Race, 2009).

- c) TBHQ y galato de propilo (GP): El TBHQ aumenta la estabilidad oxidativa y mejora el color de los productos alimentarios que contienen específicamente aceites vegetales, mientras que el GP estabiliza tanto aceites vegetales como grasas animales, siendo usado en productos cárnicos, especias y aperitivos, además de su importante uso en la base de las gomas de mascar. Ambos antioxidantes tienen, por separado, efecto sinérgico con el BHA y/o BHT. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el TBHQ y el GP tienen potencial para formar moléculas complejas con ácidos nucleicos y causar daño a la estructura de doble hélice del ADN (Dolatabadi y Kashanian, 2010 citado en Apak, Capanoglu y Shahidi, 2018).

Los cuatro principales antioxidantes sintéticos en uso están sujetos a un límite máximo de buenas prácticas de fabricación de 0.02% del contenido de grasa o aceite de los alimentos (Simic, 1981, citado en Gülçin, 2011). Por lo tanto, la controversia sobre la toxicidad de los antioxidantes sintéticos sobre la salud debido a su efecto tóxico y actividad carcinogénica de sus formas oxidadas, y de sus productos de reacción con los constituyentes de los alimentos, además de los costos elevados de fabricación de estos antioxidantes, han impulsado la tendencia a evitar o minimizar el uso de sustancias sintéticas y a identificar fuentes alternativas naturales y probablemente más seguras de antioxidantes alimentarios (Ariel, 2014).

#### 4.2.3.2.2. *Antioxidantes naturales*

Son aquellos extraídos de fuentes vegetales, principalmente a partir de hierbas o partes de plantas con concentraciones muy altas de determinados polifenoles, con buenas propiedades de donación de electrones y de ruptura de cadenas (Branen et al., 2001).

Algunos de los aditivos antioxidantes más importantes utilizados en la actualidad, y que se diferencian de otros por provenir de fuentes naturales, son los siguientes:

- a) Extracto de romero: Ha sido aprobado como aditivo alimentario para su uso en la Unión Europea desde 2008 y está etiquetado formalmente como "Extracto de romero - E392". Los extractos de romero se utilizan como aditivo para conservar la carne, el pescado y los aceites (Santos-Sánchez, Guadarrama-Mendoza, Salas-Coronado, Valadez-Blanco y Hernández-Carlos, 2017). En el estudio de Ortuño, Serrano, Jordán y Bañón (2014), la suplementación con extracto de romero en concentraciones de 200 y 400 ppm en la dieta de corderos durante la etapa de engorde, permitió, luego del beneficio, que la vida media de la carne cruda en atmósfera controlada se prolongue hasta 9 - 13 días.
  
- b) Extracto de semilla de uva: Es considerado por la FDA como GRAS, "generalmente reconocido como seguro" desde 2003, para ser usado como antioxidante agregado en bebidas, cereales, aceites y grasas, productos de repostería, granos, productos lácteos, frutas procesadas y jugos de frutas a niveles desde 100 a 800 ppm, tanto en sistemas agua/aceite y acuosos (Santos-Sánchez et al., 2017). Sin embargo, en las galletas preparadas por Davidov-Pardo et al. (2012b), los extractos de semilla de uva, libre y microencapsulado, a concentraciones de 0.8% y 2.6%, respectivamente, les confirieron poder antioxidante; sin embargo, el extracto microencapsulado

les proporcionó mayor actividad antioxidante y mejoró sus características sensoriales.

- c) Extracto de té verde: Se está utilizando como aditivo antioxidante natural en los alimentos. Las catequinas del té se han utilizado en la conservación de carne de res, cerdo y aves (Santos-Sánchez, 2017). Por ejemplo, en el estudio de Jamwal, Kumar, Bhat, Kumar y Kaur (2015), empanadas de pollo con extracto de té verde en concentraciones de 400 ppm tuvieron una vida útil de 21 días en almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ( $4 \pm 1$  °C) reduciendo su oxidación. Asimismo, el extracto de té verde a una concentración de 4% fue agregado por Ahmad et al. (2015, citado en Santos-Sánchez, 2017) a la harina de trigo para la elaboración de galletas, el cual aumentó la aceptabilidad del color, el aroma y el sabor del producto final.

A continuación, en la Tabla 1, se nombrará las ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales en comparación con los antioxidantes sintéticos:

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los antioxidantes naturales frente a los sintéticos

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
La mayoría presenta solubilidad tanto en agua como en aceite (amplio rango de solubilidades), siendo útiles en la preparación de emulsiones y otras formulaciones (Moure et al, 2001; Ariel, 2014).	Son de igual o mayor costo que los antioxidantes sintéticos, dependiendo de la fuente de extracción y la metodología empleada (Sarkar y Ghosh, 2016). Son más caros si se purifican, y menos eficientes si no son purificados (Madhavi, Deshpande y Salunkhe, 1996).
Su aplicación en alimentos no se encuentra restringida (Bonilla, Mayen, Merida y Medina, 1999).	Si son añadidos en concentraciones demasiado altas, puede ocurrir cierta toxicidad (muy baja) (Race, 2009).
Son inocuos, son rápidamente aceptados por los consumidores, son metabolizados por completo en el organismo y el interés de su uso va en aumento (Sarkar y Ghosh, 2016; Gülçin, 2011).	Presentan un amplio rango de actividad antioxidante (Sarkar y Ghosh, 2016). Aquellos con actividad antioxidante baja deben ser añadidos en cantidades mayores que los antioxidantes sintéticos para producir el mismo efecto.
Contribuyen a valorizar los recursos naturales, ya que muchos de ellos son residuos vegetales, favoreciendo al hombre y al medio ambiente (De Oliveira et al., 2009b).	La fracción activa suele ser mucho más baja que la adición real al alimento (presencia de otras sustancias en su composición) (Pokorný, 2007),
Pueden favorecer las características de calidad del alimento al que son añadidos al actuar como colorantes, agentes de conservación e impartir características sensoriales favorables (Pokorný, 2007)	Pueden desfavorecer las características de calidad del alimento al que son añadidos al actuar como colorantes e impartir características sensoriales desfavorables (Pokorný, 2007)
Pueden reemplazar parcial o totalmente a un componente alimentario (Patel, 2015)	La cantidad agregada a los productos alimenticios se adapta según los resultados analíticos obtenidos (Thorat et al., 2013).

Fuente: Elaboración propia

## 4.2.4. COMPUESTOS FENÓLICOS

### 4.2.4.1. Compuestos fenólicos en las plantas

Los alimentos de origen vegetal son productos de gran interés, ya que, además de aportar macronutrientes y micronutrientes, contienen una serie de sustancias químicas no nutritivas, denominados compuestos bioactivos, los cuales pueden ser indispensables a largo plazo para mejorar nuestra salud y reducir el riesgo o retrasar el desarrollo de muchas enfermedades (Martínez-Navarrete et al., 2008; Barragán, 2011). En el reino vegetal podemos distinguir cuatro grandes grupos de compuestos bioactivos, como son las sustancias terpénicas, las azufradas, las nitrogenadas y, las más estudiadas, las fenólicas, que se encuentran de forma general en todos los alimentos de origen vegetal (Tomás-Barberán, 2003).

Los compuestos fenólicos son moléculas que contienen al menos un grupo fenol, es decir, un anillo aromático unido con uno o más grupos hidroxilo (Porras-Loaiza y López-Malo, 2009) (Figura 5), y engloban a más de 8000 compuestos, desde moléculas sencillas de poco peso molecular hasta polímeros complejos, y cuya característica más relevante es su comportamiento antioxidante (Porras-Loaiza y López-Malo, 2009; Sotero et al., 2011; Gimeno, 2015; Martín, 2018). Estos compuestos desempeñan una serie de funciones en el crecimiento y reproducción de las plantas, protegiéndolas contra patógenos externos, el estrés, la radiación UV y los depredadores (Peñarrieta, Tejada, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014). La disposición de los compuestos fenólicos en los vegetales no es uniforme y varía de acuerdo con cada especie (El Gharras, 2009); sin embargo, estos compuestos se encuentran preferentemente en la cáscara y semilla de muchos frutos (Ayala-Zavala et al., 2011).

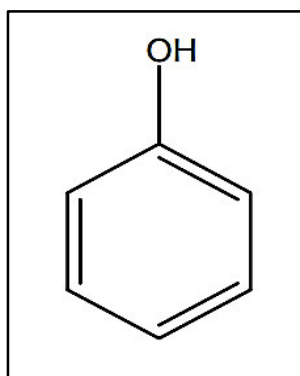


Figura 5. Estructura química del grupo fenol

Fuente: Peñarrieta et al., 2014



#### 4.2.4.2. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo con el número de anillos fenólicos que contienen y con los elementos estructurales que enlazan estos anillos (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy y Jiménez, 2004). En ese sentido, los compuestos fenólicos se pueden agrupar en: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos (Peña y Restrepo, 2013).

##### 4.2.4.2.1. Ácidos fenólicos

Existen dos grupos de ácidos fenólicos: el ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico (Manach et al., 2004) (Figura 6). En general, estos compuestos pueden estar presentes en forma libre o enlazados a muchos componentes vegetales, a través de enlaces acetal, éter o éster (Zadernowski, Czaplicki y Naczki, 2009).

Los ácidos hidroxibenzoicos ( $C_6-C_1$ ) incluyen al ácido p-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido vanílico y ácido sirínico (Balasundram et al., 2006). Estos pueden estar presentes en forma conjugada con azúcares o ácidos, así como también en forma libre (Çilek, 2012; Häkkinen, Kärenlampi, Mykkänen y Törrönen, 2000). Estos ácidos han sido encontrados en especias (nuez moscada, albahaca, clavo de olor, anís, canela y tomillo), frutos secos (nuez, dátil y castaña), *berries* (arándano, cereza, fresa, frambuesa), té negro y aceitunas. El ácido gálico y su forma dimérica (ácido elágico) son los componentes esenciales de estructuras complejas como los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) (Collado, 2011).

Dentro de los ácidos hidroxicinámicos ( $C_6-C_3$ ), los compuestos más representativos son el ácido ferúlico, p-cumárico, cafeico y sinápico (Bravo, 1998). Estos compuestos suelen encontrarse esterificados con diversos ácidos orgánicos, como son el ácido quínico, shikímico o tartárico. La esterificación de los ácidos cafeico y quínico origina al ácido clorogénico, que se encuentra principalmente en el café y yerba mate (Gómez, 2015). El ácido ferúlico se encuentra principalmente en el tomate, la cerveza, y en gran proporción en los granos de cereales (D'Archivio et al., 2007).

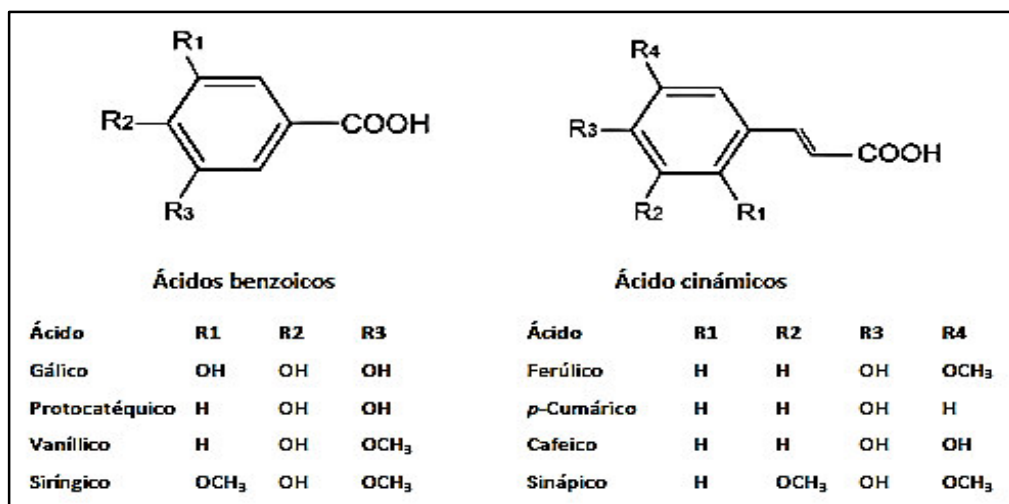


Figura 6. Estructura química de los ácidos fenólicos

Fuente: Ariel, 2014

#### 4.2.4.2.2. Flavonoides

Los flavonoides conforman el conjunto de compuestos fenólicos más variado y extensamente distribuido en los vegetales (Ariel, 2014). Se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes, y se estima que el número siga creciendo (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras y Tuñón, 2002; Perea, 2013). La estructura básica de los flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) consiste en dos anillos fenilos (A y B) unidos por un anillo pirano (C) (Figura 7.a), común en la mayoría de los flavonoides (Escamilla, Cuevas y Guevara, 2009).

Las variaciones en el anillo C origina las principales clases de flavonoides, es decir, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas) (Manach et al., 2004; Çilek, 2012). En cambio, las sustituciones en los anillos A y B originan diversos compuestos para cada clase de flavonoide, y estas sustituciones comprenden alquilación, oxigenación, acilación, sulfonación y glicosilación (Ignat, Volf y Popa, 2011). La Figura 7.b muestra la estructura química de las distintas clases de flavonoides.

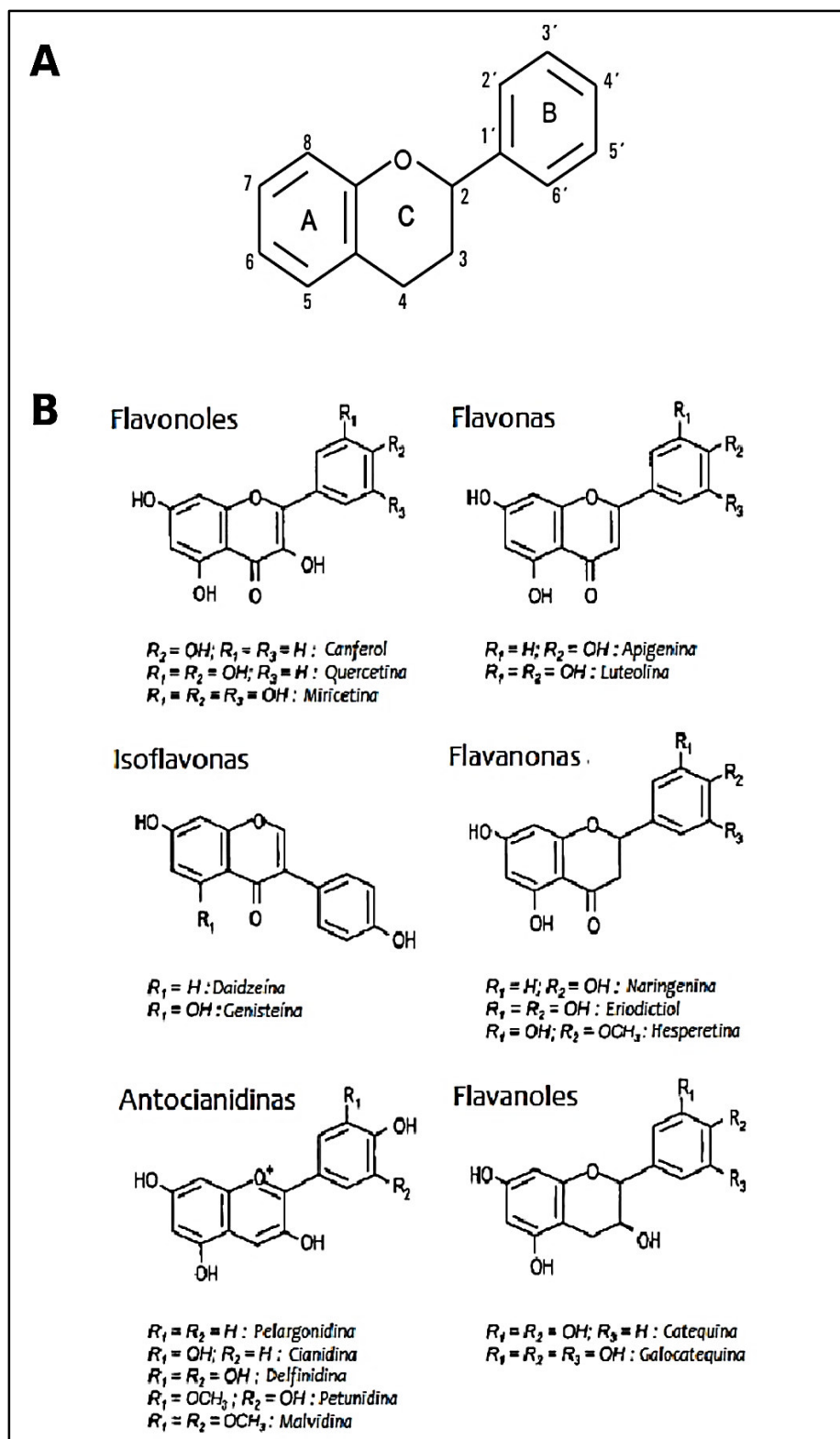


Figura 7. Estructura química de los flavonoides

A) Estructura básica de los flavonoides, B) Principales flavonoides y sus derivados

Fuente: Ariel, 2014

Los flavonoides se encuentran generalmente unidos con moléculas de azúcar, en forma de O-glicósidos o C-glicósidos; sin embargo, también se les puede encontrar en las plantas en su forma libre, conocidos como agliconas (Cartaya y Reynaldo, 2001; Martínez-Flórez et al., 2002), con excepción de los flavanoles que no tienen enlace con ningún tipo de azúcar. La glicosilación permite que los flavonoides sean más solubles (Martínez-Flórez et al., 2002). El residuo de azúcar más frecuente en estos compuestos es la glucosa o ramnosa, aunque también pueden estar unidos con otros residuos de azúcares (por ejemplo, galactosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico) (Manach et al., 2004).

Los *flavonoles* son los compuestos más ubicuos en los alimentos, siendo los glicósidos de quercetina y kaempferol los más representativos (Manach et al., 2004). Las principales fuentes de flavonoles son las frutas y verduras, como la cebolla, manzana y pimienta negra. También se encuentran en el té y vino (Çilek, 2012). Los flavonoles generalmente se acumulan en el fruto y hojas de las plantas, debido a que su biosíntesis es provocada principalmente por la luz solar (Price, 1994; Martínez-Flórez et al., 2002; Cortell y Kennedy, 2006).

Las *flavonas* representan los flavonoides menos abundantes en las frutas y verduras, siendo los glicósidos de luteolina y apigenina los más comunes. Las fuentes más importantes de flavonas son el perejil, el apio, la manzanilla y el orégano (Khanam, Sam, Zakaria, Ching y Bhat, 2015; Hostetler, Ralston y Schwartz, 2017).

Las *isoflavonas* poseen una estructura química análoga a la molécula “estradiol”, debido a esto, son consideradas como hormonas vegetales o “fitoestrógenos” (D’Archivio et al., 2007). Las principales isoflavonas son: genisteína, daidzeína y gliciteína, las cuales se pueden encontrar como agliconas libres o como glicósidos, los cuales, a su vez, pueden estar esterificados con un grupo acetil o malonil (Coward, Smith, Kirk y Barnes, 1998). Las isoflavonas están presentes en varias leguminosas, principalmente en la soya y en productos que la contienen (Kudou et al, 1991).

Las *flavanonas* son encontradas en elevadas concentraciones en cítricos, menta y tomate. La hesperetina en naranjas, eriodictiol en limones y naringenina en pomelo son los principales ejemplos de flavanonas en alimentos (D’Archivio et al., 2007). Estos compuestos están unidos por enlace glicosídico a un disacárido en la posición 7 (principalmente, rutinosa o neohesperidosida), el cual

es el responsable del sabor del alimento que lo contiene (Tomás-Barberán y Clifford, 2000).

Las *antocianidinas* se encuentran principalmente como glicósidos, siendo las formas más comunes la pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (Aguilera, Reza, Chew y Meza, 2011; Salinas, García, Coutiño y Vidal, 2013). Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma de glicósido se conocen como antocianinas (Okumura, Soares y Cavalheiro, 2002). Las antocianinas se encuentran con mayor frecuencia en los tejidos de color rojo, azul y violeta de flores y frutos (Perea, 2013). Están ampliamente distribuidas en la dieta humana, siendo encontradas en ciertas variedades de cereales, vino tinto, uvas, fresas y bayas (Ariel, 2014; Gómez, 2015).

Los *flavanoles*, a diferencia del resto de los flavonoides, no se encuentran estructuralmente glicosilados (Apeleo, 2016). En la naturaleza pueden aparecer como monómeros (catequinas) y como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Las catequinas más comunes son la galocatequina, epigalocatequina, epicatequina galato y epigalocatequina. Se encuentran en frutas como el albaricoque, mora y cereza, así como también en el vino, chocolate y té (Arts, Van de Putte y Hollman, 2000a; Arts, Van de Putte y Hollman, 2000b). La polimerización de las catequinas monoméricas da lugar a las proantocianidinas o taninos condensados, los cuales son los responsables de la astringencia de frutas como la manzana, la uva, el durazno, de bebidas como el té, el vino, la cerveza, y del amargor del cacao y su presencia en el chocolate (Gomez, 2015).

#### 4.2.4.2.3. *Lignanos y estilbenos*

Los lignanos ( $C_6-C_3-C_3-C_6$ ) están presentes principalmente en su forma libre. Se encuentran en semillas como la linaza (fuente más rica de lignanos), granos ricos en fibra (trigo, cebada y avena), leguminosas (frijol, lenteja y soja) y vegetales (ajo, espárrago, brócoli y zanahoria) (Saleem, Kim, Ali y Lee, 2005; Gomez, 2015).

Los estilbenos ( $C_6-C_2-C_6$ ) no tienen una distribución muy amplia en los alimentos vegetales (Martínez y Rivas, 2012). Su principal representante es el resveratrol, especialmente los isómeros *trans* en forma glicosilada o libre. Se encuentran en alimentos como las bayas, maní y uvas, así como en sus derivados (vinos) (Delmas, Lançon, Colin, Jannin and Latruffe, 2006).

#### 4.2.4.3. Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son considerados los principales agentes antioxidantes que se producen en las plantas (Khaled-Khodja, Boulekbache-Makhlouf y Madani, 2014) y, por lo tanto, son los más abundantes en la dieta (Andrade y Fasolo, 2014), actuando en la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con los procesos oxidativos a nivel celular, su propiedad de eliminación de radicales libres protege las células de las lesiones causadas por estas moléculas altamente reactivas, además poseen propiedades antiinflamatorias y antialérgicas y quimiopreventivas; y reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Davidov-Pardo et al., 2012a, Skowrya, 2014; Tomás-Barberán, 2003); también actúan en la prevención de la oxidación progresiva en los alimentos que los contienen (Branen et al., 2001).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura química, en particular del número y las posiciones de los grupos hidroxilo y sus conjugaciones, y de la cantidad de sustituciones en el anillo aromático (Balasundram et al., 2006; Estrada, 2013; Landete et al., 2013). El mecanismo de reacción entre un antioxidante fenólico (FenOH) y un radical libre como el peroxilo ( $\text{ROO}^\circ$ ) puede ser descrito de la siguiente manera (Arias, 2016):



Donde  $\text{FenO}^\circ$  es el radical libre del antioxidante fenólico oxidado,  $\text{ROOH}$  es el hidropéroxido,  $\text{ROOFenO}$  es un producto estable y  $\text{Q}$  es cualquier quinona o metil-quinona, dependiendo del número y posición de los grupos hidroxilo en el anillo aromático. El comportamiento de las reacciones indica que el mecanismo corresponde al esquema de reacción de antioxidantes primarios.

#### 4.2.4.4. Residuos alimentarios como fuentes naturales de compuestos fenólicos

Los residuos alimentarios son aquellos que se descartan luego de la cosecha, del consumo directo, o procesamiento de los frutos para la producción de pulpas, jugos, refrescos, aceites, derivados cosméticos, etc. Los residuos de un fruto están conformados por la cáscara, semilla, orujo y bagazo, que habitualmente son botados por falta de creatividad en generar nuevos productos a partir de ellos, y se estima que estos residuos pueden llegar a ser del 25 al 50% del peso total del fruto (Gimeno, 2015; Medina-Torres, Ayora-Talavera, Espinosa-Andrews, Sánchez-Contreras y Pacheco, 2017).

La falta de disposición final y el manejo inadecuado de estos residuos ha promovido la búsqueda de un uso para ellos y, como tal, se les ha otorgado un valor agregado a través de la extracción de fitoquímicos bioactivos (Medina-Torres et al., 2017), debido a que se ha demostrado que muchos residuos, agrícolas e industriales, son fuentes atractivas de antioxidantes naturales, siendo los compuestos fenólicos en su mayoría los responsables de dicha actividad antioxidante (Dorta, 2014; Gimeno, 2015; Çilek, 2012; Aizpurua-Olaizola et al., 2015; Fernández-Agulló et al., 2013; Peng et al., 2010; Ghafoor et al., 2009; González-Montelongo, Lobo y González, 2010).

En varios estudios se ha descubierto que el contenido de fenoles totales es particularmente alto en la cáscara y/o semilla de los frutos en comparación con la pulpa (Soong y Barlow, 2004; Ayala-Zavala et al., 2011; Contreras-Calderón, Calderón-Jaimes, Guerra-Hernández y García-Villanova, 2011). Por ejemplo, se han identificado compuestos fenólicos en semilla y cáscara de uva (Lu y Foo, 1999; Farhadi, Esmailzadeh, Hatami, Forough y Molaie, 2016), semilla y cáscara de mango (Soong y Barlow, 2004; Ajila, Bhat y Prasada, 2007; Dorta, 2014), residuos de manzana (Balasundram et al., 2006; Lu y Foo, 1997), orujo de uva (Lapornik, Prošek y Wondra, 2005), semilla y cáscara de cítricos (Tenorio, 2016), semilla de palta (Ayala-Zavala et al., 2011; Calderón-Oliver et al., 2016), semilla y cáscara de guayaba (Khalifa, Barakat, El-Mansy y Soliman, 2016), mazorca de cacao, piel de pitahaya (Gimeno, 2015), semilla de copoazú (Contreras-Calderón et al., 2011), cáscara de plátano (González-Montelongo et al., 2010), cáscara de caimito y marañón (Moo-Huchin et al., 2015), semilla de tamarindo (Sandesh, Velu y Singh, 2014), semilla y cáscara de zapote (Berto, Ribeiro, De Souza, Fernandes y Chisté, 2015), entre otros. Algunos de estos ejemplos, se detallan a continuación:

Tabla 2. Compuestos fenólicos en residuos de diversas frutas

<b>Residuo</b>	<b>Compuesto Fenólico</b>	<b>Niveles <sup>a</sup></b>	<b>Referencia</b>
Cáscara de manzana	Flavonoides	22.99 mg EC/g b.s.	Balasundram et al. (2006)
	Antocianinas	1.69 mg ECG/g b.s.	
Cáscara de mango	Fenoles totales	70.1 ± 4.6 mg EAG/g b.s.	Dorta (2014).
	Flavonoides	21.2 ± 2.5 mg ER/g b.s.	
Semilla de mango	Fenoles totales	117 ± 13.5 mg EAG/g b.s.	Soong y Barlow (2004)
Semilla de palta	Fenoles totales	51.60 mg EAG/g b.h.	Ayala-Zavala et al. (2011)
Semilla de guayaba	Flavonoides	0.21 ± 0.10 mg EQ/g b.s.	Khalifa et al. (2016)
	Flavonoles	0.13 ± 0.08 mg EQ/g b.s.	
	Fenoles totales	0.43 ± 0.16 mg EAG/g b.s.	
Piel de pitahaya	Fenoles totales	2.08 ± 0.80 mg EAG/g b.s.	Gimeno (2015)
Semilla de copoazú	Fenoles totales	4.97 ± 0.18 mg EAG/g b.h.	Contreras-Calderón et al. (2011)
Semilla de zapote	Fenoles totales	23.50 mg EAG/g b.s.	Berto et al. (2015)
Cáscara de zapote	Fenoles totales	1.156 mg EAG/g b.s.	Berto et al. (2015)
Cáscara de uva	Fenoles totales	27.56 ± 1.01 mg EAG/g b.s	Farhadi et al. (2016)
	Flavonoides	19.74 ± 0.77 mg EQ/g b.s.	
	Antocianinas	7.04 ± 0.03 mg ECG/g b.s.	
Semilla de uva	Fenoles totales	15.79 ± 0.48 mg EAG/g b.s	Farhadi et al. (2016)
	Flavonoides	9.96 ± 0.94 mg EQ/g b.s.	

E.C.: Equivalente de catequina; E.C.G.: Equivalente de cianidin-glucósido; E.R.: Equivalente de rutin; EAG: Equivalente de ácido gálico; E.Q.: Equivalente de quercetina. <sup>a</sup> Expresado en base húmeda (b.h) o base seca (b.s).

Fuente: Elaboración propia



Dentro de los residuos vegetales, las semillas son capaces de almacenar metabolitos secundarios como tocoferoles, compuestos fenólicos y carotenoides. Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides y taninos son los principales responsables del alto potencial antioxidante en los extractos de semillas de frutos exóticos (Benariba et al., 2013; Omena et al., 2012; Jing et al., 2012). El interés creciente en el estudio de semillas de especies exóticas y poco conocidas y su aprovechamiento como fuentes naturales de compuestos fenólicos, además de brindar beneficios a la salud y reducir la contaminación ambiental, da valor agregado al residuo, brinda beneficios económicos a los agricultores de la región y posibilita el descubrimiento de nuevos principios activos (Oliveira, Yamada, Fagg y Brandão, 2012; Barbosa, 2016; Medina-Torres et al., 2017).

#### 4.2.5. UNGURAHUI

##### 4.2.5.1. Nombres comunes

El ungurahui (*Oenocarpus bataua* Mart.) es conocido con más de 50 nombres en la región tropical del continente americano; sin embargo, los más conocidos son *ungurahui* o *sacumama* en Perú, *chupil* en Ecuador, *batauá* o *patauá* en Brasil, *majo* o *ch'ari* en Bolivia, *aricaguá* o *palma seje* en Venezuela y *milpesos*, *patabá* o *seje* en Colombia (Balick, 1992).

##### 4.2.5.2. Descripción botánica

El ungurahui pertenece taxonómicamente a la familia *Arecaceae*, género *Oenocarpus* y especie *Oenocarpus bataua* Mart (Montúfar y Pintaud, 2008). La palabra “Oenocarpus” significa: *oeno* = vino y *carpus* = fruto, o sea, “vino del fruto”, demostrando la importancia del jugo elaborado a partir de la pulpa del fruto (Amazonas, 2008). La palmera mide aproximadamente de 15 a 35 m de altura (Camacho, 2015). Los frutos son drupas ovoides o elipsoides, son de color verde cuando están inmaduros, y mientras van madurando, se van tornando de color negro violáceo. El tamaño de los frutos es de 2.3 a 3.6 cm de largo y 1.7 a 2.5 cm de diámetro, agrupados en racimos con peso entre 2 y 32 kg, con 500 a 4000 frutos. Los frutos presentan epicarpio liso y se encuentran recubiertos por una capa cerosa y negra violácea; mesocarpio carnoso, oleaginoso, de aproximadamente 0.5 a 1.5 mm de espesor y de color entre crema y violeta; semilla dura, leñosa, cubierta por grandes fibras delgadas y oscuras, endosperma duro. El contenido de cáscara más pulpa del fruto tiene un espesor de 2 a 3 mm (Belizario y Cahuama, 2014; Camacho, 2015), el resto del espesor del fruto lo ocupa la semilla. El peso total de un fruto oscila de 8.4 a 15.4 g, compuesto aproximadamente de 1.2 a 2.8 g de epicarpio, 1.3 a 2.7 g de mesocarpio y 5.8 a 10.2 g de endocarpio, y con un rendimiento de

pulpa entre 21.3 y 25.1% (González, Mejía y Torres, 2014). Es decir, con respecto al peso total del fruto, aproximadamente el 30%, le pertenece a la cáscara más pulpa, mientras el 70% del peso restante es semilla (Quispe, Ayala, Ingunza, Landeo y Pascual, 2009).



Figura 8. Palmera de ungrahui

Fuente: Machado, 2008



Figura 9. Racimo de ungrahui con frutos maduros suspendidos

Fuente: Natura, 2014



Figura 10. Fruto de unguurahui con la señalización de sus partes: epicarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpio (semilla)

Fuente: Adaptado de Four Magazine, 2015

#### 4.2.5.3. Aspectos geográficos y climatológicos

La palmera de unguurahui crece de forma silvestre en la selva tropical, a lo largo de la cuenca del río Amazonas (Darnet, Silva, Rodrigues y Lins, 2011), se encuentra distribuida en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Guyana (Camacho, 2015). En la selva del Perú, está distribuida en los departamentos de Madre de Dios, Loreto, Junín, Ucayali, San Martín, Pasco y Huánuco (Camacho, 2015).

El clima tropical húmedo y tierras tanto inundables como no inundables son propicias para el crecimiento de esta palmera. La siembra ocurre principalmente en épocas de gran precipitación pluvial, en zonas con gran humedad acumulada, alternada con el aguaje. La cosecha ocurre durante todo el año, pero se da con mayor frecuencia desde octubre hasta marzo. Una palmera tiene una producción anual de 30 a 36.8 kg (Pinedo, Rengifo y Cerrutti, 1997), dependiendo de la geografía y clima de la zona.

#### 4.2.5.4. Usos tradicionales

##### 4.2.5.4.1. *Uso alimentario/ nutricional*

Los frutos son utilizados tradicionalmente de diferentes maneras por las comunidades amazónicas como medio de vida para subsistir, ya sea para consumirlas de forma natural, como para obtener de manera artesanal diversos alimentos, tales como helados, refrescos, masato, chicha, leche (chapo de unguurahui) y aceite comestible de sabor agradable, o para su comercialización en los mercados de la localidad (Balick, 1992; Quispe et al., 2009). Las hojas jóvenes se utilizan para la extracción y consumo del palmito del meristemo foliar, aportando gran cantidad de fibra (Miranda, Montaña,

Zenteno, Nina y Mercado, 2008).

El mesocarpio del unguurahui aproximadamente 7.4% de proteínas, siendo un valor elevado en comparación con otros mesocarpios de frutas tropicales que poseen de 1-5% de proteínas en materia seca. La composición de aminoácidos es comparable a la proteína animal y considerablemente superior a la vegetal (Darnet et al. 2011; Miranda et al., 2008). Según Balick y Gershoff (1981, citado en Pastore, Fernandes de Araújo, Petry, Martinez-Echevarria y Costa-Fernandes., 2005), entre los aminoácidos no esenciales destacan el ácido aspártico (122 mg), ácido glutámico (96 mg), prolina (75 mg), glicina (69 mg), alanina (58 mg), arginina (56mg) y serina (54 mg). Entre los aminoácidos esenciales destacan la leucina (78 mg), treonina (69 mg), valina (68mg), lisina (53 mg), isoleucina (47 mg) y tirosina (43 mg). Se ha determinado también predominancia de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) de 6.1 mg/ 100 g en materia seca en el mesocarpio de unguurahui (Rezaire et al., 2014) que representa al 86% de los tocoferoles presentes en el fruto (Montúfar et al., 2010).

La torta y harina de unguurahui que poseen fibra, proteína, y carbohidratos, pueden ser potencialmente aprovechadas en la industria de alimentos para la elaboración de insumos o ingredientes alimentarios (González y Torres, 2011).

En cuanto a la leche de unguurahui, de los 20 aminoácidos presentes en esta bebida, 18 superan los valores mínimos requeridos por la FAO. La leche contiene esteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol), carbohidratos y provitamina A. Su contenido calórico es similar al de la leche humana, al de la carne roja y superior al de la leche de soya por su mejor calidad proteica (Miranda et al., 2008).

El aceite del unguurahui es de mejor o igual calidad que el aceite de oliva debido al perfil de ácidos grasos encontrados en la composición de la pulpa (ácido oleico, 72.9-82.4%; ácido palmítico, 6.0-14.9%; ácido esteárico, 2.8-9.4%; ácido linoléico, 2.7-8.8%; ácido palmitoleico, 0.6%; ácido mirístico, 0.4%; ácido linolénico, 0.2-4.6%; y ácido láurico, 0.2%) y a su rendimiento de extracción (29.1%; similar al olivo, 18-35%) (Pastore et al., 2005; Darnet et al., 2011). Por otro lado, el valor nutricional de la semilla de unguurahui es bajo, ya que contiene solo 2.9% de proteína y 0.3-3% de aceite, en comparación con la pulpa del fruto (Miranda et al., 2008).

#### 4.2.5.4.2. *Uso medicinal /estético*

Los frutos se usan principalmente contra la diabetes y el cáncer (Sosnowska, Ramirez y Millán, 2010). El aceite del fruto de unguurahui es bebido por las comunidades indígenas amazónicas cuando

ocurren problemas de asma y TBC. Por sus propiedades hidratantes, también se usa el aceite con fines cosméticos, para el cuidado de la piel y o en fórmulas para el tratamiento de la caspa, para revitalizar o combatir la caída del cabello, para mantener su color y brillo natural (Rainforest Alliance, 2014); la infusión de las raíces adventicias es antidiarreico, antiparasitario y ayuda a calmar la gastritis y controlar la diabetes, la raíz también es usada para teñir el cabello; la maceración con agua de los frutos inmaduros triturados contrarresta el paludismo (Pinedo et al., 1997; Sosnowska et al., 2010); la leche obtenida de la pulpa del fruto es utilizada como una bebida nutritiva para combatir la anemia (Araujo-Murakami y Zenteno, 2006); y el palmito es consumido para mejorar el hígado (Sosnowska et al., 2010).

#### 4.2.5.4.3. *Uso en construcción/ artesanía*

Las hojas y los tallos del ungurahui son utilizados en la construcción de aldeas. Las hojas son usadas para la fabricación de techos de las viviendas (Sosnowska et al., 2010). Las hojas jóvenes se utilizan para fabricar canastillas, abanicos, paneras, morrales y escobas, mientras que las hojas maduras se utilizan para elaborar dardos o flechas (Miranda et al., 2008). Los peciolos son usados en la fabricación de dardos y los tallos son usados para confeccionar arcos y puntas de flechas (Pinedo et al., 1997). Los frutos son utilizados para teñir. Algunos lugareños utilizan las semillas del fruto con fines artesanales, de las cuales crean amuletos, pulseras, collares, botones, etc (Miranda et al., 2008).

#### 4.2.5.5. *Potencial fenólico en la pulpa y semilla del fruto*

En el estudio de la composición fenólica del fruto de ungurahui realizada por Rezaire et al. (2014), se realizó una comparación entre el ungurahui y el açai y se demostró que el ungurahui posee mayor capacidad antioxidante en las pruebas TEAC y FRAP, y una capacidad antioxidante bastante similar con el açai en el ensayo DPPH. El ungurahui también posee una alta capacidad antioxidante al compararlo con otras bayas conocidas como “ricas en antioxidantes”, posicionándose como una “súper fruta”. Investigaciones previas han revelado una composición polifenólica original que no ha sido reportada en otras especies del género *Oenocarpus*, en la cual destacan los estilbenos (principalmente el “piceatanol”, considerado en algunos casos más activo que el resveratrol), ácidos fenólicos (principalmente el ácido clorogénico), antocianinas y procianidinas (Rezaire et al., 2014). La presencia de estos compuestos fenólicos demuestra el gran potencial del fruto como fuente de antioxidantes (Rezaire et al., 2014; Hidalgo et al., 2016; Funasaki, Barroso, Fernandes y Menezes, 2016). Un aspecto importante es que la semilla de ungurahui, la cual representa aproximadamente

el 70% del peso del fruto, presenta un mayor contenido de fenoles totales y mayor actividad antioxidante que la pulpa; además, la capacidad antioxidante por DPPH del extracto de semilla es muy semejante a la observada para el patrón de quercetina (Hidalgo et al., 2016).

Tabla 3. Composición fenólica del extracto de pulpa de unguirahui

<b>Grupo fenólico</b>	<b>Composición</b>	<b>Concentración (ug/g de peso seco)</b>
Esterol	$\Delta^5$ -avenasterol	N. D.*
Estilbeno	Dihexosa de resveratrol	220
Estilbeno	Isorapontigenina	390
Estilbeno	Piceatanol	1980
Ácido hidroxicinámico	Ácido clorogénico	1530
Ácido hidroxibenzoico	Hexosa de ácido siríngico	31
Antocianina	Cianidina-3-rutinósido	470
Procianidina	Taninos	18000

\*: N.D significa que no está definido por el autor.

Fuente: Rezaire et al., 2014; Montúfar et al., 2010.

#### 4.2.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El proceso de extracción permite la recuperación de compuestos fenólicos a partir de residuos alimentarios. En la actualidad, no existe una técnica de extracción estandarizada (Fontana, Antonioli y Bottini, 2013). La selección del método para obtener extractos ricos en compuestos antioxidantes determina el rendimiento, eficiencia y costo económico de la extracción (Dorta, 2014). En general, los métodos de extracción pueden clasificarse como métodos convencionales y no convencionales (Dueñas, 2017).

##### 4.2.6.1. Métodos de extracción convencionales

Los métodos convencionales han sido muy utilizados, pero presentan tiempo de extracción bastante prolongados, baja selectividad, bajo rendimiento de extracción, la técnica es laboriosa y requiere cantidades relativamente grandes de solventes (Dorta, 2014). Asimismo, las elevadas temperaturas

utilizadas durante la extracción pueden producir degradación de compuestos fenólicos por ionización, hidrólisis u oxidación (Dueñas, 2017).

Podemos encontrar dos métodos de extracción convencionales: *extracción líquido-líquido* y *extracción sólido-líquido*. En el primer método, una solución líquida que contiene el soluto (alimentación) se mezcla con un líquido inmiscible o casi inmiscible (solvente), y como resultado, se obtiene dos soluciones: el extracto que consta del solvente y soluto extraído, y el refinado que consta de los residuos de la solución inicial con prácticamente nada de soluto (Ignat et al., 2011). Mientras que, en el segundo método, los solutos contenidos en una matriz sólida migran a un solvente capaz de disolverlos (Skowrya, 2014). El tiempo requerido para que el solvente interactúe con la matriz es crítico para la recuperación del soluto y depende de la solubilidad del soluto, temperatura de extracción, área superficial de la matriz y viscosidad del solvente (Ballard, 2008).

#### 4.2.6.2. Métodos de extracción no convencionales

Los métodos de extracción no convencionales permiten reducir el tiempo de extracción, preservar el valor nutricional o fisiológico de los componentes de interés y reducir el costo económico del proceso. Están basados en tecnologías más eficientes, selectivas y más respetuosas con el medio ambiente para obtener extractos ricos en compuestos antioxidantes a partir de biorresiduos (Puértolas, Luengo, Álvarez y Raso, 2012). Entre los métodos de extracción no convencionales destacan la extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas, extracción asistida por altas presiones, extracción por pulsos eléctricos y extracción asistida por ultrasonido (Dorta, 2014; Hemwimol, Pavasant y Shotipruk, 2006).

##### 4.2.6.2.1. *Extracción asistida por ultrasonido (EAU)*

La extracción se lleva a cabo en baño ultrasónico (Ballard, 2008). La mayor eficiencia de EAU, en comparación con las técnicas convencionales, se atribuye al fenómeno de cavitación (Figura 11). Este fenómeno abarca la formación, crecimiento (expansión y compresión) y colapso de burbujas durante la propagación de una onda de ultrasonido en un medio líquido (Chemat et al., 2016).

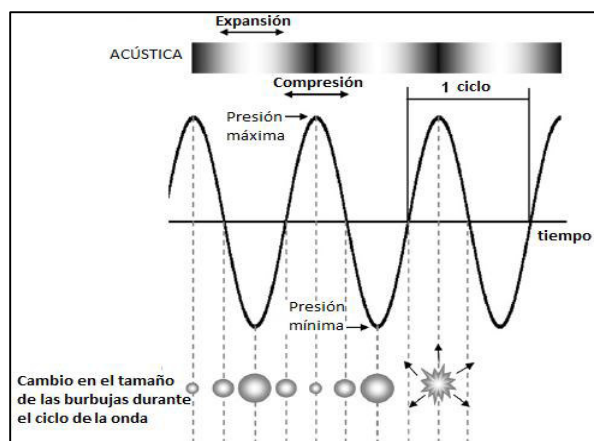


Figura 11. Cavitación producida por la EAU

Fuente: Soria y Villamiel, 2010

A medida que las ondas pasan a través del líquido, se generan burbujas que viajan en la superficie del material vegetal a una velocidad que depende de la naturaleza de la onda y del material (Soria y Villamiel, 2010) (Figura 12.A). Las burbujas crecen durante los ciclos de expansión (presión mínima), y se comprimen durante los ciclos de compresión (presión máxima). Este aumento de presión y temperatura causado por la compresión conduce a la implosión o colapso de las burbujas muy cerca de la pared celular, alterando su permeabilidad y causando la disrupción celular (Toma, Vinatoru, Paniwnyk y Mason, 2001; Hemwimol et al., 2006) (Figura 12.B). Finalmente, ocurre la penetración del solvente al interior de la célula a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas, facilitando así la difusión de los componentes deseados fuera de la célula (Ballard, 2008; Dueñas, 2017; Medina-Torres et al., 2017) (Figura 12.C).

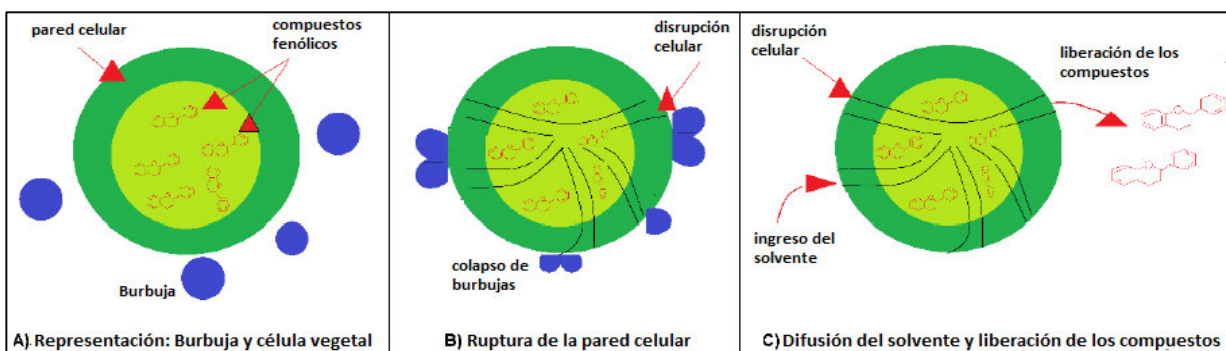


Figura 12. Colapso de burbujas por cavitación y liberación de compuestos de interés

(A) Representación de las burbujas y la célula vegetal, (B) Ruptura de la pared celular y colapso de las burbujas y (C) Difusión del solvente a través de la disrupción celular y liberación de los compuestos

Fuente: Medina-Torres et al., 2017



La EAU es considerada una tecnología aplicable en el campo de la “Química Verde” por ser un proceso sostenible y, por lo tanto, "amigable con el medio ambiente", con el que es posible utilizar materias primas renovables, reduciendo el consumo de energía (Medina-Torres et al., 2017). Ha demostrado ser un método eficiente de extracción no térmica (Binti, 2012) que permite realizar la extracción a temperatura ambiente, siendo recomendable para compuestos termolábiles; sin embargo, el ultrasonido puede ocasionar pequeñas oscilaciones de temperatura (Dueñas, 2017). Además, mejora la eficiencia de extracción de compuestos de interés al aumentar el rendimiento y acortar el tiempo de extracción en varios tejidos vegetales (Hemwimol et al., 2006). Sin embargo, existen parámetros que influyen en el proceso de EAU como, por ejemplo, el solvente y el tiempo.

La selección del *solvente de extracción* no solo está determinada por la solubilidad de los metabolitos de interés, sino también por los parámetros físicos, como la viscosidad, la tensión superficial y la presión de vapor del solvente. Se prefiere un solvente con baja presión de vapor, ya que el colapso de la burbuja de cavitación es más intenso en comparación con los solventes con alta presión de vapor. Asimismo, solventes con baja viscosidad y tensión superficial producen burbujas con mayor facilidad porque tienen menor densidad y requieren de menos energía (Chemat et al., 2016).

Un adecuado *tiempo de extracción* permite ahorrar energía y aumenta la eficiencia del proceso (Mokrani y Madani, 2016; Medina-Torres et al., 2017). El fenómeno de cavitación genera mayor transferencia de masa y mayor interacción soluto-solvente, lo que resulta en un menor tiempo de extracción en comparación con los métodos convencionales. El rendimiento de la extracción se incrementa con el tiempo de contacto entre el soluto y el solvente; sin embargo, según Dueñas (2017), se debe tener cuidado con tiempos excesivos de exposición a la sonicación, ya que la intensidad de la energía del baño ultrasónico puede desestabilizar y reducir la calidad de los compuestos de interés.

#### 4.2.7. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)

##### 4.2.7.1. Definición

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) fue introducida por primera vez por Box y Wilson (1951). Es una herramienta estadística de análisis multivariable que permite establecer las condiciones óptimas con el objetivo de mejorar un proceso (Rajaei, Barzegar, Hamidi y Sahari, 2010). Puede usarse para evaluar los efectos de múltiples factores (variables independientes), solos

o en combinación, y sus interacciones con una o más variables de respuesta (Li et al., 2016; Baş y Boyacı, 2007; Jang, Lee, Lee, Choi y Kim, 2017). Esta metodología brinda una vasta información a partir de una reducida cantidad de experimentos, ahorrando tiempo y dinero en comparación con las metodologías tradicionales (Gimeno, 2015) como el análisis univariable, que solo toma en cuenta un factor y requiere de una gran cantidad de experimentos para determinar los niveles óptimos (Sun, Xu, Zhang, Hu y Zeng, 2011; Moreno, 2013).

La MSR analiza la información de las variables involucradas mediante gráficos de contorno (en un solo plano) o gráficos 3D (en tercera dimensión) (Zambrano-Zaragoza, Gallardo-Navarro, Meléndez y Arjona-Román, 2003). Esta metodología es aplicada tanto en laboratorios de investigación como en maquinarias corporativas (Hunter y Koehler, 2005).

#### 4.2.7.2. Representación matemática

En un lenguaje matemático, como ocurre en la MSR, se produce una supuesta “relación funcional”, como se muestra en la ecuación 9:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon, \quad (\text{Ec. 9})$$

donde  $\eta$  es la respuesta,  $f$  es la función desconocida de respuesta,  $x_1, x_2, \dots, x_n$  denotan las variables independientes,  $n$  es el número de las variables independientes y finalmente  $\varepsilon$  representa el ruido o error estadístico que representan otras fuentes de variabilidad no cuantificadas por  $f$  (Martínez, 2016). La variable respuesta se expresa como una función polinomial, ya que se busca encontrar una relación funcional adecuada entre  $\eta$  y el conjunto de variables independientes para que pueda ajustarse a un polinomio de primer o de segundo grado (Montgomery, 2004; Villanueva, 2014). Sin embargo, ajustar los datos a un polinomio de segundo orden es el mayor inconveniente de la MSR ya que no todos los sistemas que contienen curvatura están bien acomodados por esta función (Baş y Boyacı, 2007).

Comúnmente, polinomios de orden bajo como de primer y segundo orden son utilizados sobre las variables independientes. Si la respuesta se amolda a una función lineal de las variables independientes, se obtiene un modelo de primer orden (lineal), pero si existe curvatura en la respuesta, entonces se usará un modelo de segundo orden (cuadrático) (Escobar, Pardo, Buitrago y López, 2004).

#### 4.2.7.3. Fases de la metodología

Las fases típicas de la MSR son las siguientes (Gimeno, 2015):

*Primera fase.*- Se determinan las variables independientes y el rango de sus valores.

*Segunda fase.*- Se elige el diseño experimental deseado y se comprueba matemáticamente el modelo obtenido. Los diseños de primer orden (factorial  $2k$ ) y de segundo orden (Central Compuesto o Box-Behnken) son los más utilizados.

*Tercera fase.*- Se obtiene la ecuación polinomial, los gráficos de superficie de respuesta y los gráficos de contorno (Figura 13), que ayudan a identificar los valores óptimos.

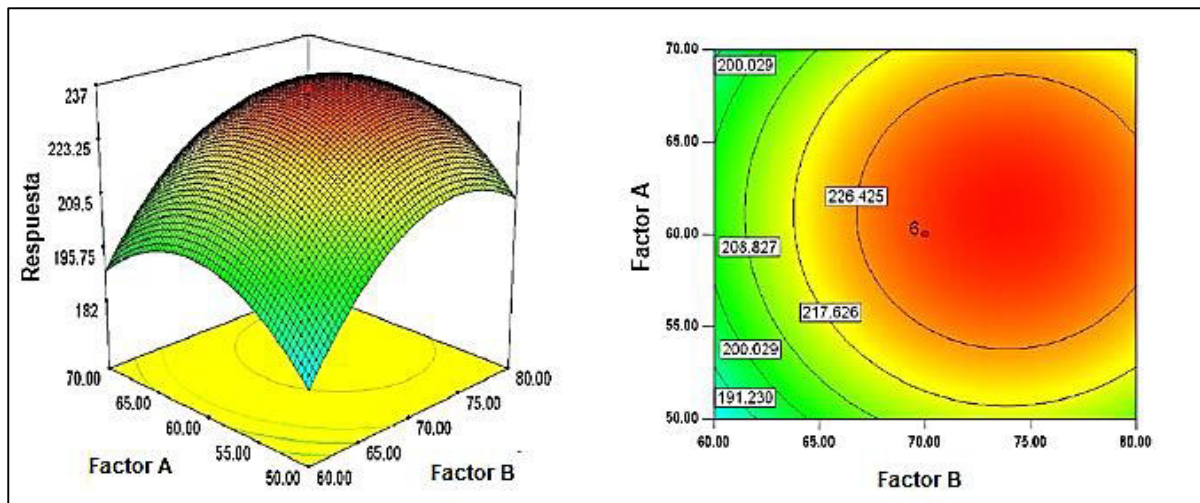


Figura 13. Superficie 3D y de contorno de la MSR, de izquierda a derecha

Fuente: Sun et al., 2011

#### 4.2.7.4. Diseño Central Compuesto

El Diseño Central Compuesto es un diseño bastante útil para la MSR, ya que su lenguaje matemático es sencillo, requiere menos tiempo de aplicación y es más eficiente que otros diseños, además es ampliamente utilizado para estimar superficies de respuesta de segundo orden, o conocidas como cuadráticas (Park, Kim y Cho, 2008; Carvalho de Lima, 2013). La optimización multirespuesta se logra mediante la determinación de la mejor combinación de los factores tal que produzcan el óptimo global, es decir que todas las respuestas den su mejor valor (Bacio, 2007).

El DCC genera puntos factoriales, puntos axiales y puntos centrales (Jiménez, 2015). La Figura 14 muestra un diseño central compuesto (DCC) de dos factores, en el que las 4 esquinas del cuadrado

representan los puntos factoriales del diseño (+/-1), los 4 puntos estrella representan los puntos axiales del diseño (+/-  $\alpha$ ) y en el centro del cuadrado se ubica el punto central replicado.

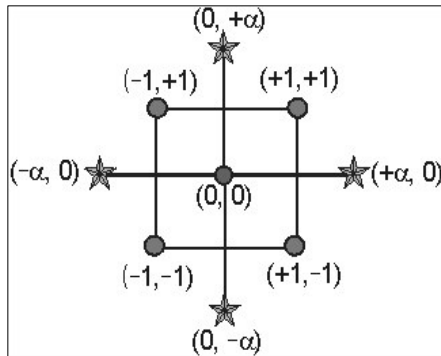


Figura 14. Diseño central compuesto de dos factores

Fuente: Stat-Ease Inc., 2018

La ubicación de los puntos estrella (axiales) determina si el diseño es ortogonal o rotatable. Un diseño es rotatable si puede hacer estimaciones con la misma cantidad de precisión en todas las direcciones de la superficie ajustada. Un diseño es ortogonal si las estimaciones de todos los términos en la superficie ajustada no están del todo correlacionadas (TIBCO Software Inc., 2018), esto significa que los errores en la estimación de un efecto no varían la estimación del otro efecto. Los diseños centrales compuestos ortogonales nos impiden confundir accidentalmente los efectos de dos factores diferentes. (Wass, 2010).

#### 4.2.7.5. Extracción de compuestos de interés mediante la MSR

La extracción de compuestos de interés utilizando la MSR no solo sirve como ayuda visual para tener una imagen más clara de los efectos de diversos factores en la extracción, sino que también nos ayuda a localizar la región donde se optimiza la extracción (Jang et al., 2017) y reduce el número de ensayos experimentales en procedimientos de extracción estadísticamente complejos como en los que intervienen matrices alimentarias (Lingzhu et al., 2015).

Diversos procesos en la industria alimentaria requieren ser optimizados para hacerse más eficientes y la MSR ha sido utilizada para lograr ese objetivo en técnicas de molienda, hidrólisis de polisacáridos (Rodríguez-Nogales, Ortega, Perez-Mateos y Busto, 2007) , síntesis de ácidos (Jang et al., 2017), fermentación (Carvalho de Lima, 2013) y otros procesos bioquímicos, extracción de compuestos de interés como pigmentos, aditivos, enzimas, aminoácidos, hidratos de carbono y sustancias nutraceuticas (Gimeno, 2015). Actualmente, el diseño central compuesto de la MSR está

siendo utilizado con éxito en la optimización de la EAU de polifenoles a partir de fuentes naturales como *Origanum majorana* (Hossain et al., 2012), barba de choclo (Lingzhu et al., 2015), melaza (Chen, Zhao y Yu, 2015), hojas de *Perilla frutescens* (Li et al., 2016), entre otros.

#### 4.2.8. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Existen diversos sistemas que generan radicales libres con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante de una determinada muestra. Por ello, los radicales libres reaccionan con la muestra, la cual, gracias a su capacidad antioxidante, inhibe a los primeros (Ramírez, 2017). Esta inhibición de los radicales libres es directamente proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra (Cerón y López, 2013).

La capacidad antioxidante de los alimentos ha sido medida a través de los años por diversos métodos espectrofotométricos (Aparcana y Villarreal, 2014). Entre los ensayos espectrofotométricos más utilizados se encuentran el método de barrido de radicales libres DPPH y el método de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) o también conocido como método del fosfomolibdeno. Asimismo, la capacidad antioxidante de los alimentos se ha correlacionado linealmente con su contenido fenólico en numerosos estudios (Karadag, Ozcelik y Saner, 2009). Por ello, se aplica el ensayo de Folin Ciocalteu como un ensayo de rutina simple y reproducible en numerosos estudios de agroquímica y alimentos que tratan sobre los antioxidantes (Huang et al., 2005).

##### 4.2.8.1. Método del DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

Este método fue propuesto originalmente por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995) y se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH<sup>\*</sup> (Aparcana y Villarreal, 2014), mediante la desaparición de compuestos cromógenos de naturaleza radical (que simulan ser EROS) (Arnao, 2000).

La molécula DPPH se caracteriza por ser un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La absorción máxima del DPPH en etanol ocurre a 517 nm y se caracteriza por ser de color morado que es intensificado por la deslocalización de su electrón. El color morado propio de la solución de DPPH<sup>\*</sup> se desvanece y se torna amarillo cuando esta reacciona con el antioxidante que le dona un átomo de hidrógeno, como se muestra en la Figura 15,

ocurriendo simultáneamente la disminución de la absorbancia. Este cambio de color es leído espectrofotométricamente y nos permite determinar la propiedad antioxidante de una muestra, tras un tiempo de reacción de 20-30 minutos (Alam, Bristi y Rafiquzzaman, 2012; Mishra, Ojhla y Chaudhury, 2012).

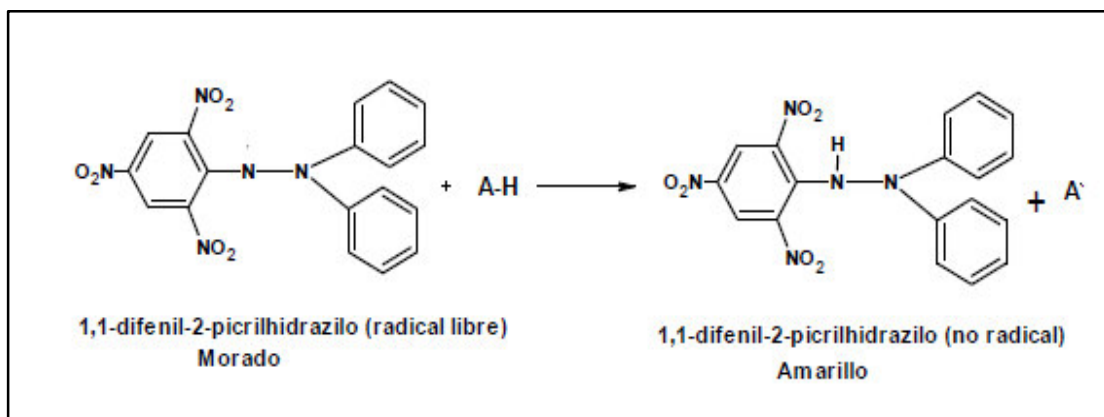


Figura 15. Estructura del DPPH al reaccionar con un antioxidante

Fuente: Alam et al., 2012

#### 4.2.8.2. Método de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) o del fosfomolibdeno

El método de la Capacidad Antioxidante Total fue establecido por Prieto, Pineda y Aguilar (1999) y tiene como principal especie implicada al molibdato de amonio. Es un método espectrofotométrico que sirve para la determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante total de una muestra, tanto de sus componentes lipofílicos como hidrofílicos (Oliveira et al., 2016). El ensayo se basa en la reducción de Mo (VI) a Mo (V) por el antioxidante, pasando de una coloración amarilla inicial a un verde azulado a medida que es reducido por el antioxidante, con la formación del complejo de fosfomolibdeno. La coloración verde azulada es más intensa cuanto mayor es la actividad antioxidante de la muestra (Bora, Miguel, Andrade y Oliveira, 2005). La reacción ocurre en medio fuertemente ácido, con temperatura cercana a ebullición y tiempo prolongado, y presenta un máximo de absorción a 695 nm (Alam et al., 2012). Se utiliza el ácido ascórbico como estándar de referencia (Montes De Oca, 2014).

La reacción ocurre en dos etapas, como se observa en la Figura 16. En la primera etapa, el fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) o sus formas protonadas reaccionan con el molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) (abreviatura derivada de la sal comercial heptamolibdato de amonio tetrahidratado) para formar el ácido 12-molibdofosfórico (12-AMF); y en la segunda etapa, éste es reducido al complejo verde de fosfomolibdato (FM) por

acción del antioxidante (AH) (Belizario y Cahuama, 2014).

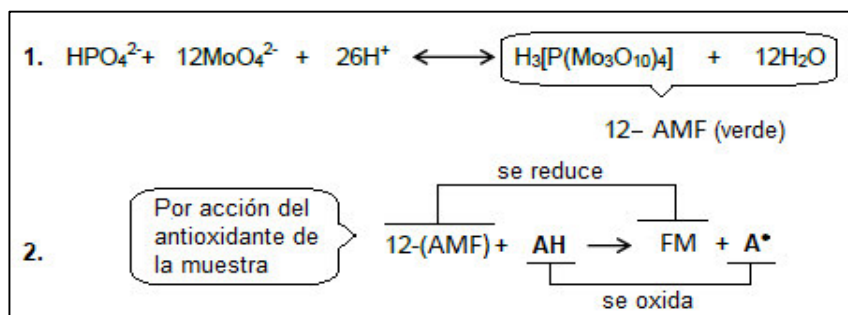
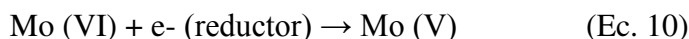


Figura 16. Reacción estequiométrica del ensayo del fosfomolibdeno

Fuente: Adaptado de Belizario y Cahuama, 2014

#### 4.2.8.3. Determinación del contenido fenólico total por Folin-Ciocalteu

La determinación cuantitativa de compuestos fenólicos en alimentos mediante el uso de reactivo Folin-Ciocalteu es un método generalizado que se basa en una reacción de oxidación/reducción (redox), y con el que se mide la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el molibdeno del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a un complejo azul donde ocurre la reacción de transferencia de electrones entre el Mo (VI) y el reductor (Tovar, 2013), según la ecuación 10:



El método implica la oxidación de los compuestos fenólicos en medio alcalino (pH=10) originando óxidos de tungsteno ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y de molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ), y la medición espectrofotométrica del complejo de molibdotungstosfosfato azul resultante entre 750-765 nm. Generalmente, el ácido gálico se usa como estándar de referencia (Magalhães, Segundo, Reis y Lima, 2008).

Se desconoce la naturaleza química exacta del reactivo F-C, pero se cree que contiene heteropolifosfotungstato-molibdato (Huang et al., 2005). Para tener resultados reproducibles es importante mezclar la muestra y el reactivo F-C en condiciones diluidas y agregar la solución de carbonato al final de la preparación con un tiempo de incubación prolongado que puede ser superior a 1 hora (Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventós, 1999).

#### 4.2.9. MICROENCAPSULACIÓN

La encapsulación, según Madene, Jacquot, Scher y Desobry (2006), es la técnica mediante la cual un material se recubre o es atrapado dentro de otro material o sistema. El material central recubierto

se refiere a la sustancia que será encapsulada y se denomina “compuesto activo” o “núcleo”, y el material de recubrimiento se refiere al polímero que se ubica alrededor del núcleo y se denomina “material de pared” o “agente encapsulante”. Si las partículas generadas tras el proceso de encapsulación presentan un diámetro medible en micrones, son micropartículas, y el proceso habrá sido una microencapsulación.

#### 4.2.9.1. Importancia de la microencapsulación

Una forma innovadora de brindar protección a compuestos de grado alimentario como pigmentos naturales, aceites y grasas, colorantes y antioxidantes debido a la sensibilidad que poseen frente a la luz, humedad, oxígeno, temperatura o metales que pueden causar su degradación es mediante la microencapsulación (Gibbs, Kermasha, Alli y Mulligan, 1999; Rosenberg, Kopelman y Talmon, 1985; Herrera, 2013; Herazo, 2013), haciendo que estos materiales alimenticios resistan mejor las condiciones ambientales, de procesamiento y empaçado (Luna, López, Jiménez y Luna, 2016).

La industria alimentaria aplica la tecnología de la microencapsulación por los siguientes motivos (Shahidi y Han, 1993; Gaonkar, Vasisht, Khare y Sobel, 2014):

1. Permite reducir la reactividad del núcleo (ingrediente activo sensible) en relación con el entorno exterior; es decir, aumenta su estabilidad y controla su velocidad de transferencia.
2. Promueve un manejo más fácil del material central al convertir un líquido difícil de transportar en micropartículas sólidas, con un tamaño y una superficie exterior bastante similar a los otros materiales de la mezcla, y al evitar la formación de bultos.
3. Permite la liberación controlada del material del núcleo a fin de lograr un tiempo de espera adecuado hasta el estímulo correcto (en condiciones deseadas).
4. Genera cambios fisicoquímicos deseados en la percepción sensorial del producto alimenticio debido al enmascaramiento del sabor, color u aroma original del núcleo.

#### 4.2.9.2. Caracterización de las microcápsulas

El tamaño, la estructura y la forma de las microcápsulas dependen de las características intrínsecas (composición, propiedades fisicoquímicas, etc.) del núcleo y del encapsulante, y de la técnica de microencapsulación (Gibbs et al., 1999). Cinco morfologías son las más conocidas: las cápsulas multinúcleos, las cápsulas mononucleares o simples, las cápsulas multiparedes, la matriz que tienen muchos núcleos incrustados y la cápsula con núcleo irregular (Fang y Bhandari, 2010; Gharsallaoui et al., 2007; Cuaspué, 2015) (Figura 17).



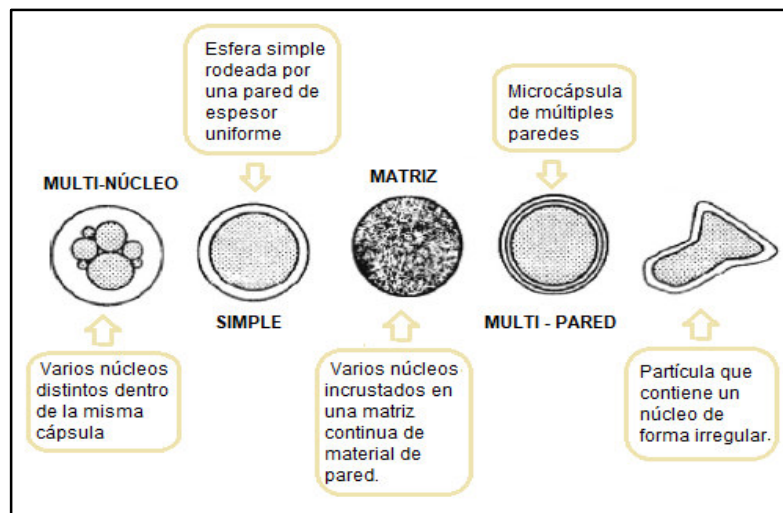


Figura 17. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas

Fuente: Adaptado de Gharsallaoui et al., 2007

Es importante que exista un equilibrio de masa entre el material encapsulante y el núcleo (Çam et al., 2013; Çilek, 2012). Una relación entre núcleo: encapsulante (p/p) inferior a 1:2 puede conllevar a que el núcleo quede expuesto en la superficie de las microcápsulas, mientras que una relación superior a 1:4, puede resultar en un polvo con un contenido de núcleo muy bajo, lo que no es deseable en aplicaciones alimentarias. (Robert et al., 2010; Gallardo et al., 2013).

#### 4.2.9.3. Microencapsulación mediante secado por aspersión

Las técnicas para microencapsular compuestos de interés incluyen procesos físicos y químicos. Los procesos químicos incluyen la polimerización interfacial, la coacervación, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, co-cristalización y atrapamiento de liposomas. Los procesos físicos incluyen el enfriamiento por atomización (*spray chilling*), extrusión, secado por lecho fluidizado, separación por disco rotatorio y el secado por aspersión (*spray drying*), siendo este último uno de los más importantes y más utilizados en la industria alimentaria (Gibbs et al., 1999; Herrera, 2013).

El secado por aspersión se basa en la atomización de un fluido de alimentación a través de la formación de pequeñas gotitas en forma de chispas que son secadas a gran velocidad al tener contacto con el aire caliente dentro de una cámara de secado y como producto de esa deshidratación se forman partículas secas en forma de polvos o aglomerados (Ramírez, 2013).

Algunas de las ventajas que nos brinda el método de secado por aspersión son las siguientes: Produce un producto de alta calidad con un costo relativamente bajo, presenta equipamiento disponible y operación continua, brinda un secado rápido de las partículas debido al tiempo muy corto de contacto con el calor y la alta velocidad de evaporación del solvente durante el proceso, permite obtener un rendimiento alto y, sobretodo, tiene la capacidad para manejar muchos materiales sensibles al calor sin causarles efectos perjudiciales significativos (Gharsallaoui et al., 2007; Fazaeli, Tahmasebi y Emam-Djomeh, 2012; Desai y Park, 2005; Sosnik y Seremeta, 2015).

#### 4.2.9.3.1. Descripción del proceso

El proceso de secado por aspersión empieza cuando el fluido de alimentación ingresa al dispositivo de atomización, que está formado por una boquilla aspersora, una cámara de secado, un ciclón separador y un tubo colector del producto seco, y termina con la obtención de pequeñas partículas sólidas. (Ramírez, 2013) (Figura 18).

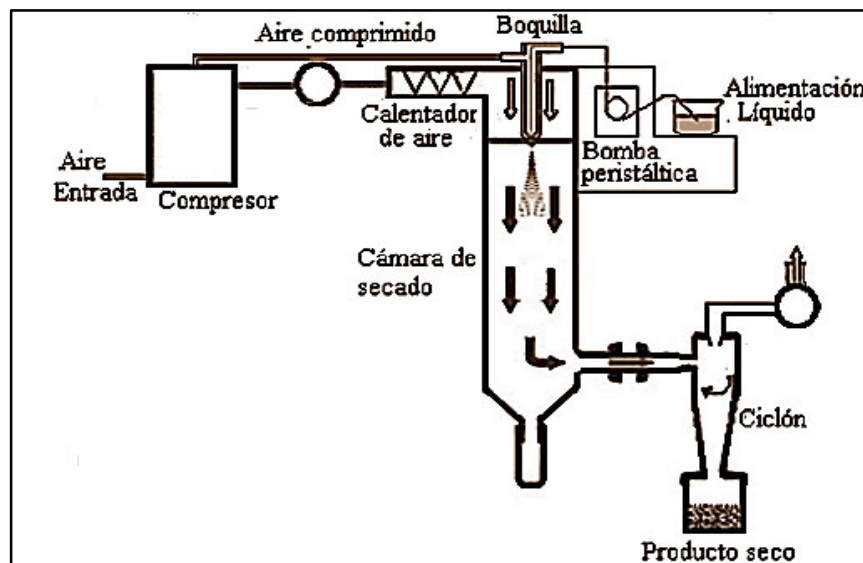


Figura 18. Equipo de secado por aspersión tipo laboratorio

Fuente: Ramírez, 2013

El secado por aspersión consiste en 5 etapas:

1. Bombeo de la alimentación: El líquido de alimentación (solventes + materiales de encapsulación) ingresa al sistema, viaja por la sonda y es impulsado por la bomba peristáltica hasta llegar a las boquillas aspersoras (Ramírez, 2013).

2. Contacto con el aire de secado: Cuando las pequeñas gotas del líquido de alimentación salen por las boquillas aspersoras, se ponen en contacto con el aire de secado que ingresa a una temperatura de 150-220 °C y se crea una superficie de transferencia máxima de calor entre el aire seco y el líquido. El secado se puede dar en co-corriente o en contracorriente. En co-corriente, el líquido se atomiza en la misma dirección que el flujo de aire; mientras que, en contracorriente, el líquido se atomiza en dirección opuesta al flujo de aire (Ramírez, 2013).

3. Porcentaje de aspersión: Las finas gotas del líquido se secan en segundos gracias a la alta velocidad con que se evapora el solvente (Gharsallaoui et al., 2007). Un aumento de la temperatura de las gotas genera la formación de una fina película del material encapsulante y termina con la formación de una costra seca en la superficie (Lozano, 2009; Ramírez, 2013).

4. Separación del producto seco del aire: Los polvos secos se exponen a temperaturas moderadas de salida (50-80 °C) que limitan las degradaciones térmicas (Ramírez, 2013). El polvo obtenido está hecho de partículas que se originan a partir de gotas esféricas después de encogerse (Gharsallaoui et al., 2007). El ciclón ubicado a la salida de la cámara de secado (parte inferior derecha del equipo) se encarga de separar el aire de las partículas encapsuladas, ya que estas últimas se adhieren a las paredes del ciclón como consecuencia de la fuerza centrífuga que se genera (Lozano, 2009).

5. Recolección de las microcápsulas: El vaso colector que se encuentra debajo del ciclón separador, receptiona las partículas encapsuladas que por gravedad terminan descendiendo, mientras que el aire casi sin partículas es retirado por la parte superior del ciclón separador. En general, las microcápsulas producidas son de tipo “matriz” (Ré, 1998), de forma aproximadamente esférica, un tamaño que varía entre 5 y 600 micras y, casi siempre, presentan una cubierta porosa (Lozano, 2009).

#### 4.2.9.3.2. *Maltodextrina como material encapsulante*

Los materiales encapsulantes más comunes son proteínas como la gelatina y el suero de leche; gomas como la arábica, la acacia y el alginato; lípidos como la cera y la lecitina; polisacáridos como la celulosa, los almidones y sus derivados (ciclodextrinas y maltodextrinas) (Ceballos, 2008).

La maltodextrina se obtiene por hidrólisis ácida suave de los granos de varios almidones (maíz, papa u otros), está conformada por unidades de  $\beta$ -D-glucosa unidas por puentes glucosídicos, de 5-10 unidades de glucosa por molécula (Ceballos, 2008). En general, las maltodextrinas tienen una alta solubilidad en agua, baja viscosidad, capacidad formadora de película, sabor suave, alto contenido

de sólidos, bajo contenido de azúcar, inodoras, fácilmente digeribles, forman soluciones incoloras, son razonablemente baratas, están disponibles comercialmente y se usan ampliamente como encapsulante para la microencapsulación de diversas sustancias en la industria alimentaria (Gibbs et al., 1999; Ferreira, Rocha y Coelho, 2007; Ceballos, 2008; Sáenz, Tapia, Chávez y Robert, 2009; Kha, Nguyen y Roach, 2010; Akhavan, Jafari, Assadpoor y Dehnad, 2016).

La elección de la maltodextrina como encapsulante depende principalmente del ingrediente activo a ser encapsulado y de las condiciones del proceso. Comercialmente, las maltodextrinas se clasifican por el contenido de equivalentes de dextrosa (ED). Las maltodextrinas con  $ED < 10$  pueden ser usadas como sustitutos de grasas, mientras que las maltodextrinas con  $ED > 10$  son ampliamente utilizadas como encapsulantes protegiendo y estabilizando compuestos de interés como los polifenoles (Ruiz y Segura, 2016; Fang y Bhandari, 2010).

#### 4.2.9.4. Microencapsulación de compuestos fenólicos

El método de encapsulación aplicado a los polifenoles tiene por objetivo reducir su alta reactividad e inestabilidad, enmascarar su sabor y olor no deseados, potencializar su actividad y mantener su integridad estructural y biodisponibilidad hasta el consumo, y con ello, extender su vida útil y áreas de uso (Herrera, 2013; Çilek, 2012).

Diversos autores han microencapsulado compuestos fenólicos naturales extraídos de diferentes plantas, como de grosella negra (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011), tuna (Sáenz et al. 2009), fresa china (Fang y Bhandari, 2011), yerba mate (Nunes et al., 2015), açai (Tonon, Brabet y Hubinger, 2008, 2010), semilla de la uva (Zhang, Mou y Du, 2007; Davidov-Pardo, Arozarena y Marín-Arroyo, 2012a), orujo de la uva (Boonchu y Utama-ang, 2013), noni (Krishnaiah, Sarbatly y Nithyanandam, 2012), cereza (Çilek, 2012), granada (Çam et al., 2013), entre otros.

Por lo tanto, la microencapsulación protege los compuestos de interés, para aplicarlos, por ejemplo, como ingredientes y aditivos alimenticios en formulaciones nutraceuticas, incluso bajo condiciones ambientales adversas (Herrera, 2013).

#### 4.2.10. ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son aquellos que, independientemente de aportar nutrientes, se ha demostrado mediante estudios científicos que generan beneficios para la salud al mejorar las funciones del organismo, reducir el riesgo de aparición de dolencias y complementar las dietas

diarias (Aranceta y Sarrea, 2003). Estos tipos de alimentos se caracterizan por ser sensorialmente aceptables, fáciles de consumir y suelen ajustarse a los requerimientos nutricionales diarios (Aranceta y Sarrea, 2003; Morones, 2012).

#### 4.2.10.1. Situación de los alimentos funcionales

La revista Agraria.pe (2017) manifiesta que, existe una alternativa para cambiar la tendencia de salud en el mundo, ya que, ocurren 38 millones de muertes anuales por enfermedades crónicas no transmisibles (diabetes tipo 2, ataques cardíacos o cáncer) y esta alternativa es la producción de alimentos funcionales. El consumo de alimentos funcionales en el mundo es cada vez más creciente. La industria de alimentos funcionales en el 2011 alcanzó alrededor de 175 mil millones de dólares que representa el 5% del mercado global de alimentos, con tasas de crecimiento anual de 48% (Prochile, 2014; Fuentes Berrio, Acevedo Correa y Gelvez Ordoñez, 2015). Un estudio llevado a cabo por Leatherhead Food Research en el 2011, reveló a los países más desarrollados como los principales demandantes de alimentos funcionales: Japón con 38% de participación de mercado, Estados Unidos con 31% y la Unión Europea con 29% (ProChile, 2014).

En la Figura 19 se observa distintos ingredientes utilizados por la industria alimentaria para la elaboración de productos, siendo los ingredientes funcionales los de mayor venta en el 2015 y con proyección de seguir liderando en el mercado en el 2020.

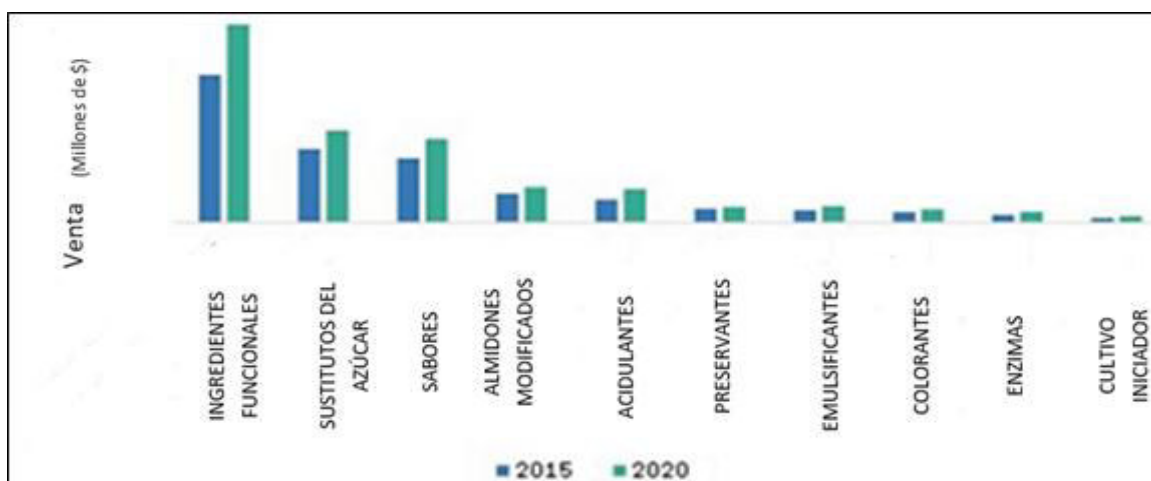


Figura 19. Evolución del mercado de los ingredientes alimentarios y su proyección al 2020

Fuente: Adaptado de MarketsandMarkets (citado por AINIA, 2015)

En Perú, diferentes instituciones vinculadas con el consumo de alimentos más saludables, como el Laboratorio de Grasas, Aceites y Alimentos Funcionales de la Universidad de Lima donde, en mayo del 2018, se realizó el proyecto “Elaboración de bebida funcional fuente de omega 3 y antioxidantes microencapsulados de cáscaras de camu camu y mango para promover el desarrollo comercial de la biodiversidad”, tiendas como “La Sanahoria” y “Ekovida” que impulsan a llevar un estilo de vida más sano mediante la compra de productos orgánicos y funcionales, empresas como “Granotec Perú”, dedicada a la producción de insumos e ingredientes para la industria de alimentos funcionales que contribuyan a prevenir enfermedades, son grandes ejemplos que están impulsando el consumo de alimentos funcionales en el Perú.

En cuanto a los productos de biocomercio, los granos andinos (como quinua y kiwicha), las frutas nativas (como camu camu y aguaymanto) y el paiche son ejemplos de alimentos oriundos que destacan por sus cualidades nutricionales y funcionales (PromPeru, 2014). Actualmente, se están elaborando una gran variedad de alimentos funcionales procesados, no todos son producidos en el Perú, pero sí contienen ingredientes peruanos en su formulación, y actualmente están siendo vendidos en el mercado internacional:

Tabla 4. Alimentos funcionales con ingredientes peruanos en su formulación

<b>Alimento funcional</b>	<b>País de destino</b>
Leche de espelta con granada	Unión Europea
Polvo de supergranos	Unión Europea
Snack a base de aguaymanto deshidratado	Unión Europea
Galletas integrales con extracto de maíz morado	Unión Europea
Hamburguesas de quinua al limón	Unión Europea
Leche de arroz enriquecida con calcio	Suiza
Pan enriquecido con harina de cañihua,	Suiza
Galleta con chispas de chocolate, harina de quinua y kiwicha	Suiza

Fuente: Adaptado de PromPeru, 2013a; PromPeru, 2013b; PromPeru, 2014

Dentro de la clasificación de los alimentos funcionales, se encuentran aquellos ricos en compuestos fenólicos, que cumplen función antioxidante (Vásquez, De Cos y López-Nomdedeu, 2005). El antioxidante puede ser el ingrediente funcional más prometedor para agregar a un producto (Jesionkowska, Sijtsema, Konopacka y Symoneaux, 2009).

La Tabla 5 muestra el crecimiento en ventas que tuvieron los productos funcionales más vendidos durante el 2009 con respecto al año anterior, en función a los ingredientes alimentarios declarados en sus etiquetas. Por ejemplo, los productos que declararon el ingrediente “antioxidante” en sus etiquetas, tuvieron un crecimiento en las ventas mayor al 29%, siendo solamente superados por los productos que declararon al “omega” (>42%) como ingrediente (The Nielsen Company, 2009).

Tabla 5. Declaraciones alimentarias en la etiqueta de los productos funcionales más vendidos a nivel mundial en el 2009

Declaración de la etiqueta	Crecimiento en las ventas (2009) (%)
Omega	+42%
Antioxidante	+29%
Libre de gluten	+16%
Probiótico	+13%
Calcio	+13%
Fibra	+13%
Bajo índice glucémico	+12%
Sin sal/sodio	+10%

Fuente: The Nielsen Company, 2009

A continuación, se presentan estudios científicos en los que se elaboraron productos funcionales que contenían extractos vegetales con propiedades antioxidantes en su formulación:

Tabla 6. Alimentos enriquecidos con extractos vegetales

<b>Antioxidante incorporado</b>	<b>Producto</b>	<b>Referencia</b>
Extracto microencapsulado de <i>Garcinia cambogia</i> y de té verde	Pan	Ezhilarasi, et al. (2013); Pasrija et al. (2015).
Curcumina encapsulada	Queso y yogurt	Marcolino, Zanin, Durrant, Benassi y Matioli (2011).
Curcumina encapsulada	Helado	Sousdaleff et al., 2013
Extracto de granada microencapsulado	Yogurt	Robert et al. (2010)
Extracto de granada microencapsulado	Helado	Çam et al. (2013)
Extracto de semilla de uva	Galleta	Davidov-Pardo et al. (2012b)

Fuente: Elaboración propia

#### 4.2.10.2. Galletas

Son productos obtenidos mediante el horneado apropiado de una masa (sólida o semisólida), de las figuras formadas del amasado de derivados del trigo u otras harinas sucedáneas, con otros ingredientes aptos para el consumo humano. Presentan un límite máximo de 12% de humedad (g/100 g) (NTP 206.001, 2016) y, por lo tanto, una vida útil prolongada. Su composición a base de harina, azúcar, materias grasas y huevos brinda las calorías requeridas por personas activas, teniendo gran aceptabilidad por la población en general, que las consume de preferencia entre las comidas (Mejía, 2009).

En el mercado peruano, se distribuye aproximadamente más de 100 marcas de galletas, cuya venta supera los 300 millones de dólares, siendo un mercado muy grande y rivalizante. El consumo de galletas está aumentando 7% anual y su consumo per cápita llega a 4.1 kg anuales, valor que se encuentra sólo por debajo de Argentina (5 kg anuales) y Brasil (6.7 kg anuales), los cuales son los consumidores mayoritarios en América del Sur. La venta de galletas ocurre principalmente en pequeños paquetes individuales, los que podemos encontrar en las bodegas. Entre las galletas dulces y saladas, las galletas dulces poseen el 60% del mercado (Contreras, 2015).



#### 4.2.10.2.1. Clasificación

Según NTP 206.001 (2016), las galletas se clasifican:

- a) Galleta salada o dulce: Producto que tiene un sabor predominantemente salado o dulce.
- b) Galleta con o sin cobertura: Producto que podrá estar bañado parcial o totalmente por diferentes tipos de coberturas.
- c) Galleta con o sin relleno: Producto que contiene en su interior uno o más rellenos.

La clasificación es referencial, ya que podrá haber combinaciones de estas (NTP 206.001, 2016).

#### 4.2.10.2.2. Materias primas y su función en la elaboración de galletas

- a) Harina de trigo: Principal ingrediente, procedente de trigo blando (*Triticum aestivum*). Entre las proteínas del gluten, las gliadinas contribuyen a la cohesión y elasticidad de la masa, haciéndola más blanda y fluida, mientras que las gluteninas contribuyen a la extensibilidad, haciéndola más fuerte y firme. Cuando se añade un solvente a la harina y se amasa, este hidrata las proteínas, potencia las interacciones hidrofóbicas y la formación de puentes disulfuros, creando una red proteica tridimensional y viscoelástica que retiene todos de los componentes de la harina, incluido el gas (Cabeza, 2009).
- b) Azúcar: La principal función del azúcar es dar dulzor a la galleta; sin embargo, brinda otras características secundarias a la galleta: En primer lugar, tiene un efecto sobre el gluten, ablandándolo y haciéndolo más extensible (apertura de la miga, aumento de viscosidad y retención de gases); en segundo lugar, el azúcar le confiere dureza a la galleta, ya que se satura en el horneado, y al enfriarse, se asienta rígidamente y; por último, debido a que el azúcar se funde durante la cocción, forma una masa de jarabe derretido que, en presencia de aminoácidos, péptidos y proteínas, da lugar a la reacción de Maillard (producción de melanoidinas de color pardo oscuro) consiguiendo tonos morenos sobre la superficie de la galleta horneada., afectando su textura y color (Pérez, 2017).
- c) Mantequilla: La mantequilla desempeña una misión antiaglutinante en las masas, contribuye a su plasticidad, suavidad y actúa como lubricante. Cuando se realiza la cocción de la masa, los compuestos grasos se derriten y las partículas de aire contenidas en su interior son liberadas,

haciendo que la galleta se esponje y, por lo tanto, aumente su área superficial y reduzca su grosor y peso. Además, la grasa frena la cristalización de la sacarosa y favorece el sabor y la textura de las galletas obteniendo como resultado galletas menos duras, menos ásperas, más fragmentables y con más tendencia a deshacerse en la boca. (Cabeza, 2009; Pérez, 2017).

- d) *Huevo*: La lecitina del huevo posee componentes eficaces como emulsionantes llamados fosfolípidos. Los emulsionantes en general hacen más extensibles las masas reduciendo la dureza y tenacidad, aceleran la dispersión de los componentes grasos y acuosos reduciendo el tiempo de mezclado y mejorando el sabor de las galletas (Contreras, 2015; Pérez, 2017; Cabeza, 2009; Conde, 2016).
- e) *Sal*: La sal se utiliza para potenciar el sabor de la galleta, endurecer el gluten (ayuda a mantener la red de gluten) y producir masas menos adherentes (Pérez, 2017; Cabeza, 2009).
- f) *Esencia de vainilla*: La vainilla es una de las esencias saborizantes más utilizadas en los productos horneados, siendo la vainillina su principal componente que le da el sabor y el aroma característico (Pérez, 2017).
- g) *Bicarbonato de sodio*: El bicarbonato de sodio forma parte de los aireadores, llamados también gasificantes o leudantes que, durante la cocción de la masa, produce anhídrido carbónico que incrementa el volumen de la masa, de tal forma que se desarrolla una textura porosa dentro de la galleta. Esta sal debe ser incorporada a la masa previo tamizado y se debe batir enérgicamente luego de su incorporación para evitar residuos groseros de ella en la masa final (Pérez, 2017).

#### 4.2.10.2.3. Galletas enriquecidas

La adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una alternativa para el desarrollo de alimentos funcionales, ya que incrementa el aporte de antioxidantes a nuestra dieta (García, 2005; Soler, 2009). Las galletas son un candidato potencial para ser enriquecidas con extractos fenólicos durante su formulación porque son productos variados, de bajo costo y consumidos por casi todos los niveles socioeconómicos, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Davidov-Pardo et al., 2012b). Las galletas han servido como matrices alimentarias claves para ser enriquecidas con compuestos de interés por ser altamente palatables y poseer una larga vida útil, siendo ventajas que las diferencian de otros productos alimentarios

(Mejía, 2009).

Existen varios estudios que han demostrado que el enriquecimiento de galletas con diversas fuentes de compuestos bioactivos es un buen ejemplo para su utilización como alimentos funcionales. Umesha et al. (2015) informaron que la encapsulación del aceite de semilla de berro evitó la oxidación de los ácidos grasos omega 3 en la galleta durante la cocción y 5 meses de almacenamiento. Davidov-Pardo et al. (2012b) adicionaron el extracto polifenólico libre y microencapsulado de semilla de uva en la galleta y evaluaron la percepción sensorial y del consumidor. De Camargo, Vidal, Canniatti-Brazaca y Shahidi (2014) incorporaron distintas cantidades de cascarilla de maní a una formulación de galleta logrando aumentar el contenido fenólico y con ello, aportar antioxidantes al producto final. Mišan et al. (2009) agregaron una mezcla de cuatro diferentes extractos antioxidantes de plantas a las galletas que sinérgicamente mejoraron la estabilidad oxidativa y capacidad antioxidante del producto. Petrović et al. (2016) reportaron que las galletas enriquecidas con una suma del 15% de compuestos bioactivos extraídos del orujo de la cereza y encapsulados con proteínas de soya y suero de leche fueron las que presentaron mejores características físicas. Por último, Tumbas Šaponjac et al. (2016) mostraron que el extracto de orujo de cereza influyó positivamente en las características funcionales de las galletas fortificadas y su conservación.

#### 4.2.10.3. Caracterización en las galletas

##### 4.2.10.3.1. *Análisis de color*

El color de un producto influye en la elección de compra por parte del consumidor debido a que determina su grado de aceptabilidad individual y frente a otros productos con los que compite, siendo una de las características de calidad más importantes en los alimentos. Durante la elaboración de un producto se producen cambios en el color como consecuencia del horneado, maduración, congelamiento, almacenamiento, cocción, enfriado, etc., los cuales pueden ser medidos. (Vargas, 2016).

Existen diversos sistemas que permiten medir los colores de un determinado producto, entre ellos, se encuentra el sistema color Munsell, color CIE, espacios de color CIE L\*a\*b\* (CIELAB), espacios de color Hunter Lab y Lovibond. Uno de los espacios de color más usados en la actualidad es el espacio CIELAB, utilizado no solo en el campo de los alimentos, sino también en medicina, farmacia, minería, geología, etc. (Vargas, 2016).

Las coordenadas de color que son utilizadas en el sistema CIELAB permiten ubicar un determinado color en el espacio y son las siguientes:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .  $L^*$  indica luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  son coordenadas de cromaticidad.  $L^*$  representa la diferencia entre la luz ( $L^* = 100$ ) y la oscuridad ( $L^* = 0$ ). El componente  $a^*$  representa la diferencia entre verde ( $-a^*$ ) y rojo ( $+a^*$ ) y el componente  $b^*$  representa la diferencia entre azul ( $-b^*$ ) y amarillo ( $+b^*$ ) (Sahin y Gülüm, 2006). El espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$  se muestra en la Figura 20.

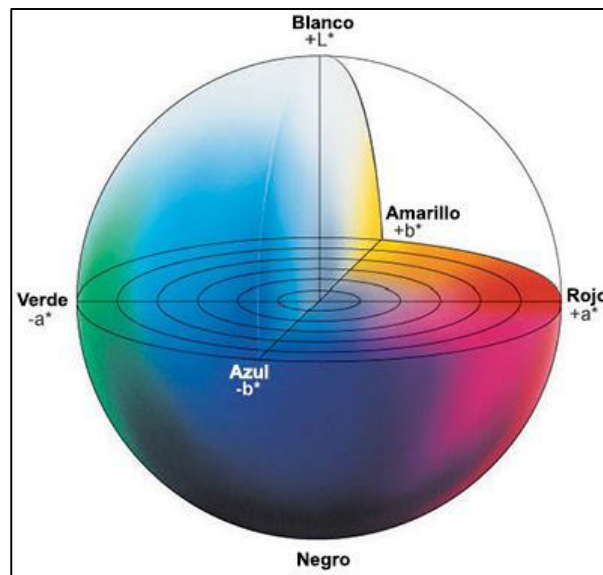


Figura 20. Espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$

Fuente: Konica Minolta Sensing Americas Inc., s.f.

#### 4.2.10.3.2. Análisis sensorial

La evaluación sensorial es utilizada para medir, analizar e interpretar reacciones de los materiales, que son percibidas por los sentidos (vista, olfato, gusto, tacto y oído).

El análisis sensorial no puede ser reemplazado o reproducido por ningún aparato, ya que las respuestas que generan los sentidos ante un determinado estímulo son bastante complejas, en ellas se da la participación de una variedad de receptores corporales. La medición numérica de las respuestas sensoriales son la clave para crear nuevos productos, reformularlos, investigar cambios originados por el procesamiento, adición de un ingrediente nuevo o almacenamiento del producto, manteniendo la calidad del producto en todas las etapas del proceso (Watts, Ylimaki, Jeffery y Elías, 2001).

A continuación, se muestran 3 tipos de pruebas sensoriales, que son utilizadas según el objetivo planteado al momento de evaluar un alimento (Tabla 7):

Tabla 7. Clasificación de las pruebas sensoriales

<b>Clasificación</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Pregunta de interés</b>	<b>Tipo de prueba</b>	<b>Características de panelistas</b>
Discriminatorias	Determinar si dos productos son percibidos de manera diferente por el consumidor.	¿Existen diferencias entre los productos?	Analítica (orientadas al producto)	Panel con agudeza sensorial, orientados al método usado, algunas veces entrenados, conformado por pocos panelistas.
Descriptivas	Determinar la naturaleza de las diferencias sensoriales.	¿En qué tipos de características específicas difieren los productos?	Analítica (orientadas al producto)	Panel con agudeza sensorial y motivación, entrenados o altamente entrenados, conformado por pocos panelistas.
Afectivas	Determinar la aceptabilidad de consumo de un producto.	¿Qué productos gustan más y cuáles son los preferidos?	Hedónica (orientadas al consumidor)	Panel que usa constantemente el producto, no entrenados, conformado por muchos panelistas.

Fuente: Adaptado de Liria, 2007

Las pruebas afectivas, o también llamadas “orientadas al consumidor” o “hedónicas”, nos permiten identificar si existe diferencias entre muestras y evaluar la magnitud de estas diferencias, para que así, la característica diferencial se mantenga o se cambie. Las pruebas afectivas pueden ser pruebas de preferencia y de aceptabilidad (Liria, 2007).

- a) **Pruebas de Preferencia:** Se tiene varias muestras que serán evaluadas por los panelistas quienes finalmente indicarán si prefieren una muestra sobre otra o si no tienen preferencia (Mejía, 2009).
- b) **Pruebas de Aceptabilidad:** Mide cuánto puede agradar o desagradar una muestra, determinando el grado de aceptación por parte del panelista (Mejía, 2009). Entre las escalas utilizadas para realizar este tipo de prueba, se tiene una escala *gráfica lineal*, que se basa en una línea horizontal

con un límite mínimo y máximo, tabulada o no, acompañada de locuciones verbales en los extremos; y *escala hedónica de nueve puntos*, que se basa en una lista de posibles respuestas que indican distintos niveles de satisfacción por parte del consumidor, en el que el consumidor elige la respuesta que más se asemeja a su percepción sobre el producto. Para esta prueba se utilizan escalas categorizadas, que pueden tener diferente número de categorías y que comúnmente van desde “me gusta extremadamente”, pasando por “no me gusta ni me disgusta”, hasta “me disgusta extremadamente”. Los panelistas indican el grado en que les agrada cada muestra, escogiendo la categoría apropiada (González, Rodeiro, Sanmartín y Vila, 2014).

#### *4.2.10.3.3. Análisis proximal*

El análisis proximal es aplicado cuando se requiere hacer formulaciones sobre un determinado producto, para corroborar que se cumpla con las especificaciones o requerimientos indicados durante una formulación, cuando se quiere comparar el valor nutricional de productos que compiten en el mercado, etc. Este análisis comprende la evaluación del contenido de humedad, proteínas (nitrógeno total), lípidos, ceniza y fibra en una muestra (Olvera, Martínez y Real de León, 1993).

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El estudio de análisis taxonómico se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) (Anexo I). La parte experimental de la presente investigación se realizó en el laboratorio de “Investigación y Desarrollo” de la Facultad de Química e Ingeniería Química, y de “Química Analítica” de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, así como en los laboratorios del “Centro de Control Analítico” de Cenprofarma y de “Farmacognosia y Medicina Tradicional” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, pertenecientes a la UNMSM.

### **5.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **5.2.1. REACTIVOS QUÍMICOS**

Etanol al 96% de la marca Alkofarma, etanol grado HPLC de la marca Fisher Scientific, reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) de la marca Sigma-Aldrich, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico de la marca J. T. Baker, reactivo Folin- Ciocalteu 2N, hidróxido de sodio, éter de petróleo, metanol, acetona, carbonato de sodio y molibdato de amonio de la marca Merck, fosfato de sodio dodecahidratado de la marca Riedel-de-Haën, cloroformo, ácido gálico y n-hexano de la marca Fermont, anhídrido acético, hidróxido de amonio y ácido nítrico de la marca J.A. Elmer, cloruro de mercurio (II), ácido ascórbico, cloruro férrico y magnesio metálico de la marca Scharlau. También se utilizaron otros reactivos preparados (Dragendorff, Mayer, Bertrand, Sonnenschein, Rosenheim, Bornträger, de gelatina, de Grignard, de Fehling, de Ninhidrina y de vainillina alcohólica).

#### **5.2.2. MATERIALES DE VIDRIO Y AFINES**

Probetas graduadas de 50 y 100 ml, bureta de 50 ml, fiolas con tapa de 10, 50, 100 y 250 ml, pipetas de 1, 5 y 10 ml, matraces aforados de 50 y 100 ml, balón de 500 ml, vasos precipitados de 50, 100, 250 y 500 ml, frascos de vidrio de 250 ml, crisoles de 40 ml, tubos de ensayo de 30 x 200 y 10 x 75, desecador, bagueta, viales ámbar, placas petri y luna de reloj.

### 5.2.3. OTROS MATERIALES

Cuchillos de acero inoxidable, tabla de picar de PVC de alta densidad, mortero de porcelana, pinzas para crisol, bandeja de acero inoxidable, parafilm, picetas, propipetas, tamiz de malla #80, espátulas de acero inoxidable, espátula de plástico, bandejas de loza, rodillo, papel manteca, papel aluminio, papel craft, rollo stretch film, bolsas de polietileno con cierre zipper ético, bolsas DoyPack trilaminadas de PET/aluminio/polipropileno, moldes de acero inoxidable, glicerina, licuadora, batidora, papel filtro n°2 (Whatman), cocinilla eléctrica, guantes de látex, nasobucal y cofias, formatos de evaluación para panelistas, lapiceros, platos redondos de poliestireno expandido, vasos descartables de plástico de 200 ml y servilletas.

### 5.2.4. INSUMOS

Se utilizó maltodextrina de la marca Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) como material encapsulante, así como los siguientes ingredientes: harina de trigo sin preparar, bicarbonato de sodio, huevo, mantequilla sin sal, azúcar, sal y vainilla.

### 5.2.5. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Micropipetas de 5 a 50 uL y de 100 a 1000 uL (marca Accumax).
- Micropipetas de 0.5 a 5 ml (marca Eppendorf Research® plus).
- Termómetro (marca Boeco. Rango de temperatura -10 a 110 °C).
- pHmetro (marca HITECH, modelo PH-009 (III). Rango de medida PH 0.01 - 14.00).
- Refractómetro (marca HITECH, modelo RHB-32ATC).
- Molino de martillos (marca Pulvex, modelo MM200).
- Horno (marca Zenith Lab, modelo ODHG- 9053A. Temperatura máxima 300 °C).
- Mufla (marca Hobersal, modelo HD230PA. Temperatura máxima 1200 °C).
- Baño maría (marca Memmert, modelo WNB 45. Temperatura máxima 95 °C).
- Agitador magnético (marca IKA, modelo RCT basic. Rango de velocidad 0 - 1500 rpm).
- Analizador de humedad (marca OHAUS, modelo MB45. Rango de humedad 0.01 - 100 %).
- Balanza analítica (marca AyD, modelo GH-200. Capacidad 0.1 mg - 220 g).
- Balanza analítica (marca AyD, modelo HR-250AZ. Capacidad 0.1 mg - 252 g).
- Balanza analítica (marca ACCULAB, modelo ALC-210.4. Capacidad 0.1 mg - 210 g).
- Balanza electrónica de plataforma (modelo TS 60. Capacidad 0.5 - 50 Kg).
- Balanza electrónica digital (marca MH-Series, modelo Pocket Scale. Capacidad 0.01-200 g).



- Centrífuga (marca GREETMED, modelo GT119-100T. Velocidad máxima 4000 rpm).
- Rotavapor (marca BOECO, modelo RVO 400 SD).
- Baño ultrasónico (marca Branson, modelo B1510MTH. Capacidad ½ galón).
- Espectrofotómetro (marca Thermo Scientific, modelo Helios Beta).
- Atomizador (marca TOPTION, modelo TP-S15).
- Sistema de digestión (marca Büchi, modelo K-425).
- Equipo Soxhlet (extractor Soxhlet, condensador tipo Allihn y un matraz de balón).
- Horno de cocina (marca Electric).
- Refrigerador-congelador (marca LG).

### 5.3. MATERIA PRIMA

La materia prima fue el fruto maduro de unguurahui (*Oenocarpus bataua* Mart.), familia *Arecaceae*, proveniente de la ciudad de Pucallpa, departamento de Ucayali - Perú. El fruto fue lavado y desinfectado. La semilla fue separada manualmente de la cáscara y pulpa del fruto, fue sometida a un secado por horno a 40°C por 48 horas y se redujo su tamaño utilizando un molino de martillos. La semilla molida se secó a 40 °C hasta peso constante. Finalmente, fue pulverizada en una licuadora (Oster) y tamizada (malla #80) hasta obtener un polvo fino que se colocó dentro de una bolsa DoyPack trilaminada en congelación (-20°C) para las posteriores evaluaciones.

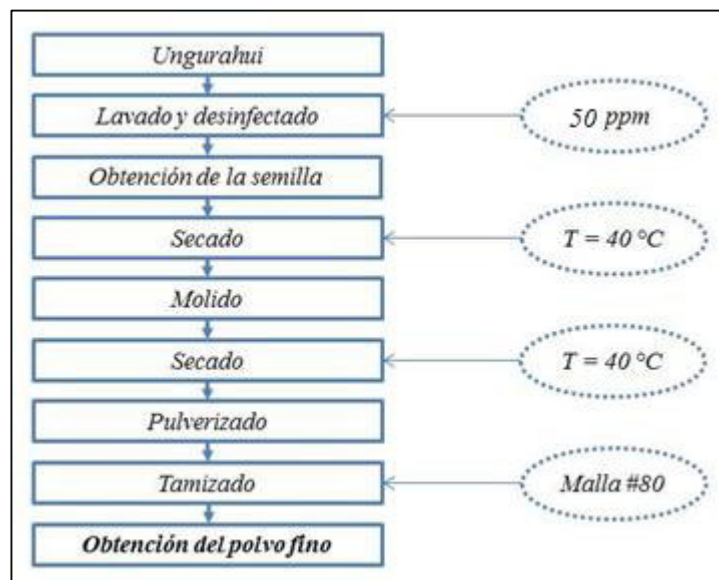


Figura 21. Flujo de operaciones para la obtención del polvo fino de semilla de unguurahui

Fuente: Elaboración propia

## **5.4. ENSAYOS PRELIMINARES**

Para esta primera parte, el proceso de extracción se realizó siguiendo el método descrito por Torres (2018), con ligeras modificaciones. Para realizar la extracción para los ensayos preliminares, el polvo fino de semilla de unguirahui se dejó macerar con una mezcla de agua-etanol al 50% usando una relación de soluto-solvente de 1:30 (p/p) por 12 horas a temperatura ambiente. Luego, la solución fue filtrada usando papel Whatman n°2 y el sobrenadante fue sometido a un sistema a vacío para la evaporación parcial del solvente. Finalmente, la solución concentrada fue secada a 40°C hasta peso constante. El extracto hidroetanólico de semilla de unguirahui fue utilizado para realizar ensayos como la prueba de solubilidad y marcha fitoquímica, en cambio, para la determinación del pH se utilizó como muestra la solución concentrada del extracto.

La prueba de solubilidad se realizó con el objetivo de elegir el o los solvente(s) más adecuado(s) para ser utilizado(s) en el proceso de optimización. Asimismo, la marcha fitoquímica buscó detectar los principales grupos de metabolitos secundarios que contiene el extracto y de interés alimentario, también para descartar la presencia de aquellos que podrían ser tóxicos para la salud como los glucósidos cianogénicos. Por último, la determinación de pH se realizó para tener conocimiento de la acidez o alcalinidad del medio en que se realiza la extracción y su posible efecto sobre los compuestos bioactivos.

### **5.4.1. DETERMINACIÓN DE pH**

Para medir el pH del extracto hidroetanólico de semilla de unguirahui se utilizó un pHmetro digital previamente calibrado con los buffers pH 4.00±0.01 y pH 10.00±0.01, según la metodología descrita por Delgado (2007). Posteriormente, el electrodo del pHmetro se introdujo en la solución concentrada y se leyó por triplicado el pH de la muestra.

### **5.4.2. MARCHA DE SOLUBILIDAD**

El extracto hidroetanólico de semilla de unguirahui se sometió a reacción con solventes de diferentes polaridades, de acuerdo a lo descrito por Guillermo (2002), con ligeras modificaciones. En 7 tubos de ensayo se añadieron, en cada uno, pequeñas porciones de extracto seco y 2 ml de solvente (agua, metanol, etanol, acetona, cloroformo, hexano y éter de petróleo). A continuación, todos los tubos se agitaron vigorosamente por 2 minutos y se observaron los resultados, los cuales se expresaron como (+), (++) y (+++) para indicar “poco soluble”, “soluble” y “muy soluble”, respectivamente, y (-) para “insoluble”.

### 5.4.3. MARCHA FITOQUÍMICA

Para el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios, se colocó en una fiola 50 mg del extracto hidroetanólico de semilla de ungrahui y se enrasó con una solución de etanol: agua (1:1) a 50 ml, teniendo una concentración de extracto de 1000 ppm. Se utilizó el método de Matos (1997) con ligeras modificaciones de Rondón et al. (2017), para las pruebas de alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, azúcares, aminoácidos libres, terpenoides y glicósidos. Los resultados cualitativos se expresaron como (+), (++) y (+++) para indicar cambio de color/precipitado leve, moderado o intenso, respectivamente, y (-) para indicar la ausencia de fitoquímicos.

#### a) Prueba para carbohidratos

*Ensayo de Molish:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico y 5 gotas de la solución alcohólica de alfa-naftol, seguida de 5 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a lo largo del lado del tubo. La formación de un anillo violeta en la interfase indica la presencia de carbohidratos.

*Ensayo de Fehling:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico, 5 gotas del reactivo Fehling “A” (solución de CuSO<sub>4</sub>) y 5 gotas del reactivo Fehling “B” (solución de NaOH y tartrato Na-K). Se colocó en baño maría a ebullición por 1 minuto. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de azúcares reductores.

#### b) Prueba para alcaloides

Aproximadamente 1 ml de muestra se mezcló con HCl al 10% (5 gotas) en un tubo de reacción para realizar los siguientes ensayos:

*Ensayo de Dragendorff:* Se añadió 3-4 gotas del reactivo de Dragendorff (solución de yoduro potásico-bismútico). La formación de un precipitado rojo anaranjado indica la presencia de alcaloides.

*Ensayo de Mayer:* Se añadió 3-4 gotas del reactivo de Mayer (solución de yoduro potásico-mercúrico). La formación de un precipitado blanco o crema indica la presencia de alcaloides.

*Ensayo de Bertrand:* Se añadió 3-4 gotas del reactivo de Bertrand (solución de ácido sílico-túngstico). La formación de un precipitado blanco lechoso indica la presencia de alcaloides.

*Ensayo de Sonnenschein:* Se añadió 3-4 gotas del reactivo de Sonnenschein (ácido fosfomolibdico). La formación de un precipitado verde azulado indica la presencia de alcaloides.

c) Prueba para terpenoides

*Ensayo de Salkowski:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico, 2 ml de cloroformo y 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a lo largo del lado del tubo. Una coloración marrón rojiza en la interfase indica la presencia de terpenoide.

*Ensayo de Liebermann-Burchard:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico, 10 gotas de cloroformo y 10 gotas de anhídrido acético. Se dejó enfriar y se agregó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (3-4 gotas) por las paredes del tubo. Una coloración verde azulada indica la presencia de esteroides, mientras que una coloración pardo anaranjado indica la presencia de triterpenoides.

d) Prueba para flavonoides y taninos

*Ensayo de cloruro férrico:* En un tubo de ensayo, se añadieron 1 ml del extracto hidroetanólico y 2 gotas de cloruro férrico al 5%. Una coloración o precipitado de azul oscuro indica la presencia de taninos hidrosolubles, mientras que una coloración o precipitado verde oscuro indica la presencia de taninos condensados o proantocianidinas.

*Ensayo del hidróxido de sodio (10%):* En un tubo de ensayo, se añadieron 1 ml del extracto hidroetanólico y 3 gotas del reactivo de sodio al 10%. Una coloración amarilla-roja, naranja-café, rojo-púrpura o azul indica la predominancia de xantonas y/o flavonas, flavonoles, chalconas o antocianinas, respectivamente.

*Ensayo de la gelatina:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico y 4 gotas del reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco lechoso indica la presencia de taninos.

*Ensayo de Shinoda:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico, 5 virutas de magnesio metálico y 3 gotas del reactivo de HCl. Una coloración roja a salmón indica la presencia de flavonoles, flavonas, flavononoles y flavanonas, mientras que una coloración amarilla indica la presencia de isoflavonas. Isoflavononas, catequinas, auronas y chalconas no dan reacción.

*Ensayo de Rosenheim:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico, 5 gotas del reactivo de HCl concentrado y se colocó en baño maría por 10 minutos a ebullición. Luego de ser enfriado, se agregó 4 gotas del reactivo de Rosenheim (solución de alcohol amílico). La formación de un precipitado rojo pardo indica la presencia de leucoantocianidina.

e) Prueba para saponinas

*Ensayo de la espuma:* Se añadió el extracto hidroetanólico (1 ml) con agua destilada (1 ml) en un tubo de ensayo, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó en reposo por 10 minutos. La formación de espuma indica la presencia de saponinas. El contenido de saponina se midió como sigue: sin espuma (-); espuma inferior a 3 mm de altura (+); Espuma de 6 mm de altura (++) y espuma superior a 8 mm de altura (+++).

f) Prueba para glicósidos

*Ensayo de hidróxido de amonio:* En un tubo de ensayo, se añadieron 1 ml del extracto hidroetanólico y 2 gotas del reactivo de hidróxido de amonio concentrado. Después de dos minutos, una coloración roja indica la presencia de glicósido de antraquinona.

*Ensayo de Grignard:* En un tubo de ensayo, se añadieron 20 mg del extracto seco, 1 ml de agua destilada y 2 gotas de cloroformo. Se colocó una tira de papel impregnado con reactivo de Grignard (“papel picrosódico”, preparado con carbonato de sodio al 10% y ácido pícrico al 1%) en la boca del tubo, sin tocar los bordes y se tapa. Se calentó en estufa a 35°C y después de 24 horas se observó el color desarrollado en el papel. Una coloración roja indica la presencia de glicósido cianogenético.

g) Prueba para aminoácidos libres

*Ensayo de Ninhidrina:* En un tubo de ensayo, se añadieron 10 gotas del extracto hidroetanólico y 3 gotas del reactivo de ninhidrina al 0.2%. Una coloración azul-violeta indica la presencia de aminoácidos libres.

## 5.5. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA SEMILLA DE UNGURAHUI

### 5.5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para determinar los valores de los factores que optimizaron el valor de las variables de respuesta. Para realizar esta optimización, se utilizó el Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO) con dos factores (concentración de etanol y tiempo de extracción) y cinco niveles (Tabla 8). La selección y rango de los factores se decidió sobre la base de la literatura científica. Las variables de respuesta fueron: rendimiento de extracción, contenido fenólico total (CFT) y la capacidad antioxidante medida por los métodos CAT y DPPH.

Tabla 8. Factores y niveles del Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO)

Niveles	Factores	
	Concentración de etanol (X1, %)	Tiempo de extracción (X2, min)
-1.07809	48.4382	13.8287
-1	50	15
0	70	30
+1	90	45
+1.07809	91.5618	46.1713

Fuente: Elaboración propia

El diseño consistió en 10 tratamientos que incluyeron 4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 2 puntos centrales para estimar los errores (Tabla 9). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los datos experimentales obtenidos para cada respuesta se ajustaron a diferentes modelos polinomiales (lineal, interacción de dos factores o cuadrático) y para elegir el mejor modelo se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple.

Tabla 9. Diseño experimental de las condiciones de extracción obtenidas con el Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO)

Corrida	Niveles codificados		Niveles reales	
	EtOH (%)	Tiempo (min)	EtOH (%)	Tiempo (min)
1	-1.07809	0	48.4382	30
2	-1	-1	50	15
3	-1	+1	50	45
4	0	-1.07809	70	13.8287
5	0	0	70	30
6	0	0	70	30
7	0	+1.07809	70	46.1713
8	+1	-1	90	15
9	+1	+1	90	45
10	+1.07809	0	91.5618	30

Fuente: Elaboración propia

La ecuación polinomial, ya sea de primer orden (Ec. 11) o de segundo orden (Ec. 12), que se utilizó para realizar las predicciones de las variables de respuesta, fueron las siguientes:

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_j X_j \quad (\text{Ec. 11})$$

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_j X_j + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{jj} X_j^2 \quad (\text{Ec. 12})$$

donde,  $Y$  es la variable de respuesta pronosticada,  $\beta_0$  es el intercepto,  $\beta_i$  y  $\beta_j$  representan los efectos lineales,  $\beta_{ij}$  es el efecto de interacción,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{jj}$  son los efectos cuadráticos,  $X_i$  y  $X_j$  son los niveles codificados de los factores (concentración y tiempo) y la variable  $X_i X_j$  representa la interacción lineal entre  $X_i$  y  $X_j$ .

Una vez que se obtuvieron los modelos para cada una de las respuestas, se generaron las gráficas de

superficie 3D, las cuales fueron analizadas para determinar el efecto de los factores sobre cada variable de respuesta. Posterior a ello, se realizó la optimización de las cuatro respuestas en simultáneo, asignándoles previamente una misma importancia. Para llevar a cabo la optimización de múltiples respuestas, se utilizó la función *deseabilidad*, la cual definió en primer lugar, una deseabilidad individual para cada respuesta, y a partir de la combinación de estos valores se definió la deseabilidad global. Por lo tanto, al maximizar este parámetro se obtuvieron los valores óptimos de concentración de etanol y tiempo de extracción que maximizaron las respuestas (rendimiento, CFT, CAT y DPPH).

Para validar el modelo, se realizó un experimento con las nuevas condiciones de concentración y tiempo de extracción. Los valores experimentales obtenidos para cada respuesta fueron comparados con los pronosticados por el software, con la finalidad de asegurar que el modelo permita predecir cada respuesta con precisión.

#### 5.5.2. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La extracción se llevó a cabo en un baño ultrasónico Branson 1510, con una potencia de 150 W y una frecuencia de 50-60 Hz. Antes de iniciar las extracciones, se buscó controlar el ligero calentamiento del agua a medida que el tiempo de extracción aumentaba por encima de 20 minutos. El objetivo fue mantener la temperatura en el rango requerido ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Entonces, para evitar una posible interferencia de la temperatura sobre las respuestas en estudio, se decidió enfriar el agua y controlar la temperatura durante el proceso con un termómetro digital.

Teniendo en cuenta el control de la temperatura, se siguió la metodología descrita por Lan, Lin y Zheng (2014), con ligeras modificaciones, para realizar la extracción de compuestos fenólicos de la semilla de unguirahui. Aproximadamente 10 g de polvo fino de semilla de unguirahui se extrajo con 300 ml de una mezcla de agua-etanol (solvente de extracción) a diferentes concentraciones (48.44 – 91.56 %) y tiempos de extracción (13.83 – 46.17 min). Durante la sonicación, se usó *parafilm* y papel de aluminio para cubrir la “boca” de los matraces con la finalidad de evitar pérdidas de solvente por evaporación y para minimizar la oxidación de compuestos bioactivos por acción del oxígeno; de igual modo, se usó papel de aluminio grueso (37 micrones) para evitar la oxidación de compuestos bioactivos por acción de la luz. Las diferentes mezclas fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 min y filtradas con papel Whatman n°2, obteniendo de esta manera los sobrenadantes, que



fueron concentrados a 40°C, en agitación constante y bajo presión reducida en un balón de rotavapor (sumergido parcialmente en una solución de glicerina y conectado a un sistema a vacío). Luego de evaporar la mayor parte del solvente, los extractos fueron secados en un horno a 40°C hasta peso constante y designados como “extractos de ungurahui” (EU). Estos extractos se recolectaron mediante un raspado, se usó un mortero con pilón para reducir el tamaño de sus cristales y se almacenaron en viales de color ámbar a -20°C hasta los posteriores análisis fenólicos y antioxidantes. Cada tratamiento (n= 10) se realizó por triplicado, es decir, se obtuvieron 30 extractos.

El rendimiento de extracción (RE) se calculó como la relación entre el peso de los EU obtenidos al final del proceso y el peso del polvo fino utilizado para el proceso de extracción (Ec. 13):

$$RE (\%) = \frac{\text{Masa del extracto seco (g)}}{\text{Masa del polvo tamizado (g)}} \times 100 \quad (\text{Ec. 13})$$

### 5.5.3. ANÁLISIS FENÓLICO Y ANTIOXIDANTE DE LOS EU

#### 5.5.3.1. Preparación de las muestras

Se pesaron 25 mg de cada EU, obtenidos a diferentes condiciones de extracción, y se disolvieron en una solución hidroetanólica hasta 100 ml (250 ppm). Luego, para la determinación del CFT se tomaron alícuotas de 10 ml de cada solución y se mezclaron con el mismo solvente hasta 25 ml, siendo 100 ppm la concentración final de las muestras. Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH y CAT, se tomaron alícuotas de 4ml de cada solución y se mezclaron con el mismo solvente hasta 100 ml, siendo 10 ppm la concentración final de las muestras.

#### 5.5.3.2. Determinación del contenido fenólico total (CFT)

El método colorimétrico de Folin-Ciocalteu fue utilizado para realizar la medición del contenido de fenoles totales (CFT) en los EU siguiendo la metodología de Leba et al. (2016), pero con ligeras modificaciones. Para la realización del análisis, se mezcló 0.3 ml de cada muestra, 0.9 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (1 N), 4.5 ml de agua destilada y, por último, se añadió 0.3 ml de una solución de carbonato de sodio (20 % p/v) a cada mezcla, se agitaron y fueron incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad por 1 h. Cumplido ese tiempo, se midieron las absorbancias a 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis.

Para la preparación del blanco, se mezcló 0.3 ml de solvente hidroetanólico, utilizado para disolver los EU, con las mismas proporciones de Folin-Ciocalteu, agua destilada y carbonato de sodio y fue analizado de la misma manera que las muestras. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

El ácido gálico fue usado como estándar o patrón de referencia para la determinación del CFT de las muestras, a través de una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico (2.5 - 200 ug/ml). Los resultados fueron expresados como mg equivalente de ácido gálico por gramo de extracto de semilla de unguirahui (mg EAG/g EU).

### 5.5.3.3. Determinación de la capacidad antioxidante

#### 5.5.3.3.1. Método de la Capacidad Antioxidante Total (CAT) o del fosfomolibdeno

Para evaluar la capacidad antioxidante total de los EU mediante el método de fosfomolibdeno, se utilizó la metodología desarrollada por Prieto et al. (1999) que consiste en la reducción del molibdeno VI a molibdeno V por los compuestos antioxidantes del extracto y la subsecuente formación de un complejo de fosfato/molibdeno de color verde-azul en un ambiente ácido. Para la preparación del reactivo fosfomolibdato, se disolvió 0.4660 g de molibdato de amonio, 0.1064 g de fosfato de sodio dodecahidratado y 0.3 ml de ácido sulfúrico concentrado en agua destilada para 100 ml de reactivo.

Para el análisis, se mezcló una alícuota de 450 µl de las muestras con 4.5 ml del reactivo fosfomolibdato preparado anteriormente, los tubos fueron cerrados con parafilm e incubados en baño maría a 95°C por 90 minutos. Después, las mezclas fueron enfriadas a través de un baño de hielo y leídas a 695 nm en un espectrofotómetro UV-visible. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido ascórbico por gramo de extracto de semilla de unguirahui (mg EAA/g EU).

Para la preparación del blanco, se mezcló 450 µl de agua destilada con 4.5 ml del reactivo fosfomolibdato, también se incubó en baño maría a 95°C por 90 minutos y se analizó de la misma manera que las muestras. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. El ácido ascórbico fue usado como estándar para obtener la curva de calibración a partir de soluciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ug/ml que se sometieron al mismo procedimiento que las muestras para obtener sus valores de absorbancia.

La absorbancia de la solución de ácido ascórbico a 10 ug/ml fue utilizada para comparar su

capacidad antioxidante con el EU que obtuvo el máximo valor de CAT, utilizando la siguiente ecuación:

$$AAR (\%) = \frac{A_{c \text{ máx EU}}}{A_{c \text{ aa}}} \times 100, \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde:

AAR (%) es el porcentaje de actividad antioxidante relativa con respecto al ácido ascórbico,  $A_{c \text{ máx EU}}$  es la máxima absorbancia corregida de los EU y  $A_{c \text{ aa}}$  es la absorbancia corregida del ácido ascórbico a 10 ppm.

#### 5.5.3.3.2. Método del DPPH

Para preparar el reactivo DPPH, se pesó 10 mg de DPPH y se diluyó con etanol grado HPLC en una fiola de 50 ml (solución madre). Luego se tomó 25 ml y se aforó a 250 ml con el mismo solvente, obteniendo una concentración final de 20 ppm. La solución preparada se colocó en un frasco ámbar, fue cubierta con papel aluminio y fue utilizada el mismo día de su preparación.

La capacidad de los compuestos antioxidantes para realizar el barrido del radical libre DPPH se determinó siguiendo la metodología de Mahmoudi, Khali, Benkhaled, Benamirouche, y Baiti (2016) con ligeras modificaciones. Se tomó 1.5 ml de cada muestra y se mezcló con 3.0 ml de la solución fresca de DPPH preparada anteriormente. Las mezclas se agitaron enérgicamente por 20 segundos y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 minutos bajo oscuridad con el objetivo de obtener valores estables de absorbancia. La absorbancia fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro UV- Vis. Para la preparación del control, se tomó 1.5 ml de la solución fresca de DPPH y se mezcló con 3.0 ml de etanol grado HPLC. La mezcla se dejó reposar por 30 minutos bajo oscuridad y se analizó de la misma manera que las muestras. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de la absorbancia debido al barrido del radical DPPH se calculó como se muestra en la ecuación 15:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde:

$A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia de la solución de DPPH.

#### 5.5.4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO

Los valores de concentración de etanol y tiempo de extracción que maximizaron las variables de respuesta (rendimiento de extracción, contenido fenólico total y capacidad antioxidante) fueron obtenidos mediante el programa Design Expert y fueron aplicados experimentalmente en un nuevo proceso de extracción con el objetivo de obtener el EU óptimo, designado como “extracto de semilla de ungurahui libre” (EUL).

Para la validación del modelo, se realizó los análisis de CFT y capacidad antioxidante al EUL, según las secciones 5.5.3.2. y 5.5.3.3. Finalmente, los valores obtenidos experimentalmente fueron comparados con lo valores pronosticados por el programa, estimando de esta manera el porcentaje de error del modelo:

$$\% \text{ Error} = \frac{\% \text{ valor experimental} - \% \text{ valor predicho}}{\% \text{ valor predicho}} \times 100 \quad (\text{Ec. 16})$$

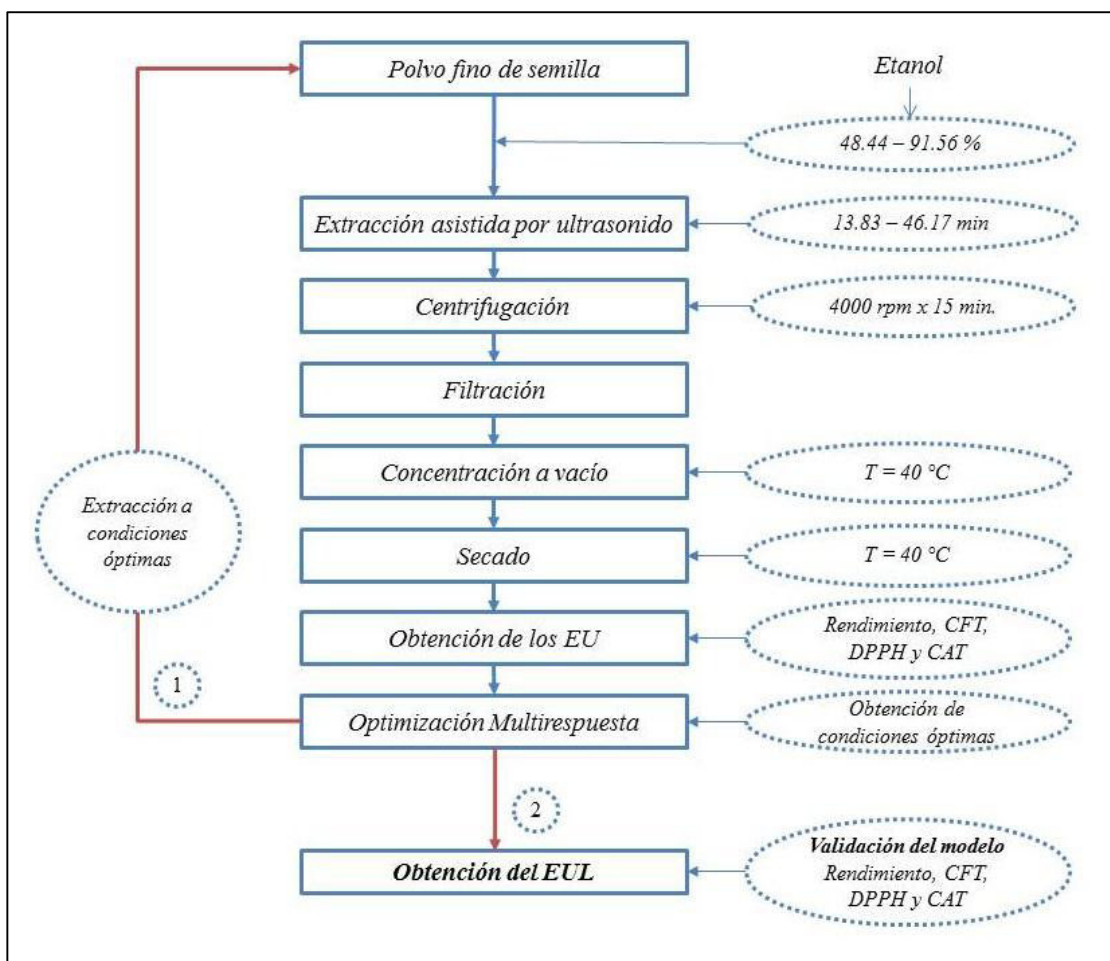


Figura 22. Flujo de operaciones para la obtención y análisis del extracto de semilla de unguahui libre (EUL)

Fuente: Elaboración propia

## 5.6. MICROENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE UNGURAHUI

Para preparar la solución de alimentación, el EUL (4 g) fue disuelto en agua-etanol (44 g) a la concentración óptima de extracción, y la maltodextrina (12 g), utilizada como material encapsulante, fue disuelta en agua destilada (20 g). Ambas soluciones, por separado, se agitaron de forma continua (800 rpm) por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez que se obtuvo una solución clara de maltodextrina, se transfirió a una bureta de 50 ml y se añadió lentamente a la solución que contenía el extracto hasta alcanzar una concentración de sólidos en suspensión de 20 % (p/p). La mezcla ( $\approx$  80 ml) se homogenizó a 10000 rpm usando un homogenizador Ultra-Turrax durante 10 minutos y se mantuvo en agitación hasta que fue microencapsulada.

La microencapsulación se realizó mediante la técnica de secado por aspersión utilizando un equipo mini-Spray Dryer de laboratorio (Toption TP-S15, China) con dos boquillas de alimentación de 0.5 mm de diámetro y bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada a 150 °C, velocidad del aire a 90% y velocidad de alimentación de 18% (6 ml/min). La mezcla se agitó constantemente para asegurar la homogeneidad de la alimentación durante el secado. Como resultado del proceso, se obtuvo microcápsulas de EUL, designadas como “extracto de semilla de unguirahui microencapsulado” (EUM). La muestra microencapsulada fue pesada e inmediatamente colocada en bolsa trilaminada para evitar que sea afectada por acción de la luz y humedad. La muestra fue almacenada en un desecador hasta los análisis posteriores.

### 5.6.1. ANÁLISIS DE BARRIDO ESPECTRAL

Para evaluar cualitativamente la posible degradación de los compuestos fenólicos del extracto de semilla de unguirahui a causa de la temperatura de microencapsulación, los extractos (EUL y EUM) fueron sometidos a un análisis de barrido espectral utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. en el rango de 200 a 400 nm. Se prepararon tres soluciones con los extractos, utilizando como solvente la mezcla de agua-etanol a la concentración óptima (48.44 %). El EUL se preparó a 100 ppm y el EUM a 400 ppm, por último, se preparó una solución a 100 ppm con EUL sometido bajo condiciones de atomización, pero sin maltodextrina ( $EUL_M$ ) con la finalidad de comparar la ausencia del efecto protector de la maltodextrina a diferencia del EUM. Las tres soluciones preparadas fueron sometidas al análisis de barrido espectral utilizando un espectrofotómetro UV-Vis de un solo haz.

### 5.6.2. RENDIMIENTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN

El rendimiento de la microencapsulación (RM) se realizó con la finalidad de conocer cuánto material inicial (extracto y maltodextrina) se pudo recuperar luego de la microencapsulación. El rendimiento de la microencapsulación (RM) fue determinado gravimétricamente como la relación entre el peso de las micropartículas obtenidas al final de la atomización (EUM) y el peso de los sólidos iniciales añadidos (EUL y maltodextrina) (Ec. 17):

$$RM (\%) = \frac{\text{masa final de las microcápsulas (g)}}{\text{masa de maltodextrina (g)} + \text{masa del extracto}} \times 100 \quad (\text{Ec. 17})$$

### 5.6.3. EFICIENCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN

La eficiencia de la microencapsulación (% EM) se determinó mediante una relación porcentual entre el contenido fenólico total de las microcápsulas (CFT<sub>M</sub>) y el contenido fenólico superficial de las microcápsulas (CFS<sub>M</sub>) (Ec. 18). La parte no encapsulada puede ser definida como la fracción que es fácilmente extraída con solventes orgánicos sin ruptura de la matriz sólida (Gallardo et al., 2013). Para obtener el CFT<sub>M</sub>, se desintegró 0.030 g de EUM y se disolvió en 25 ml de una solución hidroetanólica (48.44%) con un Ultra Turrax T25 Basic (IKA, Alemania) a 10000 rpm durante 1 minuto, luego se agregaron 20 ml de la misma solución hidroetanólica, se agitó durante 5 min y se filtró con papel Whatman n°2. Para obtener el CFS<sub>M</sub>, se usó el mismo procedimiento, pero a diferencia de desintegrar las microcápsulas, se lavaron por goteo con 45 ml de solución hidroetanólica durante 5 minutos (Davidov-Pardo et al., 2012a). Ambas soluciones filtradas fueron transferidas a fioles volumétricas y enrasadas a 50 ml con el objetivo de obtener los valores de CFT<sub>M</sub> y CFS<sub>M</sub> del extracto total y superficial por espectrofotometría UV- vis.

$$\% EM = 1 - \frac{CFT_M}{CFS_M} \quad (\text{Ec.18})$$

### 5.6.4. CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS EXTRACTOS

Se realizó la caracterización organoléptica de los extractos (EUL y EUM) considerado aspecto, color, olor y sabor, según la metodología de Inocente (2009).

### 5.6.5. ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS

Se realizó la evaluación de las partículas del EUL y EUM por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscopy*), donde, según Fazaeli et al. (2012), la imagen es formada paso a paso con el barrido de un haz de electrones a través de la muestra. Este análisis permitió detectar la posible agregación de las partículas, determinar su tamaño y visualizar su estructura.

Las muestras se fijaron por adhesión en una cinta especial de carbono, que les permitió ser conductoras, se colocaron en el portamuestras y se transfirió al microscopio electrónico modelo EVO MA 10 (ZEISS, Alemania), operado en modo de alto vacío de  $4 \times 10^{-6}$  mbar y a un voltaje de aceleración de electrones de 20 kV. Se obtuvieron microimágenes en un rango de aumento de 500 -

10000 veces utilizando el software SmartSEM V05.06.

La obtención del diámetro promedio se realizó solo para las partículas de EUM. Esto fue posible a través de la adquisición y análisis de imágenes por medio del programa ImageJ (software Fiji, USA) y el software de procesamiento Origin 9.0 (Electronic Arts, USA). Se usaron las imágenes obtenidas por SEM que tuvieron un aumento de 1000x alcanzándose un recuento de más de 1400 partículas.

#### 5.6.6. ANÁLISIS FENÓLICO Y ANTIOXIDANTE DE LAS MICROCÁPSULAS

Para los análisis fenólico y antioxidante, se preparó una concentración de EUM de tal forma que contenía teóricamente la misma concentración del EUL que se utilizó en la validación del modelo optimizado, con el objetivo de compararlos y evaluar el grado de degradación de los compuestos antioxidantes tras el proceso de secado por aspersión. El análisis fenólico se realizó mediante la determinación del CFT de las microcápsulas. Se pesó 20 mg de EUM y se disolvió en una solución hidroetanólica hasta 50 ml (400 ppm), luego se siguió la metodología empleada en la sección 5.5.3.2. El análisis antioxidante, se realizó mediante la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH. Se tomó 1 ml de la solución anterior y se mezcló con el mismo solvente hasta 10 ml, siendo la concentración final de la muestra igual a 40 ppm, luego se siguió la metodología empleada en la sección 5.5.3.3.2.

Cabe resaltar que los valores de CFT del EUL y EUM fueron transcritos en los resultados del día 0 en la **Sección 5.6.7** que corresponde al “análisis de la estabilidad fenólica de los extractos durante el almacenamiento”.

#### 5.6.7. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Los extractos, EUL y EUM, fueron almacenados en viales translúcidos a temperatura ambiente (25°C) por un periodo de 180 días. El análisis fenólico del EUL y EUM se realizó mediante el CFT (método de Folin-Ciocalteu) cada 45 días, siguiendo la misma metodología descrita en la sección 5.5.3.2.



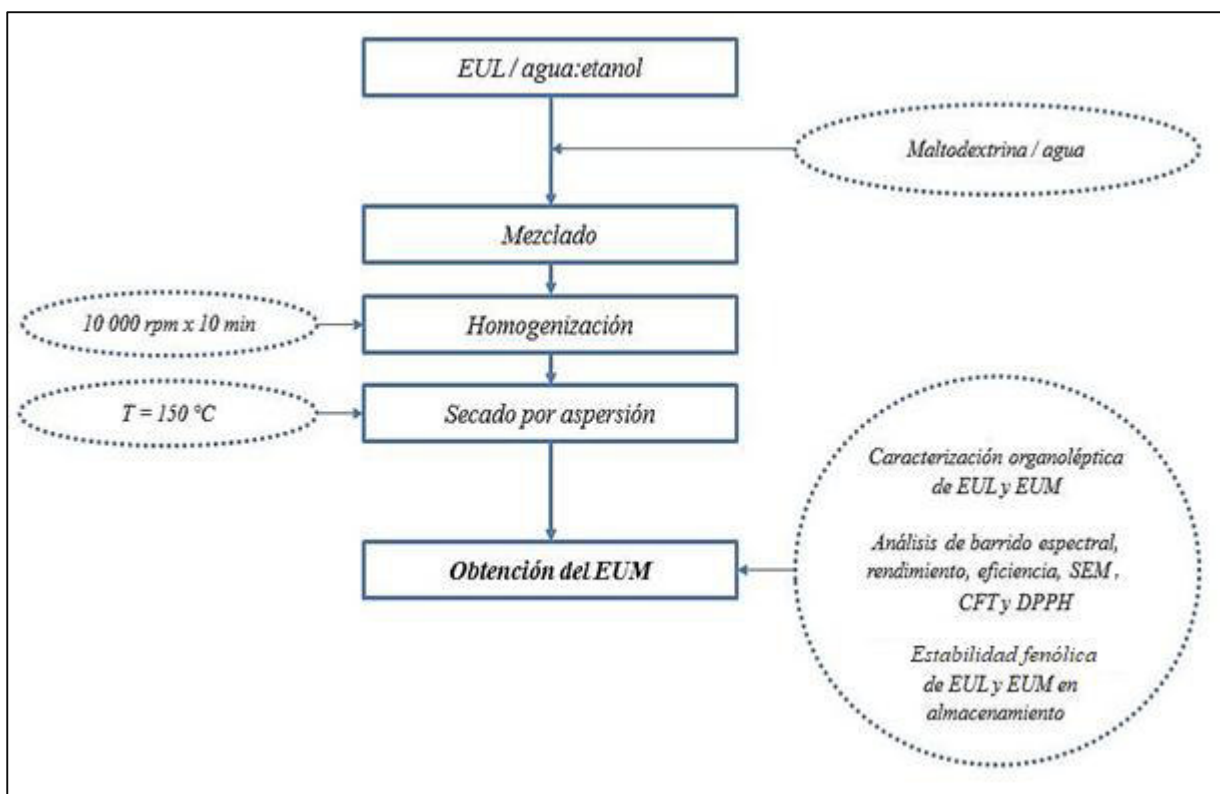


Figura 23. Flujo de operaciones para la obtención y análisis del extracto de semilla de unguurahui microencapsulado (EUM)

Fuente: Elaboración propia

## 5.7. ELABORACIÓN DE GALLETAS ENRIQUECIDAS CON EXTRACTOS DE SEMILLA DE UNGURAHUI

### 5.7.1. FORMULACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE LAS GALLETAS ENRIQUECIDAS

Se prepararon tres tratamientos de galleta: (1) galletas enriquecidas con EUL (G-EUL), (2) galletas enriquecidas con EUM (G-EUM) y (3) galletas control (G-C); es decir, sin la adición del EUL o EUM. La tabla 10 muestra los ingredientes que se utilizaron en la formulación de las galletas. Como se observa, se utilizó la misma formulación para todos los tratamientos, con la excepción de la cantidad de extracto añadido a cada galleta. El peso de cada galleta fue aproximadamente 7 y 6 g antes y después del horneado, respectivamente.

Tabla 10. Formulación de las galletas enriquecidas

<b>Ingredientes</b>	<b>G-C (g/batch)</b>	<b>G-EUL (g/batch)</b>	<b>G-EUM (g/batch)</b>
Harina	228.62	228.62	228.62
Azúcar	114.31	114.31	114.31
Mantequilla	114.31	114.31	114.31
Esencia de vainilla	3.59	3.59	3.59
Huevo	60.81	60.81	60.81
Bicarbonato de sodio	3.17	3.17	3.17
Sal	0.18	0.18	0.18
EUL	---	2.64	---
EUM	---	---	10.55*

(\*) La cantidad añadida de EUM corresponde aproximadamente a una cantidad similar de compuestos fenólicos presentes en los 2.64 g de EUL.

Fuente: Elaboración propia

### 5.7.2. PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS GALLETAS ENRIQUECIDAS

La preparación de las galletas, se derritió la mantequilla y se combinó con el azúcar, esencia de vainilla y huevo mediante el uso de una batidora (Oster, U.S.A) a velocidad media, hasta lograr una mezcla homogénea. Por otro lado, se cernió la harina de trigo junto con el EUL (previamente cernido) o el EUM, según corresponda, y se combinó con la mezcla anterior mediante el uso de una espátula de silicona. Se agregó bicarbonato de sodio y sal a la mezcla final y se continuó agitando manualmente hasta homogeneizar por completo todos los ingredientes. La masa obtenida se estiró con la ayuda de un rodillo y se cortó con la ayuda de un molde de acero, formando piezas circulares de 50 mm de diámetro. Estas piezas fueron cocidas en un horno modelo Moulinex (Moulinex Ltda.,

Francia) durante 8 minutos a 180°C. Las galletas horneadas se enfriaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se almacenaron en frascos de vidrio con tapa hermética para evitar el ingreso de humedad, y forrados con papel aluminio para evitar el ingreso de luz.

### 5.7.3. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD

#### 5.7.3.1. Análisis de CFT de las galletas

La evaluación de la estabilidad de los compuestos fenólicos en las muestras de galleta antes y después del horneado, se realizó mediante el análisis de CFT. Se siguió la metodología descrita por Davidov-Pardo et al. (2012b), con ligeras modificaciones. Las galletas fueron previamente desengrasadas antes de medir el CFT para evitar cualquier interferencia en las mediciones por la presencia de lípidos. De cada tratamiento, se tomaron dos muestras de 2.50 g de galleta cruda. La primera muestra —G-EUL y G-EUM crudas— fueron desengrasadas directamente, mientras que la segunda muestra —G-C, G-EUL y G-EUM crudas— fueron horneadas (con un peso final de 2.14 g) y molidas para luego ser sometidas al mismo proceso de desengrasado. Cada muestra a ser desengrasada se colocó dentro de un cartucho de papel filtro y se desengrasó con 150 ml de éter de petróleo (40-60°C de ebullición) en un equipo Soxhlet hasta la tercera sifonada, que permitió obtener éter sin arrastre de grasa en el tubo extractor. Al terminar el proceso, se retiraron las muestras y se dejaron secar durante la noche.

Para la determinación del CFT, las muestras secas y desengrasadas se sometieron al proceso de extracción por ultrasonido con 120 ml de metanol al 95% por 15 min. El extracto se centrifugó a 4000 rpm, se filtró y el sobrenadante fue utilizado para realizar el ensayo Folin-Ciocalteu según lo descrito en la sección 5.5.3.2. Para fines de cálculo, los resultados se expresaron en mg EAG/paquete, considerando que un paquete de galletas contiene 10 unidades ( $\approx 60$  g).

#### 5.7.3.2. Medición del color de las galletas

La medida del color de las muestras se determinó mediante la metodología del sistema CIELAB (León, Mery, Pedreschi y León, 2006). Se utilizaron los siguientes instrumentos: una cámara digital Canon EOS Digital Rebel XS con 10 megapíxeles de resolución que fue colocada de forma vertical a 30 cm de distancia de las muestras, una cartulina negra como fondo y dos focos ahorradores de 9W como fuentes de iluminación. El ángulo entre el eje del lente y los focos fue de 45 grados. Una vez obtenidas las fotos, se seleccionó la parte central de cada muestra, la cual fue analizada en el programa Paint con el objetivo de obtener los valores R, G y B. Se realizó la transformación del

modelo RGB255 al sistema CIE L\*a\*b\* mediante el programa EasyRGB, donde la coordenada L\* representa luminosidad; la coordenada a\*, enrojecimiento; y la coordenada b\*, amarillez. Cada muestra se analizó por triplicado para obtener un valor colorimétrico promedio.

#### 5.7.3.3. Análisis químico proximal de las galletas

La composición proximal (humedad, proteínas, grasas y cenizas) de las muestras (G-C, G-EUL y G-EUM) horneadas se analizó de acuerdo con los procedimientos de la AOAC. El contenido de humedad se realizó utilizando el analizador de humedad; el contenido de proteína cruda ( $N \times 6.25$ ) se estimó mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 1995); el contenido de grasa se determinó mediante extracción con éter de petróleo en un equipo Soxhlet (AOAC, 2000); el contenido de cenizas se determinó mediante incineración a  $525 \pm 25^\circ\text{C}$  (AOAC, 2005) y los carbohidratos totales se calcularon por diferencia. La energía total se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Energía (kcal)} = 4 \times (\text{g de proteínas} + \text{g de carbohidratos}) + 9 \times (\text{g lípidos}) \quad (\text{Ec. 19})$$

#### 5.7.3.4. Análisis sensorial de las galletas

Las muestras fueron evaluadas 12 horas después de haber sido horneadas. Para evitar la ganancia de humedad y preservar los atributos sensoriales en las muestras durante el transporte, se colocaron en frascos de vidrio forrados con papel film y sellados herméticamente. En la primera etapa de la evaluación, 56 estudiantes de la E.A.P de Ingeniería Agroindustrial de la UNMSM entre 17 y 25 años fueron interrogados sobre la frecuencia semanal con que consumían galleta y el tipo de galleta que usualmente preferían, con el objetivo de seleccionar aquellos cuya frecuencia de consumo de galleta era de al menos una vez por semana y que presentaran preferencia por las galletas dulces. Se seleccionó a 30 estudiantes que cumplían con ambos requisitos para la segunda etapa de la evaluación.

En la segunda etapa, se explicó el procedimiento de evaluación sensorial a los panelistas y se aclararon las dudas surgidas antes de iniciar la prueba. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), en que las galletas se sirvieron en platos de poliestireno expandido, y fueron codificadas con números aleatorios de 3 dígitos: 385 (G-C), 609 (G-EUL) y 217 (G-EUM). El tamaño de la muestra fue una unidad entera de galleta y los panelistas bebieron agua al pasar de una muestra a otra. La prueba se realizó en un salón, bajo luz blanca, a temperatura ambiente y con ventilación.

Los panelistas evaluaron los atributos sensoriales como olor, sabor, textura, color y apariencia en cada una de las muestras mediante una escala lineal no estructurada de 10 cm, acotada en sus extremos inicial y final con los términos “me disgusta mucho” y “me gusta mucho”, respectivamente; asimismo, evaluaron la aceptabilidad global de las muestras mediante una escala hedónica de nueve puntos, desde la categoría “me disgusta extremadamente” hasta “me gusta extremadamente” (Handa, Goomer y Siddhu, 2011). En ambas escalas se les permitió asignar el mismo valor a más de una muestra. El porcentaje de aceptabilidad de la galleta fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Aceptabilidad} = \frac{N}{N_o} \times 100 \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde:

N = número de personas que prefirieron la galleta “X”.

No= número total de personas encuestadas.

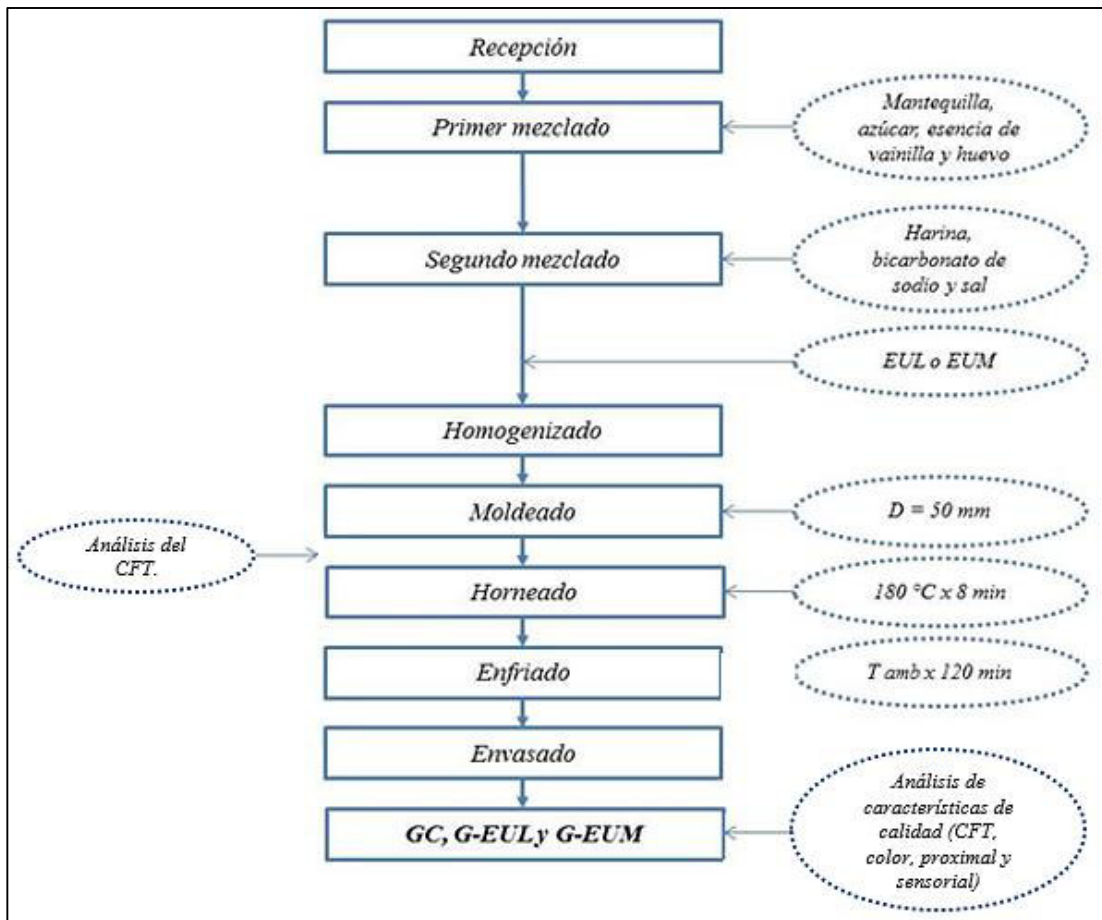


Figura 24. Flujo de operaciones para la obtención y análisis de las galletas enriquecidas

Fuente: Elaboración propia

## 5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos y medidas analíticas se llevaron a cabo al menos por duplicado y se reportaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (Microsoft Excel 2016, Microsoft). El análisis de regresión múltiple de los datos de optimización, según la MSR, se realizó usando el software “Design Expert” (Versión 10.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE. UU), el cual permitió obtener las gráficas de Superficie de Respuesta, de correlación y de deseabilidad. Las gráficas de Pareto se obtuvieron a partir del software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia). La diferencia significativa entre las medias de cada tratamiento fue comparada mediante la prueba de Tukey (Minitab Inc., State College, EE. UU) con un nivel de significancia de 0.05. La correlación de Pearson se utilizó para determinar las asociaciones entre el CFT y la capacidad antioxidante de los extractos. Para la lectura de los análisis espectrofotométricos, se utilizó los softwares “VISIONlite™ - Quant Application” y “VISIONpro™” (Thermo Fisher Scientific Inc., Überlingen, Alemania). Para los análisis realizados a las galletas enriquecidas, se utilizó un Diseño Completamente al Azar, los valores fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ) y la diferencia significativa entre las medias de cada tratamiento fueron comparadas mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. ENSAYOS PRELIMINARES

#### 6.1.1. DETERMINACIÓN DE pH

El pH del extracto hidroetanólico de semilla de ungurahui fue  $6.39 \pm 0.02$ . Según Mylonaki, Kiassos, Makris y Kefalas (2008), los compuestos bioactivos son bastante estables a pH 6.0, el cual les permite aumentar su solubilidad en medios polares debido a la disociación de los grupos -OH de los ácidos fenólicos. El pH aproximadamente neutro del extracto evita la rápida degradación oxidativa de los compuestos fenólicos, a diferencia de que si estuvieran en un  $\text{pH} > 7$  debido a la sensibilidad de estos compuestos en medios alcalinos (Pasrija et al., 2015; Boza et al., 2000 citado en Reyes-Jurado, Palou y López-Malo, 2014; Garzón, 2008).

#### 6.1.2. MARCHA DE SOLUBILIDAD

Los resultados de la marcha de solubilidad (Tabla 11) muestran que el extracto hidroetanólico de semilla de ungurahui es soluble en solventes de alta y mediana polaridad, como el agua, metanol y etanol, deduciendo que sus metabolitos secundarios también presentan dichas polaridades. Diferentes autores como Rojas-Llanes, Martínez y Stashenko (2014) y Fernández-Agulló et al. (2013) obtuvieron un mayor contenido de compuestos fenólicos utilizando una mezcla de solventes polares. Esto puede atribuirse a varios factores como la constante dieléctrica y estructura química de los solventes, y la estructura molecular de los metabolitos presentes en los extractos, que contienen partes polares y no polares, cuya proporción los hace selectivamente extraíbles por determinada mezcla de solventes (Dorta, 2014).

Tabla 11. Marcha de solubilidad del extracto hidroetanólico de semilla de unguurahui

<b>Solvente</b>	<b>Solubilidad</b>
Éter de Petróleo	-
Hexano	-
Cloroformo	-
Acetona	-
Etanol	++
Metanol	+++
Agua	+

(-): insoluble, (+): poco soluble, (++): soluble, (+++): muy soluble.

Fuente: Elaboración propia

### 6.1.3. MARCHA FITOQUÍMICA

Los resultados obtenidos en el estudio de los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroetanólico se muestran en la Tabla 12. El análisis fitoquímico reveló la marcada presencia de compuestos fenólicos como flavonoides (proantocianidinas y flavonoles) y taninos, a los cuales se les han atribuido propiedades antioxidantes (Rice-Evans, Miller y Paganga, 1996; Martínez-Navarrete et al., 2008), antiinflamatorias (Halliwell, 2001; Marquardt y Watson, 2014; Mendes, 2014) y anticancerígenas (Hertog, Hollman, Katan y Kromhout., 1993; Andrade y Fasolo, 2014) a lo largo de los años. Estos compuestos fenólicos generalmente se encuentran en forma de glicósidos, tal como señala Torres (2018). Probablemente por este motivo, la prueba de azúcares reductores en el extracto dio positivo. También se observó la leve presencia de triterpenos, terpenoides y saponina, que según Aparecida (2014) y Mendes (2014), contribuyen a la actividad antiinflamatoria de muchas plantas. Por otro lado, hubo ausencia de alcaloides, glucósidos cianogénicos y antraquinona, lo cual es favorable si el extracto va a ser aplicado posteriormente a una matriz alimentaria o presenta algún fin alimentario, ya que, se especula que estos metabolitos pueden ser tóxicos para los humanos (Carretero, 2000 citado en Robles-García et al., 2016; Sánchez y Santa, 2009; Elizalde, Porrilla y Chaparro, 2009). Cabe mencionar que en la literatura no figura ningún análisis cualitativo realizado a la semilla de unguurahui previamente a este estudio.



Tabla 12. Marcha fitoquímica del extracto hidroetanólico de semilla de unguurahui

<b>Prueba</b>	<b>Reacción típica</b>	<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Resultado</b>
Molish	Anillo violeta en la interfase	Azúcares no reductores	-
Fehling	Precipitado rojo ladrillo	Azúcares reductores	++
FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde oscuro	Taninos condensables (proantocianidinas)	+++
Gelatina	Precipitado blanco lechoso	Taninos	++
Shinoda	Coloración roja a salmón	Flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanonoles y flavanonas)	++
Hidróxido de sodio al 10%	Coloración café -naranja	Flavonoides (flavonoles)	+++
Rosenheim	Precipitado rojo pardo	Leucoantocianidinas	++
Lieberman- Burchard	Coloración pardo anaranjado	Triterpenos	+
Salkowski	Coloración marrón rojiza	Terpenoides	+
Ninhidrina	Coloración violeta	Aminoácidos libres	-
Dragendorff	Precipitado naranja	Alcaloides	-
Mayer	Precipitado blanco	Alcaloides	-
Bertrand	Precipitado blanco lechoso	Alcaloides	-
Sonnenschein	Precipitado verde azulado	Alcaloides	-
Saponinas	Formación de espuma	Saponinas	+
Grignard	Coloración rosa o roja	Glicósidos cianogénicos	-
Hidróxido de amonio	Coloración roja	Glicósidos de antraquinona	-

(-): ausencia de fitoquímicos, (+): cambio de color/precipitado leve, (++) : cambio de color/precipitado moderado, (+++): cambio de color/precipitado intenso.

Fuente: Elaboración propia

En el análisis del fruto de unguurahui, la presencia de flavonoides y taninos fue corroborada por Hidalgo et al. (2016) que cuantificaron altos valores de fenoles y con ello, alta actividad antioxidante en la semilla, indicando que estos extractos son normalmente ricos en taninos, que son los responsables en su mayoría de la elevada capacidad antioxidante. Asimismo, triterpenos, flavonoides y taninos fueron encontrados en el extracto etanólico de una mezcla de semilla y pulpa del fruto de unguurahui realizado por Pires y Lima (2017), que a su vez reportaron la ausencia de saponina. Aunque en este análisis se tuvo un resultado positivo para saponina, en la literatura no se encuentra evidencia de la presencia de este metabolito en otras semillas de la misma familia o género.

En el género *Oenocarpus*, el fruto del bacaba fue estudiado por Pina, Silva, Miranda y Almeida (2017), que reportaron la presencia de flavonoides y triterpenos libres. Sin embargo, según Carvajal, Hata, Sierra y Rueda (2009), la presencia de un tipo de metabolito en una planta no condiciona su presencia en otras especies del mismo género. Por otro lado, Marinho (2017) reportó la presencia de fenoles y flavonoides en la semilla de dos especies de açai, en la familia *Arecaceae*.

## **6.2. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

### **6.2.1. ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN**

Para la elección de las condiciones de extracción (factores) y del establecimiento de sus niveles, se hizo una exhaustiva revisión bibliográfica sobre extracciones realizadas a la palmera del unguurahui o a otras plantas similares, debido a que no se encontró antecedentes de extracción aplicados a la semilla del fruto en estudio.

Estudios previos relacionados con la extracción de compuestos fenólicos del unguurahui reportaron que una mezcla de acetona/agua 70/30 % (v/v) fue el mejor solvente para extraer especialmente elagitaninos y proantocianidinas de alto peso molecular en la pulpa del fruto (Rezaire et al., 2014), así como mezclas de acetona/agua 70/30 % (v/v) y metanol/agua 70/30 % (v/v) permitieron alcanzar los valores más altos de fenoles totales en hojas y raíces de esta palmera (Leba et al., 2016).

En fitoterapia se recomienda macerar las plantas en soluciones hidroetanólicas a concentraciones de 30% (Hoffman, 1996 citado en Soto-García y Rosales-Castro, 2016), o 70% (Sosa, 1997) por ser un procedimiento de extracción seguro y eficiente, debido a que el etanol es considerado como solvente GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) (Fernández-Agulló et al., 2013; Xavier, Freire,

Vidal-Tato y González-Álvarez, 2015). A pesar de que en la literatura se han usado diversos solventes que incluyen metanol, éter etílico, acetato de etilo y etanol para la extracción de compuestos de interés de fuentes vegetales, el etanol es especialmente adecuado para su uso en procesos alimentarios (Bonilla et al., 1999).

Al estudiar la capacidad extractiva del etanol puro y de la mezcla etanol-agua en distintas proporciones, Giannuzzo, Nazareno, Mishima y López de Mishima (2000), encontraron que la mezcla etanol-agua en las proporciones 70:30 y 60:40 % (v/v) permitieron obtener las mayores concentraciones del flavonoide *naringina* debido a que la alta polaridad del agua permite mayor penetración del solvente a las membranas de las células, logrando una mayor eficiencia de extracción. Por otra parte, Fernández-Agulló et al. (2013) obtuvieron los valores más altos de actividad antioxidante y contenido fenólico al utilizar agua-etanol como solvente de extracción en la proporción 50:50 % (v/v) concluyendo que las mezclas de etanol y agua fueron más eficientes en la extracción de compuestos bioactivos que los sistemas mono-solventes. Por ende, es más conveniente utilizar como solvente una mezcla de agua y etanol para la obtención de extractos naturales con altas concentraciones de compuestos bioactivos.

La duración del tiempo también influye en la extracción de compuestos bioactivos; por esto, varios autores evaluaron el efecto de diferentes rangos de tiempo sobre el proceso de extracción (Yilmaz y Toledo, 2006; Spigno, Tramelli y De Faveri, 2007; González- Montelongo et al., 2009; Lapornik et al., 2005; Moreno, 2013). Tiempos largos de extracción por ultrasonido pueden producir una recuperación menor del compuesto bioactivo, lo que podría explicarse por reacciones entre los radicales generados por el ultrasonido y el compuesto bioactivo (Soria y Villamiel, 2010).

Por lo tanto, en base a la literatura revisada y según los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se fijaron los niveles para los factores de la extracción por ultrasonido, es decir, concentración de etanol entre 50 a 90 % y tiempo de extracción entre 15 a 45 minutos. La relación sólido: líquido y la temperatura de extracción se mantuvieron constantes a 1:30 (p/v) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

### **6.3. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

#### **6.3.1. AJUSTE DE LOS MODELOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA**

Se usó la MSR para realizar la optimización de la extracción de compuestos fenólicos de la semilla

de unguurahui. Se utilizó uno de los diseños más importantes de esta metodología, el Diseño Central Compuesto Ortogonal (DCCO), con el que se pudo determinar el efecto de la concentración de etanol y tiempo de extracción sobre las variables de respuesta: rendimiento de extracción (RE), contenido fenólico total (CFT) y capacidad antioxidante por CAT y DPPH. La Tabla 13 muestra los resultados experimentales aplicando el DCCO.

Tabla 13. Rendimiento de la extracción, contenido fenólico total y capacidad antioxidante de los extractos de semilla de unguurahui (EU) aplicando el DCCO

<b>EtOH (%)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>RE (%)</b>	<b>CFT (mg EAG/g)</b>	<b>CAT (mg EAA/g)</b>	<b>DPPH (% Inhibición)</b>
48.4382	30	24.82±0.05 <sup>AB</sup>	433.22±25.17 <sup>AB</sup>	1807.21±135.54 <sup>AB</sup>	74.23±1.10 <sup>AB</sup>
50	15	24.45±0.41 <sup>ABC</sup>	456.25±1.53 <sup>A</sup>	1947.83±101.69 <sup>A</sup>	76.35±2.83 <sup>A</sup>
50	45	25.17±0.45 <sup>A</sup>	412.88±8.36 <sup>BC</sup>	1692.75±129.73 <sup>BC</sup>	72.25±0.07 <sup>BC</sup>
70	13.8287	23.76±0.21 <sup>CD</sup>	446.82±5.36 <sup>A</sup>	1847.09±126.14 <sup>AB</sup>	74.85±1.27 <sup>AB</sup>
70	30	23.98±0.55 <sup>CD</sup>	415.92±0.84 <sup>BC</sup>	1737.76±36.99 <sup>BC</sup>	74.18±0.25 <sup>AB</sup>
70	30	24.17±0.44 <sup>BC</sup>	414.35±0.00 <sup>BC</sup>	1737.65±57.90 <sup>BC</sup>	72.43±1.11 <sup>BC</sup>
70	46.1713	24.22±0.48 <sup>BC</sup>	407.85±2.19 <sup>C</sup>	1457.94±90.25 <sup>DE</sup>	73.19±0.48 <sup>BC</sup>
90	15	22.78±0.21 <sup>E</sup>	410.12±15.29 <sup>C</sup>	1594.20±99.56 <sup>CD</sup>	71.64±2.17 <sup>C</sup>
90	45	23.31±0.53 <sup>DE</sup>	405.71±2.08 <sup>C</sup>	1401.64±48.67 <sup>E</sup>	65.77±1.21 <sup>D</sup>
91.5618	30	22.63±0.69 <sup>E</sup>	393.94±2.08 <sup>C</sup>	1378.26±92.23 <sup>E</sup>	65.13±0.34 <sup>D</sup>

Los valores están expresados como media ± desviación estándar. Las medias que no comparten una misma letra dentro de cada columna son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los valores son expresados en base seca. EtOH: etanol, RE: rendimiento de extracción, CFT: contenido fenólico total, CAT: capacidad antioxidante total, DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo. mg EAG/g: mg equivalente de ácido gálico por g de EU, mg EAA/g: mg equivalente de ácido ascórbico por g de EU.

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 14, se muestran los resultados del análisis de regresión múltiple de los modelos polinomiales obtenidos para las cuatro variables de respuesta bajo diferentes condiciones de concentración de etanol ( $X_1$ ) y tiempo de extracción ( $X_2$ ), siendo evaluados términos lineales ( $X_1$ ,  $X_2$ ), de interacción ( $X_1 * X_2$ ) y cuadráticos ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ). Se eligió un modelo lineal para el rendimiento ( $Y_1$ ) y CAT ( $Y_3$ ), mientras que, se eligió un modelo cuadrático para el CFT ( $Y_2$ ) y DPPH ( $Y_4$ ). La elección de cada modelo polinomial fue el resultado de analizar el coeficiente de determinación, falta de ajuste, coeficiente de varianza y precisión adecuada del análisis de regresión de todos los modelos polinomiales inicialmente ofrecidos por el software para cada variable de respuesta.

Tabla 14. Análisis de regresión múltiple de los modelos polinomiales de las variables de respuesta

	$Y_1$		$Y_2$		$Y_3$		$Y_4$	
Fuente	Coefficiente Estimado	valor-p	Coefficiente Estimado	valor-p	Coefficiente Estimado	valor-p	Coefficiente Estimado	valor-p
<i>Intercepto</i>	23.93	-	416.02	-	1660.23	-	73.10	-
<i>Lineal</i>								
$X_1$ - EtOH	-0.93	< 0.0001	-15.12	0.0016	-175.06	0.0003	-3.32	0.0054
$X_2$ - tiempo	0.28	0.0046	-14.20	0.0020	-137.11	0.0013	-1.86	0.0372
<i>Interacción</i>								
$X_1 * X_2$	-	-	9.74	0.0173	-	-	-0.44	0.5921
<i>Cuadrático</i>								
$X_1^2$	-	-	-3.00	0.3780	-	-	-2.74	0.0417
$X_2^2$	-	-	8.83	0.0434	-	-	1.00	0.3423
Modelo	-	< 0.0001	-	0.0035	-	0.0002	-	0.0224
<i>LOF</i>	-	0.5292	-	0.1417	-	0.0008	-	0.5030
$R^2$	0.9674		0.9712		0.9092		0.9256	
$R^2$ ajust.	0.9581		0.9351		0.8833		0.8327	
<i>CV (%)</i>	0.71		1.19		4.02		2.11	
<i>PA</i>	26.025		16.777		17.067		8.929	

$X_1$ : concentración de etanol;  $X_2$ : tiempo de extracción;  $Y_1$ : rendimiento (%);  $Y_2$ : CFT (mg EAG/g);  $Y_3$ : CAT (mg EAA/g);  $Y_4$ : DPPH (%). LOF: falta de ajuste; CV: coeficiente de variación; PA: precisión adecuada.

Fuente: Elaboración propia

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que mide el grado de fiabilidad del ajuste del modelo a un grupo de datos (Martínez, 2005), debe ser al menos 0.8 (Joglekar y May, 1987 citado en Saikia, Mahnot y Mahanta, 2015; Binti, 2012). En este caso, se obtuvieron valores de  $R^2$  iguales a 0.9674, 0.9712, 0.9092 y 0.9250 para los modelos  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$ , respectivamente. Cuando  $R^2$  es mayor que 0.9 y cercano a 1 indica una correlación satisfactoria entre los valores pronosticados (estimados) y experimentales (observados) (Haaland, 1989 citado en Ramanjaneyulu y Rajasekhar, 2016), como ocurre en el presente estudio, donde los valores pronosticados y experimentales se encuentran distribuidos homogéneamente y muy cerca uno del otro, alrededor de la línea de ajuste (Figura 25).

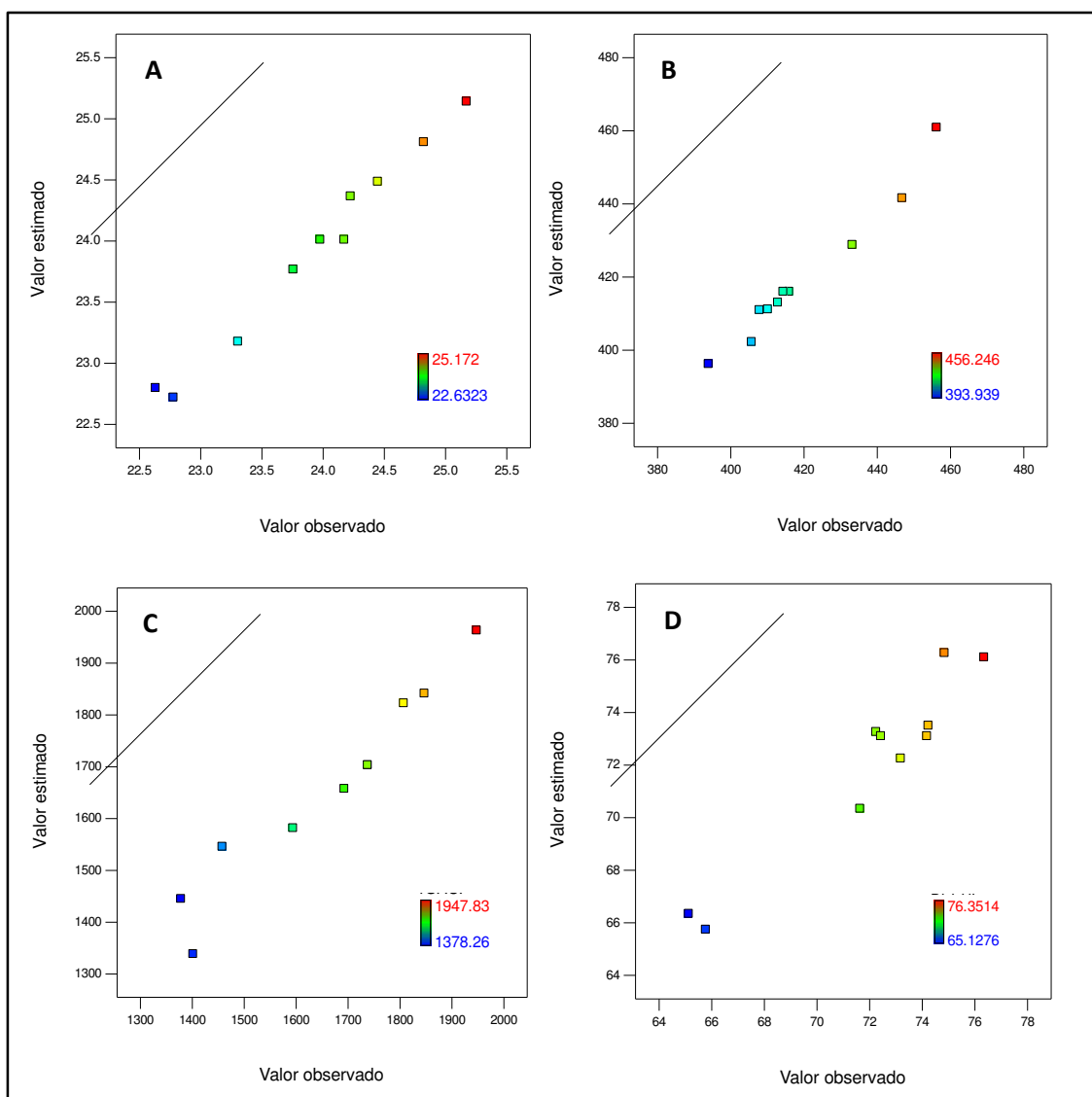


Figura 25. Correlación entre los valores estimados y observados de las variables de respuesta: A) Rendimiento (%); B) CFT (mg EAG/g); C) CAT (mg EAA/g); D) DPPH (%)

Fuente: Elaboración propia

La falta de ajuste (LOF por sus siglas en inglés, *lack of fit*) permitió determinar si los modelos se ajustaban a los datos experimentales con exactitud. Un valor de  $p > 0.05$  permite deducir que un modelo posee un buen ajuste de datos y que es capaz de predecir la respuesta (Moreno, 2013). La falta de ajuste correspondiente a los modelos de  $Y_1$ ,  $Y_2$  y  $Y_4$  fue no significativa ( $p > 0.05$ ); sin embargo, el modelo de  $Y_3$  mostró una notoria falta de ajuste ( $p < 0.05$ ) que produjo varios residuos inusualmente grandes.

La precisión adecuada (P.A) mide la relación señal-ruido y siempre se espera que su valor sea mayor que 4 para poder predecir las respuestas dentro de un determinado diseño. En este caso, se obtuvieron valores de 26.168, 16.781, 17.067 y 8.924 para los modelos de  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$ , respectivamente, que indican una adecuada señal.

El coeficiente de variación (C.V %) mide la dispersión de los datos con relación a la media. En este caso, se obtuvieron C.V. bastante bajos. Los valores de C.V menores al 5% indican homogeneidad (Rustom, 2012), precisión y fiabilidad de los experimentos (Ramanjaneyulu y Rajasekhar, 2016).

### 6.3.2. ANÁLISIS DE LOS MODELOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Mediante el análisis de regresión múltiple realizado a los datos experimentales, los factores de concentración de etanol ( $X_1$ ) y tiempo de extracción ( $X_2$ ) fueron relacionados con las variables de respuesta a través de ecuaciones predictivas de primer orden para el rendimiento ( $Y_1$ ) y CAT ( $Y_3$ ), y de segundo orden para CFT ( $Y_2$ ) y DPPH ( $Y_4$ ).

#### 6.3.2.1. Rendimiento de extracción

Experimentalmente, el rendimiento máximo de extracción (25.17 %) se logró con 50 % de etanol y 45 minutos de sonicación (Tabla 13), valores superiores a lo expuesto por Rezaire et al. (2014), quienes obtuvieron 10.5% de rendimiento de extracción a partir de la pulpa de ungurahui, utilizando una mezcla de acetona/agua 70:30 % (v/v) como solvente. Se cree que la mayor presencia de agua reduce la viscosidad de la mezcla, por lo que se mejora la transferencia de masa (Hemwimol et al., 2006).

La Tabla 14 muestra los coeficientes de regresión estimados para el rendimiento. Los términos lineales afectaron significativamente ( $p < 0.05$ ). El tiempo de extracción tuvo un efecto positivo sobre la respuesta, a diferencia de la concentración de etanol, que presentó un efecto negativo. Los coeficientes de regresión del modelo fueron utilizados para formar la siguiente ecuación:

$$Y_1 = + 23.93 - 0.93*X_1 + 0.28*X_2 \quad (\text{Ec. 21})$$

A partir de la ecuación, se construyó la gráfica de superficie 3D que muestra el efecto de los factores sobre el rendimiento de extracción (Figura 26). Se observa un mayor rendimiento cuando el solvente presenta 48.44% de etanol. Según lo reportado por Cacace y Mazza (2003), el rendimiento de la extracción está primordialmente afectado por la polaridad del tipo de solvente utilizado. El agua en el solvente genera hinchazón del material vegetal, lo que aumenta el contacto entre soluto-solvente y la transferencia de masa (Li, Pordesimo y Weiss, 2004). Por lo tanto, se infiere que el rendimiento es dependiente de la relación que guarda el solvente con el soluto en función de sus polaridades, habiendo una mayor afinidad entre ellos al utilizar menor cantidad de etanol.

La relación positiva del tiempo con el rendimiento de extracción alcanzó su máximo valor con 46.17 minutos (Figura 26). Este comportamiento concuerda con lo reportado por otros autores (González-Montelongo et al., 2010; Yang y Zhang, 2008; Zou, Wang, Gan y Ling, 2011) que obtuvieron rendimientos máximos de extracción cuando sonicaron por tiempos prolongados. Las ondas acústicas del ultrasonido inducen la cavitación (colapso de burbujas en la solución), y con ello, ruptura de la pared celular del soluto y transferencia de masa hacia el solvente mientras la solución se mantiene en sonicación (Annegowda, Bhat, Min-Tze, Karim y Mansor, 2011). Por ello, se concluye que se obtiene mayor liberación de compuestos con el pasar del tiempo.

Robles-García et al. (2016) señalaron que la comparación del rendimiento de una planta con otra se torna difícil dado que los rendimientos de las plantas dependen no solo de las condiciones de extracción, sino también de su composición, lugar de desarrollo y parte de la planta en estudio. No obstante, existen plantas que han presentado rendimientos máximos similares al unguirahui con el común denominador que también fueron semillas sometidas a una optimización de EAU con solventes mixtos; por ejemplo, *Vitis vinifera L.* (29.44%), *Trigonella foenum-graecum L.* (27.62%) (Al-Juhaimi, Adiamo, Ghafoor y Babiker, 2015) y *Persea americana Mill* (22.56%) (Arlene, Prima, Utama y Anggraini, 2015).



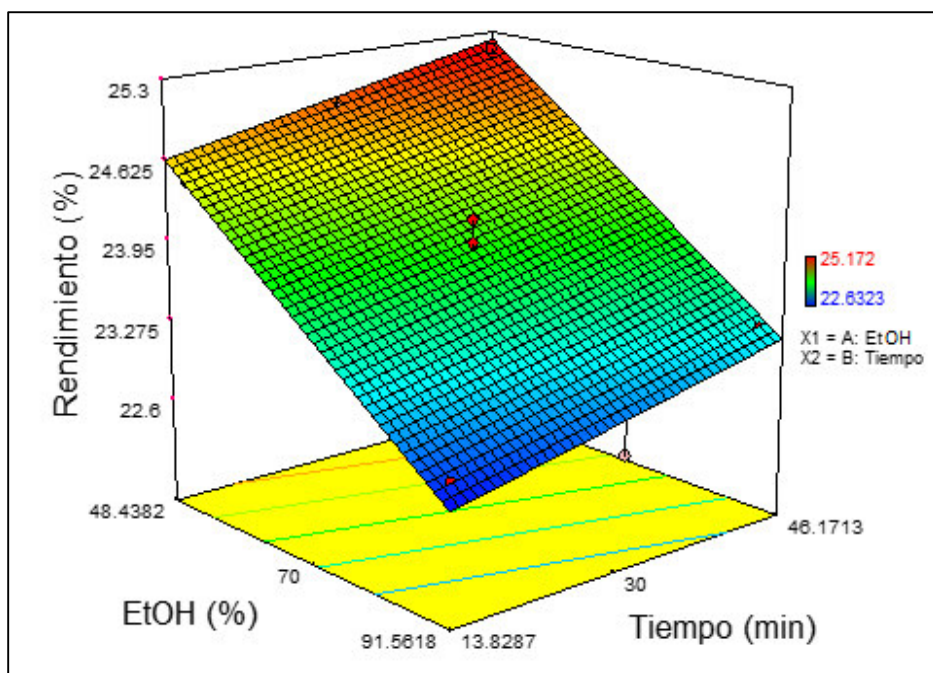


Figura 26. Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol ( $X_1$ , %) y tiempo de extracción ( $X_2$ , min) sobre el rendimiento de extracción

Fuente: Elaboración propia

### 6.3.2.2. Contenido fenólico total

Experimentalmente, el CFT máximo (456.25 mg EAG/g) se obtuvo con 50% de etanol y 15 minutos de extracción (Tabla 13) y fue relativamente alto en comparación con otros estudios bajo condiciones similares de extracción, en los que se obtuvieron 153.06 mg EAG/g en semilla de *Vitis vinifera* (Andjelković et al., 2014) y 142.0 mg EAG/g en el fruto de *Averrhoa carambola* (Annegowda et al., 2011).

La Tabla 14 muestra los coeficientes de regresión estimados para el CFT. Los términos lineales tuvieron un efecto negativo significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el CFT, mientras que, el término de interacción lineal presentó un efecto positivo significativo ( $p < 0.05$ ). Con relación a los términos cuadráticos, solo el tiempo de extracción tuvo un efecto positivo ( $p < 0.05$ ). Los coeficientes de regresión del modelo fueron utilizados para formar la siguiente ecuación:

$$Y_2 = + 416.02 - 15.12 * X_1 - 14.20 * X_2 + 9.74 * X_1 * X_2 - 3.00 * X_1^2 + 8.83 * X_2^2 \quad (\text{Ec. 22})$$

El efecto de los factores sobre el CFT se muestra en la Figura 27. Inicialmente, el CFT alcanza su valor máximo con 48.44% de etanol y después disminuye progresivamente con el aumento de la

concentración. Un principio general en la extracción con solventes es "lo semejante disuelve lo semejante", es decir, los solventes solo extraen aquellos fitoquímicos que tienen polaridad similar a ellos (Zhang et al., 2007). Por lo tanto, la relación negativa entre la concentración de etanol y el CFT ocurre por el descenso de la polaridad del solvente conforme se le adiciona mayor cantidad de etanol.

El CFT alcanzó su valor máximo con 13.83 minutos y luego disminuyó con el incremento del tiempo. Según Tao, Wu, Zhang y Sun (2014), dentro de los primeros 10 minutos de EAU se lleva a cabo la mayor disolución de los componentes de la superficie de la matriz y es en este periodo que se puede lograr extraer hasta más del 90% de compuestos fenólicos, lo que indica una tasa de extracción considerablemente rápida. Por lo tanto, se deduce que la mayoría de los compuestos fenólicos del extracto se ubicaban en la zona superficial y en otros lugares de fácil acceso de la matriz, lo que les permitió disolverse en el solvente rápidamente. Sin embargo, mayores tiempos de sonicación fueron perjudiciales para el CFT. Se cree que una extracción dilatada causa deterioro por oxidación de compuestos fenólicos al estar expuestos a la luz y el oxígeno (Chew et al., 2011; Kumar y Sharma, 2016) y también puede originar que los polifenoles se polimericen dando lugar a nuevos compuestos (Gimeno, 2015).

La disminución del CFT, conforme aumenta el tiempo de extracción, generó su valor más bajo en torno a los 30 minutos (en la zona azul de la Figura 27), que corresponde a una extracción con una concentración de etanol bastante alta, sin embargo, a medida que el tiempo continúa aumentando, el CFT no aumenta de forma significativa ( $p > 0.05$ ). Este comportamiento puede ser explicado a causa de la liberación de impurezas del material vegetal hacia el solvente durante la extracción ultrasónica prolongada que pueden afectar la permeabilidad del solvente de extracción (Dong, Liu, Liang y Wang, 2010).

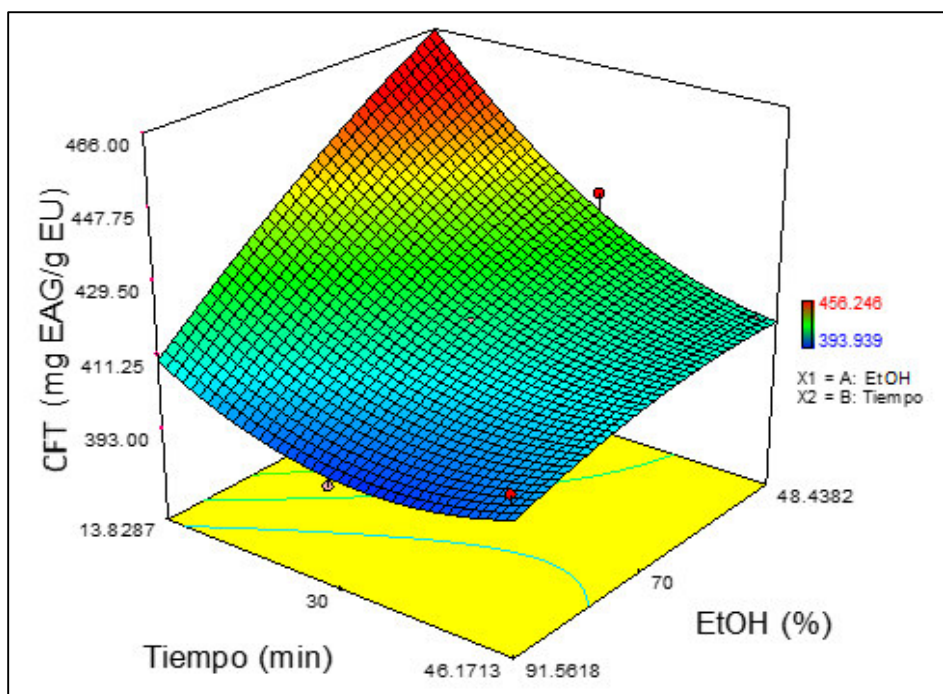


Figura 27. Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol ( $X_1$ , %) y tiempo de extracción ( $X_2$ , min) sobre el contenido fenólico total

Fuente: Elaboración propia

### 6.3.2.3. Método de la capacidad antioxidante total (CAT) o del fosfomolibdeno

Experimentalmente, el valor máximo de CAT (1947.83 mg EAA/g) se obtuvo con 50 % de etanol y 15 minutos de extracción (Tabla 13), que fue equivalente a 240% de actividad antioxidante relativa (AAR) con respecto al ácido ascórbico, es decir, el extracto de semilla de ungrahui a esas condiciones de extracción, posee una capacidad antioxidante 2.4 veces superior al ácido ascórbico (Anexo XII). Su capacidad antioxidante es mayor en comparación con otros estudios de diferentes extractos vegetales, como el el fruto y hoja de *Pittosporum pentandrum* que poseían 21.97 y 11.10 mg EAA/g, respectivamente (Montes De Oca, 2014); *Colocasia esculenta*, 68.54 mg EAA/100 g (Kumar y Sharma, 2016); *Mucuna pruriens*, 361 mg EAA/g (Ganem, 2007); *Dorstenia multiformis*; 21.21% AAR (Balestrin, Gaspari, Gomes, Dall’Stella y Dallarmi, 2008); y *Dicksonia sellowiana*, 28.80 % AAR (Oliveira et al., 2016).

La Tabla 14 muestra los coeficientes de regresión estimados para la CAT. Los términos lineales de concentración de etanol y tiempo de extracción tuvieron un efecto negativo significativo ( $p < 0.05$ ). Los coeficientes de regresión del modelo fueron utilizados para formar la siguiente ecuación:

$$Y_3 = + 1660.23 - 175.06 * X_1 - 137.11 * X_2 \quad (\text{Ec. 23})$$

La Figura 28 muestra los efectos de los factores sobre la CAT. Se observa el mayor valor de CAT cuando el solvente presenta 48.44% de etanol. El método del fosfomolibdeno permite evaluar compuestos tanto lipofílicos como hidrofílicos (Bezerra, 2014); entre ellos, los compuestos hidrofílicos son los protagonistas de la capacidad antioxidante total en varias frutas estudiadas por Cano y Arnao (2004). Por lo tanto, la capacidad antioxidante de los extractos tiene como principales responsables a los compuestos hidrofílicos.

A medida que el tiempo de extracción aumentaba por encima de 13.83 minutos, se producía una disminución de la CAT. Annegowda et al. (2011) manifiestan que una disminución de la capacidad antioxidante en procesos extensos de sonicación, puede deberse a la generación de radicales libres altamente reactivos como el hidroxilo y el peroxilo, que pueden inducir reacciones oxidativas drásticas en el medio líquido, reaccionar con los compuestos antioxidantes presentes en el extracto y degradarlos antes de que sean cuantificados por el ensayo.

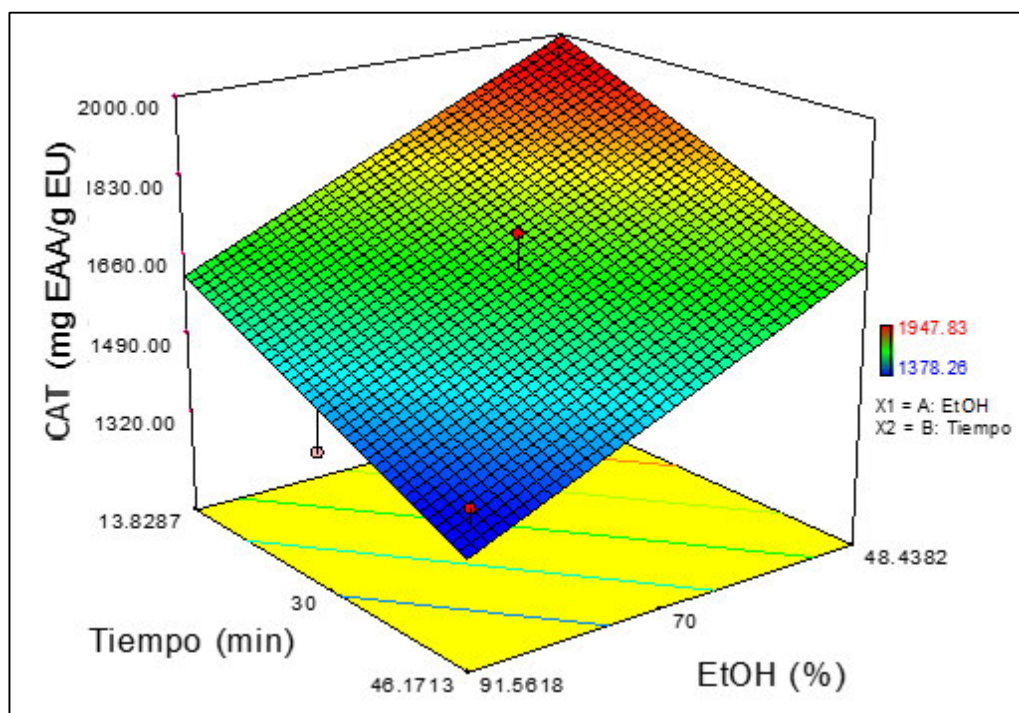


Figura 28. Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol ( $X_1$ , %) y tiempo de extracción ( $X_2$ , min) sobre la capacidad antioxidante medida por el método CAT

Fuente: Elaboración propia

#### 6.3.2.4. Método del DPPH

Experimentalmente, el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH (76.35 %) se obtuvo utilizando 50 % de etanol y 15 minutos de extracción (Tabla 13). Los resultados del análisis de regresión (Tabla 14) mostraron que los términos lineales de concentración de etanol y tiempo de extracción afectaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad antioxidante por DPPH, mientras que, de los términos cuadráticos, solo la concentración de etanol influyó significativamente ( $p < 0.05$ ). Los coeficientes de regresión del modelo fueron utilizados para formar la siguiente ecuación:

$$Y_4 = + 73.10 - 3.32*X_1 - 1.86*X_2 - 0.44*X_1*X_2 - 2.74*X_1^2 + 1.00*X_2^2 \quad (\text{Ec. 24})$$

La Figura 29 muestra el efecto de los factores sobre la capacidad antioxidante por DPPH. Se observa que, un aumento inicial de la concentración de etanol hasta aproximadamente 60% generó un incremento ligero en la actividad de barrido; sin embargo, a medida que la proporción de etanol sigue aumentando, se produce una disminución de la respuesta evidenciándose el efecto cuadrático negativo del etanol. Este fenómeno es similar a lo reportado por Kumar y Sharma (2016), en cuyo estudio se alcanzó la máxima actividad de barrido con 60 % de metanol, la cual empezó a disminuir conforme aumentaba la concentración. Gimeno (2015) y Chew et al. (2011) también reportaron influencia cuadrática del etanol sobre la capacidad antioxidante por DPPH. Mercado-Mercado, De la Rosa, Wall-Medrano, López y Álvarez-Parrilla (2013) señalan que, a diferencia de otros métodos que miden la capacidad antioxidante, el DPPH es selectivo para medir la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Por encima de un cierto límite de contenido de agua en el solvente, la capacidad antioxidante decrece, ya que una parte del DPPH puede llegar a coagular y no ser fácilmente accesible para la reacción con antioxidantes (Karadag et al., 2009). Esto indica que el DPPH posee mayor afinidad con solventes que contengan agua en proporciones relativamente bajas, favoreciendo incluso la extracción de compuestos antioxidantes lipofílicos. Sin embargo, ocurrió una disminución de la capacidad antioxidante al utilizar concentraciones de etanol superiores al 60%. Chew et al. (2011) indicaron que concentraciones muy altas de etanol perjudican la extracción de compuestos fenólicos de bajo peso molecular con poder antioxidante.

El tiempo de extracción tuvo el mismo efecto negativo que en el método de fosfomolibdeno, es decir, tiempos de extracción superiores a 13.83 minutos, ocasionaron disminución del porcentaje de inhibición. Por lo tanto, como se explicó anteriormente, una extracción ultrasónica prolongada puede ocasionar una oxidación de los compuestos fenólicos, disminuyendo su capacidad antioxidante.

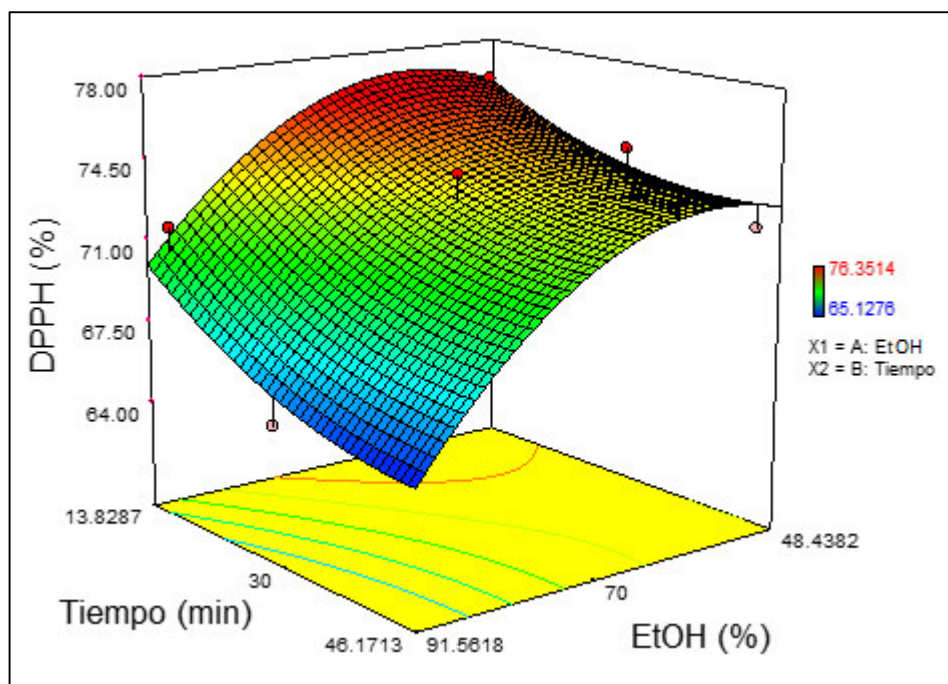


Figura 29. Superficie 3D mostrando el efecto de concentración de etanol ( $X_1$ , %) y tiempo de extracción ( $X_2$ , min) sobre la capacidad antioxidante medida por el método DPPH

Fuente: Elaboración propia.

### 6.3.3. CORRELACIÓN ENTRE CFT Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó un análisis de correlación entre el contenido fenólico total (CFT) y la capacidad antioxidante por DPPH y CAT para averiguar el grado de asociación entre estas respuestas. En la Figura 30, se observa una alta correlación directa entre el CFT y la capacidad antioxidante por CAT ( $r=0.89$ ) y DPPH ( $r=0.78$ ), es decir, existe una gran influencia positiva de los compuestos fenólicos en la propiedad antioxidante de los extractos. Otros autores también observaron alta correlación entre la capacidad antioxidante y el CFT en diferentes materiales vegetales. Se obtuvieron correlaciones de  $r=0.89$  en el extracto alcohólico de arándanos (Spagolla, Santos, Passos y Aguiar, 2009),  $r=0.92$  en el extracto de hojas y frutos del género *Rubus* (Baltazar, 2012) entre el CAT y CFT, y correlaciones de  $r=0.89$  en el extracto etanólico de guayaba (Olaya y Restrepo, 2012),  $r=0.86$  en extracto etanólico de *Orthosiphon aristatus* (Chew et al., 2011) entre el DPPH y CFT. Esto corrobora que el interés en la extracción de compuestos fenólicos radica en su potencial antioxidante (Dai y Mumper, 2010), ya que, mayor valor de capacidad antioxidante significa que los compuestos fenólicos tienen una mayor capacidad para estabilizar radicales libres (Jacobó-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009).

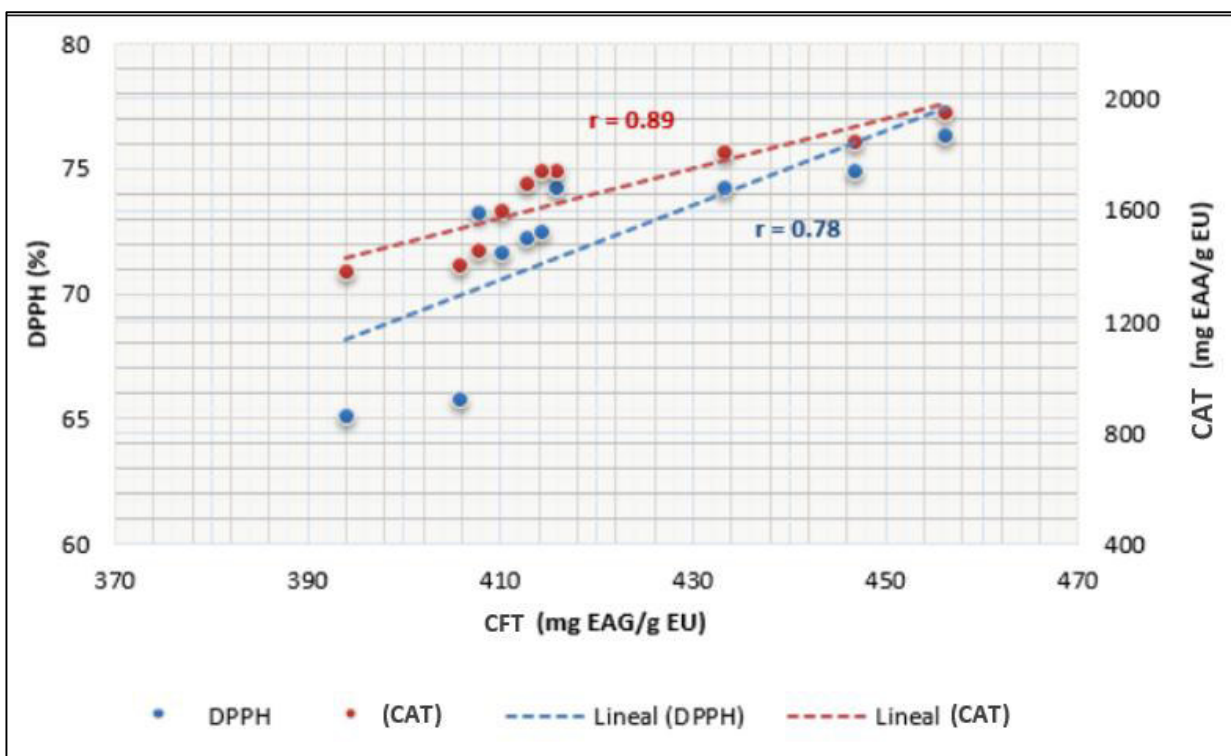


Figura 30. Correlación entre el CFT y la capacidad antioxidante de los EU

Fuente: Elaboración propia

#### 6.3.4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO

Luego de obtener los resultados numéricos y gráficos de los modelos de Superficie de Respuesta, se optimizaron las condiciones de extracción colocando los factores en el rango estudiado y maximizando los resultados de las cuatro variables de respuesta, todas con un mismo nivel de importancia (+++). Por ende, el resultado de la optimización multirespuesta señala las condiciones óptimas de extracción en función de la concentración de etanol y tiempo de extracción (Tabla 15).

Tabla 15. Valores optimizados de los factores de extracción

<b>Factores</b>	<b>Valores codificados</b>	<b>Valores sin codificar</b>
Concentración de etanol (%)	-1.07809	48.4382
Tiempo de extracción (min)	-1.07809	13.8287

Fuente: Elaboración propia

La deseabilidad global del modelo optimizado fue 0.94 (Figura 31). Al ser un valor entre 0.8 y 1 dentro de la escala de deseabilidad, puede ser considerado como “muy bueno”, tal como lo indica Lazic (2004 citado en Bacio, 2007). Como se observó anteriormente (Figura 26 - 29), las diferentes respuestas requieren de diferentes condiciones óptimas de extracción para ser maximizadas y esto podría conllevar a que, al usar ciertas condiciones de extracción para maximizar una de las respuestas, las otras se reduzcan. Por este motivo, se utilizó un proceso de optimización multirespuesta que busca maximizar todas las respuestas y que todas ellas satisfagan de manera simultánea una sola deseabilidad global. Puesto que el software reveló que las condiciones óptimas de extracción ocurren al utilizar la mínima concentración de etanol (48.44%) y el mínimo tiempo de extracción (13.83 minutos), tanto el CFT como CAT tuvieron una deseabilidad igual a 1 porque sus valores máximos también se obtienen a esas mínimas condiciones de extracción. No obstante, los valores de deseabilidad de DPPH y rendimiento de extracción fueron 0.98 y 0.79, respectivamente; en el caso del DPPH se debe a que su valor máximo se logra con una concentración de etanol mayor al optimizado (59.51%) y en el caso del rendimiento de extracción, su valor máximo se logra con un tiempo de extracción mayor al optimizado (46.17 minutos).

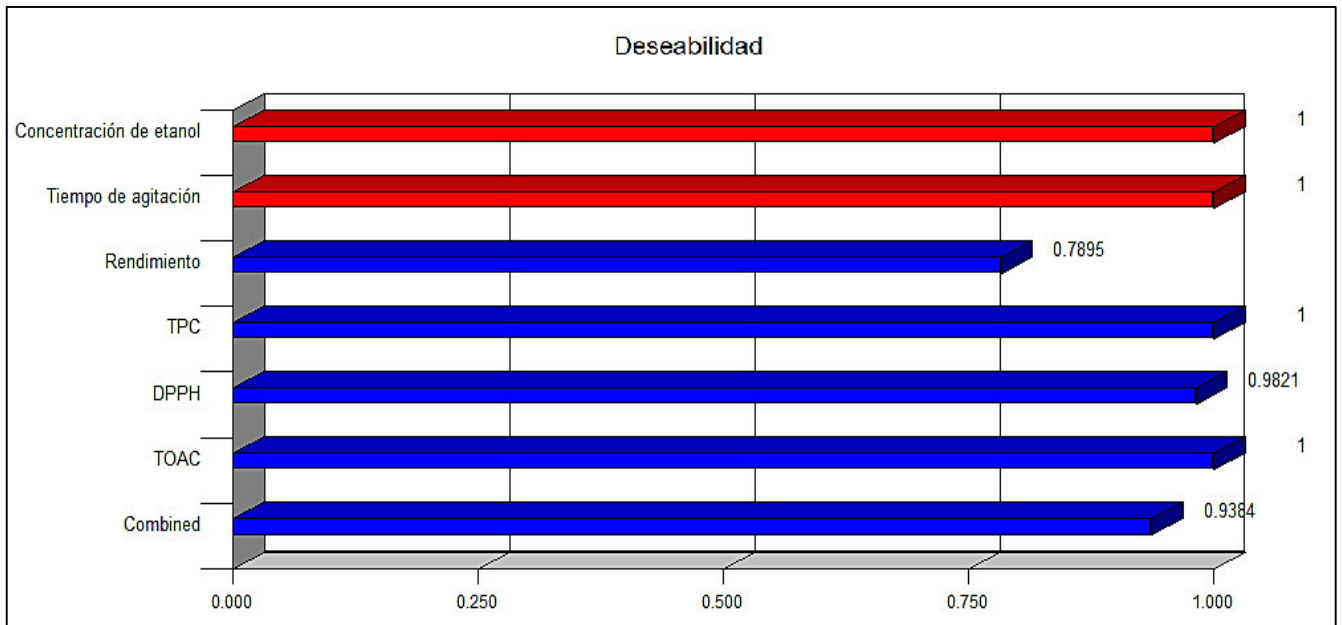


Figura 31. Deseabilidad de las condiciones óptimas de la extracción

Fuente: Elaboración propia

Las condiciones óptimas de extracción fueron utilizadas por el software Design Expert para pronosticar los valores óptimos de las variables de respuesta. El objetivo de realizar la validación es



demostrar la capacidad que tiene la MSR para predecir las respuestas generadas por el software (Ong, Soh, Shahzad y Syarhabil, 2016). Para llevar a cabo la validación del modelo optimizado, se realizó la corroboración de forma experimental y por triplicado de los valores pronosticados (estimados). Los valores experimentales (observados) obtenidos para cada respuesta, con excepción de la capacidad antioxidante por CAT, se encontraron dentro del intervalo de confianza (I.C) de 95% y presentaron pequeños porcentajes de error (< 5%) (Tabla 16), lo que indica que son valores promedios aceptables y demuestran que la MSR es una herramienta confiable para realizar la optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos. Por otro lado, el valor experimental de CAT fue relativamente bajo en comparación con el valor pronosticado por el software, presentando un porcentaje de error mayor al 5% y ubicándose, de esta manera, fuera del intervalo de confianza de 95%. Esto puede deberse a que el valor pronosticado para CAT pudo haber sido estadísticamente alterado, ya que el modelo anteriormente presentó un *lack of fit* significativo antes de la optimización, indicando que el modelo aún precisaba de ajustes; asimismo, la velocidad de enfriamiento de las muestras antes de realizar las lecturas de CAT por espectrometría también pudo haber influenciado en este resultado.

Tabla 16. Validación de los modelos de Superficie de Respuesta

<b>Respuestas</b>	<b>Valores estimados</b>	<b>I.C.* superior al 95%</b>	<b>I.C.* inferior al 95%</b>	<b>Valores** observados</b>	<b>% Error</b>
RE (%)	24.64	24.36	24.91	24.37±0.25	1.08
CFT (mg EAG/g EUL)	465.73	451.82	479.64	452.76±0.00	2.78
CAT (mg EAA/g EUL)	1996.78	1888.79	2104.77	1856.74±996.21	7.01
DPPH (%)	76.15	71.90	80.40	74.26±0.09	2.48

\*I.C. = Intervalo de confianza. \*\*Los valores están expresados como media ± desviación estándar y son expresados en base seca. EUL: extracto de semilla de unguirahui libre, RE: rendimiento de extracción, CFT: contenido fenólico total, CAT: capacidad antioxidante total, DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo. mg EAG/g EUL: mg equivalente de ácido gálico por g de EUL, mg EAA/g EUL: mg equivalente de ácido ascórbico por g de EUL.

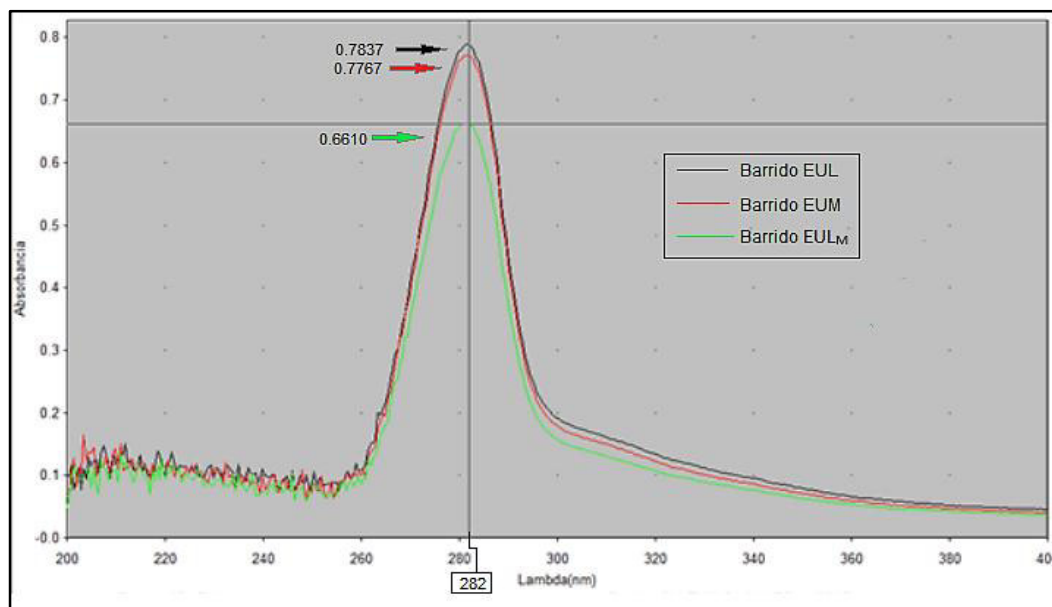
Fuente: Elaboración propia

## 6.4. MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación del extracto óptimo de semilla de unguirahui se realizó mediante secado por aspersión por ser el método más popular para formar microcápsulas, debido a que es fácil de industrializar y permite la producción continua de partículas secas de buena calidad (Wu, Zou, Mao, Huang y Liu, 2014; Akhavan et al., 2016). La maltodextrina de 10-12 equivalentes de dextrosa (ED) fue seleccionada como material encapsulante debido a que Lopera, Guzmán, Cataño y Gallardo (2009) señalan que este tipo de maltodextrina es la más efectiva en microencapsulación.

### 6.4.1. ANÁLISIS DE BARRIDO ESPECTRAL

En el análisis de barrido espectral realizado a las muestras de EUL, EUM y EUL<sub>M</sub> en el UV-vis., se observa que los picos de máxima absorción ocurren a una longitud de onda de 282 nm (Figura 32), siendo este valor el primero en ser reportado en la literatura para los extractos de semilla de unguirahui. Se infiere que existe una concentración de compuestos fenólicos que se manifiestan a esta longitud de onda, ya que, según Santos-Buelga et al. (2003 citado por Vihakas, 2014), todos los flavonoides tienen un máximo de absorción de alrededor de 240-290 nm, que se ve afectado principalmente por la conjugación del anillo A y su patrón de sustitución.



EUL: extracto de semilla de unguirahui libre (100 ppm), EUM: extracto de semilla de unguirahui microencapsulado (400 ppm), EUL<sub>M</sub>: extracto de semilla de unguirahui libre, bajo condiciones de atomización, sin maltodextrina (100 ppm). Los extractos fueron disueltos en una mezcla de etanol: agua (48.44 %).

Figura 32. Barrido espectral de los extractos hidroetanólicos de semilla de unguirahui

Fuente: Elaboración propia

En el barrido espectral de las muestras, se deduce que la temperatura de entrada del aire (150°C) en el secado por aspersión no alteró la naturaleza y/o concentración de los compuestos fenólicos presentes en el EUM ( $Abs_{prom} = 0.7767$ ) al compararlo con el EUL ( $Abs_{prom} = 0.7837$ ); sin embargo, ocurrió una degradación estadísticamente significativa de los compuestos de interés del EUL<sub>M</sub> ( $Abs_{prom} = 0.6610$ ) debido a que este no poseía el material encapsulante (maltodextrina) que lo protegiera. Çam et al. (2013) indican que la temperatura de salida y el tiempo total de secado son considerados los parámetros más importantes para cualquier análisis relacionado con el secado por aspersión. Según Chong et al. (2014), el tiempo de secado en el *spray dryer* es cuestión de unos pocos segundos (0.3 a 1.7 segundos aproximadamente) debido a la gran superficie total de secado de las gotitas de líquido expuestas al aire caliente. Ese tiempo fue suficiente para ocasionar la degradación de los compuestos presentes en el EUL<sub>M</sub>, a diferencia del EUM. Por otro lado, la temperatura de salida estuvo en torno a 60 °C, valor que se encontró dentro del rango típico de temperatura de salida (50-80 °C) que Medina-Torres et al. (2013) indican como adecuado para la microencapsulación de compuestos fenólicos que presentan fines alimentarios.

#### 6.4.2. RENDIMIENTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN (RM)

Se obtuvo un RM de 84.16%, similar al rendimiento (86.30%) obtenido por Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk (2011) en la atomización del extracto de baya de grosella negra al utilizar el mismo encapsulante y temperatura de entrada del aire a la cámara de secado que en el presente estudio. Sin embargo, según Nunes y Mercadante (2007), el RM depende más de la configuración del equipo que de las características fisicoquímicas del núcleo o encapsulante. Como consecuencia de tener un rendimiento superior a 50%, tal como manifiesta Bhandari, Datta, Crooks, Howes y Rigby (1997), ha ocurrido un secado eficiente.

La “masa de las microcápsulas” luego de la encapsulación estuvo conformada por las partículas recogidas del colector y del ciclón separador; mas las partículas adheridas a la cámara de secado no fueron consideradas. Una de las ventajas de este proceso de secado, es que los compuestos fenólicos se exponen a la temperatura de entrada por algunos segundos, por lo que son menos propensos a las reacciones de oxidación (Martín, Morales, Gallardo y Ruiz, 2009). Por esta razón, no se recogió las partículas acumuladas en las paredes de la cámara, ya que estuvieron expuestas a una temperatura alta por un mayor tiempo.

#### 6.4.3. EFICIENCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN (EM)

El contenido fenólico total y superficial de las microcápsulas,  $CFT_M$  y  $CFS_M$ , fueron  $90.79 \pm 0.83$  y  $14.56 \pm 0.93$  mg EAG/g de peso seco, respectivamente. Çilek (2012) afirma que cuanto menor sea la cantidad de fenoles en la superficie de las microcápsulas, más eficiente es el proceso de microencapsulación. Los resultados mostraron que la EM fue relativamente alta, ya que  $83.96 \pm 0.92\%$  de los compuestos fenólicos resultaron encapsulados.

#### 6.4.4. CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS EXTRACTOS

Los resultados de la caracterización organoléptica de los extractos (EUL y EUM) son mostrados en la Tabla 17. Las partículas del EUL exhibieron un aspecto de tiras cristalinas y brillantes; de color rojo oscuro que, debido a su intensidad, puede influenciar en la aceptación visual del producto alimentario al que sea añadido; el olor era mentolado-leñoso, con predominancia del segundo atributo y con tendencia a un aroma ligeramente maderero; el sentido del gusto caracteriza al extracto como insípido y que produce un poco de astringencia, pero con ausencia de amargor. A diferencia del EUL, las microcápsulas del EUM exhibieron un aspecto de polvo fino, opaco y con tendencia al apelmazamiento; de color rosa pastel debido a la influencia de la maltodextrina durante el proceso de microencapsulación; olor floral- dulce, que enmascaró el olor original del extracto; y un sabor ligeramente dulce, siendo una característica propia del encapsulante añadido. Es decir, cada extracto reflejó las características intrínsecas de sus componentes.

Tabla 17. Caracterización organoléptica de los extractos

	<b>Aspecto</b>	<b>Color</b>	<b>Olor *</b>	<b>Sabor</b>
EUL	Cristales amorfos y brillantes	Rojo oscuro o vino	mentolado - leñoso	Insípido y astringente
EUM	Partículas circulares apelmazadas	Rosa pastel	floral - dulce	Ligeramente dulce

(\*) Términos acuñados según Castro, Ramanathan y Chennubhotla, 2013.

Fuente: Elaboración propia

#### 6.4.5. ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS

Las partículas del EUL presentaron una morfología superficial irregular, tosca y de diferentes tamaños producto de las fuerzas de impacto del pilón sobre los cristales del extracto seco cuando

fueron molidos en un mortero para su posterior almacenamiento (Figura 33.a). A diferencia de las partículas del EUL, las partículas del EUM con maltodextrina (ED = 10-12) presentaron tendencia para la aglomeración y redondez, además de ser más pequeñas al ser observadas por el microscopio electrónico de barrido a una ampliación de 500x, es decir, se obtuvo una reducción en el tamaño de las partículas del EUL luego de haber sido encapsulado (Figura 33. a y b).

Se observó que algunas microcápsulas fueron esféricas y superficialmente lisas, mientras que la mayoría presentó una estructura menos redonda por causa de abolladuras en su superficie (Figura 33.c). Adicionalmente, se observó pequeñas partículas que ocupaban espacios vacíos dejados por las abolladuras de las partículas más grandes (Figura 33.d). Autores como Cai y Corke (2000), Díaz, Santos, Filardo, Villagómez y Scheinvar (2006) y Olaya, Castaño y Garzón (2009) también obtuvieron microcápsulas que exhibían tanto superficies lisas como abolladas en sus estudios de encapsulación por atomización usando maltodextrina como agente encapsulante en extracto de *Amaranthus*, fruto de *Opuntia lasiacantha*, y fruto de *Rubus glaucus* y *Solanum betaceum*, respectivamente. Rosenberg et al. (1985) indican que, la pérdida de humedad de las partículas durante el proceso de secado por aspersión puede causar deshidratación de estas haciendo que se contraigan y formen abolladuras en sus superficies; por su parte, Ré (1998) manifiesta que las abolladuras pueden ser más notorias cuanto más lento se forme la película superficial en las pequeñas gotas atomizadas. Este tipo de superficie dentada también es atribuido al uso de polisacáridos como agentes encapsulantes en el proceso de atomización (Peres et al., 2011) debido a que originan partículas menos esféricas y tersas (Pedroza-Islas, 2002).

Las microcápsulas variaron en tamaño y forma. Presentaron una distribución homogénea de tamaños (Figura 34), cuyo promedio fue  $5.05 \pm 2.62 \mu\text{m}$ . Las microcápsulas obtenidas por *spray drying* típicamente tienen un tamaño de partícula muy pequeño, generalmente menos de  $10 \mu\text{m}$  (Shahidi y Han, 1993). Según De Souza et al. (2017), el tamaño de las partículas encapsuladas es un aspecto fundamental desde la perspectiva de usarlas como ingredientes alimentarios, ya que partículas muy grandes pueden ser indeseables al causar una sensación desagradable en la boca. Asimismo, Teixeira, Andrade, Farina y Rocha-Leão (2004) indican que una distribución homogénea de diámetros puede dar una distribución homogénea de sabor al ser añadido a alimentos.

Un aspecto importante en este estudio es que no se evidenció la presencia de fracturas, grietas o fisuras en la superficie de las microcápsulas, lo que permite preservar la capacidad antioxidante del EUM y garantiza la baja permeabilidad a los gases.

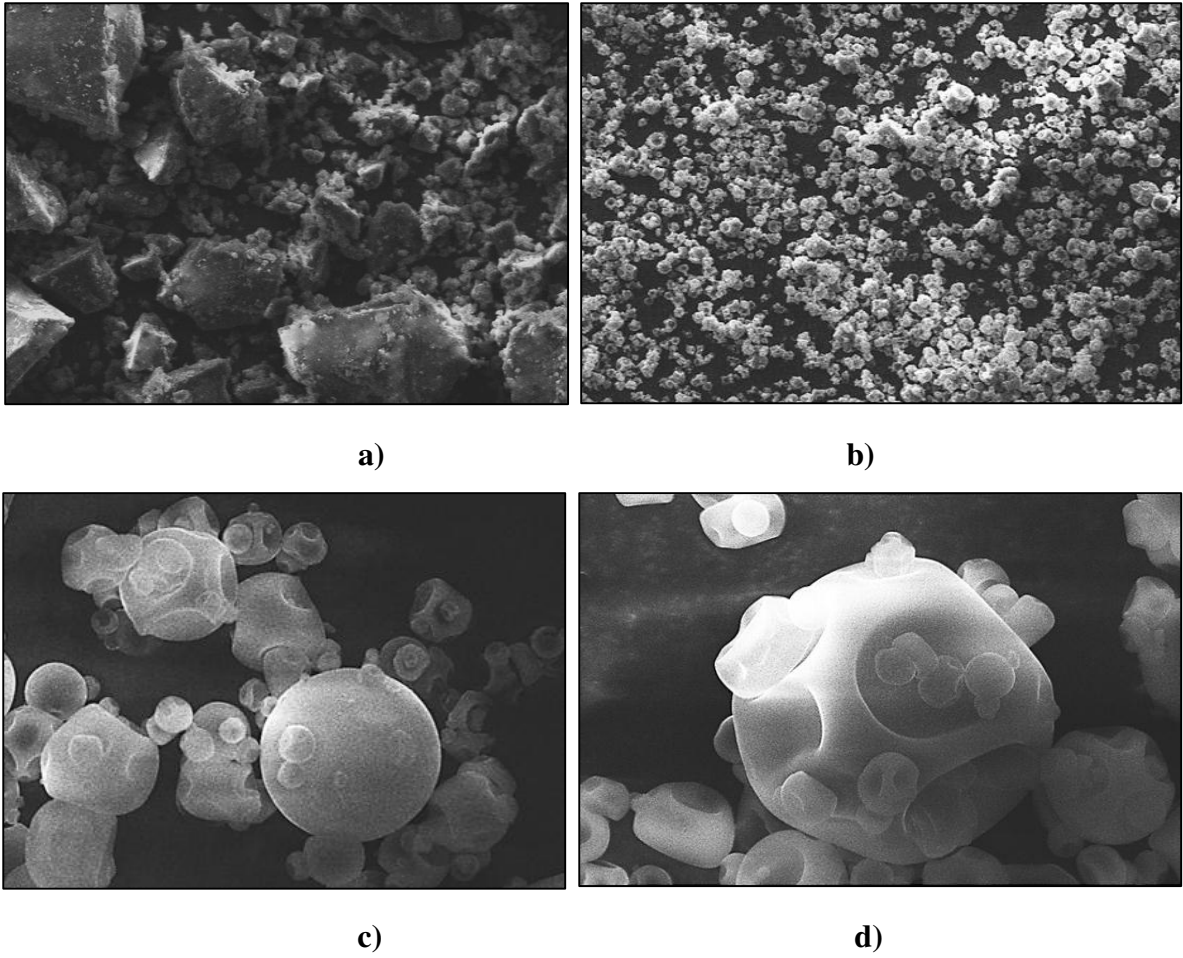


Figura 33. Morfología de los extractos a diferentes ampliaciones. a) EUL a 500x, b) EUM a 500x, c) EUM a 5000x e) EUM a 10000x

Fuente: Elaboración propia

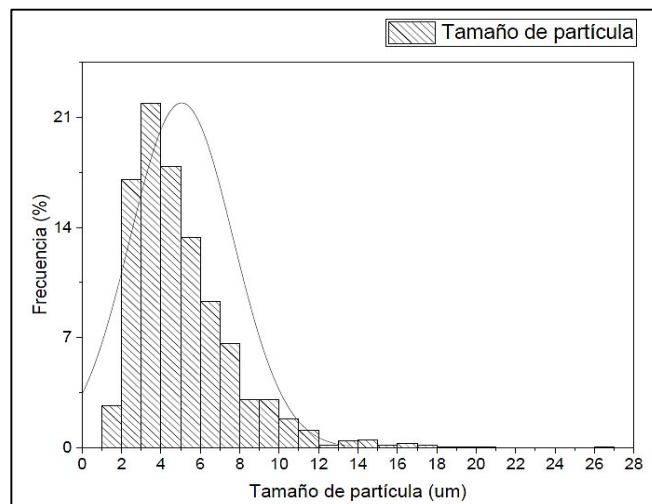


Figura 34. Curva de distribución del tamaño de partícula

Fuente: Elaboración propia

#### 6.4.6. ANÁLISIS FENÓLICO Y ANTIOXIDANTE DE LAS MICROCÁPSULAS

En la tabla 18, se muestra los valores promedios del CFT y la capacidad antioxidante por el método DPPH para el EUM, sometido a secado por aspersión a 150°C con una relación 1:3 de extracto: maltodextrina, y su comparación con el CFT y DPPH ya obtenidos anteriormente para el EUL. Se observa que el CFT para EUM (110.08 mg EAG/g EUM) es aproximadamente la cuarta parte del valor obtenido para EUL (452.76 mg EAG/g EUL), lo cual puede atribuirse a la adición de la maltodextrina en la muestra que provoca una dilución del extracto, es decir, 1 g de polvo encapsulado contiene aproximadamente 0.25 g de extracto libre (núcleo) y 0.75 g de maltodextrina (material encapsulante). Otros autores han reportado resultados similares de la aparente disminución del CFT por la adición de la maltodextrina que causó el efecto de dilución; por ejemplo, los materiales encapsulantes diluyeron el CFT en la encapsulación de extractos etanólicos de residuos de vino (Pérez-Serradilla y Luque de Castro, 2011), el CFT de los extractos microencapsulados de semillas secas y sin fermentar de copoazú en una relación 1:1 con maltodextrina se redujo un 60% comparado con el extracto original (Herrera, 2013).

Para facilitar la comparación del CFT antes y después de la encapsulación, se expresó ambas muestras bajo la misma cantidad del EUL. El CFT se redujo 2.75% después de la encapsulación, lo cual demuestra que la temperatura del aire que entró a la cámara de secado tuvo una leve influencia sobre la recuperación de los compuestos fenólicos. A pesar de la termosensibilidad de algunos compuestos fenólicos a la alta temperatura usada en el secado por aspersión, el tiempo de exposición es demasiado corto, lo que genera degradaciones en proporciones muy bajas (Herrera, 2013). En el presente estudio se obtuvo un buen porcentaje de retención de compuestos fenólicos (97.25%), en comparación con los hallazgos de Kuck y Noreña (2016), quienes encontraron un porcentaje de retención del 95.3% de CFT tras la microencapsulación del extracto acuoso de cáscara de uva con goma arábiga mediante secado por aspersión; asimismo, en el estudio de Robert et al. (2010) se recuperó más del 90% de CFT tras microencapsular el extracto etanólico de granada con maltodextrina. Es posible afirmar que el uso de materiales encapsulantes como la maltodextrina, cumplen efecto protector reduciendo las pérdidas de compuestos bioactivos.

En cuanto a la capacidad antioxidante por el método DPPH, no se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los resultados obtenidos para el EUL (74.26%) y EUM (74.59%), lo que indica que los compuestos antioxidantes del extracto de semilla de ungrahui

mostraron una tendencia estable tras el proceso de secado por aspersión. Esta variación del DPPH fue inferior en comparación con el estudio realizado por Krishnaiah et al. (2012) donde reportaron grandes pérdidas de la capacidad antioxidante luego de la encapsulación de los extractos acéticos de noni con maltodextrina, pasando de una actividad antioxidante de 76% en el extracto fresco a 28% en el extracto encapsulado. Papadakis y King (1988), y Sosnik y Seremeta (2015) concuerdan en que el tiempo real de secado de las microcápsulas dentro del *spray dryer* es extremadamente corto, en el rango de milisegundos a unos pocos segundos como máximo, evitando que el núcleo llegue a tener contacto directo con la temperatura del aire de secado y conservando de esta manera sus propiedades antioxidantes. Gharsallaoui et al. (2007) y Shahidi y Han (1993) también concuerdan que, en el secado por aspersión, la rápida evaporación del agua del material de recubrimiento durante la solidificación de las partículas mantiene la temperatura del núcleo por debajo de los 100 °C, a pesar de las altas temperaturas utilizadas en el proceso; esto conlleva a que la gota atomizada permanezca relativamente fría hasta alcanzar el estado de secado.

Tabla 18. Contenido fenólico total y capacidad antioxidante (por DPPH) del EUM y su comparación con el EUL

Tratamiento	CFT		DPPH (%)
EUL	452.76 ± 0.00 (*)	113.19 ± 0.00 <sup>A</sup> (**)	74.26 ± 0.09 <sup>A</sup>
EUM	110.08 ± 0.00 (***)	110.08 ± 0.00 <sup>B</sup> (***)	74.59 ± 0.33 <sup>A</sup>

Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n=3). Las medias que no comparten una misma letra dentro de cada columna son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p < 0.05). EUL: extracto de semilla de unguirahui libre (100 ppm), EUM: extracto de semilla de unguirahui microencapsulado (400 ppm), CFT: contenido fenólico total. (\*) mg EAG/g EUL, (\*\*) mg EAG/0.25 g EUL, (\*\*\*) mg EAG/g EUM.

Fuente: Elaboración propia

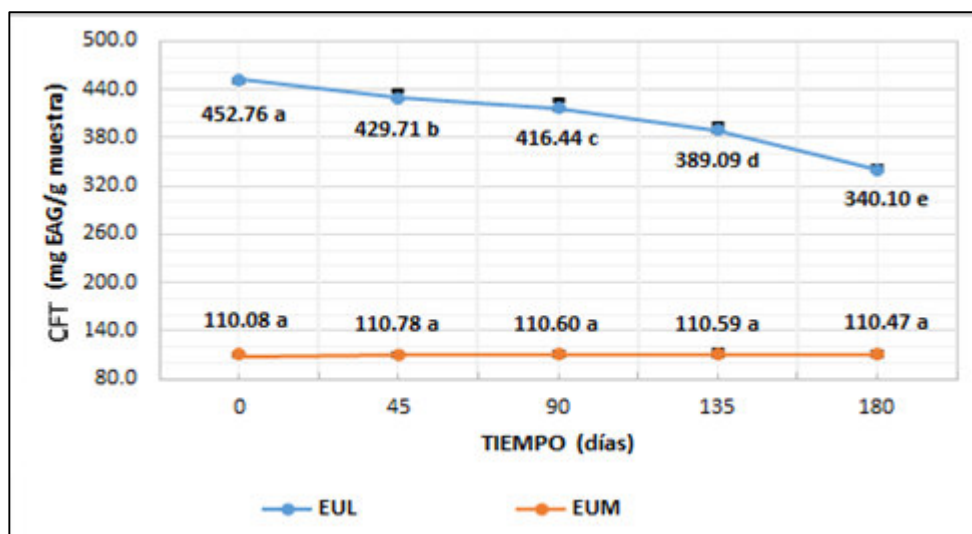
#### 6.4.7. ESTABILIDAD FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS (EUL Y EUM) DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Los extractos estuvieron almacenados a temperatura ambiente (25°C) y en viales translúcidos durante un periodo total de 180 días. Los resultados de la evaluación de la estabilidad fenólica del EUL y EUM mediante el método de Folin-Ciocalteu cada 45 días de almacenamiento son mostrados en la Figura 35. Se observa que las microcápsulas fueron más estables que el extracto en su forma libre, pero con una leve tendencia a la aglomeración con el paso del tiempo. La variación del CFT



del EUM tras 180 días de almacenamiento fue no significativo ( $p > 0.05$ ); sin embargo, hubo una pérdida fenólica significativa ( $p < 0.05$ ) de 24.88% para el EUL, mostrando una mayor degradación en los últimos 45 días. El comportamiento fenólico de los extractos con el tiempo concuerda con lo reportado por Aizpurua-Olaizola et al. (2015), quienes encontraron que los polifenoles encapsulados de los residuos de uva fueron mucho más estables en comparación con los polifenoles libres tras 6 meses de almacenamiento; asimismo, en el estudio de Laine, Kylli, Heinonen y Jouppila (2008) (2008), los polifenoles microencapsulados de la zarzamora fueron más estables que los que no fueron encapsulados tras 64 días de almacenamiento a 25 °C.

La degradación fenólica del EUL en almacenamiento se puede deber principalmente a que los compuestos fenólicos sin encapsular son más susceptibles a la oxidación en comparación con los que se encuentran dentro de las microcápsulas; ya que, según Laine et al. (2008), puede ocurrir reacciones de autooxidación e hidrólisis de los compuestos fenólicos del extracto no encapsulado en almacenamiento que contribuyen con su degradación; siendo una solución a este inconveniente lo expuesto por Sagis (2015), quien afirma que la microencapsulación ha demostrado retrasar o inhibir la oxidación, protegiendo al material encapsulado de las condiciones ambientales adversas. Por otro lado, la humedad adquirida por las partículas del EUM con el paso del tiempo no tuvo efecto negativo sobre la estabilidad del CFT. El proceso de microencapsulación con maltodextrina trae consigo la aglomeración de las partículas encapsuladas con el tiempo, sin embargo, esto contribuye a reducir la exposición de los polvos frente al entorno externo (Ferrari et al., 2011). Por lo tanto, el proceso de microencapsulación con maltodextrina mejoró la estabilidad de los compuestos fenólicos durante el periodo de almacenamiento.



Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Figura 35. Evaluación de la estabilidad de compuestos fenólicos en los extractos almacenados

Fuente: Elaboración propia

## 6.5. INCORPORACIÓN DE LOS EXTRACTOS EN LAS GALLETAS

Los extractos de semilla de ungrahui (EUL y EUM) fueron incorporados en la preparación de galletas dulces tipo vainilla. El peso de cada galleta fue aproximadamente 7 y 6 g, antes y después del horneado, respectivamente. Para evaluar la factibilidad de los extractos en el desarrollo de galletas funcionales, es importante considerar el efecto que tienen sobre las características de calidad del producto original, ya que determina el nivel de aceptabilidad por parte del cliente (Davidov-Pardo et al., 2012b).

### 6.5.1. EFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LA GALLETA

#### 6.5.1.1. Efecto sobre el contenido fenólico total (CFT)

La Tabla 19 muestra el CFT por paquete (10 unidades) de G-C, G-EUL y G-EUM. Antes del horneado, no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre el CFT de las G-EUL y G-EUM (113.45 y 77.83 mg EAG/paquete, respectivamente); sin embargo, el CFT inferior para G-EUM pudo atribuirse a la formación de complejos irreversibles entre los compuestos fenólicos y los enlaces glucosídicos de la maltodextrina durante la preparación de la masa (Shahidi y Naczki, 2003;

Sivam, Sun-Waterhouse, Quek y Perera, 2010). Después del horneado, se observa una concentración similar de compuestos fenólicos en las G-EUL y G-EUM (70.20 y 70.22 mg EAG/paquete, respectivamente), concentraciones significativamente mayores que en la G-C (22.50 mg EAG/paquete) debido a los compuestos fenólicos proporcionados por el extracto de semilla de unguirahui a las galletas enriquecidas. No obstante, la concentración fenólica en la G-C puede atribuirse a la presencia del ácido ferúlico, ácido p-cumárico y derivados de la rutina que se encuentran intrínsecamente en la harina de trigo (Pasrija et al., 2015).

Tabla 19. Contenido fenólico total por paquete de galleta antes y después del horneado

	Contenido fenólico total (mg EAG/paquete)	
	Antes del Horneado	Después del Horneado
<b>G-C</b>	---	22.50 ± 1.82 <sup>A</sup>
<b>G-EUL</b>	113.45 ± 11.51 <sup>A a</sup>	70.20 ± 4.21 <sup>B b</sup>
<b>G-EUM</b>	77.83 ± 20.45 <sup>A a</sup>	70.22 ± 5.65 <sup>B a</sup>

Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n=3). Las medias que no comparten una misma letra mayúscula dentro de cada columna son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p<0.05). Las medias que no comparten una misma letra minúscula dentro de cada fila son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p<0.05). Los valores son expresados en base húmeda. G-C: galleta control, G-EUL: galleta enriquecida con extracto de semilla de unguirahui libre, G-EUM: galleta enriquecida con extracto de semilla de unguirahui microencapsulado.

Fuente: Elaboración propia

Como consecuencia del proceso de horneado, la G-EUM presentó la mayor retención fenólica. Se observó una degradación significativa (38.12%) de los compuestos fenólicos en la G-EUL, a diferencia de una degradación no significativa (9.78%) en la G-EUM. La alta temperatura de horneado (180°C) pudo haber causado la degradación parcial de los compuestos fenólicos de ambos extractos (EUL y EUM); sin embargo, los compuestos fenólicos de la G-EUL presentaron mayor superficie expuesta al calor facilitando su mayor degradación. Asami, Hong, Barrett y Mitchell (2003) mencionan que las altas temperaturas de horneado se consideran desfavorables debido a la posibilidad de inducir la condensación oxidativa o la descomposición de compuestos termolábiles como los fenólicos (Asami et al., 2003); sin embargo, a pesar de las reacciones químicas que ocurren dentro de los alimentos horneados, Sagis (2015) menciona que la microencapsulación protege al

compuesto activo contra el deterioro térmico y la oxidación al reducir su reactividad hacia la matriz, mejorar su actividad y su biodisponibilidad.

Otros estudios también compararon productos de panadería enriquecidos con bioactivos como, por ejemplo, Ashok et al. (2012) reportaron una alta retención del ácido tetrahidrofólico que estuvo encapsulado en galletas horneadas a 180°C, a diferencia de las galletas enriquecidas con el ácido no encapsulado. Pasrija et al. (2015) también obtuvieron mayor retención fenólica, aunque no significativo, en el pan horneado que fue enriquecido con extracto de té verde encapsulado, en comparación con el pan control y el que estuvo enriquecido con extracto de té verde sin encapsular.

Normalmente, se consume de 25 mg a 1 g de compuestos fenólicos por día, dependiendo del tipo de dieta (Paladino, 2008; Manach et al., 2004; Scalbert and Williamson, 2000). En este caso, el aporte fenólico de un paquete de galletas enriquecidas contiene aproximadamente 70 mg de fenoles, expresado como ácido gálico equivalente, con la expectativa de que su capacidad antioxidante ayude a prevenir enfermedades crónicas y degenerativas.

#### 6.5.1.2. Efecto sobre el color

Los resultados del análisis de color realizado a las muestras de galleta se presentan en la Tabla 20. Se observa que las G-EUL y G-EUM presentaron valores de luminosidad ( $L^*$ ) y amarillez ( $b^*$ ) más bajos y valores de enrojecimiento ( $a^*$ ) más altos que la G-C debido a que el color característico del EUL (rojo vino) influyó significativamente en el producto final. Este mismo comportamiento fue reportado en el estudio de galletas enriquecidas con extracto de cereza encapsulado realizado por Petrović et al. (2016) donde el color de las muestras enriquecidas fue significativamente diferente de la muestra control.

El color característico de los productos de panadería también es atribuido a las reacciones de caramelización y de Maillard que ocurren en el horno durante la cocción originando así el pardeamiento en estos productos (Tong et al., 2010). La reacción de caramelización en la G-EUM no solo tuvo como responsables a los azúcares comestibles presentes en la galleta, sino también a la maltodextrina, ya que, Rowe, Sheskey y Quinn (2009) afirman que la maltodextrina sometida a altas temperaturas puede desencadenar reacciones de oscurecimiento debido a su contenido de azúcares; por ello, el color más oscuro de la G-EUM que el resto de galletas, reflejado en un menor valor de

L\* y mayor valor de a\* (Tabla 20), es el resultado de un mayor contenido de azúcares en su formulación, concluyendo también que, la maltodextrina no logró enmascarar el color original del núcleo en la G-EUM.

Tabla 20. Medición del color de las galletas

Galleta	Color		
	L*	a*	b*
G-C	77.65 ± 0.57 <sup>A</sup>	-7.54 ± 0.56 <sup>A</sup>	31.36 ± 1.35 <sup>A</sup>
G-EUL	73.97 ± 1.08 <sup>B</sup>	-4.57 ± 1.20 <sup>B</sup>	22.94 ± 0.72 <sup>B</sup>
G-EUM	66.63 ± 2.15 <sup>C</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>C</sup>	23.67 ± 0.58 <sup>B</sup>

Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n=3). Las medias que no comparten una misma letra mayúscula dentro de cada columna son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p<0.05). G-C: galleta control, G-EUL: galleta enriquecida con extracto de semilla de unguirahui libre, G-EUM: galleta enriquecida con extracto de semilla de unguirahui microencapsulado.

Fuente: Elaboración propia



Figura 36. Color de las galletas horneadas. Izq.: G-C, centro: G-EUM, der.: G-EUL

Fuente: Elaboración propia

### 6.5.1.3. Efecto sobre la composición proximal

En la Tabla 21, se muestra los resultados del análisis químico proximal de la G-C, G-EUL y G-EUM. Se observa que, el porcentaje de humedad de todos los tratamientos se encuentra por debajo del 12% de humedad que es la cantidad máxima permitida establecida por la NTP 206.001:2016. El contenido de humedad fue mayor en la G-EUM, probablemente porque la maltodextrina retuvo una mayor cantidad de agua en el alimento (Neri, 2007). Por otra parte, la adición de polvo encapsulado provocó un aumento significativo (p<0.05) en el contenido de cenizas en la G-EUM con respecto a la G-C. Tanto las fuentes naturales (Carbajal y Torres, 2016; Ocampo-Duran, Fernández-Lavado y Castro-Lima, 2013) como la maltodextrina (Anexo VIII) presentan trazas de minerales en su

composición (Carbajal y Torres, 2016; Ocampo-Duran, Fernández-Lavado y Castro-Lima, 2013), los que sumarían al contenido de cenizas en las galletas enriquecidas.

Hubo una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) del contenido proteico debido a la incorporación de los extractos. La G-C (5.91%) presentó un mayor contenido proteico que las enriquecidas (5.30 y 5.21%) debido a que esta galleta tiene mayor porcentaje de harina de trigo en su formulación, y entre los componentes de la harina de trigo están las proteínas (10 - 12 %), particularmente las que integran el gluten representan entre un 80 - 85 % del total de las proteínas del trigo (De la Vega, 2009). Varastegani, Zzaman y Yang (2015) también reportaron que el contenido proteico de las galletas disminuía conforme la harina de trigo era reemplazada en mayor proporción por la harina de pulpa de papaya. El contenido de carbohidratos aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) debido a la adición del polvo encapsulado a la galleta, ya que, la maltodextrina es un producto de alta pureza que, como señala Badui (2001, citado en Medina, 2013), está integrada exclusivamente por hidratos de carbono. El contenido graso fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) para la G-EUM en comparación con las otras galletas probablemente como resultado de la ligera repulsión que se evidenció entre la mantequilla y el EUM durante el amasado, provocando pérdida de grasa en el papel manteca antes del horneado. Esto puede atribuirse a la ausencia de grupos lipofílicos en la estructura de la maltodextrina (Ré, 1998; Yañez-Fernández et al., 2002), evitando así una mezcla homogénea entre ambos ingredientes.

Tabla 21. Análisis químico proximal de las galletas

<b>Composición (g/100 g)</b>	<b>G-C</b>	<b>G-EUL</b>	<b>G-EUM</b>
Humedad	3.65 ± 0.01 <sup>A</sup>	3.60 ± 0.00 <sup>A</sup>	3.86 ± 0.06 <sup>B</sup>
Cenizas	0.93 ± 0.04 <sup>A</sup>	1.01 ± 0.02 <sup>AB</sup>	1.02 ± 0.00 <sup>B</sup>
Proteínas	5.91 ± 0.06 <sup>A</sup>	5.30 ± 0.06 <sup>B</sup>	5.21 ± 0.19 <sup>B</sup>
Carbohidratos	68.51 ± 0.09 <sup>A</sup>	68.26 ± 0.79 <sup>A</sup>	71.25 ± 0.23 <sup>B</sup>
Grasas	21.00 ± 0.00 <sup>A</sup>	21.83 ± 0.71 <sup>A</sup>	18.67 ± 0.47 <sup>B</sup>
<b>Energía (Kcal/100 g)</b>	486.71 ± 0.13 <sup>A</sup>	490.74 ± 3.44 <sup>A</sup>	473.84 ± 2.60 <sup>B</sup>

Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n=2). Las medias que no comparten una misma letra mayúscula dentro de cada fila son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Fuente: Elaboración propia

#### 6.5.1.4. Efecto sobre los atributos sensoriales

El efecto de los extractos (libre y encapsulado) sobre la calidad sensorial de las galletas se muestra en la Tabla 22. La adición del EUL afectó negativamente el olor y sabor de la G-EUL, lo cual es atribuido a la astringencia que puede aparecer en el producto cuando está enriquecido directamente con compuestos fenólicos (Çam et al., 2013), como los de origen vegetal. Estos inconvenientes de sabor y olor menguaron en la G-EUM, ya que, la encapsulación enmascaró parcialmente estas características indeseables del EUL. Según Liu, Ma, Gao y McClements (2016) indican que la formación de enlaces no covalentes de los polisacáridos, como la maltodextrina, con los polifenoles reduce las interacciones de estos últimos con las proteínas salivales, reduciendo así su tendencia a causar astringencia y mejorando el sabor en la masticación. Por otro lado, la adición del EUM provocó un color más oscuro y la formación de grietas en la superficie de la G-EUM, lo cual no fue muy agradable para los panelistas, recibiendo puntuaciones bajas en los atributos de color y apariencia. Sin embargo, ambas galletas enriquecidas, G-EUL y G-EUM, presentaron mayor aceptabilidad global que la G-C.

Se observa que la G-EUL presentó una aceptabilidad global significativamente mayor que la G-C ( $p < 0.05$ ) debido principalmente a que obtuvo puntajes más altos en los atributos de color, apariencia y textura. Asimismo, se observa que la G-EUM presentó una aceptabilidad global mayor que la G-C con puntajes más altos en los atributos de color, apariencia, sabor, (estadísticamente no significativos) y textura (estadísticamente significativo). La textura de las galletas enriquecidas fue mejor a causa de la suma de características aportadas por los ingredientes en sus formulaciones. Asimismo, Cuervo (2012) menciona que los consumidores posicionan el color y la apariencia por encima de otros atributos cuando se promocionan nuevos productos.

No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la aceptabilidad global entre las galletas enriquecidas (EUL-6.43, EUM-5.77). Debido a que ambas galletas presentaron aceptabilidades globales aceptables, resultaría conveniente la adición tanto del EUL como del EUM en este producto de panadería, ya que, además de ser fuentes de compuestos antioxidantes, mejoraron la mayoría de las características sensoriales del producto original.

Tabla 22. Aceptabilidad sensorial de las galletas

Galleta	Color	Apariencia	Sabor	Olor	Textura	Aceptabilidad global
<b>G-C</b>	4.62 ± 2.07 <sup>A</sup>	4.24 ± 2.31 <sup>A</sup>	5.54 ± 2.65 <sup>A</sup>	6.56 ± 2.33 <sup>A</sup>	4.76 ± 2.35 <sup>A</sup>	5.20 ± 2.30 <sup>A</sup>
<b>G-EUL</b>	7.54 ± 1.72 <sup>B</sup>	7.52 ± 1.91 <sup>B</sup>	5.39 ± 2.25 <sup>A</sup>	5.25 ± 2.66 <sup>B</sup>	6.12 ± 1.97 <sup>B</sup>	6.43 ± 1.48 <sup>B</sup>
<b>G-EUM</b>	4.72 ± 2.02 <sup>A</sup>	4.99 ± 2.03 <sup>A</sup>	6.26 ± 1.58 <sup>A</sup>	5.89 ± 1.60 <sup>AB</sup>	6.13 ± 1.81 <sup>B</sup>	5.77 ± 1.87 <sup>AB</sup>

Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n° panelistas=30). Las medias que no comparten una misma letra mayúscula dentro de cada columna son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p<0.05). G-C: galleta control, G-EUL: galleta enriquecida con extracto de semilla de unguirahui libre, G-EUM: galleta enriquecida con extracto de semilla de unguirahui microencapsulado.

Fuente: Elaboración propia

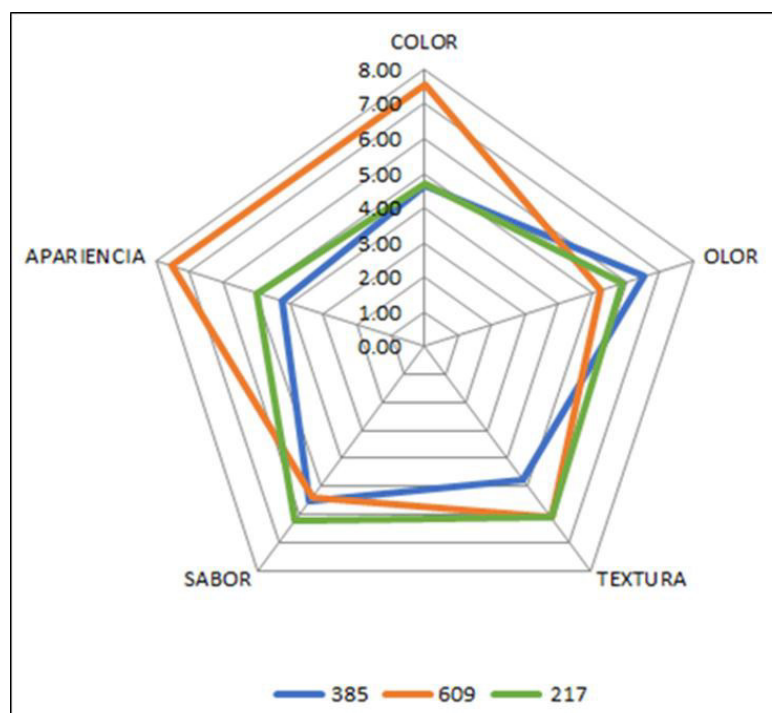


Figura 37. Atributos sensoriales de las galletas

Fuente: Elaboración propia



## VII. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroetanólico de semilla de unguirahui presentó pH casi neutro, metabolitos secundarios con tendencia a la alta y mediana polaridad, y presencia de compuestos fenólicos, en su mayoría, flavonoides y taninos.
2. Las condiciones óptimas de extracción, 48.44% de etanol y 13.83 minutos, pronosticaron un valor máximo para cada variable de respuesta de forma simultánea que, tras la validación se encontraron muy cerca de sus valores experimentales, con excepción del CAT, demostrando la fiabilidad de la MSR en este proceso de extracción.
3. La capacidad antioxidante de los EU se debe principalmente a los compuestos fenólicos por la alta correlación directa que existe entre ellos. Asimismo, el extracto con la mayor capacidad antioxidante (método CAT) puede incluso duplicar la capacidad antioxidante del ácido ascórbico.
4. Se comprobó el efecto protector de la maltodextrina mediante el barrido espectral ( $\lambda=282$  nm) que mostró cualitativamente que la temperatura de secado por aspersión no afectó al EUM; y mediante la conservación del CFT y la capacidad antioxidante.
5. La morfología y tamaño de partículas del EUL fue variable e irregular; en cambio, EUM presentó partículas con tendencia redonda, tamaño homogéneo y sin rupturas superficiales, preservando su capacidad antioxidante. En la caracterización organoléptica, cada extracto reflejó las características propias de sus componentes. La maltodextrina también protegió al EUM durante los 180 días de almacenamiento dándole estabilidad fenólica, mientras que, el EUL sufrió gradual pérdida fenólica.
6. La G-EUL, a diferencia de la G-EUM, presentó degradación fenólica significativa luego del horneado, pero finalmente ambas galletas presentaron cantidades similares de fenoles ( $\approx 70$  mg EAG/paquete) y mayor aceptabilidad global que la G-C. La G-EUL mejoró el color y la apariencia; sin embargo, la textura, sabor y olor de la G-EUM resultaron más atractivos, además de su menor contenido de grasa luego del horneado.

En resumen, el EUL y EUM poseen compuestos fenólicos que pueden considerarse ingredientes naturales para ser incorporados en la elaboración de galletas, mejorando la capacidad antioxidante y características sensoriales de este producto alimentario.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar otros métodos y/o parámetros de extracción para obtener extractos de semilla de ungurahui con el mayor contenido fenólico.
2. Realizar un análisis de HPLC-MS al extracto de semilla de ungurahui para la separación, identificación y cuantificación de los diferentes compuestos fenólicos.
3. Utilizar otros métodos para la determinación de la capacidad antioxidante del extracto de semilla de ungurahui. Evaluar a qué grado de madurez del fruto de ungurahui se puede extraer mayores concentraciones de compuestos fenólicos de la semilla.
4. Evaluar la estabilidad fenólica durante el almacenamiento y realizar pruebas microbiológicas a las galletas enriquecidas para estimar su vida útil.
5. Adicionar el extracto microencapsulado en otras matrices alimentarias de menor costo y/o mayor consumo, y evaluar el efecto protector del encapsulante sobre la capacidad antioxidante de estos nuevos productos.
6. Fomentar en las comunidades nativas los beneficios de la semilla de ungurahui para su producción y consumo en forma de extractos, e impulsar así el desarrollo social y económico de la zona, así como la incorporación de estilos de vida más saludables entre los ciudadanos.
7. Realizar un estudio a las propiedades físicas y químicas de los residuos de la extracción para su potencial uso en el proceso de compostaje y producir un abono orgánico de alta calidad.
8. Investigar la absorción, biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos en el organismo luego de ser ingeridos, comprobando que la dosis ingerida cumpla con los beneficios divulgados para la salud.

## IX. LISTA DE REFERENCIAS

1. Agraria.pe. (2017, 30 enero). Perú ya cuenta con un primer laboratorio para crear superalimentos funcionales. Recuperado 16 diciembre, 2017, de <http://agraria.pe/noticias/peru-ya-cuenta-con-un-primer-laboratorio-para-crear-13062>
2. Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., y Meza, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de ciencias biológicas y de la salud*, 13(2), 16-22.
3. Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., y Usobiaga, A. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry*, 190, 614-621. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.117>
4. Ajila, C., Bhat, S., y Prasada Rao, U. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4), 1006-1011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.036>
5. Akhavan, S., Jafari, S. M., Assadpoor, E., y Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
6. Al-Juhaimi, F., Adiamo, O. Q., Ghafoor, K., y Babiker, E. E. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed. *CyTA - Journal of Food*, 1-6. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1110202>
7. Alam, M. N., Bristi, N. J., y Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
8. Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., y Decker, E. A. (2009). Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969-2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
9. Amazonas, L. (2008). *Estudo das propriedades físicas, químicas e termofísicas de óleos regionais e suas misturas* (Tesis de maestría). Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
10. Andjelković, M. Z., Milenkovic-Andjelković, A. S., Radovanović, B. C., & Radovanović, A. N. (2014). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenols From Seeds of

- Grape Pomace. *Acta Chim. Slov.*, 61, 858–865.
11. Andrade, J. M, y Fasolo, D. (2014). Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and Contribution to Health Promotion. In R. Watson, V. Preedy, y S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols in Human Health and Disease* (Ed. rev., pp. 253-265). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00020-7>
  12. Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A., y Mansor, S. M. (2011). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4), 510-514. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0435-8>
  13. AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis*. 16<sup>th</sup> Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., U.S.A.
  14. AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17<sup>th</sup> Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, U.S.A.
  15. AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*. 18<sup>th</sup> Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., U.S.A.
  16. Apak, R., Capanoglu, E., y Shahidi, F. (2018). *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. Northumberland, UK: Wile
  17. Aparcana, I. M. y Villarreal, L. S. (2014). *Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de Physalis peruviana “aguaymanto” de diferentes lugares geográficos del Perú* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
  18. Aparecida, T. (2014). *Análise fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante do extrato metanólico das flores de Alternanthera paronichioides*. (Tesis de maestría). Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, Brasil.
  19. Apeleo, E. (2016). *Antioxidantes naturales en la dieta de cordero para preservar las características físicas, químicas y sensoriales de su carne enriquecida en ácidos grasos omega 3*. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
  20. Aranceta, J., y Serra, Ll. (2003). *Guía de alimentos funcionales*. Recuperado de [http://www.fesnad.org/resources/files/Publicaciones/guia\\_alimentos\\_funcionales.pdf](http://www.fesnad.org/resources/files/Publicaciones/guia_alimentos_funcionales.pdf)
  21. Araujo-Murakami, A. y Zenteno, F.S. (2006). Bosques de los Andes orientales de Bolivia y sus especies útiles. In M. Moraes, B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius, y H. Balslev

(Eds.), *Botánica Económica de los Andes Centrales* (pp. 146-161).

22. Ardiles, N. E. y Mozo, V. J. (2017). *Determinación del tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado usando antioxidantes sintéticos y naturales mediante uso del rancimat*. (Tesis de pregrado), Universidad Nacional del Santa, Ancash, Perú.
23. Arias, A. J. (2016, 8 de abril). *Cinética de la reacción de los radicales libres con antioxidantes naturales, fenoles*. Trabajo de aplicación, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
24. Ariel, R. (2014). *Obtención de ingredientes alimenticios con capacidad antioxidante mejorada por aplicación de distintos procesos a semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa*)* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
25. Arlene, A. A., Prima, K. A., Utama, L., y Anggraini, S. A. (2015). The Preliminary Study of the Dye Extraction from the Avocado Seed Using Ultrasonic Assisted Extraction. *Procedia Chemistry*, 16, 334-340. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.061>
26. Armenteros, M.; Ventanas, S.; Morcuende, D.; Estévez, M. y Ventanas, J. (2012). *Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos*. Extremadura, España: Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria.
27. Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science y Technology*, 11(11), 419-421. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(01)00027-9)
28. Arts, I. C. W., Van de Putte, B., y Hollman, P. C. H. (2000a). Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1746–1751. <https://doi.org/10.1021/jf000025h>
29. Arts, I. C. W., Van de Putte, B., y Hollman, P. C. H. (2000b). Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1752–1757. <https://doi.org/10.1021/jf000026>
30. Asami, D. K., Hong, Y., Barrett, D. M., y Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural

- Practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1237-1241. <https://doi.org/10.1021/jf020635c>
31. Ayala-Zavala, J., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J., Siddiqui, M. W., ... González-Aguilar G. A (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
  32. Ayuso, M. (2015, 27 febrero). Cinco cosas prohibidas en otros países que comemos en España. *El Confidencial*, pp. 1–2. Recuperado de [https://www.elconfidencial.com/alma-corazon-vida/2013-05-06/cinco-cosas-prohibidas-en-otros-paises-que-comemos-en-espana\\_501942/](https://www.elconfidencial.com/alma-corazon-vida/2013-05-06/cinco-cosas-prohibidas-en-otros-paises-que-comemos-en-espana_501942/)
  33. Bacio, L. V. (2007). *Optimización Multi-Objetivo en el Problema de Metodología de Superficie Multi-Respuesta* (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Matemáticas, A. C., Guanajuato, México.
  34. Bakowska-Barczak, A. M. y Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301-1309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.002>
  35. Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
  36. Balestrin, L., Gaspari, J., Gomes, O., Dall’Stella, D., y Dallarmi, M. (2008). Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multififormis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 230-235.
  37. Balick, M. (1992). *Jessenia y Oenocarpus: palmas aceiteras neotropicales dignas de ser domesticadas*. Roma: FAO.
  38. Ballard, T. (2008). *Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins* (Tesis doctoral). Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, U.S.A.
  39. Balslev, H., Grandez, C., Paniagua, N., Louise, A., y Lykke, S. (2008). Palmas (Arecaceae) útiles en los alrededores de Iquitos, Amazonía Peruana. *Rev. peru. biol.*, 15(1), 121-132.
  40. Baltazar, A. (2012). *Efeito do solvente nas propriedades antioxidantes e no conteúdo em compostos fenólicos de extratos de frutos e folhas de Rubus* (Tesis de maestría). Universidade do Algarve, Faro, Algarve, Portugal.

41. Barbosa, M.O. (2016). *Bioativos em sementes de sete espécies não convencionais ocorrentes no Brasil*. (Tesis doctoral). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
42. Barragán, P. A. (2011). *Potencial saludable de sustancias bioactivas de algunas verduras* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
43. Barreiro, M. F., y Ferreira, I. C. (2014, agosto). *Microencapsulation of natural bioactives for food applications*. Ponencia presentada en LANOTEC- CeNAT- CONARE, San José, Costa Rica. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/153413584.pdf>
44. Baş, D., y Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
45. Belizario, J.C., y Cahuama, P. (2014). *Evaluación de la capacidad antioxidante del copoazú (Theobroma grandiflorum) y ungurahui (Oenocarpus bataua) en el proceso de la elaboración del néctar* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Puerto Maldonado, Madre de Dios, Perú.
46. Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., y Sener A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 35-40. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60020-9](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60020-9)
47. Berardini, N., Knödler, M., Schieber, A., y Carle, R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 6(4), 442–452. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.06.004>
48. Berto, A., Ribeiro, A. B., De Souza, N. E., Fernandes, E., y Chisté, R. C. (2015). Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit Quararibea cordata against ROS and RNS. *Food Research International*, 77, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.018>
49. Bezerra, C. (2014). *Asemeia extraaxillaris (Chodat) J.F.B. Pastore y J.R. Abbott (Polygalaceae) E Microlobius foetidus (Subsp. Paraguensis (Benth.) M. Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): Contribuição ao estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida)* (Tesis doctoral). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
50. Bhandari, B. R., Datta, N., Crooks, R., Howes, T., y Rigby, S. (1997). A semi-empirical

- approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15(10), 2509–2525. <https://doi.org/10.1080/07373939708917373>
51. Binti, H. (2012). *Optimization of extraction parameters of total phenolic compound from Cosmos caudatus* (Tesis de pregrado). Universiti Malaysia Pahang, Malaysia.
52. Bolaños, A. (2013, 26 de abril). Antioxidantes más usados: Su efecto sobre la inmunidad y parámetros productivos de las aves. *Actualidad Avipecuaria*, pp. 1–2. Recuperado de <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/antioxidados-mas-usados-su-efecto-sobre-la-inmunidad-y-parametros-productivos-de-las-aves.html>
53. Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., y Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66(2), 209-215. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00046-1](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00046-1)
54. Boonchu, T., y Utama-ang, N. (2013). Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1079-7>
55. Bora, K., Miguel, O., Andrade, C., y Oliveira, C. A. (2005). Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. *Visão Acadêmica*, 6(2), 6-15. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1079-7>
56. Box, G. E. P., y Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13(1), 1–45.
57. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
58. Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., y Thorngate, J. (2001). *Food Additives* (2<sup>a</sup> ed.). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
59. Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
60. Brewer, M. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 1-27. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
61. Cabeza, S. (2009). *Funcionalidad de las materias primas en la elaboración de galletas*



- (Tesis de maestría). Universidad de Burgos, España.
62. Cacace, J., y Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(02)00497-1)
63. Cai, Y., y Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, 65(6), 1248-1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>
64. Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., y Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.048>
65. Caleja, C., Ribeiro, A., Barros, L., Barreira, J. C., Antonio, A. L., Oliveira, B. P., ... Ferreira, I. (2016). Cottage cheeses functionalized with fennel and chamomile extracts: Comparative performance between free and microencapsulated forms. *Food Chemistry*, 199, 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.085>
66. Çam, M., İçyer, N. C., y Erdoğan, F. (2013). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>
67. Camacho, R. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante e irritabilidad dérmica del aceite de unguurahui Oenocarpus bataua para uso cosmético* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú.
68. Camps, D., Ruffino, S., Majul, E., y Joison, A. (2010). *Bioquímica del estrés oxidativo*. Córdoba, Argentina: Lulu.
69. Cano, A., y Arnao, M. B. (2004). Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina c de zumos de naranja comerciales: relación con sus características organolépticas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(3), 185-189. <https://doi.org/10.1080/11358120409487759>
70. Carbajal, S. y Torres, C. (2016). *Evaluación bromatológica del Oenocarpus bataua C. (ungurahui)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía, Iquitos, Perú.
71. Cartaya, O., y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
72. Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de

- hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos Schultesiana* Krukoff). *Revista Colombia Forestal*, 12, 161-170.
73. Carvalho de Lima, C .M. (2013). *Application of response surface methodology (RSM) to optimize the hybridization efficiency of a PNA probe targeting Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de maestría). University of Porto, Porto, Portugal.
74. Castro, J. B., Ramanathan, A., y Chennubhotla, C. S. (2013). Categorical Dimensions of Human Odor Descriptor Space Revealed by Non-Negative Matrix Factorization. *PLoS ONE*, 8(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073289>
75. Ceballos, A. (2008). *Estudio comparativo de tres sistemas de secado para la producción de un polvo deshidratado de fruta* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
76. Cerón, L. y López, I. (2013). *Extracción y cuantificación de compuestos con actividad antioxidante a partir de cáscaras de tres variedades de papa (Solanum tuberosum) en el departamento de Nariño* (Tesis de pregrado). Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.
77. Chan, J. P. (2015). *Eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos de la mashua (Tropaeolum tuberosum) en la estabilidad del aceite de linaza (Linum usitatissimum l.)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
78. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A., y Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 1-66. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
79. Chen, M., Zhao, Y., y Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.110>
80. Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M., y Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427-1435.
81. Chong, P., Yusof, Y., Aziz, M., Nazli, N. M., Chin, N., y Muhammad, S. S. (2014). Effects of Spray Drying Conditions of Microencapsulation of *Amaranthus gangeticus* Extract on Drying Behaviour. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 33-42.

<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.006>

82. Chordi, S. (2013). *Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad* (Tesis de pregrado). Universitat de Lleida, Lleida, España.
83. Çilek, B. (2012). *Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry (prunus cerasus l.) pomace* (Tesis de maestría). Middle East Technical University, Turkey.
84. Collado, J. (2011). *Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas*. (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España.
85. Conde, CH. (2016). *Efecto de la inclusión de semillas. de chía (salvia hispánica l.), temperatura y tiempo de horneado en la elaboración de galletas enriquecidas* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.
86. Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., y García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047-2053. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>
87. Contreras, L. (2015). *Desarrollo de una galleta dulce enriquecida con harina de quinua blanca (Chenopodium quinoa) utilizando diseño de mezclas*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
88. Cortell, J. M., y Kennedy, J. A. (2006). Effect of Shading on Accumulation of Flavonoid Compounds in (Vitis vinifera L.) Pinot Noir Fruit and Extraction in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8510–8520. <https://doi.org/10.1021/jf0616560>
89. Coward, L., Smith, M., Kirk, M., y Barnes, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1486–1491. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1486s>
90. Criado, C., y Moya, M. (Eds.). (2009). *Vitaminas y Antioxidantes* (Ed. rev.). Madrid, España: Sanidad y Ediciones S.L.
91. Cuaspud, M. (2015). *Obtención de aceite de aguacate microencapsulado mediante secado por atomización* (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
92. Cuervo, S. (2012). *El poder del color: La influencia de los colores en el consumidor*. (Tesis de pregrado). Universidad de León, León, España.
93. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., y Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell' Istituto Superiore di*

- Sanità*, 43(4), 348–361.
94. Dąbrowski, A., Konturek, S. J., Konturek, J. W., y Gabryelewicz, A. (1999). Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *European Journal of Pharmacology*, 377(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00421-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00421-5)
95. Dai, J., y Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
96. Darnet, S., Silva, L., Rodrigues, A., y Lins, R. (2011). Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 488–491.
97. Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., y Marín-Arroyo, M. R. (2012a). Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 941–951. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0848-z>
98. Davidov-Pardo, G., Moreno, M., Arozarena, I., Marín-Arroyo, M., Bleibaum, R., y Bruhn, C. M. (2012b). Sensory and Consumer Perception of the Addition of Grape Seed Extracts in Cookies. *Journal of Food Science*, 77(12), 430–438. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02991.x>
99. De Camargo, A. C., Vidal, C. M. M., Canniatti-Brazaca, S. G., y Shahidi, F. (2014). Fortification of Cookies with Peanut Skins: Effects on the Composition, Polyphenols, Antioxidant Properties, and Sensory Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1–8. <https://doi.org/10.1021/jf503625p>
100. De la Vega, G. (2009). Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 13(38), 27–32.
101. De Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., y Trevisan, M. T. S. (2009a). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689–702.
102. De Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Barros, M. P., Mano, C. M., y Goulart, M. O. F. (2009b). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115(2), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.045>
103. De Souza, V. B., Thomazini, M., Echalar Barrientos, M. A., Nalin, C. M., Ferro-Furtado,

- R., Genovese, M. I., y Favaro-Trindade, C. S. (2017). Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 77, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.040>
104. Decker, E., Elias, R., y McClements, J. (Eds.). (2010). *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Cornwall, UK: Woodhead Publishing Series.
105. Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B., y Latruffe, N. (2006). Resveratrol as a Chemopreventive Agent: A Promising Molecule for Fighting Cancer. *Current Drug Targets*, 7(4), 423–442. <https://doi.org/10.2174/138945006776359331>
106. Desai, K. G. H., y Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. <https://doi.org/10.1081/drt-200063478>
107. Díaz, F., Santos, E., Filardo, S., Villagómez, R., y Scheinvar, L. (2006). Colorant extraction from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5(2), 1330-1337.
108. Díaz, G., Escobar, W., y Pizarro, E. (2013). Estrés Oxidativo Cuando el equilibrio se pierde. *Motricidad y Persona*, 13, 45-60.
109. Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., y Wang, W. (2010). Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.05.006>
110. Dorta, E. (2014). Obtención de extractos con elevada actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de piel y semilla de mango. In M. González, y M. G. Lobo (Eds.), *TD. Ciencias* (pp. 1–278). Recuperado de <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/66>
111. Dos Santos, M., Mamede, R., Rufino, M., De Brito, E., y Alves, R. (2015). Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. *Antioxidants*, 4(3), 591–602. <https://doi.org/10.3390/antiox4030591>
112. Dranca, F., y Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.008>
113. Dueñas, J. (2014). *Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad Quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas*

- convencionales y extracción asistida por ultrasonido.* (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
114. El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science y Technology*, 44(12), 2512–2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
115. Elejalde, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326–335.
116. Elizalde, A., Porrilla, Y., y Chaparro, D. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(1), 45–54.
117. Escamilla, C. I., Cuevas, E. Y., y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 1–3.
118. Escobar, J., Pardo, E., Buitrago, G., & López, L. (2004). Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. *Revista colombiana de Biotecnología*, 6(2), 43–53.
119. Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A. (2005). Constituyentes bioactivos no nutricionales de origen vegetal. In M. Juárez, A. Olano, y F. Morais (Eds.), *Alimentos Funcionales* (pp. 101–153). Madrid, España: RUMAGRAF S.A.
120. Estrada, K. (2013). *Estudio de la liberación de antocianinas y otros compuestos fenólicos de maíz morado desde el interior de una emulsión doble  $W_1/O/W_2$  y determinación del coeficiente de difusión.* (Tesis de maestría). Universidad Iberoamericana, México D.F.; México.
121. Ezhilarasi, P., Indrani, D., Jena, B., y Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.009>
122. Fang, Z., y Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science y Technology*, 21(10), 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
123. Fang, Z., y Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.093>
124. Farhadi, K., Esmailzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., y Molaie, R. (2016). Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed,

- cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry*, 199, 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083>
125. Fazaeli, M., Tahmasebi, M., y Emam-Djomeh, Z. (2012). Characterization of food texture: application of Microscopic technology. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*, 855–871.
  126. Feduchi, E. (2010). Rutas centrales del metabolismo intermediario. In E. Feduchi, I. Blasco, C. Romero, y E. Yáñez (Eds.), *Bioquímica: Conceptos esenciales* (Ed. rev., pp. 237–252). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
  127. Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M., Valentão, P., Andrade, P., González-Álvarez, J., y Pereira, J. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
  128. Ferrari, C. C., Pereira, C., Liserre, A. M., Moreno, I., Marconi, S., y De Aguirre, J. M. (2011). *Spray Drying of Blackberry Juice using Maltodextrin or Gum Arabic as Carrier Agents*. Documento presentado en Proceedings of the 6th CIGR Section VI International Symposium “Towards a sustainable Food Chain”. Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management., Nantes, France.
  129. Ferreira, I., Rocha, S., y Coelho, M. (2007). Encapsulation of Antioxidants by Spray-Drying. *Chemical Engineering Transactions*, 11(2), 713–717.
  130. Fontana, A. R., Antonioli, A., y Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
  131. Food and Drug Administration (2018a). *List of classifications, Volumes 1-123*. Recuperado de <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>
  132. Food and Drug Administration (2018b, 9 abril). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. Recuperado 10 septiembre, 2018, de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.110>
  133. Food and Drug Administration (2018c, 9 abril). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. Recuperado 10 septiembre, 2018, de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.115>
  134. Four Magazine. (2015, 16 diciembre). Chefs Pantry | Central [Foto]. Recuperado 13

- diciembre, 2017, de <http://www.four-magazine.com/tasting-notes/chefs-pantry-central/>
135. Fuentes Berrio, L., Acevedo Correa, D., y Gelvez Ordoñez, V. M. (2015). Alimentos funcionales: Impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 140–149. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)140-149](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)140-149)
  136. Funasaki, M., Barroso, H. S., Fernandes, V. L. A., y Menezes, I. S. (2016). Amazon rainforest cosmetics: Chemical approach for quality control. *Química Nova*, 39(2), 194–209. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160008>
  137. Gallardo, G., Guida, L., Martínez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., y Hermida, L. G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.020>
  138. Ganem, J. (2007). *Atividade biológica da semente de Mucuna pruriens* (Tesis de maestría). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
  139. Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A., y Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the food industry*. California, USA: Elsevier.
  140. García, F. J. (2005). *Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes* (Tesis doctoral). Universidad de Murcia, España.
  141. García, R. (2012, 21 febrero). La Salud Integral: Radicales libres. Recuperado 22 septiembre, 2017, de <http://www.lasaludintegral.es/index.php/2012/02/21/radicales-libres/>
  142. Garti, N., y McClements, D. J. (2012). *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
  143. Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: *Revisión*. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27–36.
  144. Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., y Jo, I. H. (2009). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
  145. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., y Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>



146. Giannuzzo, A. N., Nazareno, M. A., Mishima, H. T., y López de Mishima, B. A. (2000). Extracción de naringina de *Citrus paradisi* L. estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20(2), 257–261. <https://doi.org/10.1590/s0101-2061200000020002>
147. Gibbs, B., Kermasha, S., Alli, I., y Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213–224.
148. Gimeno, D. (2015). *Optimización de la extracción de compuestos de interés en subproductos de frutas tropicales para su aplicación en matrices alimentarias*. (Tesis de maestría). Universidad de Zaragoza, España.
149. Gómez, M. (2015). *Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
150. Gonzáles, A., y Torres, G. (2011). *Manual de producción de plantones de *Oenocarpus bataua* C. Martius “Ungurahui”*. Iquitos: IIAP. Recuperado de: [http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/95/2/gonzales\\_Libro\\_2011.pdf](http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/95/2/gonzales_Libro_2011.pdf)
151. Gonzáles, A., Mejía, K., y Torres, G. (2014). Caracterización morfológica de frutos de *Oenocarpus bataua* C. Martius “ungurahui”. *Folia Amazónica*, 23(2), 131–138.
152. González, M., y González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2(12), 1842–1866. <https://doi.org/10.1039/c0ay00361a>
153. González, V., Rodeiro, C., Sanmartín, C., y Vila, S. (2014). Introducción al Análisis Sensorial: Estudio hedónico del pan en el IES Mugardos. Recuperado de <http://www.seio.es/descargas/Incubadora2014/GaliciaBachillerato.pdf>
154. González-Montelongo, R., Lobo, M., y González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.01>
155. González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., y Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3–9.
156. Gregori, S. (2017, 8 mayo). La formación de los radicales libres [Publicación en un blog]. Recuperado 22 septiembre, 2017, de <http://www.binipatia.com/la-formacion-de-los-radicales-libres/>
157. Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of*

- Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
158. Gutiérrez, J., y Morales, J. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Medicina Interna de México*, 20(4), 287–295.
159. Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Mykkänen, H. M., y Törrönen, A. R. (2000). Influence of Domestic Processing and Storage on Flavonol Contents in Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2960–2965. <https://doi.org/10.1021/jf991274c>
160. Halliwell, B. (2001). Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs y Aging*, 18(9), 685–716. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>
161. Handa, C., Goomer, S., y Siddhu, A. (2011). Physicochemical properties and sensory evaluation of fructoligosaccharide enriched cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 192–199. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0277-4>
162. Hemwimol, S., Pavasant, P., y Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.09.009>
163. Herazo, I. C. (2013). *Obtención y estabilización de antocianinas de berenjena (Solanum melongena L.) mediante microencapsulación y su evaluación como compuesto funcional en la industria alimentaria* (Tesis de maestría). Universidad de Córdoba, Argentina.
164. Herrera, Y. M. (2013). *Microencapsulación de compuestos con poder antioxidante extraídos a partir de semillas sin fermentar de Theobroma cacao y Theobroma grandiflorum* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
165. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., y Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20(1), 21–29. <https://doi.org/10.1080/01635589309514267>
166. Hidalgo, P. S. P., Nunomura, R. C. S., y Nunomura, S. M. (2016). Amazon Oilseeds: Chemistry and Antioxidant Activity of Patawa (*Oenocarpus bataua* Mart.). *Revista Virtual de Química*, 8(1), 130-140. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160009>
167. Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C., Martin-Diana, A. B., y Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.001>

168. Hostetler, G. L., Ralston, R. A., y Schwartz, S. J. (2017). Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(3), 423–435. <https://doi.org/10.3945/an.116.012948>
169. Huang, D., Ou, B., y Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
170. Hunter, W. G., y Koehler, T. L. (2005). Metodología de la superficie de respuesta. In J. M. Juran, F. M. Gryna., y R. S. Bingham (Eds.), *Manual de control de la calidad* (2ª ed., pp. 917–927). Barcelona, España: Editorial Reverté.
171. Ibáñez, F. C., Torre, P., y Irigoyen, A. (2003). Aditivos Alimentarios. *Nutrición y Bromatología*, 1–10.
172. Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
173. Inocente (2009). *Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de Triplaris americana L. (Tangarana colorada)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
174. Jacobo-Velázquez, D., y Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *Journal of Food Science*, 74(9), 107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01352.x>
175. Jamwal, A., Kumar, S., Bhat, Z. F., Kumar, A., y Kaur, S. (2015). The quality and storage stability of chicken patties prepared with different additives. *Nutrition y Food Science*, 45(5), 728–739. <https://doi.org/10.1108/nfs-01-2015-0009>
176. Jang, S., Lee, A. Y., Lee, A. R., Choi, G., y Kim, H. K. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice using response surface methodology. *Integrative Medicine Research*, 6(4), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.003>
177. Jesionkowska, K., Sijtsema, S. J., Konopacka, D., y Symoneaux, R. (2009). Dried fruit and its functional properties from a consumer's point of view. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(6), 85–88. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512601>
178. Jiménez, M. G. (2015). Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto.

179. Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., ... Yiu, L. (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chemistry*, 132(3), 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.00>
180. Kadoma, Y., Ito, S., Yokoe, I., y Fujisawa, S. (2008). Comparative Study of the Alkyl and Peroxy Radical-scavenging Activity of 2-t-Butyl-4-methoxyphenol (BHA) and its Dimer, and their Theoretical Parameters. *In vivo*, 22, 289–296.
181. Kanner, J. (2010). Metals and food oxidation. In E. A. Decker, R. J. Elias, y D. J. McClements (Eds.), *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications* (pp. 36–54). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Series.
182. Karadag, A., Ozcelik, B., y Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
183. Kha, T. C., Nguyen, M. H., y Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016>
184. Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., y Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.037>
185. Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H. A., y Soliman, S. A. (2016). Optimizing Bioactive Substances Extraction Procedures from Guava, Olive and Potato Processing Wastes and Evaluating their Antioxidant Capacity. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology*, 2(1). <https://doi.org/10.17756/jfcn.2016-027>
186. Khanam, Z., Wen, C. S., y Bhat, I. U. H. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.04.006>
187. Konica Minolta Sensing Americas Inc. (s.f.). Entendiendo El Espacio de Color CIE L\*A\*B\* [Publicación en un blog]. Recuperado 10 octubre, 2017, de <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>

188. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., y Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(5), 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.09.003>
189. Kuck, L. S., y Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194, 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>
190. Kudou, S. H., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K. et al. (1991). Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (*Glycine max* MERRILL). *Agric. Biol. Chem.*, 55(9), 2227–2233.
191. Kumar, V., y Sharma, H. K. (2016). Process optimization for extraction of bioactive compounds from taro (*Colocasia esculenta*), using RSM and ANFIS modeling. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 704–718. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9440-y>
192. Laine, P., Kylli, P., Heinonen, M., y Jouppila, K. (2008). Storage Stability of Microencapsulated Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11251–11261. <https://doi.org/10.1021/jf801868h>
193. Lan, S., Lin, J., y Zheng, N. (2014). Evaluation of the Antioxidant Activity of *Coreopsis tinctoria* Nutt. and Optimisation of Isolation by Response Surface Methodology. *Acta Pharmaceutica*, 64(3), 369–378. <https://doi.org/10.2478/acph-2014-0026>
194. Landete, J. M. (2013). Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706–721. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.555018>
195. Lapornik, B., Prošek, M., y Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>
196. Larrea, J. (2012). *Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario*. (Tesis de maestría). Universidad Pública de Navarra, España.
197. Leba, L., Brunschwig, C., Saout, M., Martial, K., Bereau, D., y Robinson, J. (2016). *Oenocarpus bacaba* and *Oenocarpus bataua* Leaflets and Roots: A New Source of Antioxidant Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1014. <https://doi.org/10.3390/ijms17071014>

198. León, K., Mery, D., Pedreschi, F., y León, J. (2006). Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006>
199. Li, H., Pordesimo, L., y Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.02.016>
200. Li, H., Zhang, Z., Xue, J., Cui, L., Hou, T., Li, X., y Chen T. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 36(4), 686–693. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.13516>
201. Lingzhu, L., Lu, W., Dongyan, C., Jingbo, L., Songyi, L., Haiqing, Y., y Yuan Y. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from maize filaments by response surface methodology and its identification. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 152–163. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.022>
202. Liria, M. (2007). Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos. Lima: Agrosalud. Recuperado de <http://lac.harvestplus.org/wp-content/uploads/2008/02/Guia-para-la-evaluacion-sensorial-de-alimentos.pdf>
203. Liu, F., Ma, C., Gao, Y., y McClements, D. J. (2016). Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 76–95. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12229>
204. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
205. Lopera, S., Guzmán, C., Cataño, C., y Gallardo, C. (2009). Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. *Vitae*, 16(1), 55–65.
206. Lozano, M. (2009). *Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de opuntia stricta mediante secado por atomización*. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España.
207. Lu, Y., y Foo, L. (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 59(2), 187–194. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(96\)00287-](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(96)00287-)

208. Lu, Y., y Foo, L. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, 65(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(98\)00245-3](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(98)00245-3)
209. Luna, J. J., López, J. M., Jiménez, O., y Luna, L. (2016). Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(10), 1–11.
210. Machado, A. (2008, 20 agosto). Pataua na terra da gente [Foto]. Recuperado 13 diciembre, 2017, de <http://www.altinomachado.com.br/2008/08/patau-na-terra-da-gente.html>
211. Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., y Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
212. Madhavi, D. L., Salunkhe, D. K., y Deshpande, S. S. (1996). *Food Antioxidants: Technological: Toxicological and Health Perspectives*. New York, USA: Marcel Decker.
213. Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., y Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
214. Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., y Baiti, I. (2016). Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.010>
215. Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Ceballos, G., y Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*, 33–39.
216. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
217. Manley, D. (2001). *Biscuit, cracker and cookie recipes for the food industry* (3ª ed.). Florida, USA: CRC Press.
218. Marcolino, V. A., Zanin, G. M., Durrant, L. R., Benassi, M. D. T., y Matioli, G. (2011). Interaction of Curcumin and Bixin with  $\beta$ -Cyclodextrin: Complexation Methods, Stability, and Applications in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3348–3357. <https://doi.org/10.1021/jf104223k>
219. Marinho, M. (2017). *Caracterização fitoquímica dos extratos de resíduo de duas espécies*

- euterpe e sua aplicabilidade biotecnológica*. Ponencia presentada en el 57° Congresso Brasileiro de Química, Centro de Eventos da FAURGS, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.
220. Marquardt, K. C., y Watson, R. R. (2014). Polyphenols and Public Health. In R. R. Watson, V. R. Preedy, y S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 9–15). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00002-5>
221. Martín, M. J., Morales, M. E., Gallardo, V., y Ruiz, M. A. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 50(1), 43–50.
222. Martín, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1). Recuperado: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1968/2366>
223. Martínez, C. I., Rivas, S. M. (2012). *Aplicación de la técnica de Folin-ciocalteu para cuantificación de polifenoles totales en cápsulas fitomedicinales*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua.
224. Martínez, E. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, 38, 315–322.
225. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271–278.
226. Martínez, M. P. (2016). *Residuos de alcachofa (Cynara scolymus L.) variedad 'Lorca' como fuente de compuestos fenólicos y su aplicación como antioxidantes* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
227. Martínez-Navarrete, N., Camacho, M., y Martínez, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/s1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/s1138-0322(08)75623-2)
228. Matos, F. J. A. (1997). *Introdução à fitoquímica experimental* (2ª ed.). Fortaleza, Brasil: Edições UFC.
229. Medina, L. (2013). *Obtención de maltodextrinas por vía enzimática a partir del almidón de camote (Ipomoea batatas)*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Jiquilpan, Michoacán, México.
230. Medina-Torres, L., García-Cruz, E., Calderas, F., González Laredo, R., Sánchez-Olivares,



- G., Gallegos-Infante, J., ... Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 642–650. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.038>
231. Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., y Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
232. Mehta, S. K., y Gowder, S. J. T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. <http://dx.doi.org/10.5772/61884>
233. Mejía, C.M. (2009). *Elaboración de galletas enriquecidas con concentrado proteico foliar de zanahoria (Daucus carota)*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho, Perú.
234. Mendes, R. F. (2014). *Investigação do potencial químico e farmacológico de Xylopiá sericea A. St.-Hil. (Annonaceae)* (Tesis de maestría). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.
235. Mercado-Mercado, G., De la Rosa, L., Wall-Medrano, A., López, J., y Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 36–46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
236. Miranda, J., Montaña, F., Zenteno, F., Nina, H., y Mercado, J. (2008). *El Majo (Oenocarpus bataua): una Alternativa de Biocomercio en Bolivia*. La Paz, Bolivia: Trópico.
237. Mishra, K., Ojha, H., y Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
238. Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Sakač, M., Mandić, A., Sedej, I., Šimurina, O., y Tumbas, V. (2011). Antioxidant Activity of Medicinal Plant Extracts in Cookies. *Journal of Food Science*, 76(9), 1239–1244. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02400.x>
239. Mokrani, A., y Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>

240. Montes De Oca, D. (2014). *Contenido fenólico y actividad antioxidante de extractos metanólicos obtenidos de las hojas y los frutos de Pittosporum pentandrum* (Tesis de pregrado), Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
241. Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (2ª ed.). Ciudad de México, México: Limusa.
242. Montúfar, R., y Pintaud, J. C. (2008). Estatus taxonómico de *Oenocarpus bataua* (Euterpeae, Arecaceae) inferido por secuencias del ADN cloroplástico. *Rev. peru. biol.*, 15(1), 73–78.
243. Montúfar, R., Laffargue, A., Pintaud, J., Hamon, S., Avallone, S., y Dussert, S. (2010). *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): Rediscovering a Source of High Oleic Vegetable Oil from Amazonia. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(2), 167–172. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1490-4>
244. Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas, M. L. V., ... Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013>
245. Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., ... Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.12>
246. Moreno, J. (2013). *Extracción de compuestos antioxidantes del gel de Aloe vera. Optimización del proceso mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta*. (Tesis de pregrado). Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, España.
247. Morones, P. M. (2012). *Efecto de la fortificación de galletas de avena con harina de lenteja y aceite de linaza y su impacto en la vida de anaquel* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
248. Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00223-5)
249. Muñoz, A. M., Fernández, A., Ramos, F., y Alvarado-Ortiz, C. (2007). Evaluación de la

- actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Rev Soc Quím Perú*, 73(1), 30–40.
250. Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P., y Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(5), 977–985. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2353-9>
251. Nanditha, B., y Prabhasankar, P. (2008). Antioxidants in Bakery Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 1–27. <https://doi.org/10.1080/10408390701764104>
252. Natukunda, S., Muyonga, J. H., y Mukisa, I. M. (2015). Effect of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed on antioxidant activity, phytochemicals, physicochemical characteristics, and sensory acceptability of enriched cookies and mango juice. *Food Science y Nutrition*, 4(4), 494–507. <https://doi.org/10.1002/fsn3.311>
253. Natura. (2014). Natura Campus [Foto]. Recuperado 13 diciembre, 2017, de <http://www.naturacampus.com.br/cs/naturacampus/post/2017-11/post-4-patau%C3%A1>
254. Nawar, W. W. (1996). Lipids. In O. R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry* (3ª ed., pp. 225–304). New York, USA: Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.).
255. Neri, E. P. (2007). *Estudio del efecto reológico en la elaboración de pastel de chocolate bajo en grasa y carbohidratos utilizando maltodextrina y celulosa como sustitutos* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo Hgo., México.
256. NTP 206.001. (2016). PANADERÍA, PASTELERÍA Y GALLETTERÍA. Galletas. Requisitos (pp. 1-7). Lima: INACAL.
257. Nunes, I. L., y Mercadante, A. Z. (2007). Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(5), 893–900. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000500018>
258. Nunes, G. L., Boaventura, B. C. B., Pinto, S. S., Verruck, S., Murakami, F. S., Prudêncio, E. S., y De Mello Castanho Amboni, R. D. (2015). Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 151, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.031>
259. Ocampo-Duran, A., Fernández-Lavado, A. P., y Castro-Lima, F. (2013). Aceite de la palma de seje *Oenocarpus bataua* Mart. por su calidad nutricional puede contribuir a la conservación y uso sostenible de los bosques de galería en la Orinoquia Colombiana.

- Orinoquia*, 17(2), 215–229.
260. Okumura, F., Soares, M. H. F. B., y Cavalheiro, É. T. G. (2002). Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. *Química Nova*, 25(4), 680–683. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000400025>
261. Olaya, C. M., Castaño, M. P., y Garzón, G. A. (2009). Efecto de la temperatura, almacenamiento y la actividad de agua sobre la estabilidad de antocianinas de *Rubus glaucus* y *Solanum betaceum Cav. dark-red strain*. *Acta biológica Colombiana*, 14(3), 143–158.
262. Olaya, J. A., y Restrepo, L. P. (2012). Estudio del contenido de fenoles y actividad antioxidante de guayaba en diferentes estados de madurez. *Acta biológica Colombiana*, 17(3), 611–624.
263. Oliveira, V. B., Yamada, L. T., Fagg, C. W., y Brandão, M. G. (2012). Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*, 48(1), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.011>
264. Oliveira, V., Zuchetto, M., Oliveira, C., Paula, C., Duarte, A., Miguel, M., y Miguel, O. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 18(1), 230–239. [https://doi.org/10.1590/1983-084x/15\\_106](https://doi.org/10.1590/1983-084x/15_106)
265. Olvera, M. A., Martínez, C. A., y Real de León, E. (1993, mayo). Manual de Técnicas para Laboratorio de Nutricion de Peces y Crustáceos. Recuperado 17 diciembre, 2017, de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S00.htm>
266. Omena, C. M. B., Valentim, I. B., Guedes, G. S., Rabelo, L. A., Mano, C. M., Bechara, E. J. H., ... Goulart, M. O. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, 49(1), 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.010>
267. Ong, L. J., Soh, A. S., Shahzad, M., y Syarhabil, M. (2016). Optimization of Ficus deltoidea Using Ultrasound-Assisted Extraction by Box-Behnken Statistical Design. *Recent Advances in Biology and Medicine*, 02, 71–78. <https://doi.org/10.18639/rabm.2016.02.293654>
268. Ortuño, J., Serrano, R., Jordán, M. J., y Bañón, S. (2014). Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or

- 400mgkg<sup>-1</sup>. *Meat Science*, 96(4), 1452–1459. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.021>
269. Paladino, S. C. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera l.)*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
270. Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(10), 1249–1262. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.07.003>
271. Papadakis, S. E., y King, C. J. (1988). Air temperature and humidity profiles in spray drying. 2. Experimental measurements. *Industrial y Engineering Chemistry Research*, 27(11), 2116–2123. <https://doi.org/10.1021/ie00083a027>
272. Park, S. H., Kim, H. J., y Cho, J. I. (2008). Optimal Central Composite Designs for Fitting Second Order Response Surface Linear Regression Models. In C. H. Shalabh (Ed.), *Recent Advances in Linear Models and Related Areas* (pp. 323–339). Heidelberg, Germany: Physica-Verlag HD.
273. Pasrija, D., Ezhilarasi, P., Indrani, D., y Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.054>
274. Pastore, F., Fernandes de Araújo, V., Petry, A. C., Martinez-Echevarria, R., y Costa-Fernandes, E. (2005). *Plantas da Amazônia para Produção Cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia* (Projeto ITTO PD 31/99). Brasília, Brasil: Universidade de Brasília, Instituto de Química, Laboratório de Tecnologia Química.
275. Patel, S. (2015). *Emerging Bioresources with Nutraceutical and Pharmaceutical Prospects*. California, USA: Springer.
276. Pedroza-Islas, R. (2002). Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola: Vol. 6. Avances en Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.
277. Pekić, B., Kovač, V., Alonso, E., y Revilla, E. (1998). Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry*, 61(1/2), 201–206.

[https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(97\)00128-3](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(97)00128-3)

278. Peng, X., Ma, J., Cheng, K., Jiang, Y., Chen, F., y Wang, M. (2010). The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.083>
279. Peña, C. B., y Restrepo, L. P. (2013). Compuestos fenólicos y carotenoides en la papa: revisión. *Nutrición*, 14(1), 25–32.
280. Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., y Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68–81.
281. Perea, X. P. (2013). *Análisis de compuestos fenólicos y valoración de la bioactividad de extractos de testa de Jatropha curcas L. no tóxica*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
282. Peres, I., Rocha, S., Gomes, J., Morais, S., Pereira, M. C., y Coelho, M. (2011). Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.029>
283. Pérez, H. (2017). *Industria de elaboración de galletas*. (Tesis de pregrado). Universidad de La Rioja, España.
284. Pérez-Serradilla, J., y Luque de Castro, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124(4), 1652–1659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.046>
285. Petrović, J., Loncarevic, I., Šaponjac, V. T., Pajin, B., y Zaric, D. (2016). Physical characteristics of cookies enriched with microencapsulated cherry pomace extract. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 10(4), 223–226.
286. Pina, N., Silva, J., Miranda, E., y Almeida, G. (2017, noviembre). *Estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana dos frutos de Oenocarpus bacaba MART. [Arecaceae]*. Ponencia presentada en el 54° Congresso Brasileiro de Química. Natal/Rio Grande do Norte, Brasil.
287. Pinedo, M., Rengifo, E., y Cerrutti, T. (1997). *Plantas medicinales de la Amazonía peruana, estudio de su uso y cultivo*. Iquitos, Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Recuperado de <http://repositorio.iiap.org.pe/handle/IIAP/131>
288. Pires, S. S., y Lima, R. A. (2017, junio). *Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de Oenocarpus bataua MART. (Aracaceae)*. Ponencia presentada en el VIII Seminário de Pós-Graduação e Pesquisa y I Simpósio de Inovação, Propriedade Intelectual e Tecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Rondônia, Brasil.

289. Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629–642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>
290. Porrás-Loaiza, A. P., y López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121–134.
291. Price S. F. (1994). *Sun Exposure and Flavonols in Grapes*. Tesis doctoral. Oregon State University, Oregon, USA.
292. Prieto, P., Pineda, M., y Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
293. ProChile. (2014). Tendencias del Mercado: Alimentos Funcionales en Reino Unido. Recuperado de <https://www.prochile.gob.cl/documento-biblioteca/alimentos-funcionales-en-el-reino-unido/>
294. PromPeru. (2013a). El mercado de productos naturales, para la industria de Alimentos Funcionales, Cosmética y Farmacéutica en Suiza. Recuperado de [http://repositorio.promperu.gob.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/2877/Mercado\\_productos\\_naturales\\_industria\\_alimentos\\_funcionales\\_cosmetica\\_Suiza\\_2013\\_keyword\\_principal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.promperu.gob.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/2877/Mercado_productos_naturales_industria_alimentos_funcionales_cosmetica_Suiza_2013_keyword_principal.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
295. PromPeru. (2013b). Alimentos peruanos para el mundo. Recuperado de <http://www.siicex.gob.pe/siicex/documentosportal/529122432rad8267E.pdf>
296. PromPeru. (2014). Canales de Distribución de Insumos Naturales para Alimentos Funcionales en la Unión Europea. Recuperado de <http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/estudio/866047590radC4768.pdf>
297. Puértolas, E., Luengo, E., Álvarez, I., y Raso, J. (2012). Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 263–282. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101208>
298. Quispe, F., Ayala, M., Ingunza, G., Landeo, E., y Pascual, G. (2009). Caracterización de aceites, tortas y harinas de frutos de unguurahui (*Jessenia polycarpa*) y aguaje (*Mauritia flexuosa* L.) de la Amazonía peruana. *Rev Soc Quím Perú*, 75(2), 243–253.
299. Race, S. (Ed.). (2009). *Antioxidants*. Northumberland, UK: Tigmor Books.

300. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., y Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 2014, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
301. Rainforest Alliance. (2014). Ungurahui: una alternativa económica para las comunidades nativas y para la conservación de los bosques de Madre de Dios. Recuperado: 23 de agosto del 2017, de <https://www.rainforest-alliance.org/lang/es/publications/ungurahui-communities>
302. Rajaei, A., Barzegar, M., Hamidi, Z., y Sahari, M. A. (2010). Optimization of Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistachia vera*) Green Hull through Response Surface Method. *J. Agr. Sci. Tech.*, 12, 605–615.
303. Ramanjaneyulu, G., y Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of Xylanase Production through Response Surface Methodology by *Fusarium sp.* BVKT R2 Isolated from Forest Soil and Its Application in Saccharification. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01450>
304. Ramírez, M. J. (2013). *Evaluación de variables de un proceso de microencapsulación para la estabilización de polifenoles*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
305. Ramírez, M. E. (2017). *Propiedades funcionales de hoy*. Cuautitlán, México: OmniaScience.
306. Ré, M. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16(6), 1195–1236. <https://doi.org/10.1080/07373939808917460>
307. Reyes-Jurado, F., Palou, E., y López-Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68–78.
308. Rezaire, A., Robinson, J., Bereau, D., Verbaere, A., Sommerer, N., Khan, M., ... Fils-Lycaon, B. (2014). Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): Chemical and biological antioxidant activity – Phytochemical composition. *Food Chemistry*, 149, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.077>
309. Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J. C., Dias, M. M., Barros, L., Barreiro, F., y Ferreira, I. C. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.061>



310. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
311. Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., y Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science y Technology*, 45(7), 1386–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
312. Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., ... Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 18(3), 3–8.
313. Rodríguez-Nogales, J. M., Ortega, N., Perez-Mateos, M., y Busto, M. D. (2007). Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. *Food Chemistry*, 101(2), 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.055>
314. Rojano, B. A. (1997). *Oxidación de lípidos y antioxidantes*. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química.
315. Rojano, B. A., Gaviria, C. A., y Sáez, J. A. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*, 15(2), 212–218.
316. Rojas-Llanes, P., Martínez, J. R., Stashenko, E. E., y Rojas-Llanes, J. (2014). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Vitae*, 21(3), 218–227.
317. Rondón, M., Moncayo, S., Cornejo, X., Santos, J., Villalta, D., Siguencia, R., y Duche, J. (2017). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>
318. Rosenberg, M., Kopelman, I. J., y Talmon, Y. (1985). A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. *Journal of Food Science*, 50(1), 139–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13295.x>
319. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., y Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical*

- Excipients*. (6ª ed.). London, UK: Pharmaceutical Press.
320. Ruiz, J. C., y Segura, M. R. (2016). *New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds*. West Sussex, UK: Wiley.
321. Rustom, A. (2012). *Estadística descriptiva, probabilidad e inferencia. Una visión conceptual y aplicada*. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Economía Agraria.
322. Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J., y Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, *114*(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>
323. Sagis, L. M. C. (2015). *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. London, UK: Elsevier.
324. Sahin, S., y Gülüm, S. (2006). *Physical Properties of foods*. Ankara, Turkey: Board.
325. Saikia, S., Mahnot, N. K., y Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry*, *171*, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.064>
326. Salazar, R., Espinoza, G., Ruiz, C., Fernández, M. F., y Rojas, R. (2011). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes del aroma de 8 vinos peruanos. *Rev Soc Quím Perú*, *77*(2), 135–143.
327. Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F. T., y Guerrero-Beltrán, J. A. (2009). Evaluación de agentes antioxidantes de un extracto de flor de jamaica microencapsulado. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *3*(2), 14–25.
328. Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., y Lee, Y. S. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*, *22*(6), 696. <https://doi.org/10.1039/b514045p>
329. Salinas, Y., García, C., Coutiño, B., y Vidal, V. A. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista fitotecnia mexicana*, *36*(3-A), 285–294.
330. Sánchez, V. y Santa, J. F. (2009). *Estudio de antraquinonas presentes en extractos de mucílago y hojas de Aloe vera de plantas cultivadas en la región cafetera*. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
331. Sánchez, M. A. (2013). *Antioxidantes: Consumo de antioxidantes Naturales em adultos mayores de entre 65 y 75 años com Dislipidemia*. (Tesis de pregrado). Universidad Abierta

- Interamericana, B.A., Argentina.
332. Sandesh, P., Velu, V., y Singh, R. P. (2014). Antioxidant activities of tamarind (*Tamarindus Indica*) seed coat extracts using in vitro and in vivo models. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1965–1973. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1210-9>
  333. Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Valadez-Blanco, R., Hernández-Carlos, B., y Guadarrama-Mendoza, P. C. (2017). Natural antioxidant extracts as food preservatives [pdf]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16(4), 361–370. <https://doi.org/10.17306/j.afs.2017.0530>
  334. Sarkar, A., y Ghosh, U. (2016). Natural Antioxidants - The Key to Safe and Sustainable Life. *International Journal of Latest Trends in Engineering and Technology*, 6(3), 460–466.
  335. Scalbert, A., y Williamson, G. (2000). Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine. *Journal of Medicinal Food*, 3(2), 121–125. <https://doi.org/10.1089/109662000416311>
  336. Segovia, F., Lupo, B., Peiró, S., Gordon, M., y Almajano, M. (2014). Extraction of Antioxidants from Borage (*Borago officinalis* L.) Leaves—Optimization by Response Surface Method and Application in Oil-in-Water Emulsions. *Antioxidants*, 3(2), 339–357. <https://doi.org/10.3390/antiox3020339>
  337. Segovia, F., Peiró, S., Gallego, M., Mohd, N., y Almajano, M. (2014). Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food. *Antioxidants*, 3(2), 439–454. <https://doi.org/10.3390/antiox3020439>
  338. Segovia, F. J., Corral-Pérez, J. J., y Almajano, M. P. (2016). Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 85, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.005>
  339. Sen, S., y Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. In S. Andreescu, y M. Hepel (Eds.), *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy* (pp. 1–37). <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1883.ch001>
  340. Shahidi, F., y Han, X. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501–547. <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>
  341. Shahidi, F., y Naczk, M. (2003). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. Florida, USA: CRC Press.
  342. Shahidi, F., y Zhong, Y. (2005). Antioxidants: Regulatory Status. In F. Shahidi (Ed.),

- Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (6<sup>a</sup> ed., pp. 491–509). Newfoundland, Canada: John Wiley y Sons.
343. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., y Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 291–299. <https://doi.org/10.1089/109662003772519831>
344. Sing de Ugaz, O. L. (1997). *Colorantes Naturales* (Ed. rev.). Lima, Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
345. Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)
346. Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., y Perera, C. O. (2010). Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review. *Journal of Food Science*, 75(8), 163–174. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x>
347. Skowyra, M. (2014). *Antioxidant properties of extracts from selected plant materials (Caesalpinia spinosa, Perilla frutescens, Artemisia annua and Viola wittrockiana) in vitro and in model food systems*. Tesis doctoral, Department of Chemical Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.
348. Soler, A. (2009). *Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional* (Tesis doctoral). Universidad de Lleida, España.
349. Soong, Y., y Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>
350. Soria, A. C., y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
351. Sosa, R. (1997). *El poder medicinal de las Plantas*. Benito Juárez, México: Gema Editores.
352. Sosnik, A., y Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>

353. Sosnowska, J., Ramirez, D., y Millán, B. (2010). Palmeras usadas por los indígenas Asháninkas en la Amazonía Peruana. *Rev. peru. biol.*, 17(3), 347–352.
354. Sotero, V., Maco, M., Vela, J., Merino, C., Dávila, E., y García, D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(1), 66–74.
355. Soto-García, M., y Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/s0718-221x2016005000061>
356. Sousdaleff, M., Baesso, M. L., Neto, A. M., Nogueira, A. C., Marcolino, V. A., y Matioli, G. (2013). Microencapsulation by Freeze-Drying of Potassium Norbixinate and Curcumin with Maltodextrin: Stability, Solubility, and Food Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4), 955–965. <https://doi.org/10.1021/jf304047g>
357. Spagolla, L. C., Santos, M. M., Passos, L. M. L., y Aguiar, C. L. (2009). Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(2), 187–191.
358. Spigno, G., Tramelli, L., y De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
359. Stat-Ease Inc. (2018). Central Composite Design (CCD). Recuperado de <https://www.statease.com/docs/v11/designs/ccd.html>
360. Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., y Zeng, X. (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 78(3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.038>
361. Sun-Waterhouse, D., Chen, J., Chuah, C., Wibisono, R., Melton, L. D., Laing, W., ... Skinner, M. A. (2009). Kiwifruit-based polyphenols and related antioxidants for functional foods: kiwifruit extract-enhanced gluten-free bread. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), 251–264. <https://doi.org/10.1080/09637480903012355>
362. Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q., y Sun, D. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage.

363. Teixeira, M. I., Andrade, L. R., Farina, M., y Rocha-Leão, M. H. M. (2004). Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. *Materials Science and Engineering: C*, 24(5), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2004.08.008>
364. Tenorio, M. (2016). Flavonoids extracted from orange peelings tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) and their application as a natural antioxidant in sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) vegetable oil. *Scientia Agropecuaria*, 7, 419–431. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.04.07>
365. Terán, R. (2014). *Diseño de mezclas de compuestos fenólicos en función a su eficacia antioxidante en el aceite de sacha inchi (Plukenetia volubilis)* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
366. The Nielsen Company. (2009, 27 diciembre). U.S. Healthy Eating Trends Part 1 Commitment Trumps the Economic Pinch. Recuperado 16 diciembre, 2017, de <https://www.nielsen.com/us/en/insights/news/2010/healthy-eating-trends-pt-1-commitment-trumps-the-economic-pinch.html>
367. Thorat, I. D., Jagtap, D. D., Mohapatra, D., Joshi, D. C., Sutar, R. F., y Kapdi, S. S. (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*, 2, 81–104. <https://doi.org/10.7455/ijfs/2.1.2013.a7>
368. TIBCO Software Inc. (2017). Statistica Help. Recuperado de <http://documentation.statsoft.com/STATISTICAHelp.aspx?path=Experimental/Doe/Examples/Example5CentralCompositeResponseSurfaceDesigns>
369. Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., y Mason, T. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(00\)00033-x](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(00)00033-x)
370. Tomás-Barberán, F. A., y Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1073–1080. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7)
371. Tomás-Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición Y Salud*, 10(2), 41–53.
372. Tong, Q., Zhang, X., Wu, F., Tong, J., Zhang, P., y Zhang, J. (2010). Effect of honey

- powder on dough rheology and bread quality. *Food Research International*, 43(9), 2284–2288. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.08.002>
373. Tonon, R. V., Brabet, C., y Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
374. Tonon, R. V., Brabet, C., y Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.013>
375. Torres, A. (2018). *Determinación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante de extractos de orujo (epicarpo) de Vitis vinífera L. var. Italia y Negra criolla de residuos vitivinícolas como fuente de principios bioactivos aprovechables* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
376. Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la Ecorregión cafetera* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
377. Tucker, B. W., y Pigott, G. M. (2003c). FISH OILS|Composition and Properties. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2ª ed., pp. 2495–2501). <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00481-8>
378. Tumbas Šaponjac, V., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Pajin, B., Djilas, S., Petrović, J., ... Sladana, J. V. (2016). Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies. *Food Chemistry*, 207, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.082>
379. Umesh, S., Manohar, R. S., Indiramma, A., Akshitha, S., y Naidu, K. A. (2015). Enrichment of biscuits with microencapsulated omega-3 fatty acid (*Alpha-linolenic acid*) rich Garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil: Physical, sensory and storage quality characteristics of biscuits. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.018>
380. Varastegani, B., Zzaman, W., y Yang, T. A. (2015). Investigation on Physicochemical and Sensory Evaluation of Cookies Substituted with Papaya Pulp Flour. *Journal of Food Quality*, 38(3), 175–183. <https://doi.org/10.1111/jfq.12129>

381. Vargas, E. (2016). *Caracterización fisicoquímica de pan molde blanco con sustitución parcial de harina de pajuro (Erythrina edulis)*. (Tesis de pregrado). Universidad Peruana Unión, Lima, Perú.
382. Vasconcelos, A. G., Garcia-Diaz, D. F., Jimenez, P., y Silva, P. I. (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.029>
383. Vásquez, C., De Cos, A. I., y López-Nomdedeu, C. (2005). *Alimentación y Nutrición. Manual teórico-práctico*. (2ª ed.). Madrid, España: Díaz de Santos.
384. Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), 126–133.
385. Vidal, N. (2015b). La era saludable: Alimentos funcionales, nutricosmética y nutraceuticos. Recuperado 16 diciembre, 2017, de <https://www.ainia.es/insights/la-era-saludable-alimentos-funcionales-nutricosmetica-y-nutraceuticos/>
386. Vihakas, M. (2014): *Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae*. Tesis doctoral, Department of Chemistry/Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Turku, Turku, Finland.
387. Villanueva A. (2014). *Optimización multirrespuesta según la velocidad de lanzado , número de operadores, frecuencia de moto reductor , sobre el % de desviación del calibre y % de aprovechamiento final, en el proceso de selección de espárrago blanco fresco en Agualima S.A.C.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
388. Wass, J. A. (2010). First Steps in Experimental Design— The Screening Experiment. *J. Valid. Technol.*, 16, 49–57.
389. Watson, R. R., Preedy, V., y Zibadi, S. H. (2014). *Polyphenols in human health and disease*. London, UK: Elsevier.
390. Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., y Elías, L. G. (2001). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. Ottawa, Canadá: Universidad de Manitoba, Facultad de Ecología Humana, Departamento de Alimentos y Nutrición.
391. Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., y Liu, S. (2014). Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydrate Polymers*, 102, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.057>
392. Xavier, L., Freire, M. S., Vidal-Tato, I., y González-Álvarez, J. (2015). Application of



- aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from Eucalyptus wood. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 17(2), 345–354. <https://doi.org/10.4067/s0718-221x2015005000032>
393. Yang, Y., y Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.05.001>
394. Yáñez-Fernández, J., Salazar, J. A., Chaires, L., Jiménez, J., Márquez, M., y Ramos, E. G. (2002, septiembre). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21(1), 313–319.
395. Yilmaz, Y., y Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.009>
396. Youngson, R. (1994). *Antioxidantes y radicales libres*. London, UK: Harpercollins Publishers.
397. Zadernowski, R., Czaplicki, S., y Naczka, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112(3), 685–689. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.030>
398. Zambrano-Zaragoza, M. L., Gallardo-Navarro, Y. T., Meléndez, P. R., y Arjona-Román, J. L. (2003). Metodología de superficie de respuesta aplicada a la optimización de la capacidad de hidratación en un extruido de cascarilla de maíz con base en avena. *Información Tecnológica*, 14(3), 37–40.
399. Zhang, L., Mou, D., y Du, Y. (2007). Procyanidins: Extraction and microencapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2192–2197.
400. Zou, T., Wang, M., Gan, R., y Ling, W. (2011). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry, Using Response Surface Methodology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3006–3017. <https://doi.org/10.3390/ijms12053006>

## X. ANEXOS

### Anexo I. Análisis taxonómico del *Oenocarpus bataua* Mart



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

#### CONSTANCIA Nº 278-USM-2018

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

La muestra vegetal (fruto) recibida de **Katherine Kelly Navarro Valdez y Nahum Capillo Herrera**, bachilleres de Facultad de Química e Ingeniería Química, EAP de Ingeniería Agroindustrial+ de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Oenocarpus bataua* Mart.** tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: LILIOPSIDA**

**SUB CLASE: COMMELINIDAE**

**ORDEN: ARECALES**

**FAMILIA: ARECACEAE**

**GENERO: *Oenocarpus***

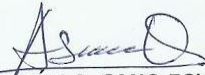
**ESPECIE: *Oenocarpus bataua* Mart**

Nombre vulgar: "ungurahui"  
Determinado por: Dr. Miguel Machaua Gonzales

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Fecha, 23 de julio de 2018



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

ACE/ddb

**Anexo II.** Análisis de capacidad antioxidante de los EU por el método DPPH



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



**PROCOLO DE ANÁLISIS N.º00433-CPF-2017**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004435/2017  
SOLICITADO POR : KATHERINE NAVARRO VALDEZ  
MUESTRA : EXTRACTO DE UNGURAHUI  
Nº DE LOTE : ----  
CANTIDAD : ----  
FECHA DE RECEPCIÓN : 06 de Marzo del 2017  
FECHA DE FABRICACION : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH			
CÓDIGO	MÉTODOS	%Act. Antioxidante	D.E.
4830	UV - VIS	74.2326	1.0966
5015		76.3514	2.8320
5045		72.2472	0.0662
7013.8		74.8498	1.2741
7030 -I		74.1825	0.2469
7030 -II		72.4308	1.1083
7046.1		73.1857	0.4778
9015		71.6383	2.1680
9045		65.7741	1.2065
9130		65.1276	0.3362

Lima, 10 de Julio del 2017

**Q.F. Nelson Bautista Cruz**  
Director del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



**Anexo III.** Análisis de capacidad antioxidante de los EU por el método CAT



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00432-CPF-2017**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004435/2017  
SOLICITADO POR : KATHERINE NAVARRO VALDEZ  
MUESTRA : EXTRACTO DE UNGURAHUI  
Nº DE LOTE : ----  
CANTIDAD : ----  
FECHA DE RECEPCIÓN : 06 de Marzo del 2017  
FECHA DE FABRICACION : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL POR MOLIBDATO DE AMONIO			
CÓDIGO	MÉTODOS	mg eq. ac. asc/g ES	D.E.
4830	UV - VIS	1807.2113	135.5393
5015		1947.8261	101.6871
5045		1692.7536	129.7324
7013.8		1847.0867	126.1367
7030 (I)		1737.7632	36.9914
7030 (II)		1737.6516	57.9023
7046.1		1457.9364	90.2506
9015		1594.2029	99.5579
9045		1401.6398	48.6740
9130		1378.2609	92.2313

Lima, 10 de Julio del 2017

Q.F. Nelson Bautista Cruz  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



## Anexo IV. Análisis de proteínas de G-C horneada



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENTRO PROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00202-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 004456/2017  
SOLICITADO POR : KATHERINE NAVARRO VALDEZ  
MUESTRA : C(-)1 Y C(-) 2  
Nº DE LOTE : -----  
CANTIDAD : 01 frasco de vidrio  
FECHA DE RECEPCIÓN : 15 de Junio del 2017  
FECHA DE FABRICACION : -----  
FECHA DE VENCIMIENTO : -----

PRUEBAS	MÉTODOS	RESULTADOS
<b>PROTEÍNAS</b>		
C(-) 1	AOAC	5,8701%
C(-) 2	AOAC	5,9577%

Lima, 26 de Junio del 2017

  
Q.F. Nelson Bautista Cruz  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR233265



**Anexo V.** Análisis de proteínas de G-EUL horneada



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA




**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00203-CPF-2017**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004454/2017  
SOLICITADO POR : KATHERINE NAVARRO VALDEZ  
MUESTRA : EUL1 Y EUL 2  
Nº DE LOTE : ----  
CANTIDAD : 01 frasco de vidrio  
FECHA DE RECEPCIÓN : 15 de Junio del 2017  
FECHA DE FABRICACION : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

PRUEBAS	MÉTODOS	RESULTADOS
<b>PROTEÍNAS</b>		
EUL 1	AOAC	5,2568%
EUL 2	AOAC	5,3444%

Lima, 26 de Junio del 2017

  
.....  
**Q.F. Nelson Bautista Cruz**  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR233205



**Anexo VI.** Análisis de proteínas de G-EUM horneada



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00201-CPF-2017**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004455/2017  
SOLICITADO POR : KATHERINE NAVARRO VALDEZ  
MUESTRA : EUM1 Y EUM2  
Nº DE LOTE : ----  
CANTIDAD : 01 frasco de vidrio  
FECHA DE RECEPCIÓN : 15 de Junio del 2017  
FECHA DE FABRICACION : ----  
FECHA DE VENCIMIENTO : ----

PRUEBAS	MÉTODOS	RESULTADOS
<b>PROTEÍNAS</b>		
EUM 1	AOAC	5,0816%
EUM 2	AOAC	5,3444%

Lima, 26 de Junio del 2017

Q.F. Nelson Bautista Cruz  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



Anexo VII. Galería de figuras



Figura 38. Obtención del polvo fino de semilla de unguurahui.

A. Fruto de unguurahui lavado y desinfectado, B. Secado de semillas enteras ( $T=40^{\circ}\text{C}$ ), C. Molienda, D. Secado de semillas molidas ( $T=40^{\circ}\text{C}$ ), E. Pulverizado, F. Tamizado (malla # 80), G. Polvo fino de semilla



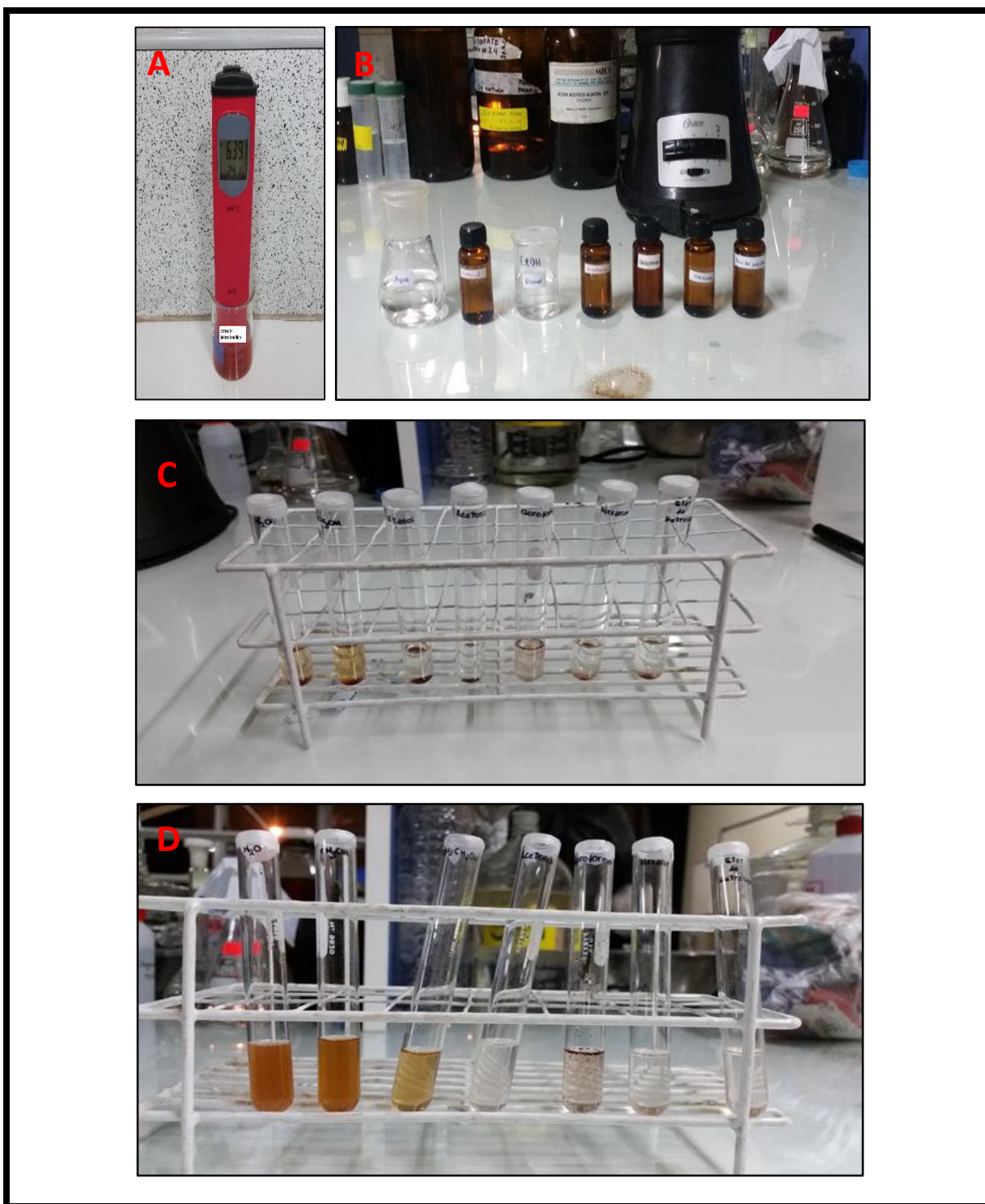
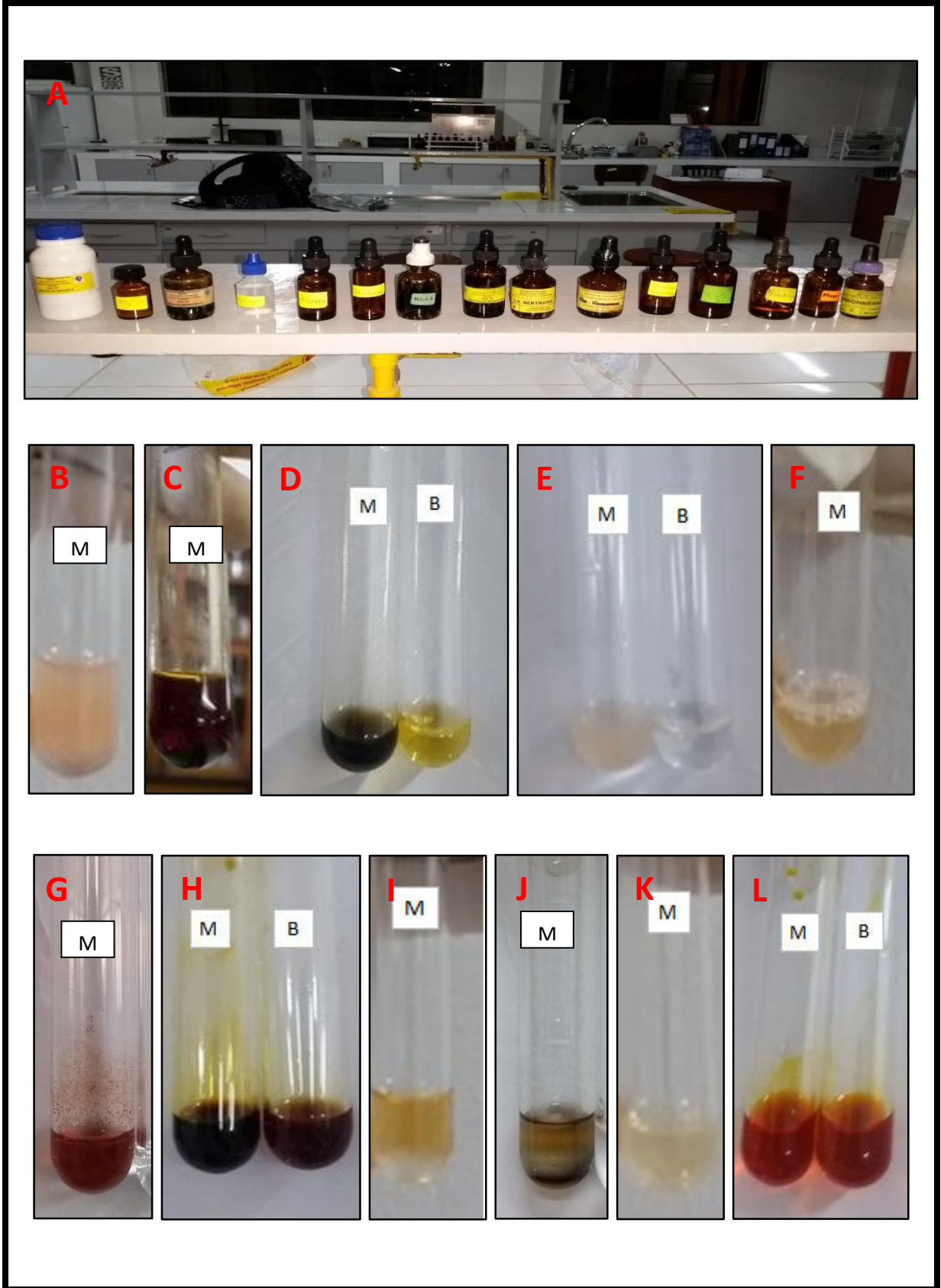
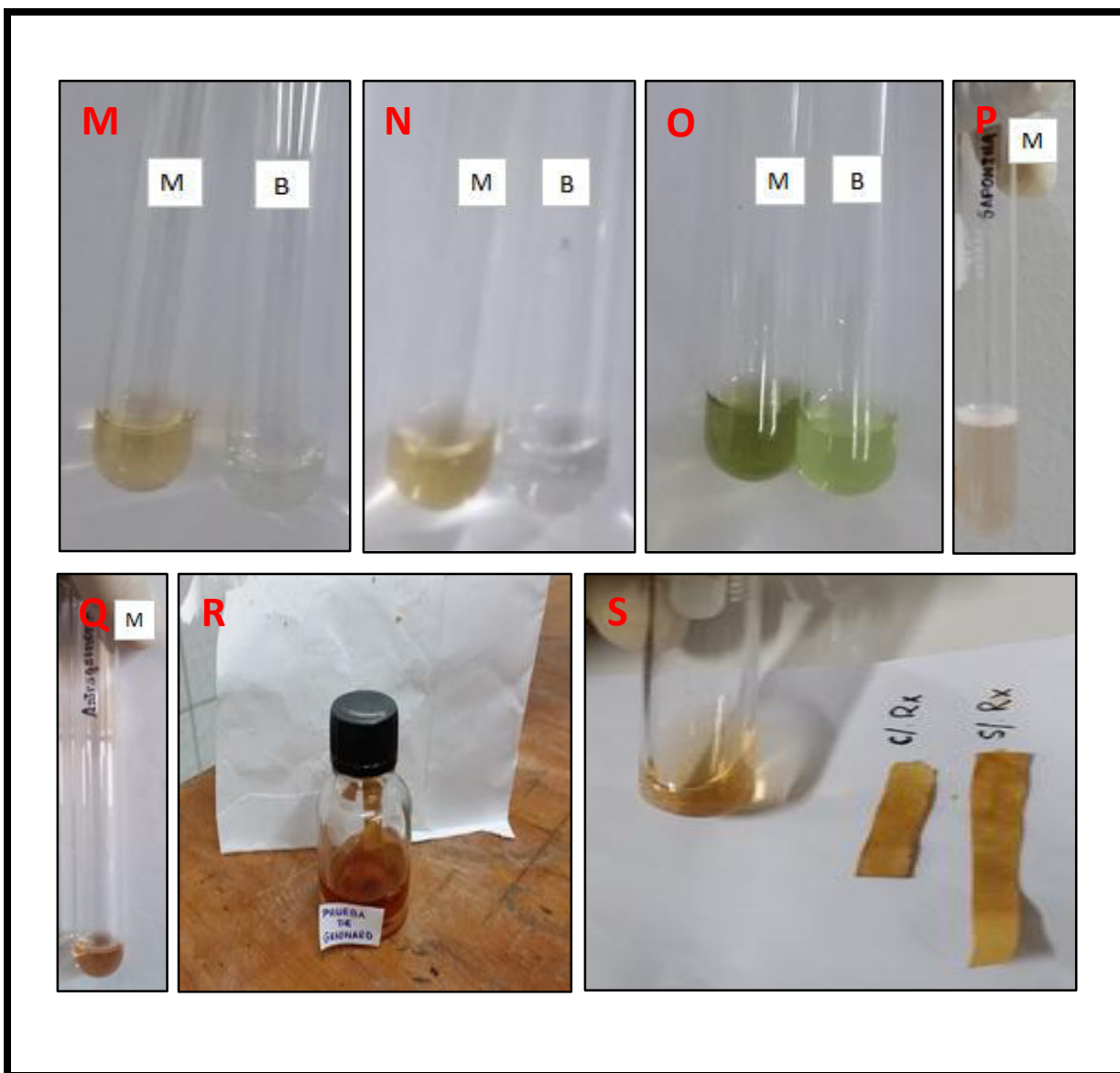


Figura 39. pH y prueba de solubilidad

A. Medición del pH, B. Solventes de diferentes polaridades, C. Reacción (t=0 min.), D. Reacción (t=2 min.)





Leyenda: M: Muestra (extracto diluido + reactivo), B: Blanco (solvente + reactivo)

Figura 40. Marcha fitoquímica

A. Reactivos, B. Ensayo de Molish, C. Ensayo de Fehling, D. Ensayo de cloruro férrico, E. Ensayo de Gelatina, F. Ensayo de Shinoda, G. Hidróxido de sodio al 10 %, H. Ensayo de Rosenheim, I. Ensayo de Lieberman-Burchard, J. Ensayo de Salkowski, K. Ensayo de Ninhidrina, L. Ensayo de Dragendorff, M. Ensayo de Mayer, N. Ensayo de Bertrand, O. Ensayo de Ensayo de Sonnenschein, P. Ensayo de Saponina, Q. Ensayo de Hidróxido de amonio (Glicósidos de antraquinona), R y S. Ensayo de Grignard (Glicósidos cianogénéticos)







Figura 41. Obtención de los extractos de semilla de unguirahui (EU)

A, B y C. Preparación de los extractos, D. Extracción asistida por ultrasonido, E. Centrifugación (4000 rpm x 15 min.), F. Filtración, G y H. Sistema de concentración al vacío ( $T=40^{\circ}\text{C}$ ), I y J. Distribución del extracto concentrado en placas de Petri, K y L. Secado de los EU ( $T=40^{\circ}\text{C}$ ), M y N. Raspado y recolección de los EU, O. Almacenamiento de los EU

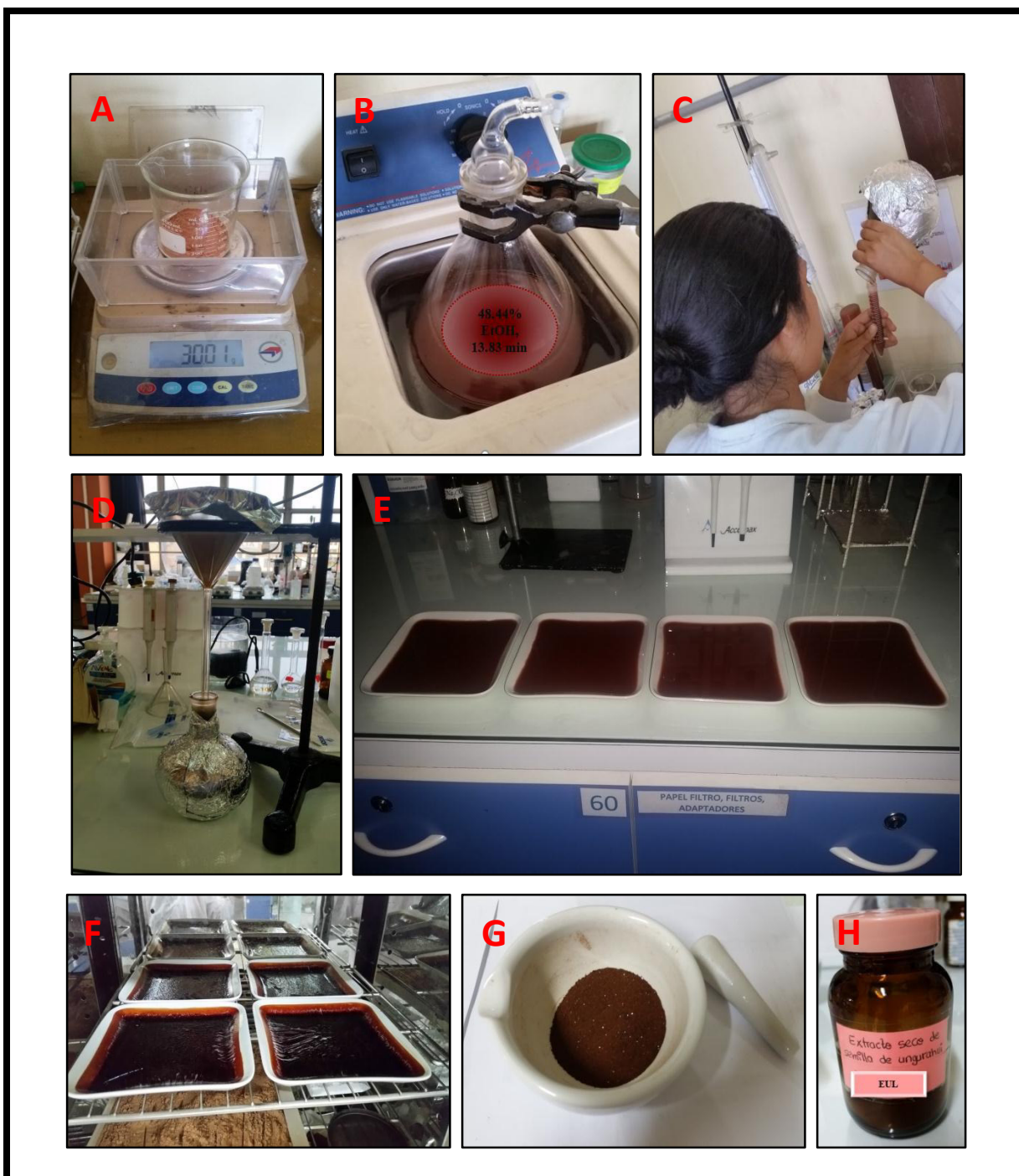


Figura 42. Obtención del extracto de semilla de unguahui libre (EUL)

A. Pesado del polvo fino de semilla, B. Extracción ultrasónica a las condiciones óptimas. C. Preparación de los tubos de centrifugación. D. Filtrado, E. Extracto filtrado, F. Extracto seco, G. Reducción del tamaño de los cristales, H. Almacenamiento del extracto de semilla de unguahui libre (EUL).

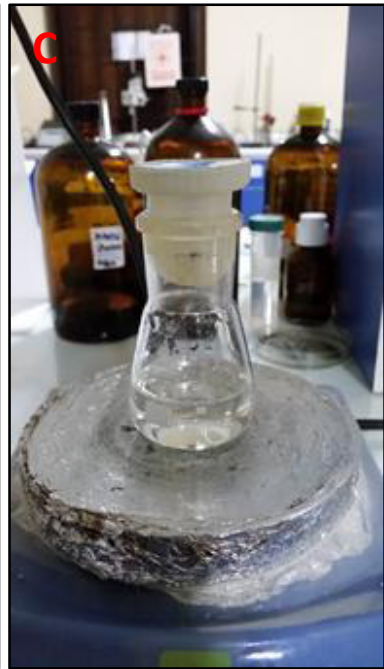






Figura 43. Obtención del extracto de semilla de unguahui microencapsulado (EUM)  
 A, B, C, D y E. Preparación de la solución de alimentación, F. Equipo mini-Spray Dryer, G. Cámara de secado, H. Ciclón separador, I. Botella colectora, J. Condiciones de secado, K. Pesado del EUM



Figura 44. Elaboración de galletas enriquecidas (G-EUL y G-EUM) y G-C

A. Primer mezclado (mantequilla, azúcar, esencia de vainilla y huevo), B. Segundo mezclado (adición de harina, bicarbonato de sodio, sal y extracto), C. Masa cruda de G-C, G-EUL y G-EUM, D. Amasado y cortado, E. Galletas antes de hornear, F. Galletas horneadas (T=180°C x 8 min.)

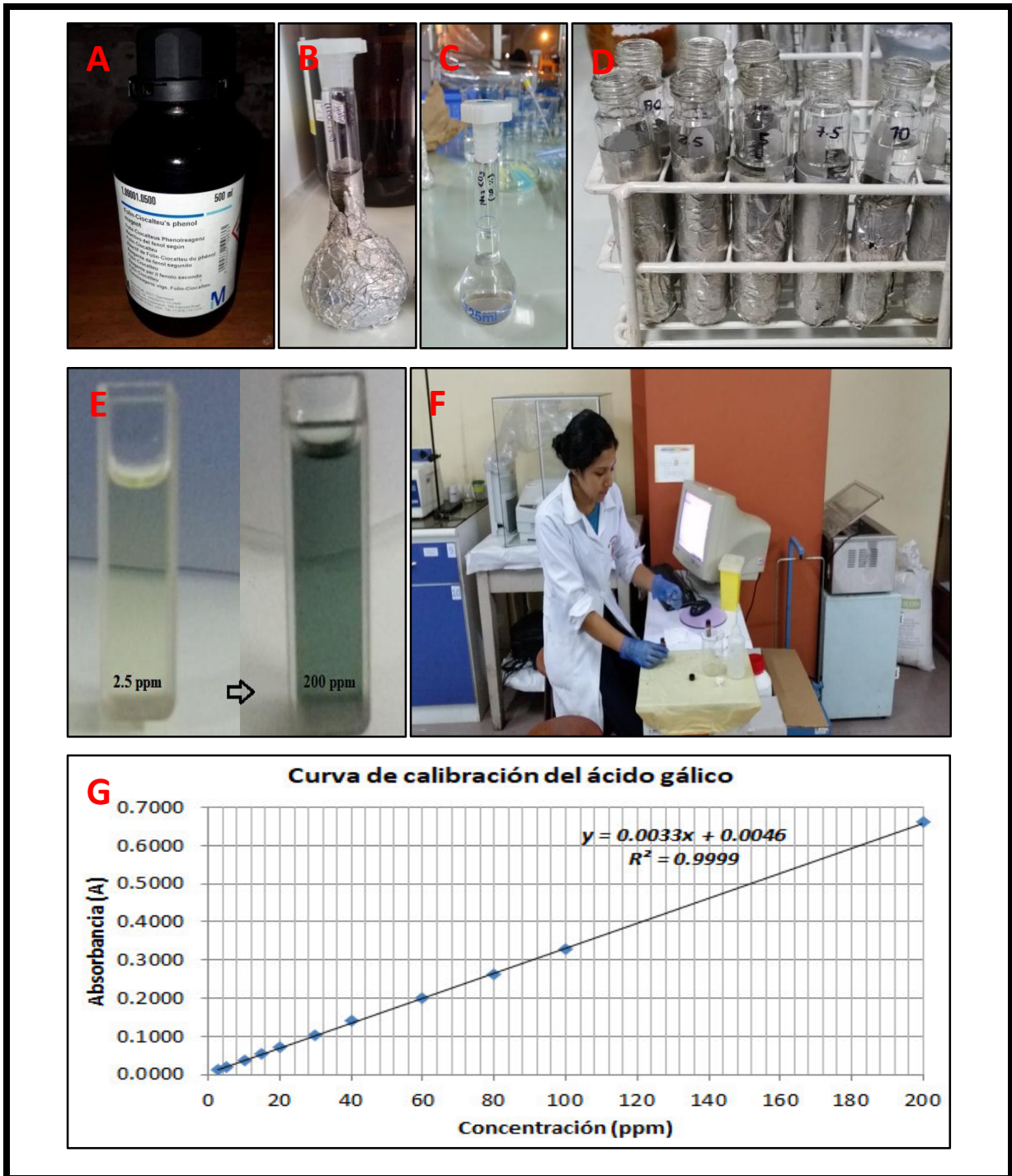
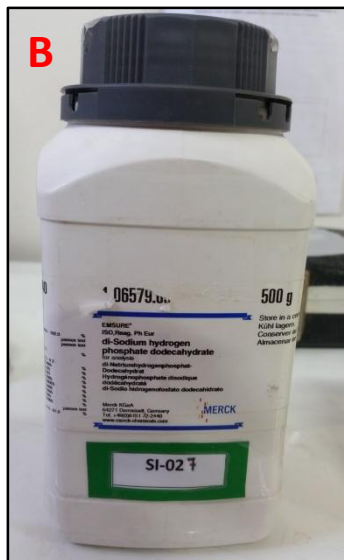
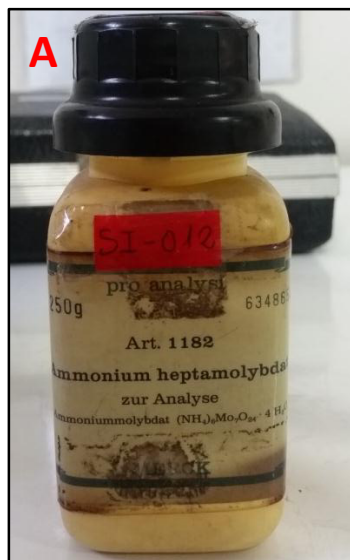


Figura 45. Análisis del contenido fenólico total (CFT) por el método de Folin-Ciocalteu  
 A. Reactivo Folin - Ciocalteu, B. Ácido gálico a 1000 ppm, C. Carbonato de sodio (20% p/v), D.  
 Concentraciones de 2.5 a 200 ppm del estándar ácido gálico, E. Coloración de las reacciones en las  
 cubetas, F. Lectura de las muestras, G. Curva de calibración del estándar



Figura 46. Análisis de la capacidad antioxidante por el método DPPH

A. Reactivo DPPH, B. Solución madre de DPPH, C. Reactivo Ácido ascórbico, D. Ácido ascórbico a 10 ppm, E. Extracto a 10 ppm, F. Reacción: muestra (extracto o ácido ascórbico) + DPPH, G. Muestra en reposo (t=30 min.), H. Lectura de la muestra



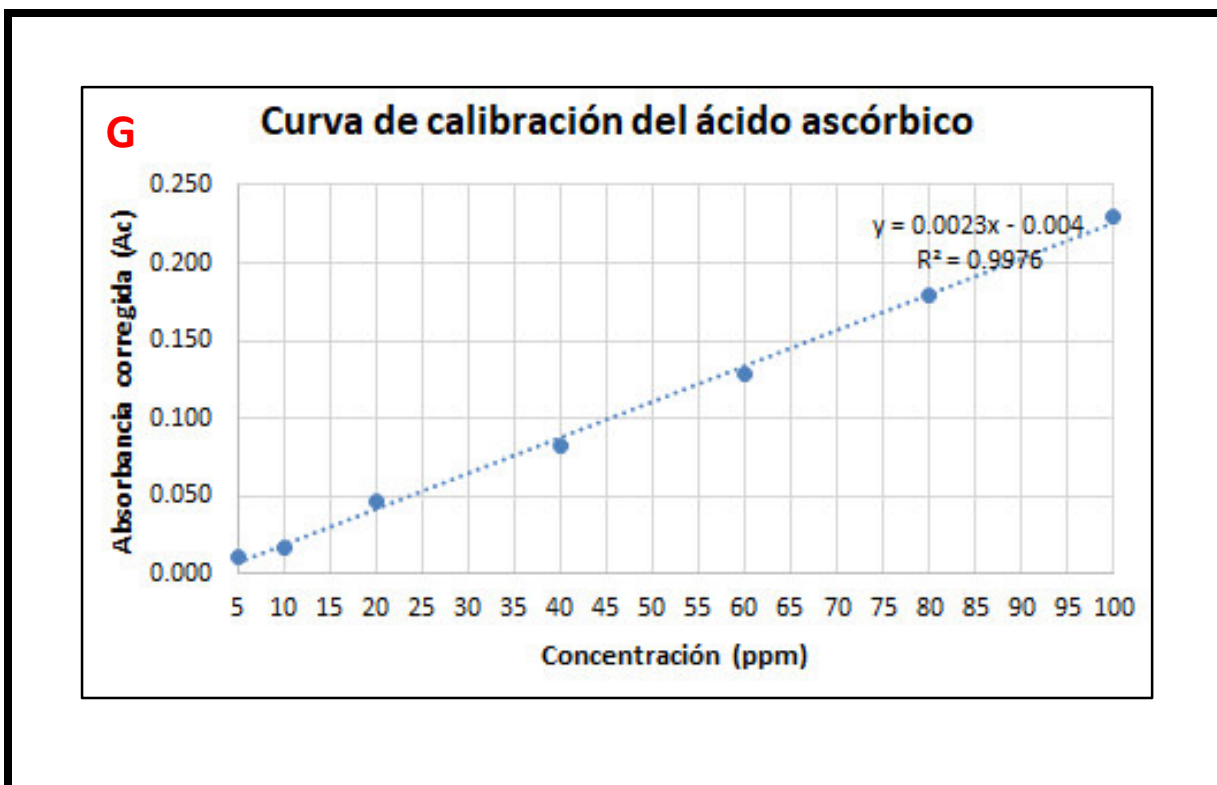


Figura 47. Análisis de la capacidad antioxidante por el método CAT

A. Reactivo molibdato de amonio, B. Reactivo fosfato de sodio dodecahidratado, C. Reactivo fosfomolibdato, D. Concentraciones de 5 a 100 ppm del estándar ácido ascórbico, E. Incubación de las muestras y del estándar en baño maría (95°C x 90 min), F. Enfriamiento en baño de hielo, G. Curva de calibración del estándar

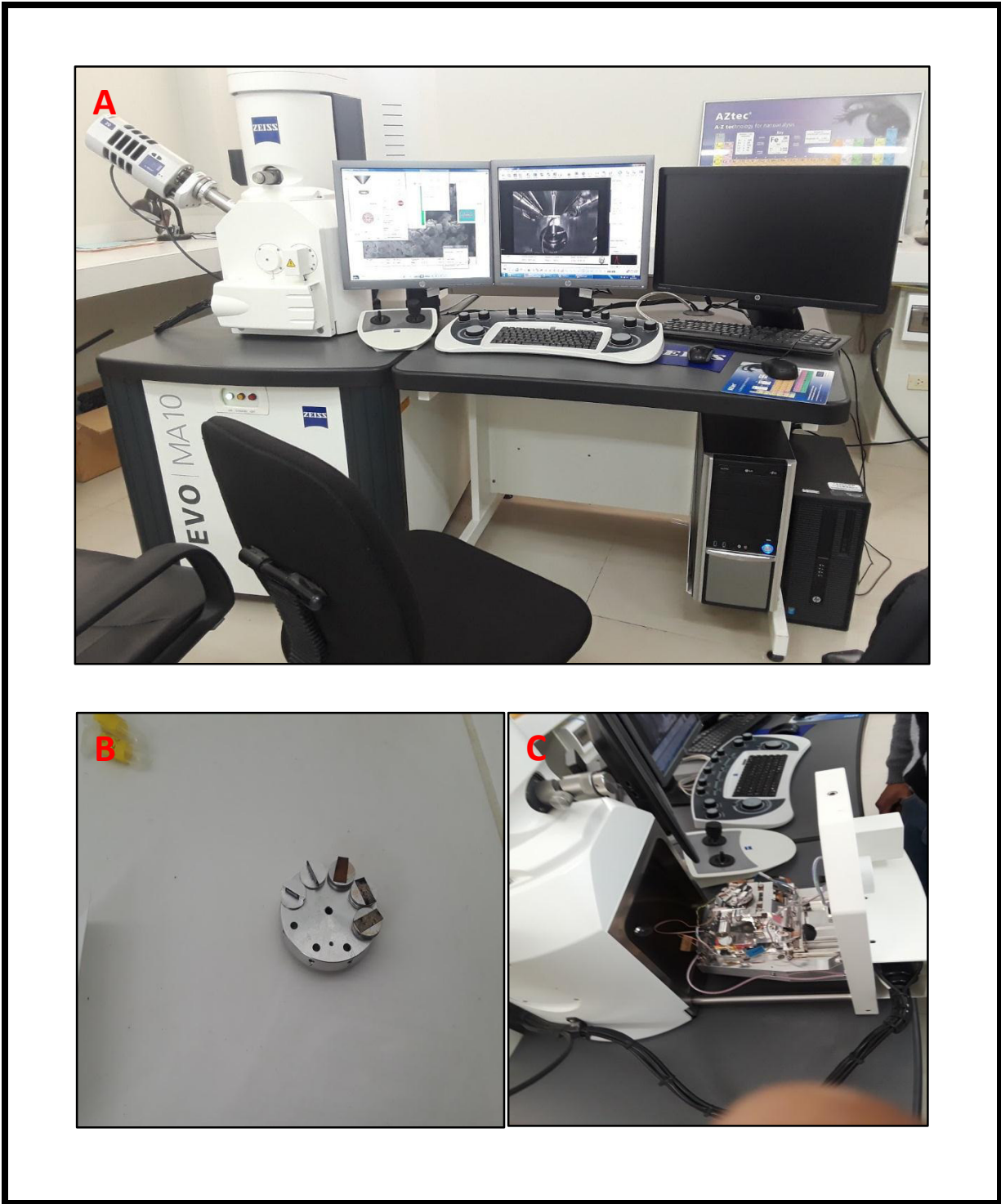


Figura 48. Análisis de morfología y tamaño de EUL y EUM

A. Microscopio electrónico de barrido, B. Adhesión de las muestras al portamuestras, C. Colocación del portamuestras en el microscopio

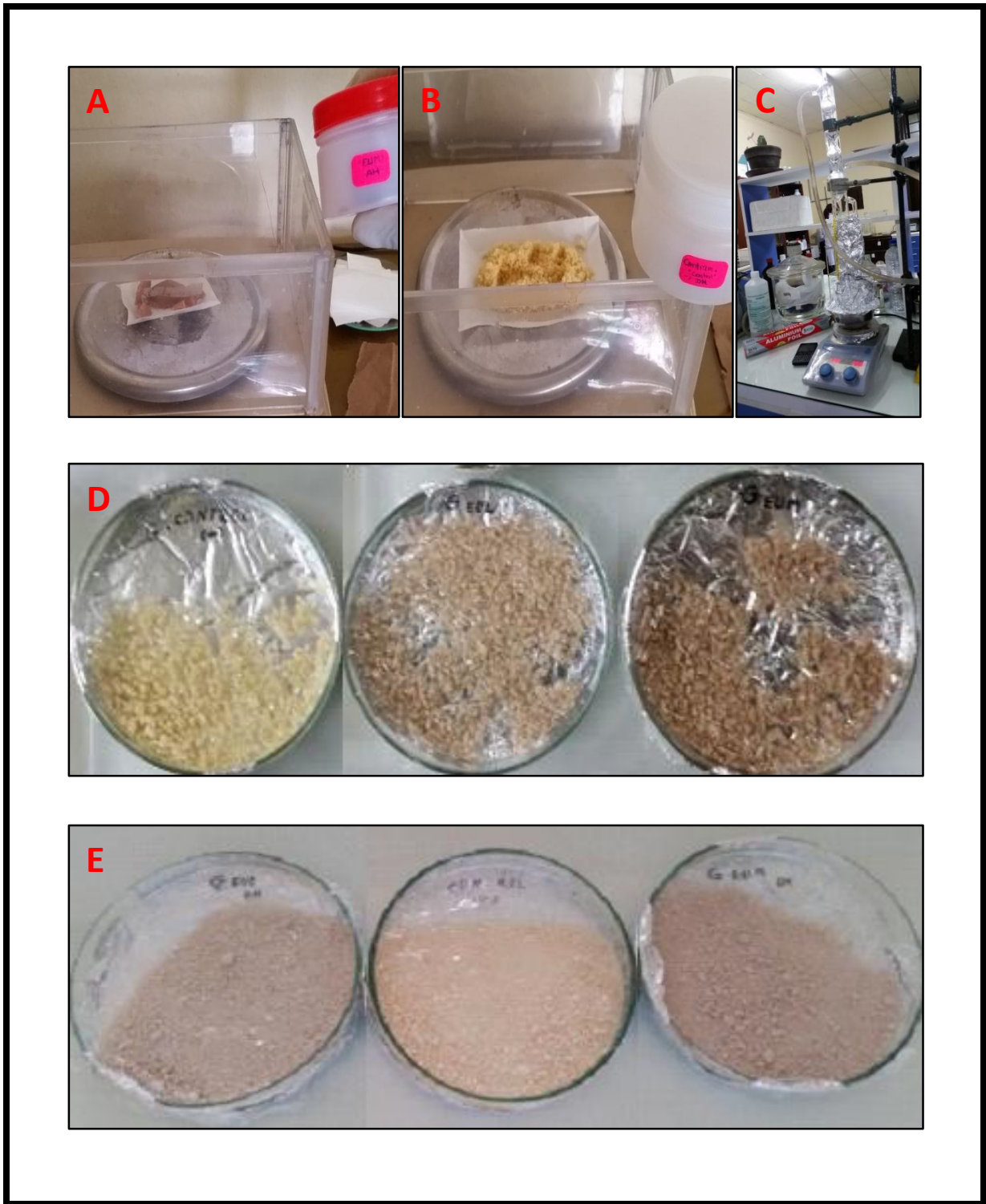
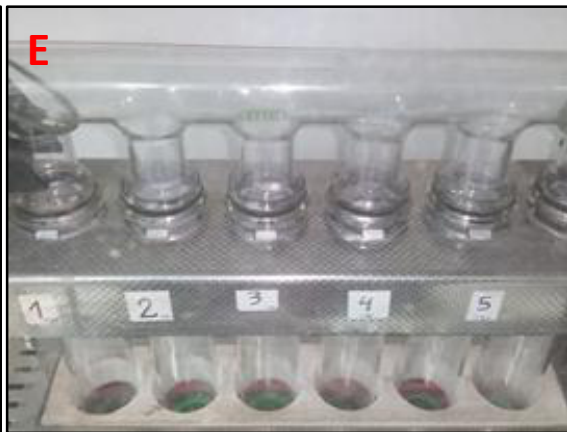
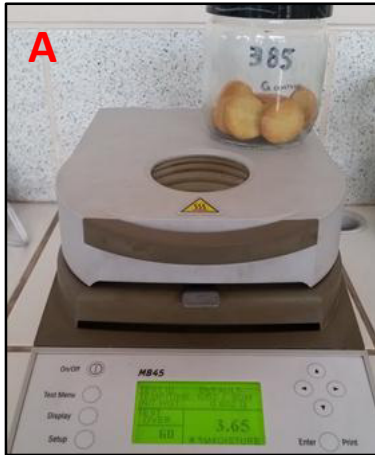


Figura 49. Desengrase de galletas para extracción y posterior análisis de CFT  
A, B. Pesado de galletas crudas y horneadas, C. Desengrase de galletas por Soxhlet, D. Galletas crudas secas y desengrasadas, E. Galletas horneadas secas y desengrasadas.





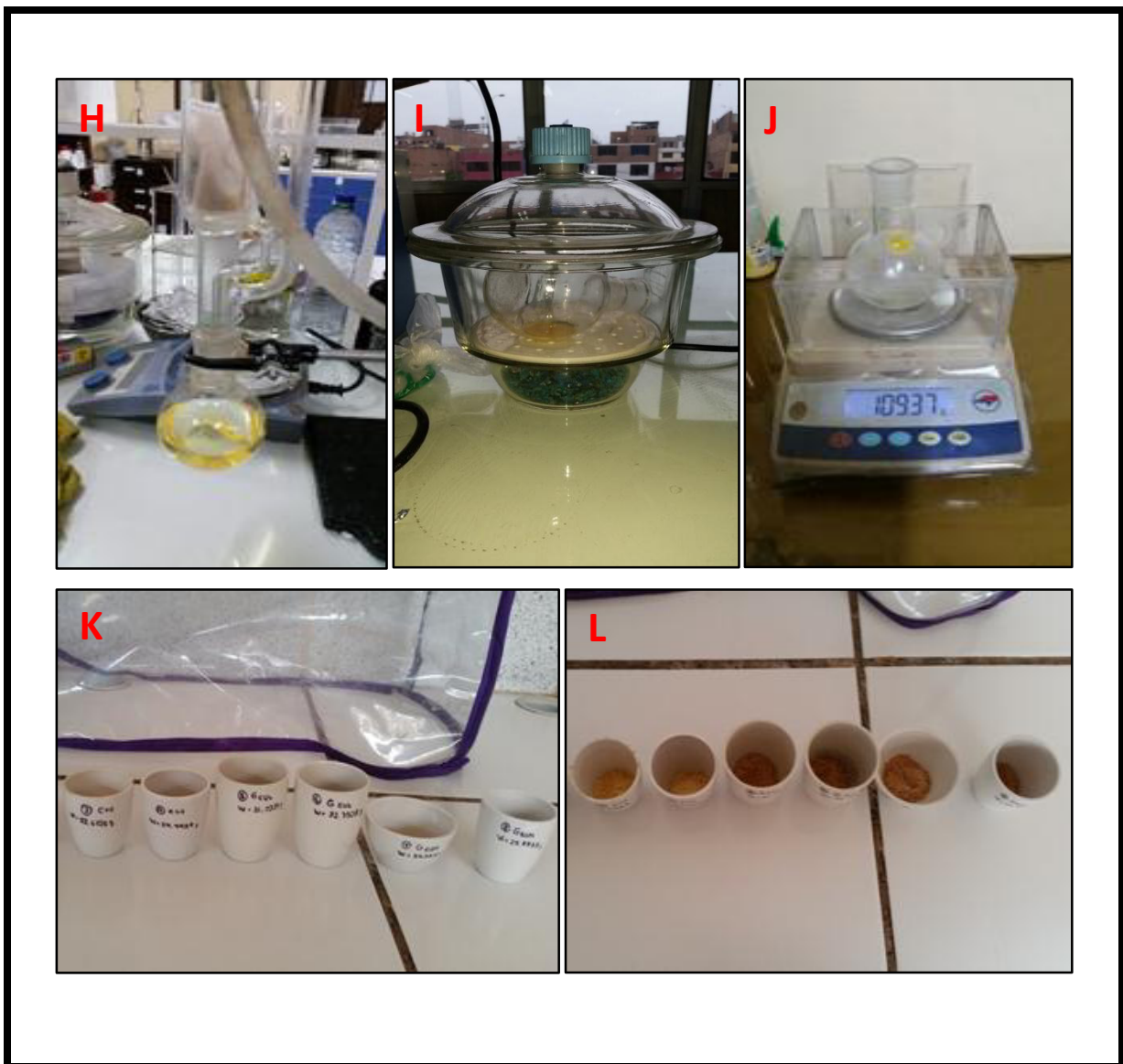


Figura 50. Análisis proximal de las galletas (G-EUL, G-EUM y G-C)

A, B y C. Determinación del contenido de humedad; D y E. Digestión de las muestras para la determinación del contenido de proteína cruda; F, G, H, I y J. Determinación de grasa mediante el equipo Soxhlet; K y L. Determinación del contenido de cenizas



## Anexo VIII. Ficha técnica de la maltodextrina

meel  
unie



Meelunie BV., Viñoly Tower, 18th floor, Claude Debussylaan 40 , 1082 MD Amsterdam  
P.O. Box 10102, 1001 EC Amsterdam, The Netherlands, tel. +31 20 53 06 530 fax +31 20 53 06 555,  
meelunie.com

# PRODUCT DATA SHEET

## MALTODEXTRIN 10-12 DE (code MA-84)

Appearance	: fine white powder
Flavour & odour	: mild sweet, odourless
Moisture	: max. 5 %
Dextrose Equivalent	: 10-12
Ash	: max. 0,3 %
pH	: 4,5 – 6,5
Higher sugars	: 76 – 89 %

### Carbohydrate composition

Dextrose	: 3 %
Maltose	: 4 - 8 %
Triose	: 7 - 11 %

### Microbiological

Total Bacteria	: max. 60 cfu per gram
Yeast & Moulds	: absent in 1 gram
Coliforms	: < 10 cfu per gram
E. coli	: absent in 1 gram
Salmonella	: absent in 25 gram

The information given is based on laboratory and field experience. It is set in good faith for guidance only. Our products are sold without any warranty whatsoever whether expressed or implied. Users should conduct their own tests in order to determine for themselves the suitability of our products for their particular purposes

ABN AMRO Bank, Amsterdam, IBAN/Accountno. EUR NL09ANBA041.10.21.117, USD NL84ABNA041.10.21.125  
Rabobank, Utrecht, IBAN/Accountno. NL50RABO030.00.06.381, Chamber of Commerce 33037079, VAT-number  
NL001417770B01

**Anexo IX.** Formato del cuestionario para la prueba hedónica (análisis sensorial)

<p>Nombre y apellido: _____</p> <p>Sexo: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M      Edad: _____      Fecha: __/__/__</p> <p>Frecuencia semanal del consumo de galleta:</p> <p>Todos los días <input type="checkbox"/></p> <p>4-6 días <input type="checkbox"/></p> <p>1-3 días <input type="checkbox"/></p> <p>No consumo galleta <input type="checkbox"/></p> <p>La galleta que prefiere es:</p> <p>Galleta dulce <input type="checkbox"/></p> <p>Galleta salada <input type="checkbox"/></p> <p>Galleta dulce o salada con relleno de crema <input type="checkbox"/></p>	<p><i>B. Pruebe, por favor, las siguientes muestras, marque con una línea vertical y coloque el código correspondiente sobre la escala para cada uno de los atributos que se presentan a continuación, según el nivel de agrado o desagrado que le produce cada muestra. No hay límite de tiempo para esta cata. Para pasar de una muestra a otra beba un poco de agua.</i></p> <p>▪ <b>Atributo 1: Color</b></p> <p style="text-align: center;"> ----- </p> <p>Me disgusta mucho <span style="float: right;">Me gusta mucho</span></p> <p>▪ <b>Atributo 2: Olor</b></p> <p style="text-align: center;"> ----- </p> <p>Me disgusta mucho <span style="float: right;">Me gusta mucho</span></p> <p>▪ <b>Atributo 3: Textura</b></p> <p style="text-align: center;"> ----- </p> <p>Me disgusta mucho <span style="float: right;">Me gusta mucho</span></p> <p>▪ <b>Atributo 4: Sabor</b></p> <p style="text-align: center;"> ----- </p> <p>Me disgusta mucho <span style="float: right;">Me gusta mucho</span></p> <p>▪ <b>Atributo 5: Apariencia</b></p> <p style="text-align: center;"> ----- </p> <p>Me disgusta mucho <span style="float: right;">Me gusta mucho</span></p> <p style="text-align: right;">¡MUCHAS GRACIAS!</p>
--	--

*A. Pruebe, por favor, las siguientes muestras y marque con una X en la categoría que mejor describa el nivel de agrado o desagrado que le produce cada muestra. No hay límite de tiempo para esta cata. Para pasar de una muestra a otra beba un poco de agua. Marque solo una de las categorías para describir una muestra. Puede asignar la misma categoría a más de una muestra.*

Categorías	Muestras		
	Código: _____	Código: _____	Código: _____
Me disgusta extremadamente			
Me disgusta mucho			
Me disgusta moderadamente			
Me disgusta poco			
No me gusta ni me disgusta			
Me gusta poco			
Me gusta moderadamente			
Me gusta mucho			
Me gusta extremadamente			

Fuente: Elaboración propia

**Anexo X.** Datos para la curva de calibración de ácido gálico a 760 nm

ABSORBANCIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO GÁLICO	
C (ppm)	A
2.5	0.0112
5	0.0195
7.5	0.0292
10	0.0382
15	0.0547
20	0.0709
30	0.1037
40	0.1395
60	0.1995
80	0.2626
100	0.3284
200	0.6600

Fuente: Elaboración propia

**Anexo XI.** Datos para la curva de calibración de ácido ascórbico a 695 nm

ABSORBANCIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ASCÓRBICO	
C (ppm)	A
5	0.011
10	0.017
20	0.046
40	0.083
60	0.129
80	0.179
100	0.230

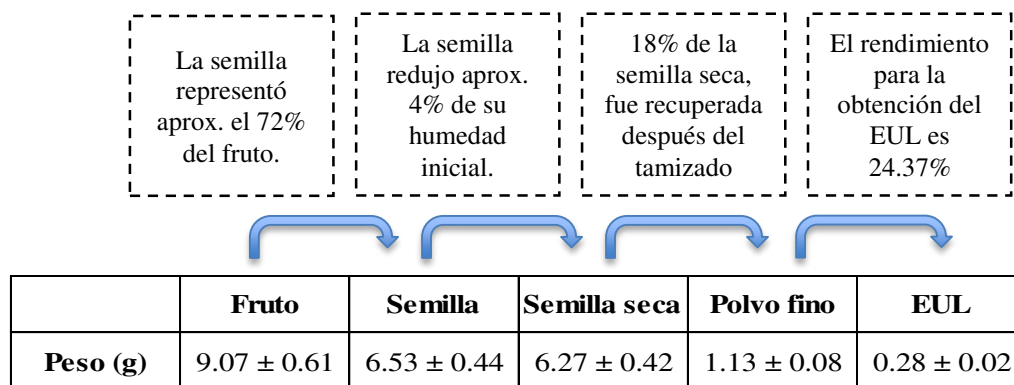
Fuente: Elaboración propia

**Anexo XII.** Porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa con respecto al ácido ascórbico (% AAR) del extracto de semilla de unguirahui a 10 ppm (mg/L).

Código	A	% AAR
EU - 4830	0.0372 ± 0.0031	219.02 ± 18.19
EU - 5015	0.0408 ± 0.0023	240.00 ± 13.76
EU - 5045	0.0349 ± 0.0030	205.49 ± 17.55
EU - 7013	0.0376 ± 0.0028	221.37 ± 16.72
EU - 7030 - I	0.0384 ± 0.0009	225.69 ± 5.30
EU - 7030 - II	0.0352 ± 0.0013	206.86 ± 7.68
EU - 7046	0.0297 ± 0.0021	174.51 ± 12.26
EU - 9015	0.0327 ± 0.0023	192.16 ± 13.47
EU - 9045	0.0284 ± 0.0011	166.86 ± 6.61
EU - 9130	0.0293 ± 0.0032	172.35 ± 12.48

Fuente: Elaboración propia

**Anexo XIII.** Pesos de la semilla de unguirahui en sus etapas de procesamiento



Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n° frutos=100).

Fuente: Elaboración propia

**Anexo XIV.** Determinación del CFT en g. de polvo fino, semilla y fruto

- ❖ Para la determinación del contenido fenólico total por g. de polvo fino de semilla:

$$CFT\left(\frac{mg\ EAG}{g\ polvo\ fino}\right) = \frac{452.76\ mg\ EAG}{1\ g\ EUL} \times \frac{0.2437\ g\ EUL}{1\ g\ polvo\ fino} = 110.34\ \frac{mg\ EAG}{g\ polvo\ fino}$$

- ❖ Para la determinación del contenido fenólico total por g. de semilla:

$$CFT\left(\frac{mg\ EAG}{g\ semilla}\right) = \frac{110.34\ mg\ EAG}{1\ g\ polvo\ fino} \times \frac{0.17\ g\ polvo\ fino}{1\ g\ semilla} = 18.76\ \frac{mg\ EAG}{g\ semilla}$$

- ❖ Para la determinación del contenido fenólico total por g. de fruto:

$$CFT\left(\frac{mg\ EAG}{fruto}\right) = \frac{18.76\ mg\ EAG}{1\ g\ semilla} \times \frac{6.53\ g\ semilla}{9.07\ g\ fruto} = 13.51\ \frac{mg\ EAG}{g\ fruto}$$

**Anexo XV.** Determinación de la cantidad de EUL y EUM por unidad de galleta

- ❖ Para la determinación de la cantidad de EUL por unidad de galleta (G-EUL):

$$EUL\ en\ galleta = \frac{2.64\ g\ EUL}{1\ batch} \times \frac{1\ batch}{527.63\ g\ masa} \times \frac{7\ g\ masa}{1\ galleta} = 0.04\ \frac{g\ EUL}{galleta}$$

- ❖ Para la determinación de la cantidad de EUM por unidad de galleta (G-EUM):

$$EUM\ en\ galleta = \frac{10.55\ g\ EUM}{1\ batch} \times \frac{1\ batch}{535.54\ g\ masa} \times \frac{7\ g\ masa}{1\ galleta} = 0.14\ \frac{g\ EUM}{galleta}$$