

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DISEÑO DE UN ALIMENTO FUNCIONAL A BASE DE UN EXTRACTO DE MANZANA  
(*MALUS DOMESTICA* VARIEDAD ANNA) CON POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica  
como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología.

Julio César Gómez González

Cartago, Junio, 2019

## Resumen

### **Diseño de un alimento funcional a base de un extracto de manzana (*Malus domestica* variedad Anna) con potencial antioxidante**

Actualmente existe gran demanda comercial de productos alimenticios preparados con ingredientes naturales, especialmente, aquellos que incluyen componentes con potencial bioactivo. Para este estudio, se utilizó un extracto de manzana con potencial antioxidante para la preparación de un alimento funcional, en presentación de “gomitas”. En pruebas preliminares se realizaron extracciones hidroalcohólicas por maceración de manzana (*Malus domestica*), donde se obtuvo numéricamente mayor concentración de polifenoles totales en muestras desecadas por liofilización al vacío que deshidratadas en un desecador. En una segunda etapa se compararon grados de maduración de manzanas variedad Anna y el porcentaje de etanol como solvente en la extracción de polifenoles totales, así como la capacidad antioxidante de los extractos para reducir el DPPH. Se obtuvo poca diferencia entre tratamientos, pero se eligió realizar posteriores extracciones con etanol al 70% de muestras de manzana pintonas, porque los polifenoles tienden a disminuir conforme avanza la maduración. Se hicieron tres repeticiones de extracciones de esta manera y no se obtuvo diferencia significativa entre ellas, generando  $3252,97 \pm 98,80$  mg EAG/L en promedio. Los extractos analizados tanto de muestras maduras como pintonas resultaron positivos para la presencia de flavonoides y leucoantocianidinas. Se realizaron pruebas de elaboración de un alimento funcional tipo gomita con estos extractos utilizando fibra de alga agar deshidratada y gelatina pura como gelificantes. Sin embargo, la vida útil de este producto fue menor a 48 horas a temperatura ambiente sin preservantes. Estos datos sugieren que la manzana variedad Anna puede ser utilizada como materia prima biofuncional con potencial antioxidante, pero se debe optimizar el vehículo de administración.

Palabras clave: *Malus domestica*, polifenoles, extracción hidroalcohólica, capacidad antioxidante, DPPH, alimento funcional.

## Abstract

### **Functional food design with an apple extract (*Malus domestica* var. Anna) with antioxidant potential**

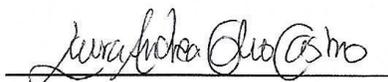
Nowadays, it exists a great commercial demand of food products prepared with natural ingredients, especially, which included bioactive potential components. In this study, it was used an apple extract with antioxidant potential for preparing a gummy functional food. At initial probes, apple (*Malus domestica*) hydroalcoholic extracts were done by mean of maceration, which had little difference between solvents and a bigger total polyphenols concentration with vacuum-freeze-dried samples than dehydrated in a dehydrator. At a second stage, different apples var. Anna maturation grades were compared and ethanol percentage of the solvent for the polyphenols content extraction, and extracts antioxidant ability for reducing DPPH. It was obtained little difference between treatments, but it was chosen 70% ethanol and not yet completely mature apples at further extractions, because polyphenols tend to reduce along maturation. Were done three repetitions of extractions in this way and it was not obtained significant difference between them, but with a mean of 3252,97±98,80 mg GAE/L and a IC50 of 0,261µL. Analyzed extracts of mature and not yet completely mature samples resulted positive for the flavonoids and leucoantocianidines presence. Gummy functional food probes were done with these extracts using dehydrated agar algae fiber and pure gelatine as gelificants however, product useful life was less than 48 hours at ambient temperature. Data suggest apple var. Anna can be utilized as biofunctional raw material with antioxidant potential, but it is necessary to optimize the administration vehicle.

**Key words:** *Malus domestica*, polyphenols, hydroalcoholic extraction, antioxidant ability, DPPH, functional food.

**“Diseño de un alimento funcional a base de un extracto de manzana (*Malus domestica* variedad Anna) con potencial antioxidante”**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología.**

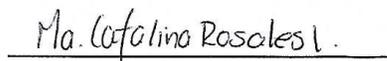
**Miembros del Tribunal**



**Dra. Laura A. Calvo Castro  
Profesora Asesora-TEC**



**Ing. Marianella Gamboa Murillo  
Profesora Asesora-TEC**



**MSc. Catalina Rosales López  
Lectora**

## **Dedicatoria**

A Dios, mi mamá, mi papá, mi hermana y mi hermano por su apoyo y ayuda incondicional.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Laura A. Calvo Castro por abrirme las puertas y darme la oportunidad de hacer este trabajo, por sus aportes, conocimiento y paciencia.

A la Ing. Marianella Gamboa Murillo por su colaboración y disposición, recomendaciones y consejos para la elaboración de las gomitas y recibirme en Agronegocios.

A la MSc. Catalina Rosales López por ser lectora de este trabajo, por su tiempo, y apoyo para el uso de equipo en el Laboratorio de Bioprocesos.

A la Dra. Virginia Montero Campos por ayudarme a resolver muchas preguntas y aclararme dudas.

A la Dra. Carolina Centeno por su colaboración y ayudarme con la metodología y recomendaciones.

A la Vicerrectoría de Investigación por facilitarme el presupuesto y los trámites que necesitaba.

A la MSc. Elizabeth Arnáez y los productores de manzanas Anna en Copey de Dota.

A Noemy Quirós Bustos y sus colaboradores en el CEQIATEC por ayudarme con los análisis requeridos.

A la profesora Mirtha Navarro y sus colaboradores en la Escuela de Química, UCR por su colaboración.

A Julián Alvarado por facilitarme equipo y reactivos que necesité para este trabajo.

A Freddy Angulo y Ricardo González en el CIPA por su disposición y ayuda en el uso del liofilizador.

A la Ing. Silvia Castro, al Ing. Johan Morales, a la Ing. Andrea Ulloa por su colaboración.

A los estudiantes Michelle Lobo, Bianca Jiménez, Fabián Arce, Chrystell Víquez, Ana Paula Flores y Paola Navarro por compartir su tiempo y ayudarme.

A la estudiante Maripaz Lemus Montero por compartir el extracto de betalainas de pitahaya.

A Carlos Gómez Córdoba en la planta piloto de Agronegocios por su colaboración.

Al profesor Alex Schmidt, Anita, Patricia, Rossy Guillén en el CIB por brindarme su ayuda.

A la profe Vilma, Beatriz, profesores y compañeros por todo.

## Índice General

	Página
Resumen.....	2
Abstract .....	3
Dedicatoria .....	5
Agradecimientos .....	6
Índice General .....	7
Índice de Cuadros .....	8
Índice de Figuras .....	9
Índice de Anexos .....	10
Introducción .....	11
Revisión de literatura .....	12
Justificación .....	21
Objetivos .....	22
Materiales y Métodos .....	23
Resultados .....	29
Discusión .....	36
Conclusiones .....	40
Recomendaciones .....	41
Bibliografía .....	42
Anexos .....	46

## Índice de Cuadros

N°		Página
1	Composición porcentual aproximada de la manzana	17
2	Resumen de las pruebas de elaboración del alimento funcional	26
3	Formulación de prueba #3 del alimento funcional	27
4	Determinación de metabolitos secundarios en extractos (70% etanol) de manzana var. Anna en dos estadios de maduración (maduras vs “pintonas”).	32

## Índice de Figuras

N°		Página
1	Manzanas Anna seleccionadas como maduras (A) vs. “pintonas” (B).	24
2	Muestra ilustrativa de extractos de manzanas maduras (M), “pintonas” (P) y manzanas mixtas (F).	25
3	Diagrama general del proceso de la elaboración del alimento funcional	27
4	A. Concentración de polifenoles totales obtenida a partir de manzanas liofilizadas y maceradas con diferentes soluciones hidroalcohólicas. B. Comparación del contenido de polifenoles totales entre manzanas de variedad Gala (n=3) y manzanas variedad Anna (n=6).	29
5	Concentración de polifenoles totales obtenida a partir de manzanas ( <i>Malus domestica</i> var. Anna) en dos estadios de maduración	30
6	Concentración de polifenoles totales obtenida a partir de manzanas ( <i>Malus domestica</i> var. Anna) “pintonas”	31
7	Gráfico de dispersión de la capacidad antioxidante sobre el DPPH de los extractos de las repeticiones de P70	32
8	Alimento funcional elaborado a partir de extracto de manzana var. Anna y agar, coloreado con pigmento a base de pitahaya.	34
9	Alimento funcional elaborado a partir de extracto de manzana var. Anna, agar y gelatina, sin colorante.	34
10	Nombre comercial y logo del alimento funcional	35

## Índice de Anexos

N°		Página
1	Resumen de la información de los extractos	46
2	Cuantificación de polifenoles totales	50
3	Análisis de capacidad antioxidante con DPPH	51
4	Pruebas de metabolitos secundarios	52
5	Cuantificación de polifenoles totales de los extractos	54
6	Determinación de la capacidad antioxidante con DPPH de los extractos	58
7	Diagrama de proceso de extracción de polifenoles	76
8	Diagrama de elaboración de gomitas	77

## Introducción

Numerosos estudios han demostrado que el consumo de diversos compuestos antioxidantes presentes en las plantas podría ayudar a mejorar la salud (Alissa *et al.*, 2012; Magrone *et al.*, 2013). Esto se debe a que los antioxidantes inhiben o reducen la formación y el daño producido por radicales libres, que no sólo producen rancidez y pérdidas de nutrientes en los alimentos en su almacenamiento, sino que también están asociados con reducción en el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer, el mal de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares y están fuertemente ligados al proceso de envejecimiento (Botero *et al.*, 2007).

Aunque las encuestas muestran un incremento en el consumo de vegetales y frutas en Costa Rica, el consumo de estos alimentos en la población nacional está por debajo de la cantidad mínima recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual es de 400 gramos de frutas por día por persona (Ministerio de Salud, 2011). La inclusión de una mayor proporción de estos productos alimenticios en la dieta podría ayudar a la prevención de enfermedades crónicas (Moreno *et al.*, 2014).

Sin embargo, se ha observado que los consumidores prefieren acudir al uso de suplementos nutricionales para mejorar su salud en lugar de mejorar sus dietas (Anders y Schroeter, 2017). Esto llevado a una mayor oferta y demanda de productos alimenticios “fortificados, fortalecidos, o suplementados” con nutrientes o fitoquímicos relevantes. En este sentido, los suplementos nutricionales naturales a base de frutas son percibidos en el mercado meta como alimentos sanos y refrescantes, con la ventaja de los alimentos funcionales de que incluyen otros aspectos valorados por los consumidores como la facilidad para almacenarlos y consumirlos (Sepúlveda *et al.*, 2011).

La presente propuesta de investigación se enfoca en el desarrollo de un alimento funcional a base de extracto de manzana (variedad Anna). Estudios previos realizados en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica han demostrado que la manzana es una muy buena fuente de fitoquímicos antioxidantes (Navarro *et al.*, 2017; Navarro *et al.*, 2018) y se ha asociado su consumo con la reducción del riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, asma y diabetes (Sepúlveda *et al.*, 2011). El producto final será unas “gomitas” a base del extracto de manzana que cumpla con los requisitos normativos para su posible consumo humano, y utilizando protocolos que faciliten eventualmente escalar el proceso para su producción comercial en el país. Las gomitas nutritivas a base de frutas ya existen en mercados norteamericanos y europeos; sin embargo, hasta donde es de nuestro conocimiento, no existen suplementos alimenticios en el mercado costarricense comercializados en el formato de gomitas que contribuyan a suplir los requerimientos nutricionales. Además, para este proyecto se utilizaron manzanas que se rechazan durante la producción agrícola debido a su aspecto, de forma que además, se aprovecha el potencial nutricional de este material de descarte.

## Revisión de literatura

### Fitoquímicos

Los fitoquímicos son sustancias químicas que producen las plantas en relativamente pequeñas cantidades (microgramos-miligramos). A pesar de que no son nutrientes, por lo que no son esenciales en los alimentos, numerosos fitoquímicos tienen el potencial de prevenir e incluso tratar diversas enfermedades en humanos (Quiliche-Estacio, 2013).

Los fitoquímicos más comunes en plantas según Aponte, M. *et al.* (S.f.), incluyen los siguientes grupos:

- Terpenos: carotenoides, fitoesteroles, capsaicina, y saponinas.
- Fenoles: isoflavonas, lignanos, flavonoides, antocianinas, catequinas y taninos.
- Tioles (compuestos organosulfurados): índoles, ditioltionas, isotiocianatos.

### Polifenoles

Los polifenoles son estructuras complejas y son los antioxidantes de mayor consumo en la dieta de humanos, con una alta implicación en la salud pública. Los compuestos polifenólicos son un grupo cercano a 8.000 sustancias que pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura. Entre los más importantes están los flavonoides, que poseen una estructura básica C6-C3-C6, como las antocianinas, catequinas y epicatequinas. El subgrupo de los fenilpropanoides que incluye los derivados del ácido hidroxicinámico, como cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico; estilbenoides, como el resveratrol, y derivados del ácido benzoico, como el gálico y algunos ácidos elágicos, entre otros. Además, hay un grupo de moléculas simples, como los ácidos fenólicos y más complejas, como los taninos (Zapata *et al.*, 2014).

Los polifenoles contribuyen a la morfología, el crecimiento, y la reproducción de las plantas y son compuestos esenciales en su fisiología. Además, los polifenoles están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos y predadores. También han resultado de gran interés en el campo de la investigación por sus múltiples aplicaciones en la industria. Estos compuestos se han empleado para la producción de tintes, papel, cosméticos, aditivos alimenticios, entre otros (Ortiz-Choez, 2015).

Los polifenoles se encuentran generalmente glicosidados en las plantas y por eso son generalmente solubles en agua. Los polifenoles en las frutas y hortalizas muestran una actividad antioxidante mayor que las vitaminas C y E, y en humanos desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas, tales como desórdenes cardiovasculares y neurodegenerativos, cáncer, diabetes tipo 2, osteoporosis, antimutagénicos y antitumorales (Zapata *et al.*, 2014).

## **Compuestos antioxidantes**

Nuestro organismo produce radicales libres constantemente. Sin embargo, éstos están controlados rigurosamente por los antioxidantes y diversos sistemas de detoxificación naturales. Cuando este precario equilibrio se rompe a favor de los radicales libres, se produce el denominado “estrés oxidativo”, el cual puede atacar a los lípidos, que constituyen las membranas celulares, las bases del ADN y los aminoácidos de proteínas. Los antioxidantes combaten los radicales libres y, por lo tanto, pueden ayudar a prevenir las enfermedades que sustentan su base fisiopatológica en la producción interna de radicales libres (Arbayza-Fructuoso *et al.*, 2014).

El cuerpo humano desarrolla sistemas de protección contra radicales libres que resultan insuficientes con la edad, por lo cual las dietas ricas en frutas y hortalizas son una alternativa para la buena salud. Las propiedades benéficas de los polifenoles están asociadas a su estructura química que es capaz de interactuar con las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que son los radicales libres más dañinos, mediante dos mecanismos: uno de transferencia de electrones (SET) y el otro de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) (Zapata *et al.*, 2014).

En el mecanismo SET, el antioxidante (ArOH) puede donar un electrón al radical peróxilo, formando entre los productos un anión peróxilo y un catión radical del antioxidante (ArO•+); y en el mecanismo HAT, el antioxidante (ArOH) atrapa un radical peróxilo por donación de átomos de hidrógeno, generando un hidroperóxido y un radical antioxidante más estable químicamente (ArO•). Los mecanismos se describen a continuación (Zapata *et al.*, 2014):



Además, pueden existir correlaciones bajas o moderadas entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, debido a la presencia de otros compuestos no fenólicos, como carotenoides y ácido ascórbico, con potencial antioxidante (Zapata *et al.*, 2014).

## **Extracción hidroalcohólica de polifenoles**

Tradicionalmente la extracción de los compuestos de interés presentes en frutas se realiza utilizando disolventes orgánicos tales como agua, acetona, metanol, etanol o mezclas de estos últimos con distintas proporciones de agua. Esta extracción sólido-líquido consiste en un fenómeno de transporte de masa en el que los sólidos contenidos en la matriz migran al solvente mientras están en contacto (Gimeno-Martínez, 2015).

Las distintas metodologías propuestas para llevar a cabo la extracción de polifenoles difieren en cuanto a variables de operación tales como la temperatura, el tipo de disolvente, el tiempo de extracción, la relación soluto-disolvente (S-D), tamaño de partícula y pH (Trillo-Contreras, 2015 y Valdés-Hernández *et al.*, 2015). La combinación más apropiada de estos parámetros es fundamental para lograr los mejores resultados

en cuanto al contenido de polifenoles, flavonoides y otras sustancias antioxidantes (Valdés-Hernández *et al.*, 2015).

Debido a la naturaleza polar de los polifenoles, estos son fácilmente solubilizados en medios polares como son las soluciones hidroalcohólicas. Diferentes investigaciones realizadas sobre el contenido de polifenoles en alimentos determinaron que la manera más común de extraer estos compuestos es la utilización de soluciones generalmente ácidas y aplicando elevadas temperaturas para poder liberar la mayor parte de los compuestos no extraíbles. Se cree que estos compuestos permanecen en el residuo asociados a componentes de la fibra dietética (polisacáridos) o bien formando complejos con proteínas o unidos entre sí formando compuestos de alto peso molecular (Venanzi, 2014).

La mezcla etanol-agua es el solvente comúnmente empleado para la extracción de fitoquímicos por su ausencia de toxicidad (aceptado por la FDA como solvente grado alimenticio) como así también por su requerimiento mínimo de seguridad en su manipulación (Venanzi, 2014).

En un estudio previo de Navarro-Hoyos *et al.* (2017), a partir de muestras liofilizadas de cáscara y pulpa de manzana variedad Anna, realizaron una extracción de polifenoles empleando Extracción Acelerada por Solvente (ASE), con solventes orgánicos y acuosos, bajo condiciones definidas de presión y temperatura, y ciclos de extracción. Las muestras liofilizadas obtenidas las purificaron con columnas cromatográficas de resina Amberlite XAD-7, que permitieron la obtención de extractos enriquecidos en polifenoles, con rendimientos que variaron entre 10.7 y 29.4 mg de extracto/g liofilizado para esta variedad.

### **Capacidad antioxidante**

Los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno sínglete y fuentes de radicales libres (Perdomo-Angulo, 2009).

El radical DPPH (2,2 diphenil-1-picrilhidrazil), es un reactivo que se usa ampliamente para investigar la inhibición de radicales libres por los polifenoles, también sufre decoloración por la cisteína, glutatión, ácido ascórbico, tocoferol, compuestos polihydroxiaromáticos (hidroquinona, pirogalol, etc.) y aminas aromáticas (pfinilendiamina, p-aminofenol, etc.). El mecanismo de reacción consiste en sustraer un átomo de hidrógeno de un fenol donador para dar difenilpicrilhidrazina y un radical fenoxil. La reacción involucra un cambio de color de violeta a amarillo, que fácilmente es monitoreado (Perdomo-Angulo, 2009).

El método de la capacidad atrapadora del radical oxígeno (ORAC) es un ensayo que mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peróxilo, relevante en la

oxidación de lípidos en los alimentos; mediante un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno HAT. En este ensayo, los radicales peróxilo (ROO•) generados por iniciadores de radicales libres, reaccionan con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente; es decir, a medida que avanza la reacción la sonda fluorescente se consume y disminuye la fluorescencia. El antioxidante adicionado al medio compite con la sonda fluorescente, manteniéndose la fluorescencia. Además, este método puede medir la expresión antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos en una muestra, y es muy utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos y productos naturales (Zapata *et al.*, 2014).

### **Contenido de fenoles totales**

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu en alimentos y vegetales. El método de Lowry con el reactivo Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes susceptibles de ser determinados espectrofotométricamente a 765 nm. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Zambrano-Sancán y García-Águila, 2016).

La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos de tungsteno (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) y molibdeno (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. Este reactivo de color amarillo, reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles (Zambrano-Sancán y García-Águila, 2016).

### **Generalidades de la manzana**

El nombre “manzana” hace referencia al nombre otorgado en un principio por Linnaeus, *Pyrus malus* (mismo género de la pera aunque ya no pertenece a él). Actualmente las manzanas se agrupan dentro del género *Malus*. Las especies consideradas como manzanas son: *Malus communis*, *Malus domestica*, *Malus pumila* y *Malus sylvestrus*. Se ha hecho mención a ellas desde la época de los romanos, griegos y en mitología frecuentemente se reconocen como símbolos de la eterna juventud. Se conocen referencias de cultivos de manzanas desde el año 300 a. C. (Polanco-Zambrano, 2017).

La manzana es un típico pomo, comestible, que presenta restos de cáliz en el ápice, la piel puede presentar diferentes colores desde el amarillo, hasta el naranja o rojo y su tamaño depende de la variedad. Las semillas se encuentran en el interior de un ovario ínfero (a diferencia de la mayoría de las rosáceas que tienen ovarios súperos) que está inmerso en la pulpa del fruto y tiene una o más semillas por segmento (Polanco-Zambrano, 2017).

El manzano es un árbol perteneciente a la familia Rosaceae. En general, estos árboles tienen la copa redonda y miden entre 7 y 12 m aunque en cultivos comerciales alcanzan entre 2 y 5 m. Las ramas son angulares y su corteza es marrón grisáceo en la madurez. Son árboles bastante longevos. Las hojas del manzano son caducas, elípticas y sus márgenes son dentados, de color verde oscuro en el haz y grisáceas en el envés. La textura es áspera y bastante gruesa. Las flores se encuentran en grupos, poseen pétalos blancos y rosados, delicados y se encuentran en número de cinco. Tienen numerosos estambres, un estigma que conduce al ovario, con cinco secciones. Estas flores son polinizadas por insectos, principalmente abejas (Polanco-Zambrano, 2017).

Los manzanos crecen muy bien al sol, son tolerantes al viento moderado. El manzano es un árbol que se adapta bien a diversas temperaturas, a los climas más fríos y a los climas más templados. Suelen crecer mejor en las regiones que tienen estaciones bien marcadas, aunque son poco tolerantes al calor (Polanco-Zambrano, 2017).

Las variedades de manzana requieren diferentes cantidades de frío, dependiendo del clima del lugar de donde provienen, o sea la duración y severidad del invierno. El manzano da la apariencia que crece más en Costa Rica que en los lugares templados, debido a que tiene muy poco tiempo de descanso; sin embargo, este crecimiento es desordenado. La variedad Anna crece hacia arriba con ramillas delgadas, en lugar de formar un marco o andamio para sostener bien la cosecha (Wainwright-Swain, 1992).

En lugares templados el manzano tiene que crecer rápidamente porque tiene pocos meses para crecer y producir. Por la rapidez con que crece en poco tiempo en el norte, y el crecimiento desordenado aquí en Costa Rica, la cantidad de crecimiento por año en los dos lugares termina siendo similar. La variedad Anna tiene la característica de alternar cosechas. Aquí en Costa Rica esto nos sirve, porque tenemos dos cosechas por año. Una cosecha pequeña se tiene en el invierno, cuando tiene más problemas con hongos, lo que lleva más altos costos de producción (Wainwright-Swain, 1992).

La composición porcentual (g/100 g) aproximada de la manzana se presenta en el cuadro 1 (Mangas-Alonso y Díaz-Llorente, 2015):

**Cuadro 1. Composición porcentual aproximada de la manzana**

<b>Componente</b>	<b>g/100 g</b>
Agua	85,56
Proteína	0,26
Grasas	0,17
Cenizas	0,19
Azúcares	10,40 (2,0 sacarosa; 2,4 glucosa; 6,0 fructosa)
Fibra dietética	2,40
Calcio	6 mg
Hierro	0,12 mg
Magnesio	5 mg
Fósforo	11 mg
Potasio	107 mg
Sodio	1 mg
Zinc	0,04 mg
Vitamina C	4,60 mg
Vitamina A	54 IU
Colesterol	0
Calorías	52 Kcal

La manzana (*Malus domestica*) es un fruto ampliamente consumido que brinda un importante aporte de antioxidantes, como los ácidos fenólicos caféico y clorogénico, procianidinas, catequinas ((+)-catequina y (-)-epicatequina) y flavonoles derivados de quercetina (Cervantes-Cardoza *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos de la manzana se pueden clasificar del siguiente modo: a) ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres; b) flavonoles; c) dihidrocalconas; d) flavonoles; y e) antocianinas. Los polifenoles están distribuidos por el conjunto del fruto, siendo el córtex donde existe la mayor proporción (aproximadamente el 65% del total), seguido de la piel donde se concentra el 24% de los polifenoles. La presencia de las diferentes familias de polifenoles a lo largo del fruto no es homogénea. Así, por ejemplo, la concentración de los ácidos hidroxicinámicos disminuye desde el corazón hasta la epidermis, al contrario de lo que ocurre con las procianidinas, las catequinas se concentran, mayoritariamente, en la pulpa y epidermis, los flavonoles y antocianinas se localizan preferentemente en la epidermis y las dihidrocalconas en las semillas (Mangas-Alonso y Díaz-Llorente, 2015).

La distribución cualitativa y cuantitativa de los polifenoles de la manzana está más concentrada en la cáscara y ésta varía relativamente poco en función de la variedad, promediando 380 y 160 mg por 100 g de manzana de concentración fenólica y de taninos respectivamente (Cervantes-Cardoza *et al.*, 2010; Palomo *et al.*, 2010).

La manzana y especialmente su piel, donde se concentra la mayor cantidad de polifenoles, en particular flavonoides, tiene una potente acción antioxidante, del orden de 83,3±8,9 TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity, expresado en  $\mu\text{mol/g}$  en equivalencia de vitamina C), lo que supone 1462 mg de vitamina C/100 g. Teniendo en

cuenta que la concentración promedio de vitamina C en manzana es de 4,6 mg/100 g, lo que supone 0,26 TOSC, se deduce que la casi totalidad de la capacidad antioxidante de este fruto proviene de otros compuestos distintos de la vitamina C, como los polifenoles (Mangas-Alonso y Díaz-Llorente, 2015).

### **Malus domestica (manzana) variedad Anna**

En los países tropicales, el cultivo del manzano se ha constituido en los últimos años en una opción de agricultura para las zonas altas fundamentados en plantaciones de variedad 'Anna', cultivar israelita obtenido al cruzar las variedades Golden Delicious y Hadasia Roja; tiene bajo requerimiento de frío y gran calidad del fruto. En Israel se han logrado rendimientos de 50 ton/ha y hasta 100 ton métricas/ha. En Costa Rica, en huertos de cuatro años de edad, las producciones son de 15 ton/ha. En el Ecuador, se habla de aproximadamente 4.500 ha sembradas en manzano que producen en promedio 6.8 ton/ha (Botero-Garcés y Morales-Soto, 2000).

En el Instituto Tecnológico de Costa Rica ya se han realizado estudios previos (Navarro-Hoyos *et al.*, 2017 y Navarro *et al.*, 2018) con esta variedad y se ha encontrado que específicamente la variedad Anna tiene un buen potencial de capacidad antioxidante. En 2019 inició un proyecto que tiene el propósito de mejorar la biodisponibilidad de los fitoquímicos de la manzana.

Estudios exploratorios han mostrado que la manzana costarricense variedad Anna posee un alto contenido de flavonoides, compuestos que podrían prevenir el estrés oxidativo y que poseen propiedades antiinflamatorias y antitumorales (Navarro-Hoyos *et al.*, 2017). En este mismo estudio, se describió que los polifenoles extraídos de frutas inmaduras de manzana Anna poseen actividades antialérgicas en ensayos *in vitro*.

En el estudio de Navarro-Hoyos *et al.* (2017) determinaron la cantidad total de polifenoles presentes en extractos de *Malus domestica* variedad Anna y obtuvieron valores promedio que oscilaron entre los  $579.0 \pm 20.9$  EAG (mg equivalentes de ácido gálico)/ g extracto y  $619.6 \pm 19.6$  mg EAG/ g extracto seco. En lo que respecta a la caracterización de los polifenoles, lograron por UHPLC-HRMS la identificación de 28 compuestos en la cáscara de la manzana variedad Anna, incluyendo nueve flavan-3-oles, entre ellos catequina, epicatequina, dímeros y trímeros y tetrámeros de procianidinas tipo B; tres ácidos, incluyendo derivados de hidroxicinámico y cumárico; ocho flavonoides, incluyendo glicósidos derivados de quercetina, miricetina y kaempferol, así como tres chalconas, incluyendo derivados de floretina. En cuanto a la pulpa, se encontró un número similar de compuestos, pero de forma distintiva un mayor número y diversidad de flavan-3-oles, incluyendo tres dímeros de procianidina de tipo B, tres trímeros de tipo B y dos dímeros de procianidina de tipo A y derivados de la dihidrochalcona floretina.

Estos autores obtuvieron un mayor número y diversidad de polifenoles en las muestras de manzana de la variedad Anna de Costa Rica en comparación con datos reportados de otras 16 variedades en otros países como Noruega, Italia, Canadá y Estados Unidos

y similares a las variedades Golden Delicious y Braeburn de Eslovenia (Navarro *et al.*, 2018).

### **Alimentos funcionales**

Los alimentos funcionales son aquellos alimentos que afectan en forma beneficiosa una o más funciones específicas del cuerpo, más allá de los efectos nutricionales, en una manera relevante para mejorar el estado de salud y bienestar, o bien, reducir el riesgo de enfermedades. Generalmente se considera que los alimentos funcionales son aquellos a los que se añade ingredientes desarrollados tecnológicamente que brindan beneficios específicos para la salud. Dicho componente puede ser añadido, removido o modificado. Los avances en la ciencia y tecnología de alimentos actualmente permiten que un alimento pueda ser formulado de manera que este sea una fuente significativa de nutrientes u otros componentes nutricionales importantes. Esto combinado con el hecho de que la biotecnología moderna puede ser utilizada para aumentar los niveles de ciertas características en los alimentos, hace posible el diseño de alimentos funcionales (Hernández-Ulate, 2017).

### **Colorante de betalaínas**

Para darle coloración a las gomitas se utilizó también una extracción hidroalcohólica del pigmento de la pitahaya roja (betalaínas).

Además de las antocianinas, los carotenoides y las clorofilas, las betalaínas representan una de las cuatro clases de pigmentos vegetales utilizados comercialmente como colorantes naturales en alimentos. En comparación con los colorantes sintéticos, las betalaínas no son tóxicas ni causan reacciones alérgicas. El color de las betalaínas se mantiene en un amplio rango de pH de 3 a 7. Esta propiedad las convierte en alternativa para colorear alimentos de baja acidez. Dado que las betalaínas poseen altos coeficientes de extinción molar, su poder colorante es comparable con los colorantes sintéticos (Esquivel y Araya-Quesada, 2012).

Las pitahayas presentan betalaínas, que es un pigmento hidrosoluble, de estas se conocen dos grupos que proporcionan colores rojos y amarillos. Las betalaínas se dividen en dos tipos; las betacianinas (desde rojo hasta el violeta) y las betaxantinas (desde el amarillo hasta el naranja), al ser hidrosoluble representan una opción como técnica de coloración en alimentos; el vegetal con mayor aporte de betalaínas es la remolacha su pigmento (rojo violáceo) es el más utilizado en la industria alimenticia, su desventaja es que organolépticamente posee un sabor desagradable debido a la presencia de geosmina y algunas pirazinas, que le producen aversión a los productos lácteos cuando son agregados, el pigmento betalaínico (betanina) que se obtiene de la pitahaya es más aceptable organolépticamente (Rivas-Serrano y Tomalá-Pihuave, 2018).

## **Vida útil de los alimentos**

El tiempo de vida útil es el tiempo que tiene un alimento antes de ser declarado no apto para consumo humano, es el tiempo antes de que se torne desagradable o simplemente nocivo (Posada-Cardona, 2011). Algunos indicadores de que la vida útil de un producto ha llegado a su fin son los siguientes: elevado número de microorganismos, oxidación de grasas y aceites, migración de humedad, pérdida de vitaminas y nutrientes, cambios de textura debidos a actividades enzimáticas, degradación de proteínas, pérdida de sabor y color, disminución o aumento de la viscosidad (Carrillo-Inungaray y Reyes-Munguía, 2013).

Las pruebas de caducidad de los alimentos sirven de aviso para evitar problemas potenciales de daño a la salud de los consumidores. Así, un mejor conocimiento de los factores que están involucrados en la pérdida de calidad de los alimentos, y de la ecología microbiana de los microorganismos que pueden desarrollarse en las condiciones particulares de un alimento, permitirá establecer de una manera más exacta su tiempo de vida útil (Carrillo-Inungaray y Reyes-Munguía, 2013).

El método directo implica almacenar el producto bajo condiciones preseleccionadas por un período de tiempo más largo que el de la vida útil prevista, se debe monitorear periódicamente en intervalos regulares de tiempo para hacer observaciones que definan el inicio del deterioro del producto (Posada-Cardona, 2011).

## Justificación

El consumo de frutas y vegetales en la población costarricense está por debajo de la cantidad mínima recomendada por la Organización Mundial de la Salud (400 gramos por día por persona) lo cual es determinante de las deficiencias de micronutrientes en la población, y un factor de riesgo de las enfermedades crónicas no transmisibles y problemas de salud en general (Ministerio de Salud, 2011). Además, en lugar de aumentar el consumo de frutas y vegetales, los consumidores prefieren acudir al uso de suplementos nutricionales para mejorar su salud (Anders y Schroeter, 2017). Sin embargo, el empleo de antioxidantes sintéticos en los alimentos se ha visto restringido en los últimos años debido a posibles riesgos para la salud (Valdés-Hernández *et al.*, 2015), por lo que es necesario aprovechar los antioxidantes, polifenoles y vitaminas que se encuentran naturalmente en las frutas y verduras. Por ello, en el mercado alimenticio ha aumentado la oferta y demanda de productos naturales, orgánicos y libres de aditivos.

Las frutas como la manzana tienen gran cantidad de polifenoles y antioxidantes que pueden tener importantes beneficios para la salud. Sin embargo, además de que existe una deficiencia en el consumo regular de estos alimentos, sus antioxidantes están presentes en concentraciones relativamente bajas en las frutas, en relación con la concentración efectiva que se requiere alcanzar en el cuerpo. Es por eso que mediante una extracción hidroalcohólica se podrían aislar y concentrar estos compuestos para la elaboración de un alimento funcional, el cual se prepararía en formato de “gomitas” con la intención de que tengan además mayor atractivo organoléptico para los consumidores. Estas gomitas comestibles podrían ayudar a satisfacer las necesidades nutricionales de las personas por su aporte de vitaminas, polifenoles y antioxidantes y, además, permitirían aprovechar material agrícola que normalmente no se utiliza. Esto beneficiaría no solamente a la población consumidora del producto, sino que también favorecería a los productores de manzana y eventualmente otras frutas.

## Objetivos

**Objetivo general:** Elaborar un alimento funcional con potencial antioxidante basado en un extracto de manzana costarricense (*Malus domestica*, variedad Anna) para el mejoramiento de la ingesta costarricense de vitaminas y fitoquímicos bioactivos.

### Objetivos específicos:

- I. Preparar un extracto rico en polifenoles a partir de cáscara y pulpa de manzana variedad Anna colectada en Copey de Dota.
- II. Determinar la cantidad de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del extracto de manzana.
- III. Elaborar gomitas comestibles a partir del extracto de manzana obtenido coloreadas con un pigmento natural.

## **Materiales y Métodos**

**Objetivo específico 1:** Preparar un extracto rico en polifenoles a partir de cáscara y pulpa de manzana variedad Anna colectada en Copey de Dota.

En una primera etapa, en los meses de febrero y marzo se realizaron pruebas preliminares de extracción de polifenoles con manzanas de las variedades Gala (n=6) y Anna (n=6) adquiridas en el supermercado o en la feria del agricultor. Se compararon dos métodos de secado (deshidratación y liofilización) y el material seco se extrajo una única vez por maceración (1:10 o 1:20, material fresco:solvente) en agitación constante (> 4 h) y sonicación (30-40 minutos) con diferentes proporciones de etanol (50, 70 y 95%) en agua destilada. La información de los diferentes extractos obtenidos se detalla en el anexo 1.

En el caso de las muestras deshidratadas, se utilizó un desecador Weston a 52°C y luego fue necesario utilizar nitrógeno líquido para triturar las muestras. Las manzanas que fueron liofilizadas en un liofilizador Alpha 1-2 LD Plus a -50°C se molieron con un mini-procesador de alimentos para obtener el polvo necesario para las maceraciones. Se obtuvo mejores resultados (en términos de concentración de polifenoles totales) utilizando el método de liofilización, por lo que en adelante se siguió utilizando esta técnica para eliminar el agua de la muestra. Además, con los datos preliminares se descartó el uso de etanol al 95%, ya que con este solvente se recuperó la menor cantidad de polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra, mg EAG/g).

Posteriormente, se evaluó la recuperación de polifenoles a partir de manzanas en distintos grados de maduración: manzanas maduras y manzanas “pintonas” (figura 1), y de manzanas maceradas con dos solventes diferentes: etanol al 50% y etanol al 70%.



**Figura 1. Manzanas Anna seleccionadas como maduras (A) vs. “pintonas” (B).**

Primeramente, las manzanas se lavaron con jabón antibacterial y se desinfectaron 90 segundos con una dilución de hipoclorito de sodio al 0,02%. Luego se cortaron las manzanas en gajos delgados y se envolvieron en papel aluminio para posteriormente congelar las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 48 horas. Después, las muestras se llevaron a liofilizar por 48 horas y luego se trituraron con un mini-procesador de alimentos para hacerlas un polvo fino.

Se pesaron 5 g del material seco triturado y se pusieron en tubos Falcon de 50 mL para la maceración con 45 mL de etanol al 50% y 70%, manteniendo una relación de soluto: solvente de 1 g de material seco por 9 ml de solvente. El grado de maduración y el porcentaje de etanol del solvente fueron los factores a evaluar mediante cuatro tratamientos en total, con tres réplicas para cada tratamiento: manzanas maduras y 50% etanol, manzanas maduras y 70% etanol, manzanas pintonas y 50% etanol y manzanas pintonas y 70% etanol. Posteriormente se pusieron a macerar las muestras en un agitador orbital a temperatura ambiente por 20,5 horas (aprox. 100 rpm). Luego se llevaron a un baño ultrasónico por 30 minutos para incrementar la extracción de los polifenoles.

Después de esto, los extractos se centrifugaron a 4000 r.p.m. por 5 min y luego se filtraron mediante kitasato, filtro de café y bomba de vacío y se pusieron en nuevos tubos Falcon de 50 mL y se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los tubos con el mosto restante se utilizaron para realizar una segunda extracción con la misma cantidad de solvente (45 mL), luego se maceró por 4 h y se centrifugó a 4000 r.p.m. por cinco minutos y se filtró nuevamente. Ambas extracciones de cada una de las réplicas se juntaron y se rotaevaporaron hasta

concentrar en un volumen de 20 mL. Los extractos concentrados se almacenaron a 4°C para un posterior análisis de capacidad antioxidante y cuantificación de polifenoles totales.

Se realizó un ANOVA para comparar estadísticamente la concentración de polifenoles totales (mg EAG/L) y actividad antioxidante (DPPH) entre los tratamientos; aunque no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, se obtuvo mejores resultados con el solvente etanol al 70% con el grado de maduración “pintonas”, por lo que se repitió este método de extracción en tres repeticiones de tres réplicas cada una. Se realizó un ANOVA para evaluar estadísticamente el promedio de recuperación en el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante (DPPH) de las tres repeticiones.

**Objetivo específico 2:** Determinar la cantidad de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del extracto de manzana.

En todos los extractos obtenidos se determinó la concentración de polifenoles totales (en mg equivalentes de ácido gálico por litro). La concentración de polifenoles totales (anexo 2) de cada extracto se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Rosales-López, 2016). La capacidad antioxidante (anexo 3) de cada extracto se analizó respecto al radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Rosales-López, 2016). Además, se realizaron pruebas cualitativas (anexo 4, Rosales-López, 2016) para determinar la presencia de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, leucoantocianidinas y triterpenos y/o esteroides) en muestras de extractos de manzanas maduras y “pintonas”.

Los grados brix del extracto M (figura 2) se midieron con un refractómetro digital de bolsillo (marca Acago) en la Planta Piloto Agroindustrial de la Escuela de Agronegocios en el TEC.



**Figura 2. Muestra ilustrativa de extractos de manzanas maduras (M), “pintonas” (P) y manzanas mixtas (F).**

**Objetivo específico 3:** Elaborar gomitas comestibles a partir del extracto de manzana obtenido y coloreadas con un pigmento natural.

Se evaluaron varias mezclas para obtener un alimento funcional en presentación de gomitas a base del extracto de manzana, utilizando ingredientes naturales y evitando la inclusión de aditivos artificiales (cuadro 2). Primero se realizó una prueba casera de la elaboración de gomitas para probar la capacidad de gelificar de un producto de fibra de alga agar deshidratada (Elegant Flower) y calcular la cantidad de este agar necesario para gelificar una pulpa diluida de fruta comercial. Se utilizaron 7 g de este agar que se disolvieron en ½ taza de agua a fuego medio hasta hervir y 1 ½ taza de la pulpa diluida de fruta. Se vertió la mezcla en un refractario y se puso a gelificar a 4°C.

En una segunda prueba se intentó utilizar 14 g de goma xanthan IQS (Insumos Químicos y Servicios) con 60 g de agua y 7 g de fibra de alga agar en 112 g de agua para darle más gomosidad a las gomitas; sin embargo, la goma xanthan no se disolvió.

**Cuadro 2. Resumen de las pruebas de elaboración del alimento funcional**

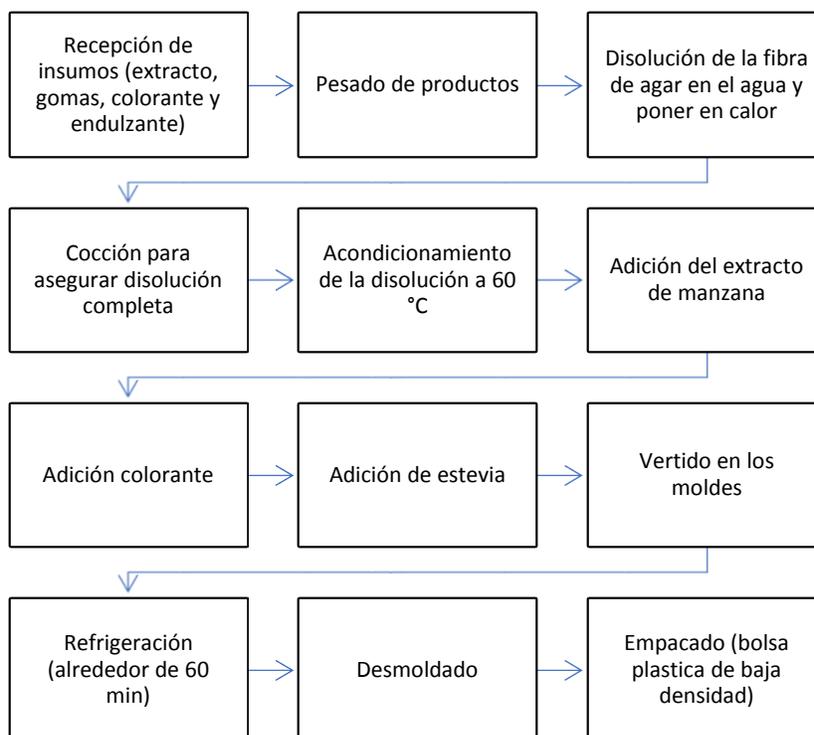
Prueba	Extracto o pulpa	Gelificante	Endulzante	Colorante
1	1 ½ tazas pulpa de guanábana	7 g fibra de alga agar en ½ taza de agua	-	-
2	217,5 g extracto de manzana	7 g fibra de alga agar en 112 g de agua y 14 g de goma xanthan en 60 g de agua	-	-
3	1 ½ tazas de pulpa de manzana	7 g fibra de alga agar en 1 taza de agua y 3,5 g de goma xanthan en ½ taza de agua	10 gotas estevia <i>Natuvia</i>	-
4	217 g extracto de manzana	10 g de fibra de alga agar en 160 g de agua	5 gotas estevia <i>Natuvia</i>	3 gotas extracto betalaínas de pitahaya roja
5	1 ½ tazas de pulpa de manzana	7 g de fibra de alga agar en ½ taza de agua y 2 láminas de gelatina pura	10 gotas estevia <i>Natuvia</i>	-

En una tercera prueba, las gomitas se realizaron con una pulpa de manzana que se obtuvo licuando tres manzanas Anna con ½ taza de agua para obtener 1 ½ tazas de la pulpa. Primeramente, se puso a remojar 3,5 g de goma xanthan en ½ taza de agua y se disolvieron 7 g de fibra de alga agar en 1 taza de agua. Luego, se mezcló la goma xanthan con el agar-agar y se agregó la pulpa de manzana. Finalmente, se agregó 10 gotas de estevia *Natuvia* como endulzante.

En una cuarta prueba (figura 3), se elaboraron las gomitas con 217,5 g de extracto de manzana Anna y 10 g de fibra de alga agar disueltos en 160 g de agua (cuadro 3). Primeramente, se disolvió el agar y luego se agregó el extracto, posteriormente se agregaron cinco gotas de endulzante de estevia *Natuvia* y tres gotas de un extracto hidroalcohólico (1:2, agua:etanol) de betalaínas de pitahaya roja liofilizada (donado por estudiantes del curso de Introducción a la Fitoquímica 2018, por Maripaz Lemus Montero). La mezcla se vertió en moldes de plástico cubiertos con azúcar molida. La mezcla se preparó en la Planta Piloto Agroindustrial de la Escuela de Agronegocios.

**Cuadro 3. Formulación de prueba #3 del alimento funcional**

Producto	Porcentaje	Cantidad (gramos)
Extracto concentrado de manzana variedad Anna	55.98	217.50
Fibra de alga agar deshidratada	2.57	10.00
Agua	41.18	160.00
Colorante (extracto de betalaínas de pitahaya)	0.13	0.50
Estevia	0.13	0.50
Totales	100.00	388.50

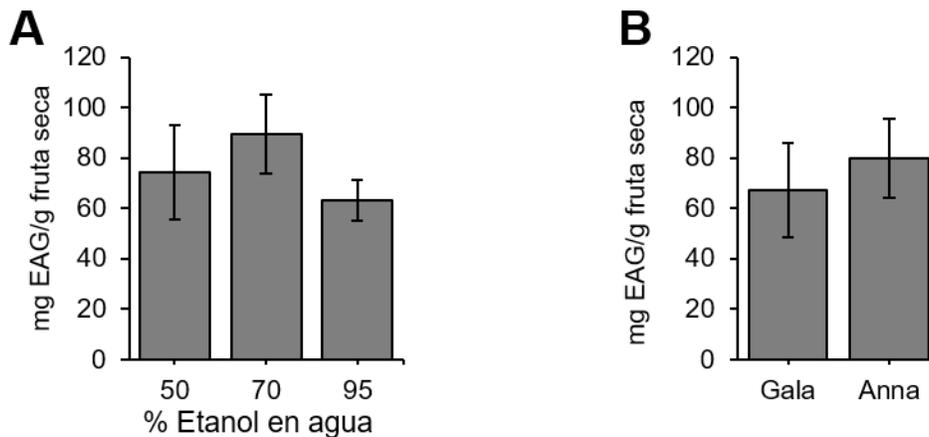


**Figura 3. Diagrama general del proceso de la elaboración del alimento funcional**

Estas pruebas demostraron la necesidad de agregar algún componente adicional para lograr una textura más viscosa y estable. Debido a esto, en una quinta preparación se utilizó 1 ½ tazas de pulpa de manzana obtenidas a partir de licuar tres manzanas Anna con ¼ taza de agua. Primero se disolvieron dos láminas de gelatina pura en ½ taza de agua calentando en microondas, una vez disuelta se puso a remojar 7 g de agar-agar en esa disolución. Luego se puso a disolver este agar-agar en fuego medio hasta hervir. Después se agregó la pulpa de manzana. Se agregaron diez gotas de estevia *Natuvia* para endulzar y se vertió la mezcla en un refractario. Se dejó enfriar y se refrigeró (4 °C) para gelificar.

## Resultados

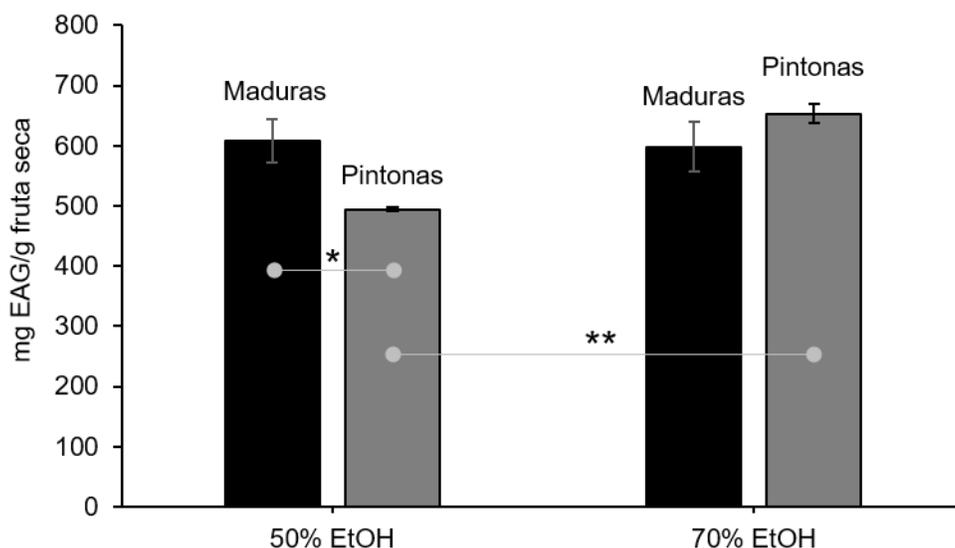
Las pruebas preliminares de extracción (figura 4) permitieron recuperar en promedio 76 mg/g polifenoles totales (mg EAG/g material seco, método de Folin-Ciocalteu) del material liofilizado (n=9) y aproximadamente 47 mg/g polifenoles totales (mg EAG/g material seco, método de Folin-Ciocalteu) del material deshidratado (de una única muestra). El material deshidratado presentó una textura más viscosa y difícil de pulverizar. No se encontró diferencia significativa entre las muestras extraídas con distintas proporciones de agua:etanol (figura 4A). Sin embargo, se obtuvo mayor concentración de polifenoles totales en manzanas maceradas con la mezcla 70% etanol en agua. Además, se obtuvo mayor concentración de polifenoles totales en frutas variedad Anna respecto a Gala (figura 4B; anexo 1, extractos GD1 a A6). Con base en estos resultados, se seleccionó como método de extracción el secado por liofilización y la maceración con etanol al 50% y 70%, el cual se siguió utilizando para comparar entre manzanas (variedad Anna) en distintos estadios de maduración.



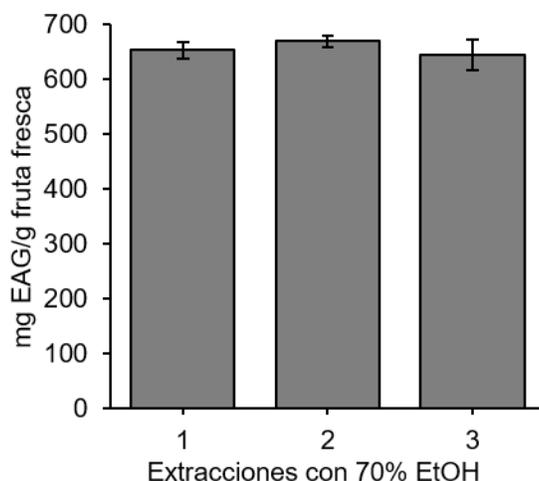
**Figura 4. A. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g muestra, promedio  $\pm$  desviación estándar) obtenida a partir de manzanas liofilizadas y maceradas con diferentes soluciones hidroalcohólicas (n=3). No se encontró diferencia significativa en el contenido de polifenoles totales entre solventes (ANOVA de una vía,  $p=0.170$ ). B. Comparación del contenido de polifenoles totales entre manzanas de variedad Gala (n=3) y manzanas variedad Anna (n=6). No se encontró diferencia significativa en el contenido de polifenoles totales entre variedades (prueba  $t$  Student,  $p=0.280$ ).**

Al comparar extractos de manzanas variedad Anna en distintos estados de maduración (maduras vs pintonas, figura 5), se obtuvo significativamente ( $p=0.03$ ) mayor contenido de polifenoles totales ( $607 \pm 36$  mg EAG/g material seco, método de Folin-Ciocalteu) en los extractos de manzanas maduras extraídas con etanol al 50% (figura 5) respecto a las manzanas “pintonas” ( $494 \pm 3$  mg EAG/g material seco). Sin embargo, no se encontró

diferencia significativa ( $p=0.122$ ) entre las manzanas extraídas con etanol al 70% (maduras  $598 \pm 42$  mg EAG/g material seco; “pintonas”  $653 \pm 15$  mg EAG/g material seco). Por otro lado, se confirmó una mayor recuperación de polifenoles totales utilizando etanol al 70% respecto a la solución con etanol al 50% en las manzanas “pintonas” ( $p=0.003$ ). Con base en estos datos, se seleccionó como solvente definitivo la solución de etanol al 70%. Se realizaron otras dos repeticiones de tres réplicas cada una empleando maceración con este solvente y con manzanas “pintonas”, con el fin de verificar la repetibilidad del método de extracción (figura 6). Con este método, se obtuvo un promedio ( $n=9$ ) de recuperación de polifenoles totales de  $656 \pm 20$  mg EAG/g fruta seca (liofilización), con un coeficiente de variación de  $2.73 \pm 1.49\%$ .



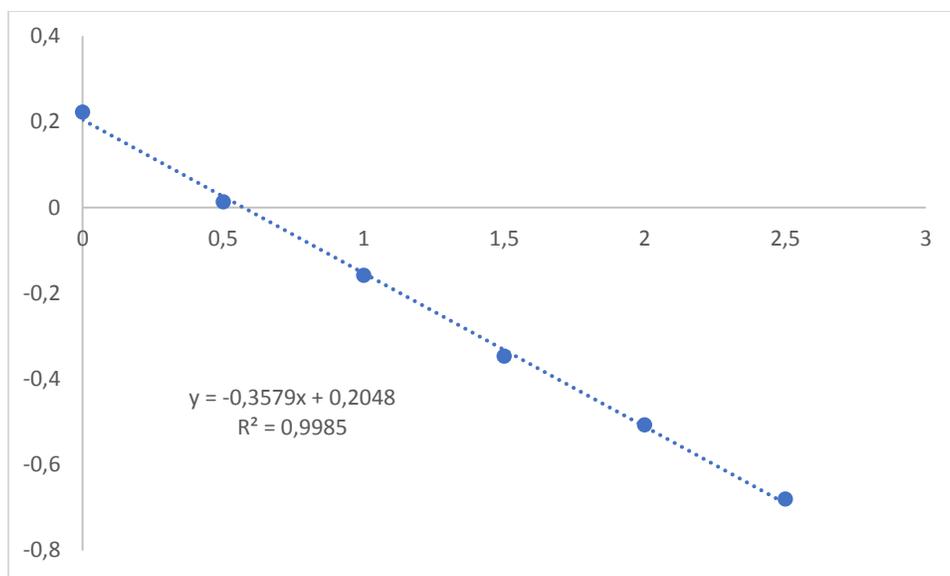
**Figura 5. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g muestra, promedio  $\pm$  desviación estándar) obtenida a partir de manzanas (*Malus domestica* var. Anna) en dos estadios de maduración (maduras vs “pintonas”) liofilizadas y maceradas dos veces con etanol al 50% y al 70% ( $n=3$ ). Los asteriscos marcan las diferencias significativas obtenidas mediante comparaciones con pruebas *t* Student (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.005$ ).**



**Figura 6. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g muestra) obtenida a partir de manzanas (*Malus domestica* var. Anna) “pintonas” liofilizadas y maceradas dos veces con etanol al 70% (n=3). Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones independientes de tres réplicas cada una. No se encontró diferencia significativa entre los experimentos realizados en distintos días con manzanas diferentes (ANOVA de una vía,  $p=0.359$ ).**

En total se analizaron 37 extractos diferentes en cuanto a su cantidad de polifenoles totales, así como su capacidad antioxidante para reducir el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Los resultados de todos los extractos se resumen en el anexo 1 y se detallan los cálculos en los anexos 5 y 6.

En el caso de la capacidad antioxidante, los datos se muestran como volumen de extracto ( $\mu\text{L}$ ) necesario para reducir en 50% (concentración inhibitoria media o IC50, por sus siglas en inglés) la intensidad de la señal espectrofotométrica a 570 nm de 50  $\mu\text{l}$  del radical DPPH (decoloración). En promedio, se necesitaron  $0.260 \pm 0.014 \mu\text{L}$  de extracto puro de manzana var. Anna (“pintonas”, n=9) para reducir en 50% al radical DPPH (figura 7). En el caso de las manzanas maduras (n=6), la IC50 en el ensayo de actividad antioxidante fue levemente menor ( $0.247 \pm 0.010 \mu\text{L}$  de extracto), lo cual implicaría mayor potencial antioxidante. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de manzana maduras vs “pintonas” ( $p=0.07$ , prueba *t* Student).



**Figura 7. Gráfico de dispersión de la capacidad antioxidante sobre el DPPH de los extractos de las repeticiones de P70**

Por otro lado, se realizaron pruebas cualitativas de presencia de metabolitos secundarios a dos extractos (70% etanol) muestra de manzanas var. Anna maduras y dos extractos muestra de manzanas var. Anna “pintonas”. Se obtuvo resultados positivos para la presencia de flavonoides y leucoantocianidinas y negativos para la presencia de alcaloides y triterpenos y/o esteroides. Los extractos procedentes de las muestras de manzana maduras, presentaron una mayor coloración rojiza en la prueba de flavonoides (cuadro 4).

**Cuadro 4. Determinación de metabolitos secundarios en extractos (70% etanol) de manzana var. Anna en dos estadios de maduración (maduras vs “pintonas”).**

Metabolito	Maduras	“Pintonas”
Flavonoides	++	+
Leucoantocianidinas	+	++
Alcaloides	-	-
Triterpenos/esteroides	-	-

+ positivo, ++ muy positivo, - negativo

Por otra parte, en cuanto a la medición de grados brix de los extractos, se hizo la medición con un refractómetro digital del extracto que se empleó luego para la elaboración de las gomitas. Este extracto presentó 16,1 ° brix.

Cabe mencionar que se realizó una prueba preliminar de citotoxicidad del extracto en fibroblastos murinos 3T3 cultivados en medio DMEM (4,5 g/L glucosa, GIBCO) suplementado con 10% de SFB (SIGMA), 2% glutamina (4mM, GIBCO), 1% penicilina-estreptomicina (10 000 u/ml penicilina G, 10 000 µg/ml de sulfato de estreptomicina; GIBCO) y 1% piruvato de sodio (0.11mg/ml, SIGMA), con un pH final de 7,5-7,7. Las células se mantuvieron en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C y alta humedad. Las células se trataron por 24 h con extracto de manzana var Anna (“pintonas”, 70% etanol) en 5 concentraciones decrecientes (desde 2250 hasta 11 µg/ml equivalentes de ácido gálico, 5 réplicas por concentración). La viabilidad celular se evaluó mediante la prueba de MTT (Calvo-Castro *et al.*, 2013) en comparación con controles de células no tratadas. En todos los casos, la viabilidad celular se mostró por arriba del 100%, sin diferencia significativa respecto al control (ANOVA de una vía, p=0.501). Esto indica que el extracto no mostró riesgo de toxicidad en esta línea celular.

En la primera prueba de la elaboración de gomitas con un producto de fibra de alga agar deshidratada y una pulpa de fruta comercial se obtuvo un producto firme, pero le faltó consistencia y textura, característica de las gomitas.

En la segunda prueba en la planta piloto de Agronegocios se intentó utilizar goma xanthan y fibra de agar para darle más textura a las gomitas; sin embargo, la goma xanthan no se disolvió por ser una gran cantidad y no se prosiguió con la elaboración de las gomitas en esa ocasión.

En la tercera prueba, las gomitas se realizaron con 1 ½ tazas de pulpa de manzana, 3,5 g de goma xanthan y 7 g de fibra de agar, y se obtuvo una consistencia y textura similar a la primera prueba, no se notó que la goma xanthan mejorara la consistencia y más bien interfirió con el sabor a manzana del producto.

En la cuarta prueba se elaboraron las gomitas en la planta piloto de Agronegocios con 217 g de extracto de manzana y 10 g de fibra de agar (figura 8). Se obtuvo una consistencia y textura del producto final similar a las pruebas anteriores, aunque tenía mayor cantidad de fibra de agar.



**Figura 8. Alimento funcional elaborado a partir de extracto de manzana var. Anna y agar, coloreado con pigmento a base de pitahaya.**

En la quinta prueba se utilizó 1 ½ tazas de pulpa de manzana, dos láminas de gelatina pura y 7 g de fibra de agar y se obtuvo una mejor consistencia y textura más firme, el sabor era agradable a manzana, aunque todavía no tiene la textura como las gomitas comerciales (figura 9).



**Figura 9. Alimento funcional elaborado a partir de extracto de manzana var. Anna, agar y gelatina, sin colorante.**

El empaque para el producto final podría ser una bolsita de polietileno de baja densidad de 24 pulgadas cuadradas blanca o coloreada para proteger las gomitas de la luz. Se podría sellar al vacío, lo que también protegería el producto del oxígeno. Sin embargo, el costo y tiempo de producción de los extractos no permitió elaborar una cantidad necesaria de gomitas como para desarrollar un prototipo de empaque. Se diseñó el logo y nombre comercial del producto (figura 10).



**Figura 10. Nombre comercial y logo del alimento funcional**

El nombre “manSana” no sólo hace referencia a la manzana como fruta, sino que la “s” en mayúscula refiere a la salud, que el producto es un alimento funcional saludable. El logo tiene un resplandor que refiere al poder natural que tiene la manzana por sus polifenoles y antioxidantes y un corazón sobre el que este poder actúa, ya que la manzana podría prevenir el padecimiento de enfermedades crónicas como las cardiovasculares (Zapata *et al.*, 2014).

El producto de la tercera prueba de elaboración del alimento funcional se puso en bolsas de cierre hermético a temperatura ambiente para analizar la vida útil y caducidad del producto, sin embargo, la vida útil del producto fue menor a 48 horas, ya que presentó mohos a simple vista.

## Discusión

Se logró preparar extractos de manzana ricos en polifenoles mediante el método de liofilizado y utilizando etanol al 70% como solvente. En frutas y hortalizas el contenido de polifenoles depende del producto considerado y puede variar entre 0,2 y 5 g EAG por kilogramo de peso fresco. La manzana contiene proporciones muy variables de compuestos fenólicos que afectan tanto a las propiedades sensoriales de ésta como a la calidad de los productos industriales, por ejemplo, zumos y sidras, que puede deberse a diferentes factores (Mangas-Alonso y Díaz-Llorente, 2015). Desde la cosecha hasta el consumo, los factores que más influyen los niveles de polifenoles son: la madurez, el etileno, el daño mecánico, la temperatura de almacenamiento, la atmósfera de almacenamiento, la realización de tratamientos antioxidantes o pro-oxidantes y el empleo de otros tratamientos (Vicente *et al.*, s.f.).

El método de secado de las muestras que generó mejores resultados fue la liofilización, la cual produjo extractos con  $1378,05 \pm 226,62$  mg/L de polifenoles en comparación con la desecación a  $52^{\circ}\text{C}$  por 9 horas, ya que los polifenoles se degradan con la temperatura, en cambio las muestras que fueron liofilizadas se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  por al menos 48 horas previamente y la sublimación del hielo congelado de las muestras ocurre a  $-50$  grados, lo cual este método permite conservar la estabilidad de los polifenoles ya que la temperatura es baja y evita la degradación de los polifenoles.

La cantidad de polifenoles extraídos y la actividad antioxidante no sólo depende del método de extracción utilizado, sino también del solvente. El solvente utilizado para las extracciones fue el etanol, el cual, aunque en el proceso se evapora por rotavaporación, es inocuo para la ingesta humana, en comparación con otros solventes como el metanol, acetona y etil-acetato (Quy Diem Do *et al.*, 2014). Es conocido que el etanol es buen solvente para extraer polifenoles, por ser un compuesto polar, así como el agua, disolvente universal. La presencia de diferentes componentes antioxidantes con características químicas y polaridades diferentes los pueden hacer o no solubles en determinado solvente (Quy Diem Do *et al.*, 2014).

En el experimento realizado para comparar el grado de maduración y el porcentaje de etanol del solvente se obtuvo una media mayor de polifenoles extraídos con etanol al 70% como solvente en la extracción ( $3103,69 \pm 206,48$  mg EAG/L) y con etanol al 50% se obtuvo una media de  $2730,13 \pm 329,93$  mg EAG/L, lo cual indicó cuál porcentaje podía ser elegido para ser utilizado en la etapa posterior de las extracciones, de esta manera se eligió el etanol al 70% para realizar las tres repeticiones de tres réplicas cada una de la extracción de polifenoles.

En el experimento realizado para comparar el grado de maduración y el porcentaje de etanol del solvente a utilizar se obtuvo una media de  $2989,24 \pm 177,05$  mg EAG/L para los tratamientos de manzana maduras, mientras que con los tratamientos de manzana pintona se obtuvo una media de  $2844,58 \pm 437,39$  mg EAG/L aunque en la literatura se reporta que, si bien es difícil establecer un único patrón de cambios en los polifenoles

solubles, es frecuente observar un descenso durante la maduración. En frutos esto puede comprenderse si se considera que muchos de estos compuestos cumplen una función protectora de las semillas y por tanto su rol, evolutivamente crucial para asegurar la propagación de la especie, finaliza en muchos casos cuando las mismas llegan a la madurez fisiológica. En contraposición con lo que ocurre con los fenoles totales las antocianinas suelen mostrar un aumento conforme progresa la madurez, dada su importancia en la pigmentación y atracción de depredadores (Vicente *et al.*, s.f.).

La maduración se caracteriza por una modificación del color (pérdida de clorofila, acumulación de carotenoides y pigmentos antociánicos). El contenido de los compuestos fenólicos, tanto global como individual (ácido clorogénico, (-)epicatequina y (+)catequina), disminuye a lo largo del desarrollo de la manzana. En general, se ha observado que la composición fenólica en los frutos jóvenes es más elevada que en los maduros, lo cual es una consecuencia de la mayor actividad enzimática que se detecta en los primeros en relación con las enzimas PAL (fenilalanina amonioliasa), CHI (calcona flavanona isomerasa) y DFR (dihidroflavonol reductasa). La actividad de estas enzimas disminuye a lo largo del desarrollo del fruto, detectándose un aumento de la actividad de la CHI y la DFR en la fase de maduración, lo cual puede estar asociado a la síntesis de compuestos antociánicos (Mangas-Alonso y Díaz-Llorente, 2015).

En las repeticiones de manzanas “pintonas” no hubo diferencia significativa entre las repeticiones, sin embargo, sí se observó que conforme las manzanas estaban más maduras la tendencia fue que tenían menor cantidad de polifenoles, sin embargo, la repetición dos tuvo una media mayor porque la muestra fue desecada por mayor tiempo en el liofilizador y estaba más seca por lo cual fue más fácil hacerla polvo, por lo tanto, esto facilitó la maceración y recuperar más polifenoles.

Por otra parte, en cuanto a la correlación entre los volúmenes de extracto puro calculados y los valores promedio de las absorbancias reales de las réplicas de las tres repeticiones de la extracción de polifenoles de muestra de manzana pintonas con etanol de 70% se obtuvo un R cuadrado de 0,9985, el cual es alto y el gráfico de dispersión (figura 7) mostró que los datos se encuentran alineados en la línea de tendencia. La ecuación obtenida  $y = -0,3579x + 0,2048$  tiene una pendiente negativa que indica que a menor absorbancia los polifenoles tuvieron una mayor capacidad antioxidante para reducir el DPPH, lo que se evidenció con el cambio de color de la reacción y se obtuvo un IC50 de 0,261  $\mu\text{L}$ , que indica que se requiere una cantidad muy pequeña de extracto puro para lograr reducir el 50% del DPPH de la reacción.

En las pruebas de presencia de metabolitos secundarios realizadas a los extractos de manzana se evidenció la presencia de flavonoides y leucoantocianidinas, pero ausencia de alcaloides y triterpenos y/o esteroides en los extractos obtenidos. Se ha reportado en la literatura que la manzana posee flavonoles, principalmente quercitina, y que las coloraciones que se obtienen en la prueba de Shinoda para flavonas y flavonoles son amarillas o rojas, lo que coincide con el color obtenido. El color que presentó la prueba de leucoantocianidinas fue rojo como lo que se indica según la prueba de Rosenheim, lo

que indica que los extractos de manzana analizados poseen también leucoantocianidinas (Rosales-López, 2016).

Se realizaron varias pruebas de elaboración del alimento funcional, para lo cual se eligió un producto de fibra de alga de agar deshidratada como gelificante, ya que al ser un gelificante de origen vegetal el producto final de las gomitas podría acceder también a un mercado de personas veganas.

En las pruebas caseras, aunque se logró elaborar un producto de consistencia y textura firme aún eran pastosas y suaves por dentro, y no tuvieron la gomosidad necesaria como la tienen las gomitas comerciales. Esto debido a que esta preparación tiene toda la humedad de las manzanas y del agua en que se licuan las manzanas para obtener la pulpa. Por el contrario, para producir los extractos, las manzanas son desecadas previamente mediante liofilización, por lo que se pierde el agua de la fruta y al producir los extractos se concentran los polifenoles y los azúcares de las manzanas, por lo que en la preparación de las gomitas el líquido utilizado es menor y la humedad es menor.

En las gomitas caseras se trató de corregir esta situación agregando 3,5 g de goma xanthan, sin embargo, la textura no cambió, por el contrario, afectó el sabor de las gomitas, ya que no se aumentó la cantidad de pulpa de manzana. La textura se mejoró agregando gelatina pura, pero aún así no se logró alcanzar la gomosidad deseada.

En el caso de las gomitas elaboradas en la Planta Piloto Agroindustrial, también se probó utilizar goma xanthan pero la cantidad propuesta fue demasiada la primera vez (14 g), ya que la goma xanthan es de difícil disolución sin ayuda de azúcares agregados que mejoren su solubilidad. Entonces se utilizó mayor cantidad de fibra de alga de agar deshidratada (10 g) y se obtuvo un producto con buen sabor y color, aunque las personas describieron que no sabía a manzana y que tampoco tuvieron la textura buscada.

Por lo tanto, la propuesta de elaboración de gomitas es utilizar el extracto de manzana con menor cantidad de fibra de alga de agar y gelatina pura hasta darle la textura deseada a las gomitas. Aunque la gelatina es un producto de origen animal podría aportarle colágeno y alcanzar la textura buscada al producto final.

Aunque la manzana posee ácido ascórbico (vitamina C), el cual es un compuesto con propiedades ácidas, reductoras y antioxidantes, muy útil en la industria como conservante, ya que puede combatir la acción de los radicales libres y mejorar la absorción de hierro no hémico en alimentos de origen vegetal en el organismo (Mejía-Vásquez, 2016), el producto elaborado requiere la adición de un preservante o el enriquecimiento con mayor cantidad de ácido ascórbico, que permita alargar su vida útil.

Una prueba de gomitas casera que se puso a temperatura ambiente (método directo para determinar la vida útil) caducó en menos de 48 horas, el crecimiento de mohos fue visible a simple vista en ese tiempo, por lo que el producto elaborado requiere de refrigeración.

No fue posible producir suficiente extracto concentrado para analizar su contenido de ácido ascórbico, ya que para el análisis se requerían 300 ml por muestra, además de este análisis se debió producir 400 ml para los análisis de composición proximal y 100 g de gomitas para las pruebas microbiológicas. El proceso de producir 100 ml de extracto concentrado conlleva aproximadamente una semana de trabajo y por ese motivo no fue posible producir gran cantidad de extracto en el tiempo establecido para el proyecto con los recursos disponibles de pequeña escala.

## Conclusiones

- Se estableció un método de extracción de manzana completa, de alta reproducibilidad y alta productividad en términos de polifenoles totales. El método de extracción para recuperar polifenoles fue utilizar la liofilización para deshidratar las manzanas y macerar con una dilución de etanol en agua como solvente, con el cual se logró obtener extractos con  $3252,97 \pm 98,80$  mg EAG/L en promedio.
- Se logró elaborar un prototipo de alimento funcional totalmente vegano a base del extracto de manzana rico en polifenoles y pigmentado con un extracto natural de pitahaya.
- El método consolidado es sencillo y podría ser fácilmente escalable para producción comercial, así como adaptable para otras frutas.
- Para la elaboración del alimento funcional se requiere incorporar gelatina pura y realizar más pruebas para elaborar las gomitas con la textura deseada.

## Recomendaciones

- Se sugiere realizar un diseño de un experimento que compare diferentes concentraciones de fibra de alga de agar deshidratada y gelatina pura para darle la textura buscada a las gomitas.
- Se recomienda realizar análisis de color y textura a la formulación de las gomitas del producto final para mantener las características deseadas.
- Una encuesta sensorial podría efectuarse entre jueces de diferentes lugares para evaluar las características de las gomitas.
- Es necesario medir los grados brix, acidez, humedad, actividad del agua y vitamina C periódicamente como características fisicoquímicas de los extractos y gomitas para asegurar que se mantiene la estabilidad del producto en el tiempo.
- Además, también es necesario realizar las pruebas microbiológicas del producto final para calcular su caducidad ya sea mediante un método directo o un método acelerado y determinar su vida útil.
- También es necesario realizar extracciones de polifenoles a las gomitas elaboradas y realizarles los análisis de cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante para determinar si la presencia y actividad de los mismos se mantiene en el tiempo.

## Bibliografía

- Alissa, EM y Ferns, GA. 2012. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012:569486 doi: 10.1155/2012/569486
- Anders, S; Schroeter, C. 2017. The impact of nutritional supplement intake on diet behavior and obesity outcomes. *PLoS ONE* 12(10):1-17.
- Aponte, M.; Calderón, M.; Delgado, A.; Herrera, I.; Jiménez, Y.; Ramírez, Z.; Rojas, J. y Toro, Y. S.f. Fitoquímicos. Instituto Nacional de Nutrición, Venezuela. Disponible en: <https://www.inn.gob.ve/pdf/docinves/fitoquimicos.pdf>
- Arbayza-Fructuoso, J.; Ruiz-Reyes, S.; Venegas-Casanova, E.; Ruidias-Romero, D. y Cosavalente-Burgos, K. 2014. Capacidad antioxidante del zumo y de los extractos hidroalcohólico y acuoso obtenidos de *Punica granatum* y su relación con el contenido de polifenoles. *Revista Farmaciencia* 2(2): 50-55
- Botero-Garcés, N. y Morales-Soto, G. 2000. Producción del manzano (*Malus* sp. cv. Anna) en el oriente antioqueño con la abeja melífera, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* 53(1): 849-862.
- Botero, M.; Ricaurte, S.; Monsalve, C. y Rojano, B. 2007. Capacidad reductora de 15 frutas tropicales. *Scientia et Technica* 3(33): 295-296
- Calvo-Castro, L.; Syed, D. N.; Chamcheu, J.C.; Vilela, F.M.P.; Pérez, A.M.; Vaillant, F.; Rojas, M. y Mukhtar, H. 2013. Protective effect of tropical Highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model. *Photochemistry and Photobiology* 89(5): 1199-1207 doi:10.1111/php.12104
- Carrillo-Inungaray, M.L. y Reyes-Munguía, A. 2013. Vida útil de los alimentos. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias* 2(3)
- Cervantes-Cardoza, V.; Rocha-Guzmán, N.E.; Gallegos-Infantes, J.A.; Rosales-Castro, M.; Medina-Torres, L. y González-Laredo, R.F. 2010. Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh – Rosaceae-). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(6): 446-456
- Quy Diem Do; Artik Elisa Angkawijaya; Phuong Lan Tran-Nguyen; Lien Huong Huynh; Felycia Edi Soetaredjo; Suryadi Ismadiji y Yi-Hsu Ju. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 296-302
- Esquivel, P. y Araya-Quesada, Y. 2012. Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* spp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3(1): 113-129

- Gimeno-Martínez, D. 2015. Optimización de la extracción de compuestos de interés en subproductos de frutas tropicales para su aplicación en matrices alimentarias. Trabajo Fin de Máster. Universidad Zaragoza. 53 p.
- Hernández-Ulate, O. 2017. Escalamiento a nivel semi-industrial de la producción de una bebida de agua de coco (*Cocos nucifera* L.) microfiltrada adicionada con el cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (cepa CRL431). Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. 116 p.
- Magrone, T.; Perez de Heredia, F.; Jirillo, E.; Morabito, G.; Marcos, A. y Serafini, M. 2013. Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases. *Can J Physiol Pharmacol* 91:387–396 doi: 10.1139/cjpp-2012-0307
- Mangas-Alonso, J.J. y Díaz-Llorente, D. 2015. La manzana y su maduración. Disponible en:[https://www.researchgate.net/profile/Luis\\_Garcia116/publication/276265061\\_Tecnologia\\_de\\_la\\_elaboracion\\_de\\_sidra\\_Equipamiento\\_industrial/links/5673ca1908aedbbb3fa195ac/Tecnologia-de-la-elaboracion-de-sidra-Equipamiento-industrial.pdf#page=11](https://www.researchgate.net/profile/Luis_Garcia116/publication/276265061_Tecnologia_de_la_elaboracion_de_sidra_Equipamiento_industrial/links/5673ca1908aedbbb3fa195ac/Tecnologia-de-la-elaboracion-de-sidra-Equipamiento-industrial.pdf#page=11)
- Mejía-Vásquez, L.Y. 2016. Diseño de una guía para la elaboración de alimentos enriquecidos o fortificados con vitaminas y minerales. Trabajo de grado como requisito para optar al título de Especialista en Alimentación y Nutrición. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia. 93 p.
- Ministerio de Salud. 2011. Política Nacional de Seguridad Alimentaria y Nutricional 2011-2021. 1° Edición. San José, Costa Rica. 54 p.
- Moreno, E.; Ortiz, B.L. y Restrepo, L.P. 2014. Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Revista Colombiana de Química* 43(3): 41-48
- Navarro-Hoyos, M.; Moreira-González, I.; Arnáez-Serrano, E.; Murillo-Masís-R.; Rivera-Méndez, W.; Zamora-Ramírez, W.; Saravia-Arguedas, A.Y. y Vargas-Huertas, F. 2017. Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 30(1): 3-13
- Navarro, M.; Moreira, I.; Arnáez, E.; Quesada, S.; Azofeifa, G.; Vargas, F.; Alvarado, D. y Chen, P. 2018. Polyphenolic characterization and antioxidant activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* cultivars from Costa Rica. *Foods* 7(15): 1-19
- Ortiz-Choez, C.A. 2015. Acción antimicrobiana de soluciones formadoras de recubrimientos comestibles a base de quitosano y extracto hidroalcohólico de mango (*Mangifera indica*) frente a microorganismos de interés sanitario. Trabajo de titulación presentado como requisito previo para optar al grado de Químico y Farmacéutico. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 82 p.

- Palomo, I.; Yuri, J.A.; Moore-Carrasco, R.; Quilodrán, A. y Neira, A. 2010. El consumo de manzanas contribuye a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Revista Chilena de Nutrición* 37(3): 377-385
- Pasquel-Arauz, B.A. 2013. Desarrollo de una gomita masticable de mora (*Rubus glaucus*) fortificada con carbonato de calcio. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniero de Alimentos. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. 134 p.
- Perdomo-Angulo, A.W. 2009. Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en extractos acuosos e hidroalcohólicos de hojas y corteza de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam) Urban "topa". Tesis para obtener el título de Ingeniero en recursos naturales renovables. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Perú. 55 p.
- Polanco-Zambrano, D.A. 2017. Manzana: características, propiedades y tipos. Manzano árbol, su cultivo. Revista Digital Animales, Mascotas, Naturaleza y Turismo. Disponible en: <https://naturaleza.paradis-sphynx.com/plantas/tipos-de-frutas/manzana-propiedades-tipos-manzano-arbol.htm>
- Posada-Cardona, C.C. 2011. Recopilación de estudios de tiempos de vida útil de productos nuevos y ya existentes de la Compañía de galletas Noel S.A.S. Informe de práctica empresarial para optar al título de Ingeniería de Alimentos. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia. 65 p.
- Quiliche-Estacio, S.H. 2013. Efectos biológicos de los antioxidantes y fitoquímicos de alimentos que presentan pigmentos antociánicos. Trabajo monográfico para optar por el título profesional de Ingeniero de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional de Cajamarca, Perú. 55 p.
- Rivas-Serrano, Y.P. y Tomalá-Pihuave, Y.L. 2018. Estabilidad de betanina en extracto acuoso y etanólico en cáscaras de pitahaya roja (*Hylocereus undatus* Haw). Trabajo de titulación presentado como requisito previo para optar por el grado de Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 78 p.
- Rosales-López, C. 2016. Manual de prácticas de curso electivo Introducción a la fitoquímica. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Sepúlveda, M.; Quitral, V.; Schwartz, M.; Vio, F.; Zacarías, I. y Werther, K. 2011. Propiedades saludables y calidad sensorial de snack de manzanas destinadas a alimentación escolar. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 61(4): 423-428
- Trillo-Contreras, J.L. 2015. Extracción y purificación de productos naturales de interés industrial. Trabajo Fin de Máster. Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Universidad de Almería. 46 p.

- Valdés-Hernández, G.V.; Cruz-Viera, L. y Comet-Rodríguez, R. 2015. Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 46: 135-145
- Venanzi, L.H. 2014. Estudio de métodos de extracción de compuestos fenólicos de orujos provenientes de vinificación de uvas cv Malbec. Tesis Licenciatura en Bromatología. Universidad Nacional de Cuyo. 54 p.
- Vicente, A.R.; Concellón, A.; Viña, S.Z.; Lemoine, M.L.; Rodoni, L.; Zaro, M.J.; Hasperue, J.; Massolo, J.F.; Ortiz, C.M.; González-Forte, L.; Quinteros, N.; Valerga, L.; Darré, M.; Ortiz-Araque, L.C. y Pintos, F. S.f. Alteraciones de los polifenoles en la etapa de poscosecha. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72815/Resumen.pdf?sequence=1>
- Wainwright-Swain, P.A. 1992. Guía para el cultivo del manzano en Costa Rica. Cuerpo de Paz. Costa Rica. Disponible en: <http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/spanish/pc/r0076s/r0076s00.htm>
- Zambrano-Sancán, J.L. y García-Águila, M.A. 2016. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Mangifera indica* L. por diferentes métodos de extracción. Trabajo de titulación presentado como requisito previo para optar al grado de Química y Farmacéutica. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 69 p.
- Zapata, S.; Piedrahita, A.M. y Rojano, B. 2014. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana* 16(1): 25-36

## Anexos

### Anexo 1

#### Resumen de la información de los extractos

Extracto	Variedad	Grado maduración	Peso fresco	Peso seco	Fecha extracción	Secado	Soluto:solvente	% Etanol	Tiempo maceración
GD1	Gala	madura	136.8	6	7/2/2019	deshidratada	1:20	50	22
GD2	Gala	madura	136.5	16.33	7/2/2019	deshidratada	1:20	50	22
GD3	Gala	madura	141.7	4.4	7/2/2019	deshidratada	1:20	50	22
GL1	Gala	madura	-	25.84	8/2/2019	liofilizada	1:10	50	5
GL2	Gala	madura	-	15.16	8/2/2019	liofilizada	1:10	70	5
GL3	Gala	madura	-	17.77	8/2/2019	liofilizada	1:10	95	5
A1	Anna	pintona	106.66	6	20/02/19	liofilizada	1:15	50	4.5
A2	Anna	pintona	109	6	20/02/19	liofilizada	1:15	70	4.5
A3	Anna	pintona	115.86	6	20/02/19	liofilizada	1:15	95	4.5
A4	Anna	pintona	115.73	16.87	27/02/19	liofilizada	1:10	70	4
A5	Anna	pintona	125.99	22.04	27/02/19	liofilizada	1:10	95	4
A6	Anna	pintona	122.04	19.33	27/02/19	liofilizada	1:10	50	4
M50-1	Anna	madura	-	5	24/04/19	liofilizada	1:9	50	20.5 y 4
M50-2	Anna	madura	-	5	24/04/20	liofilizada	1:9	50	20.5 y 4
M50-3	Anna	madura	-	5	24/04/21	liofilizada	1:9	50	20.5 y 4
M70-1	Anna	madura	-	5	24/04/22	liofilizada	1:9	70	20.5 y 4
M70-2	Anna	madura	-	5	24/04/23	liofilizada	1:9	70	20.5 y 4
M70-3	Anna	madura	-	5	24/04/24	liofilizada	1:9	70	20.5 y 4

Continúa en la siguiente página

P50-1	Anna	pintona	-	5	24/04/25	liofilizada	1:9	50	20.5 y 4
P50-2	Anna	pintona	-	5	24/04/26	liofilizada	1:9	50	20.5 y 4
P50-3	Anna	pintona	-	5	24/04/27	liofilizada	1:9	50	20.5 y 4
P70-1	Anna	pintona	-	5	24/04/28	liofilizada	1:9	70	20.5 y 4
P70-2	Anna	pintona	-	5	24/04/29	liofilizada	1:9	70	20.5 y 4
P70-3	Anna	pintona	-	5	24/04/30	liofilizada	1:9	70	20.5 y 4
P70-4	Anna	pintona	-	5	7/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P70-5	Anna	pintona	-	5	7/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P70-6	Anna	pintona	-	5	7/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P70-7	Anna	pintona	-	5	15/05/19	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P70-8	Anna	pintona	-	5	15/05/19	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P70-9	Anna	pintona	-	5	15/05/19	liofilizada	1:9	70	4 y 4
M1	Anna	madura	-	22.1	2/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
M2	Anna	madura	-	20.69	2/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P1	Anna	pintona	-	29.73	2/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
P2	Anna	pintona	-	28.86	2/5/2019	liofilizada	1:9	70	4 y 4
M	Anna	madura	-	73	-	liofilizada	1:9	-	-
P	Anna	pintona	-	30	-	liofilizada	1:9	-	-
F	Anna	pintona	-	175	-	liofilizada	1:9	-	-

**Continúa en la siguiente página**

Extracto	Sonicación	Color extracto	Volumen final	mg EAG/L	mgEAG/peso seco	IC50 (μl)	Observaciones
GD1	40	anaranjado claro	15	-		-	
GD2	40	anaranjado claro	15	753.6	46.14819351	0.649	
GD3	40	anaranjado claro	15	-		-	
GL1	30	anaranjado	15	1349.6	306.7272727	0.593	
GL2	30	anaranjado claro	15	1153.6	44.64396285	0.607	
GL3	30	amarillo	15	1262.93	83.30672823	0.617	
A1	30	rosado	15	1338.94	223.1566667	0.617	Cartucho vitamina C.
A2	30	rosado claro	15	1486.94	247.8233333	0.596	Cartucho vitamina C.
A3	30	amarillo	15	1058.94	176.49	0.617	Cartucho vitamina C.
A4	30	anaranjado claro	15	1788.27	298.045	0.599	
A5	30	amarillo	15	1337.6	79.28867813	0.629	
A6	30	anaranjado	15	1625.6	73.75680581	0.611	
M50-1	30	rojo	20	3014.13	602.826	0.263	
M50-2	30	rojo	20	2830.13	566.026	0.252	
M50-3	30	rojo	20	3192.8	638.56	0.249	
M70-1	30	rojo	20	3204.8	640.96	0.247	
M70-2	30	rojo	20	2812.8	562.56	0.233	
M70-3	30	rojo	20	2880.8	576.16	0.239	

Continúa en la siguiente página

P50-1	30	amarillo	20	2467.47	493.494	0.258	
P50-2	30	amarillo	20	2434.13	486.826	0.267	
P50-3	30	amarillo	20	2442.13	488.426	0.266	
P70-1	30	amarillo	20	3211.47	642.294	0.245	
P70-2	30	amarillo	20	3328.8	665.76	0.249	
P70-3	30	amarillo	20	3183.47	636.694	0.241	
P70-4	30	rosado claro	20	3263.86	652.772	0.275	Se procesó más seca que la repetición 1 y 3
P70-5	30	rosado claro	20	3359.03	671.806	0.269	Se procesó más seca que la repetición 1 y 3
P70-6	30	rosado claro	20	3331.45	666.29	0.282	Se procesó más seca que la repetición 1 y 3
P70-7	30	rosado	20	3142.67	628.534	0.268	
P70-8	30	rosado	20	3096	619.2	0.261	
P70-9	30	rosado	20	3360	672	0.252	
M1	30	rojo	50	6983.79	316.0085973	0.111	
M2	30	rojo	50	6701.03	323.8777187	0.105	
P1	30	anaranjado oscuro	50	7632.07	256.7127481	0.106	
P2	30	oscuro	50	5887.24	203.99307	0.111	
M	30	rojo	270	4263.1	58.39863014	0.114	Mezcla de extractos M50, M70, M1 y M2
P	30	amarillo oscuro	120	4925.17	164.1723333	0.117	Mezcla de extractos P50 y P70
F	30	anaranjado	470	5570	31.82857143	0.102	Mezcla de extractos P50, P70 excepto P70-7,8 y 9, P1 ,P2 y 200 ml extracto concentrado producido a partir de 100 g 1:9

## Anexo 2

### **Cuantificación de polifenoles totales (modificación del método de Folin-Ciocalteu. Rosales-López, 2016)**

Primeramente, se prepara la curva patrón de ácido gálico (cinco soluciones con concentraciones de 10, 20, 40, 60 y 80 mg/L) a partir de una solución madre de 0.5 g/L.

Las muestras se diluyen  $\frac{1}{2}$  con agua destilada y se toman 50  $\mu$ L de cada muestra y se colocan en tubos Eppendorf de 1,5 mL, lo mismo con las soluciones de la curva patrón de ácido gálico. Después se les agrega 50  $\mu$ L de agua destilada a cada tubo. Posteriormente, se agrega 250  $\mu$ L de solución de Folin-Ciocalteu 1/10 (0,2 N) a cada tubo, se agitan en vórtex y se dejan reposar dos minutos. Luego se agrega 200  $\mu$ L de solución de carbonato de sodio (75 g/L) a cada tubo, se agita nuevamente en vórtex y se incuban los tubos por 15 minutos a 50°C en baño maría.

Luego se coloca 200  $\mu$ L de cada muestra en una placa de 96 pozos de fondo plano y se lee la absorbancia a 620 nm en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC. Finalmente se analizan los resultados mediante un gráfico de dispersión con la absorbancia (X) vs la concentración (Y) de las soluciones de la curva patrón de ácido gálico. Se calcula la ecuación lineal y el R cuadrado. El R cuadrado debe ser mayor a 0,95. Luego se despeja la concentración de las muestras utilizando esa ecuación y se multiplica el resultado por cuatro, ya que se había realizado una dilución  $\frac{1}{2}$  de las muestras al inicio y una dilución  $\frac{1}{2}$  en la reacción.

### Anexo 3

#### **Análisis de capacidad antioxidante con DPPH (Rosales-López, 2016)**

A partir de una solución madre de 0,0219% de DPPH se preparó una solución de trabajo haciendo una dilución  $\frac{1}{2}$  con metanol (0,01095%) de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Estas soluciones deben protegerse de la luz.

Primeramente, se hace una dilución 1/20 o 1/50 de la muestra si esta está muy concentrada o 1/10 si está menos concentrada, con agua destilada.

Primero se debe colocar el metanol en cada pozo según corresponda, luego las muestras y de último el DPPH, el cual se carga de manera horizontal, es decir fila por fila, para que las reacciones ocurran al mismo tiempo entre las muestras, ya que los diferentes volúmenes de cada dilución de cada muestra se cargan de manera vertical, es decir cada columna es de una misma dilución de muestra. El volumen final de la reacción de cada pozo es 150  $\mu\text{L}$ .

En una placa de 96 pozos de fondo plano se coloca 140  $\mu\text{L}$  de metanol en los pozos de la primera fila, que corresponde al blanco de cada muestra. En la siguiente fila se carga 90  $\mu\text{L}$  de metanol, en la siguiente 80, luego 70, 60 y en la última fila 50  $\mu\text{L}$  de metanol. En un pozo aparte se cargan 100  $\mu\text{L}$  de metanol, este pozo corresponde al control negativo.

Luego se cargan las muestras: en la primera fila (de los blancos de muestras) 10  $\mu\text{L}$ . En la siguiente fila también 10  $\mu\text{L}$ , luego 20, 30, 40 y en la última fila 50  $\mu\text{L}$  de la dilución de la muestra.

Finalmente se cargan 50  $\mu\text{L}$  del DPPH preparado al inicio, a cada pozo a partir de la segunda fila, ya que los blancos de muestras no llevan DPPH. También se carga 50  $\mu\text{L}$  en el pozo del control negativo.

Luego se coloca la placa en oscuridad por 30 minutos y al finalizar se lee la absorbancia a 570 nm en un lector de placas FLUOstar Optima BMG Labtech.

Con los datos de la absorbancia para cada pozo de cada muestra (columna) se hace un gráfico de dispersión con los volúmenes ( $\mu\text{L}$ ) de muestra puros (X) y las absorbancias reales (Y). El volumen de muestra pura se calcula dividiendo el volumen cargado en cada pozo entre la dilución utilizada. Luego se calcula la absorbancia real restando a la absorbancia obtenida en cada pozo la absorbancia de los blancos de muestra. En la placa sólo se carga una fila de blancos de muestra, que corresponde a la concentración más diluida de la muestra (volumen de 10  $\mu\text{L}$ ). Para las demás concentraciones se multiplica proporcionalmente por la absorbancia que corresponde a este blanco. Luego se calcula la ecuación lineal y el R cuadrado. La absorbancia del control negativo se divide entre dos porque se reporta el IC50 (la cantidad de muestra pura necesaria para inactivar el 50% del DPPH, es decir a la mitad de la absorbancia del control negativo). Finalmente se despeja X (IC50) teniendo como Y la mitad de la absorbancia del control negativo, para cada dilución de muestras analizada, es decir para cada ecuación lineal.

## Anexo 4

### Pruebas de metabolitos secundarios

#### **Alcaloides**

En tubos de ensayo se coloca 1 ml de cada uno de los extractos M1, M2, P1 y P2. Luego se añaden cinco gotas de ácido clorhídrico al 5% y posteriormente se añaden dos gotas de reactivo de Dragendorff. Se observa si hay turbidez o precipitados para lo cual la prueba sería positiva para la existencia de alcaloides.

#### **Flavonoides**

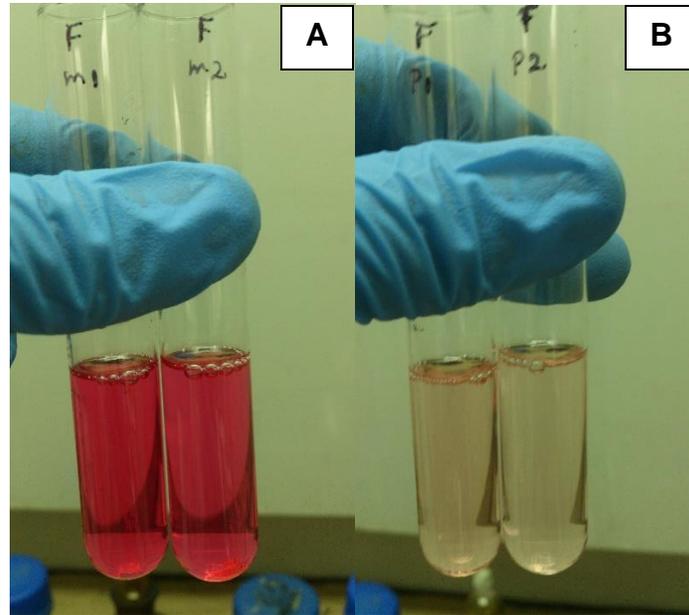
Se coloca 1 ml de cada uno de los extractos mencionados en tubos de ensayo y se añade 5 ml de etanol al 95% a cada uno y se calienta en baño maría por cinco minutos. Luego se coloca una limadura de magnesio a cada tubo y se deja caer cinco gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se observa si hay aparición de colores naranja, rosado, rojo o violeta para lo cual la prueba sería positiva para la presencia de flavonoides. Flavonas y flavonoles (amarillo o rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojos, magenta, violeta o azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas (no dan coloración).

#### **Leucoantocianidinas**

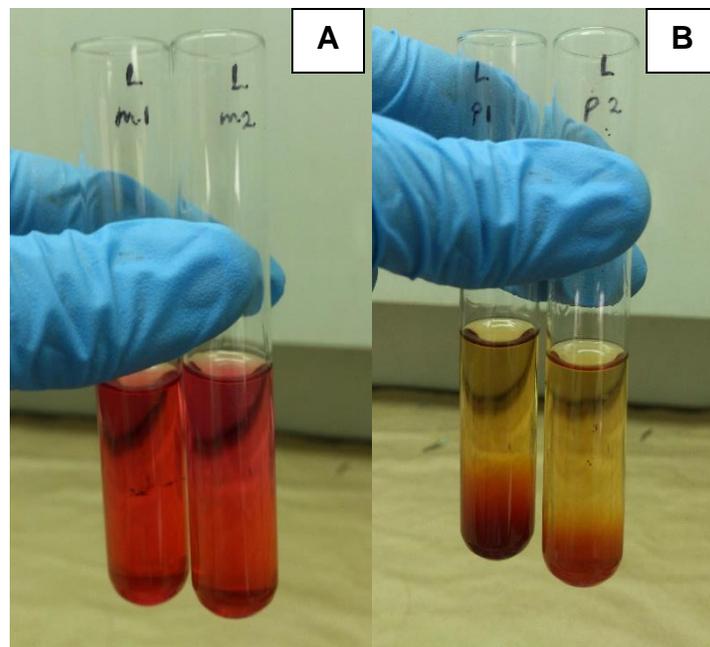
Se coloca 1 ml de cada uno de los extractos mencionados en tubos de ensayo y se añade 5 ml de etanol al 95% a cada uno y se calienta por cinco minutos. Luego se añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente se calienta en baño maría con agua hirviendo por 15 minutos. Se observa si hay aparición de coloraciones rojas que indican que la prueba es positiva para la existencia de leucoantocianidinas.

#### **Triterpenos y/o esteroides**

En tubos de ensayo se coloca 1 ml de los extractos y se añade 1 ml de ácido acético glacial, posteriormente se agregan dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se observa si hay formación de colores azules, violetas, rojos o verdes lo cual indica que el extracto contiene triterpenos y/o esteroides.



**Coloración obtenida en la prueba de flavonoides de los extractos M1, M2 (A) y P1, P2 (B)**

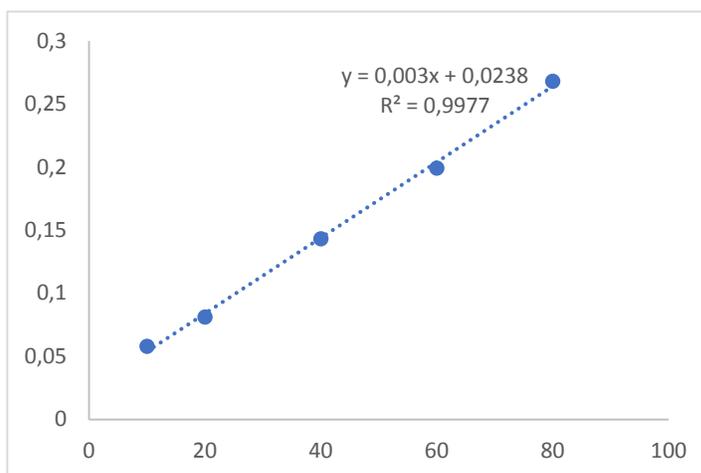


**Coloración obtenida en la prueba de leucoantocianidinas de los extractos M1, M2 (A) y P1, P2 (B)**

## Anexo 5

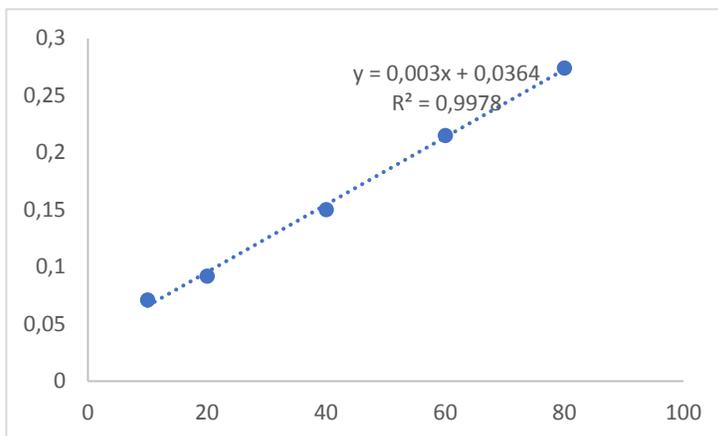
### Cuantificación de polifenoles totales de los extractos

[ ] Ácido gálico	Absorbancia
10	0.058
20	0.081
40	0.143
60	0.199
80	0.268



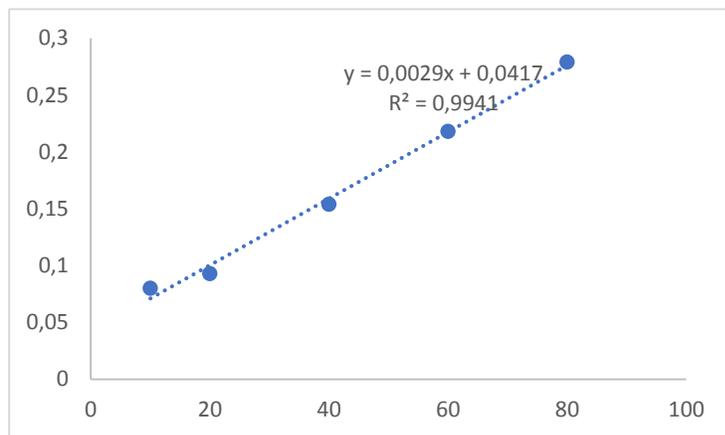
Dilución 1/2 Extracto	Absorbancia	Concentración
GD2	0.589	753.6
GL1	1.036	1349.6
GL2	0.889	1153.6
GL3	0.971	1262.933333
A4	1.365	1788.266667
A5	1.027	1337.6
A6	1.243	1625.6

[] Ácido gálico	Absorbancia
10	0.071
20	0.092
40	0.15
60	0.215
80	0.274



Dilución 1/2 Extracto	Absorbancia	Concentración
M50-1	2.297	3014.133333
M50-2	2.159	2830.133333
M50-3	2.431	3192.8
M70-1	2.44	3204.8
M70-2	2.146	2812.8
M70-3	2.197	2880.8
P50-1	1.887	2467.466667
P50-2	1.862	2434.133333
P50-3	1.868	2442.133333
P70-1	2.445	3211.466667
P70-2	2.533	3328.8
P70-3	2.424	3183.466667

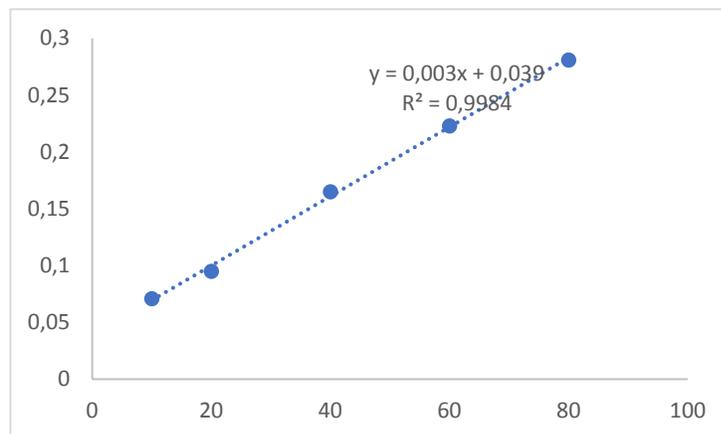
[ ] Ácido gálico	Absorbancia
10	0.08
20	0.093
40	0.154
60	0.218
80	0.279



Dilución 1/5 y 1/2		
Extracto	Absorbancia	Concentración
M1	2.067	6983.793103
M2	1.985	6701.034483
P1	2.255	7632.068966
P2	1.749	5887.241379
M	1.278	4263.103448
P	1.47	4925.172414
P70-4	2.408	3263.862069
P70-5	2.477	3359.034483
P70-6	2.457	3331.448276

Nota: hubo un derrame de un poco de muestra

[] Ácido gálico	Absorbancia
10	0.071
20	0.095
40	0.165
60	0.223
80	0.281



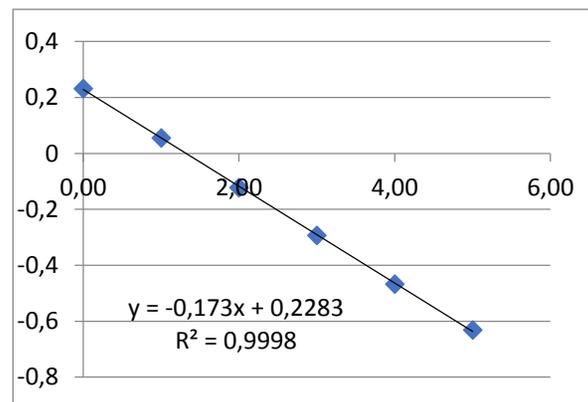
Dilución 1/5 y 1/2		
Extracto	Absorbancia	Concentración
F	1.71	5570
P70-7	2.396	3142.67
P70-8	2.361	3096
P70-9	2.559	3360

## Anexo 6

### Determinación de la capacidad antioxidante con DPPH de los extractos

Extracto 1

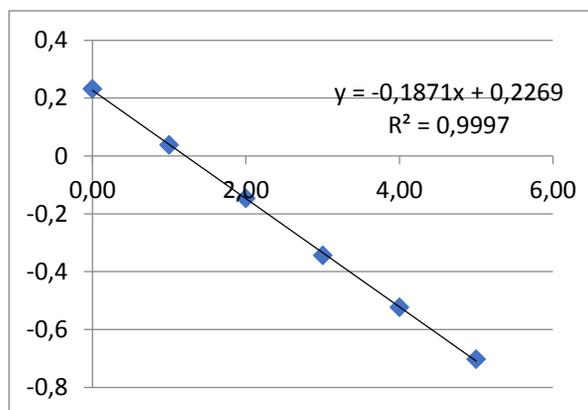
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	GD2 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.222	0.166	0.056
20	2.00	0.21	0.332	-0.122
30	3.00	0.205	0.498	-0.293
40	4.00	0.197	0.664	-0.467
50	5.00	0.199	0.83	-0.631



100%  
DPPH 0.232  
50% DPPH 0.116  
IC50 (ml) 0.649

Extracto 2

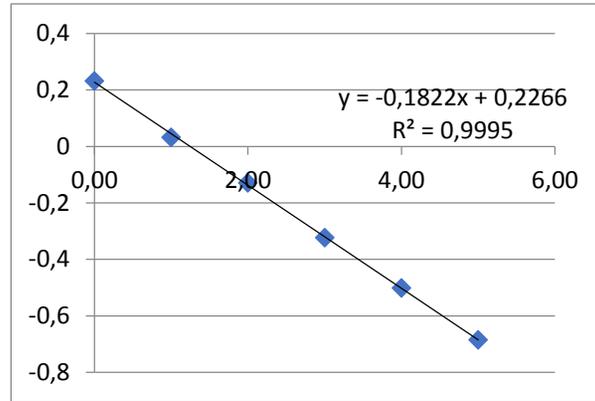
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	GL1 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.217	0.179	0.038
20	2.00	0.211	0.358	-0.147
30	3.00	0.193	0.537	-0.344
40	4.00	0.193	0.716	-0.523
50	5.00	0.193	0.895	-0.702



100%  
DPPH 0.232  
50% DPPH 0.116  
IC50 (ml) 0.593

Extracto 3

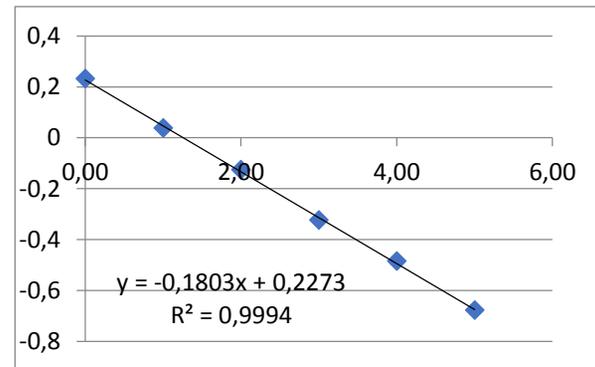
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	GL2		Absorbancia real
		Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.206	0.174	0.032
20	2.00	0.219	0.348	-0.129
30	3.00	0.199	0.522	-0.323
40	4.00	0.195	0.696	-0.501
50	5.00	0.185	0.87	-0.685



100% DPPH 0.232  
 50% DPPH 0.116  
 IC50 (ml) 0.607

Extracto 4

Muestra ul	Jugo sin diluir ul	GL3		Absorbancia real
		Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.21	0.172	0.038
20	2.00	0.218	0.344	-0.126
30	3.00	0.193	0.516	-0.323
40	4.00	0.203	0.688	-0.485
50	5.00	0.183	0.86	-0.677

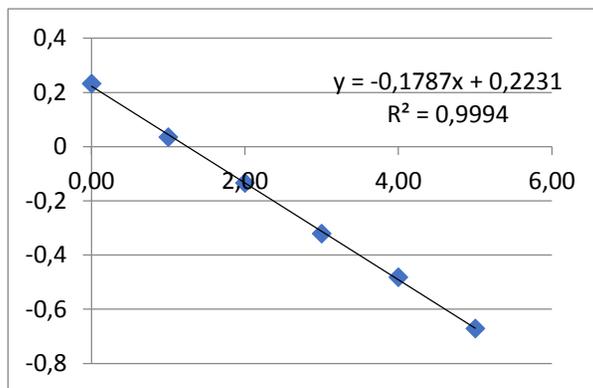


100% DPPH 0.232  
 50% DPPH 0.116  
 IC50 (ml) 0.617

Extracto  
5

A4 (70% etanol)

Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.206	0.171	0.035
20	2.00	0.208	0.342	-0.134
30	3.00	0.192	0.513	-0.321
40	4.00	0.202	0.684	-0.482
50	5.00	0.184	0.855	-0.671

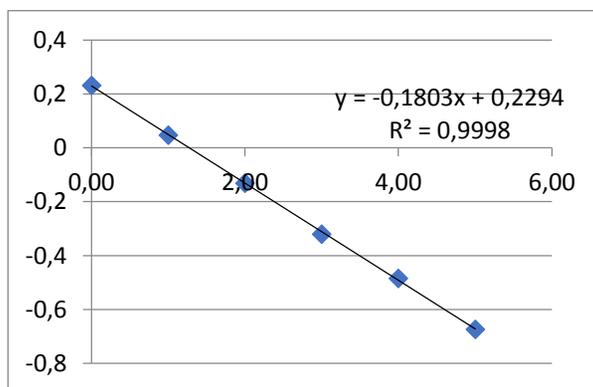


100%  
DPPH 0.232  
50% DPPH 0.116  
IC50 (ml) 0.599

Extracto  
6

A5 (95% etanol)

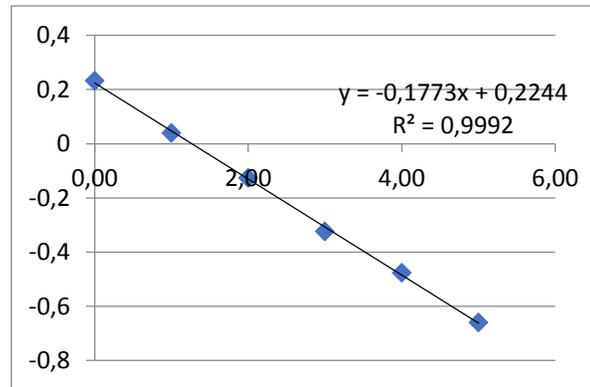
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.22	0.172	0.048
20	2.00	0.213	0.344	-0.131
30	3.00	0.196	0.516	-0.32
40	4.00	0.204	0.688	-0.484
50	5.00	0.187	0.86	-0.673



100%  
DPPH 0.232  
50% DPPH 0.116  
IC50 (ml) 0.629

Extracto 7

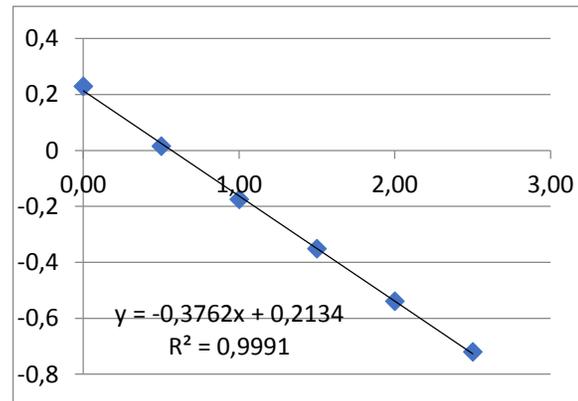
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	A6 (50% etanol) Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.232	-	0.232
10	1.00	0.208	0.168	0.04
20	2.00	0.21	0.336	-0.126
30	3.00	0.181	0.504	-0.323
40	4.00	0.196	0.672	-0.476
50	5.00	0.18	0.84	-0.66



100% DPPH 0.232  
50% DPPH 0.116  
IC50 (ml) 0.611

Extracto 8

Muestra ul	Jugo sin diluir ul	M50-1 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.199	0.184	0.015
20	1.00	0.193	0.368	-0.175
30	1.50	0.201	0.552	-0.351
40	2.00	0.197	0.736	-0.539
50	2.50	0.2	0.92	-0.72

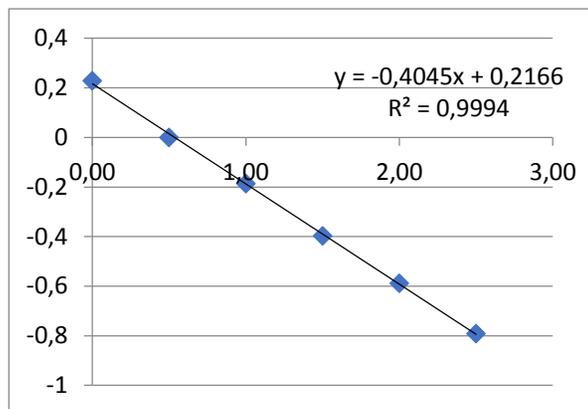


100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.263

Extracto 9

M50-2

Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.2	0.2	0
20	1.00	0.214	0.4	-0.186
30	1.50	0.203	0.6	-0.397
40	2.00	0.211	0.8	-0.589
50	2.50	0.209	1	-0.791

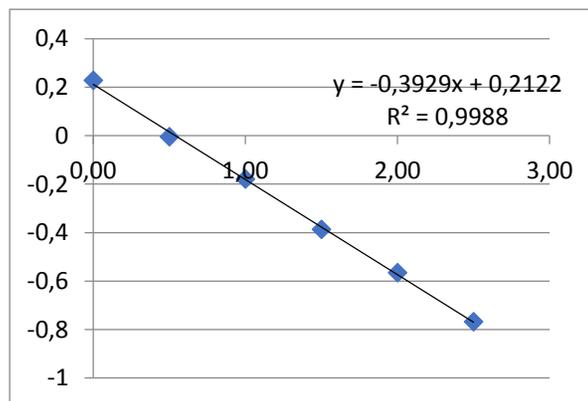


100% DPPH 0.229  
 50% DPPH 0.115  
 IC50 (ml) 0.252

Extracto 10

M50-3

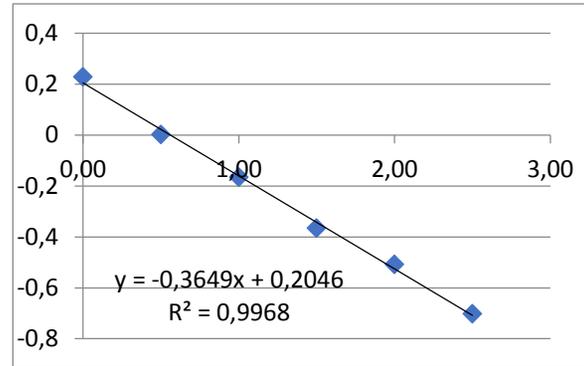
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.19	0.194	-0.004
20	1.00	0.209	0.388	-0.179
30	1.50	0.196	0.582	-0.386
40	2.00	0.211	0.776	-0.565
50	2.50	0.202	0.97	-0.768



100% DPPH 0.229  
 50% DPPH 0.115  
 IC50 (ml) 0.249

Extracto 11

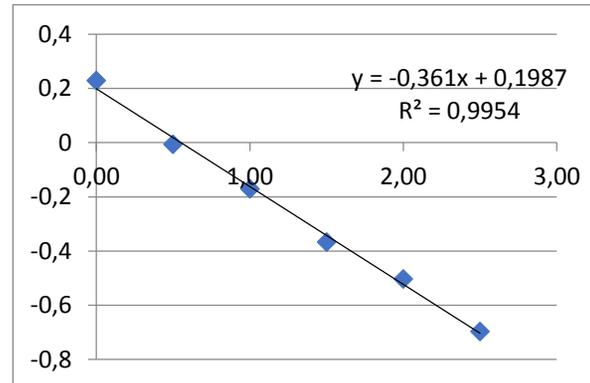
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	M70-1 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.189	0.187	0.002
20	1.00	0.209	0.374	-0.165
30	1.50	0.196	0.561	-0.365
40	2.00	0.24	0.748	-0.508
50	2.50	0.233	0.935	-0.702



100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.247

Extracto 12

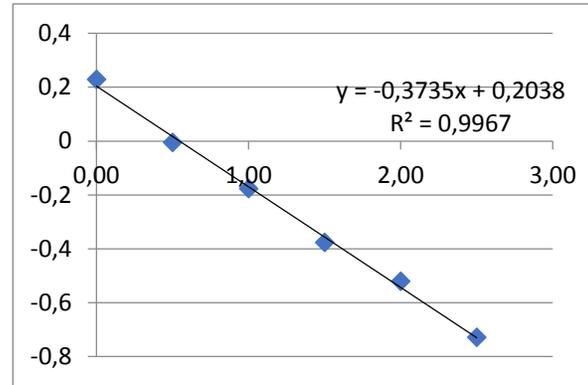
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	M70-2 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.182	0.188	-0.006
20	1.00	0.205	0.376	-0.171
30	1.50	0.197	0.564	-0.367
40	2.00	0.249	0.752	-0.503
50	2.50	0.243	0.94	-0.697



100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.233

Extracto 13

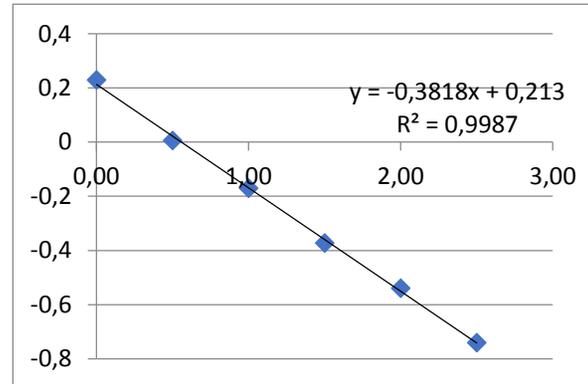
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	M70-3 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.185	0.19	-0.005
20	1.00	0.203	0.38	-0.177
30	1.50	0.194	0.57	-0.376
40	2.00	0.239	0.76	-0.521
50	2.50	0.221	0.95	-0.729



100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.239

Extracto 14

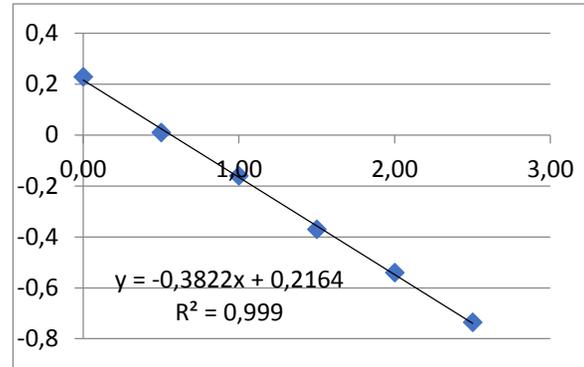
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	P50-1 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.193	0.187	0.006
20	1.00	0.204	0.374	-0.17
30	1.50	0.189	0.561	-0.372
40	2.00	0.209	0.748	-0.539
50	2.50	0.195	0.935	-0.74



100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.258

Extracto 15

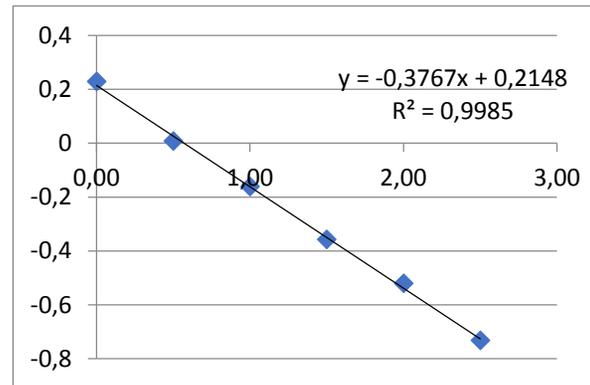
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	P50-2 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.195	0.185	0.01
20	1.00	0.21	0.37	-0.16
30	1.50	0.185	0.555	-0.37
40	2.00	0.199	0.74	-0.541
50	2.50	0.189	0.925	-0.736



100% DPPH 0.229  
 50% DPPH 0.115  
 IC50 (ml) 0.267

Extracto 16

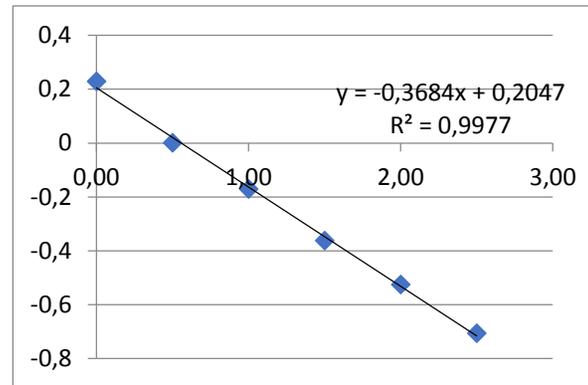
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	P50-3 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.191	0.183	0.008
20	1.00	0.204	0.366	-0.162
30	1.50	0.191	0.549	-0.358
40	2.00	0.211	0.732	-0.521
50	2.50	0.182	0.915	-0.733



100% DPPH 0.229  
 50% DPPH 0.115  
 IC50 (ml) 0.266

Extracto 17

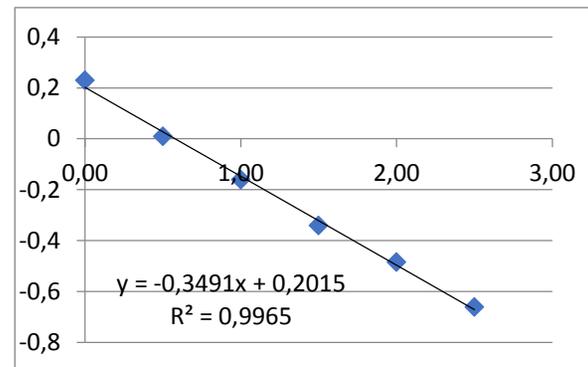
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	P70-1 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.185	0.184	0.001
20	1.00	0.197	0.368	-0.171
30	1.50	0.19	0.552	-0.362
40	2.00	0.21	0.736	-0.526
50	2.50	0.214	0.92	-0.706



100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.245

Extracto 18

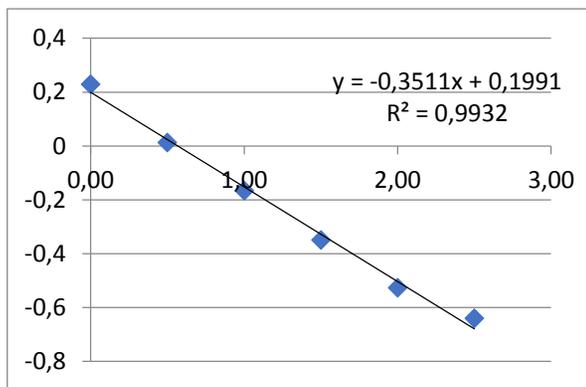
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	P70-2 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.187	0.178	0.009
20	1.00	0.195	0.356	-0.161
30	1.50	0.193	0.534	-0.341
40	2.00	0.228	0.712	-0.484
50	2.50	0.229	0.89	-0.661



100% DPPH 0.229  
50% DPPH 0.115  
IC50 (ml) 0.249

Extracto 19

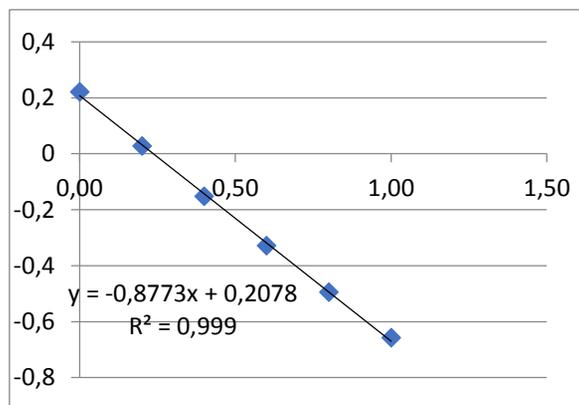
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.229	-	0.229
10	0.50	0.195	0.182	0.013
20	1.00	0.198	0.364	-0.166
30	1.50	0.197	0.546	-0.349
40	2.00	0.202	0.728	-0.526
50	2.50	0.27	0.91	-0.64



100% DPPH 0.229  
 50% DPPH 0.115  
 IC50 (ml) 0.241

Extracto 20

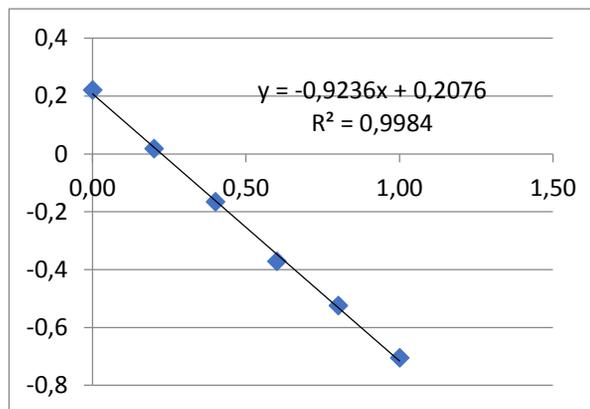
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.204	0.176	0.028
20	0.40	0.2	0.352	-0.152
30	0.60	0.199	0.528	-0.329
40	0.80	0.209	0.704	-0.495
50	1.00	0.222	0.88	-0.658



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.111

Extracto 21

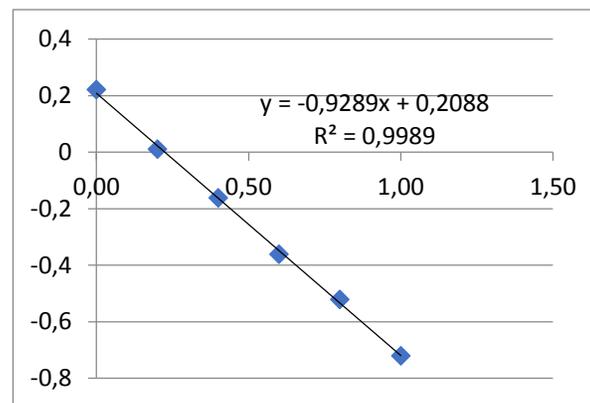
		M2		
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.21	0.191	0.019
20	0.40	0.217	0.382	-0.165
30	0.60	0.202	0.573	-0.371
40	0.80	0.24	0.764	-0.524
50	1.00	0.25	0.955	-0.705



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.105

Extracto 22

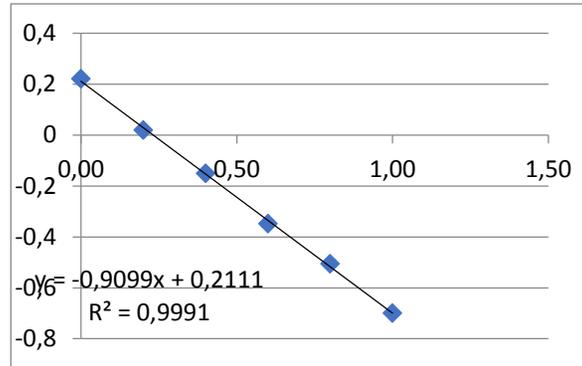
		P1		
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.198	0.188	0.01
20	0.40	0.214	0.376	-0.162
30	0.60	0.203	0.564	-0.361
40	0.80	0.231	0.752	-0.521
50	1.00	0.219	0.94	-0.721



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.106

Extracto 23

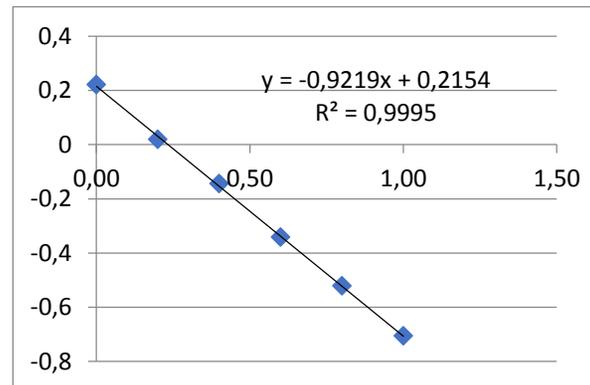
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.202	0.183	0.019
20	0.40	0.215	0.366	-0.151
30	0.60	0.201	0.549	-0.348
40	0.80	0.227	0.732	-0.505
50	1.00	0.216	0.915	-0.699



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.111

Extracto 24

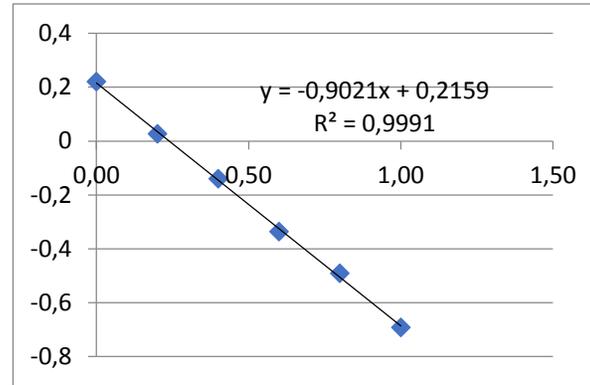
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.202	0.183	0.019
20	0.40	0.222	0.366	-0.144
30	0.60	0.207	0.549	-0.342
40	0.80	0.211	0.732	-0.521
50	1.00	0.209	0.915	-0.706



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.114

Extracto 25

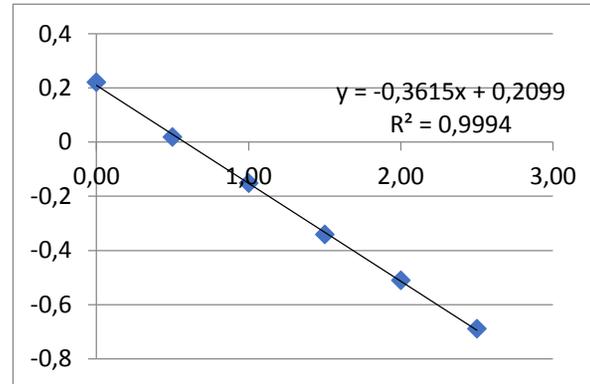
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.207	0.18	0.027
20	0.40	0.22	0.36	-0.14
30	0.60	0.204	0.54	-0.336
40	0.80	0.229	0.72	-0.491
50	1.00	0.208	0.9	-0.692



100% DPPH 0.221  
50% DPPH 0.111  
IC50 (ml) 0.117

Extracto 26

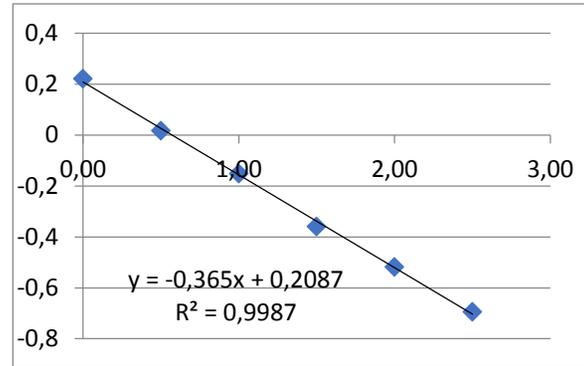
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.50	0.2	0.181	0.019
20	1.00	0.21	0.362	-0.152
30	1.50	0.202	0.543	-0.341
40	2.00	0.214	0.724	-0.51
50	2.50	0.216	0.905	-0.689



100% DPPH 0.221  
50% DPPH 0.111  
IC50 (ml) 0.275

Extracto 27

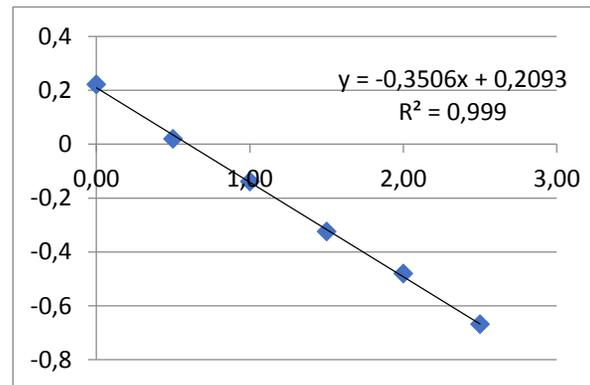
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.50	0.2	0.183	0.017
20	1.00	0.214	0.366	-0.152
30	1.50	0.19	0.549	-0.359
40	2.00	0.214	0.732	-0.518
50	2.50	0.221	0.915	-0.694



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.269

Extracto 28

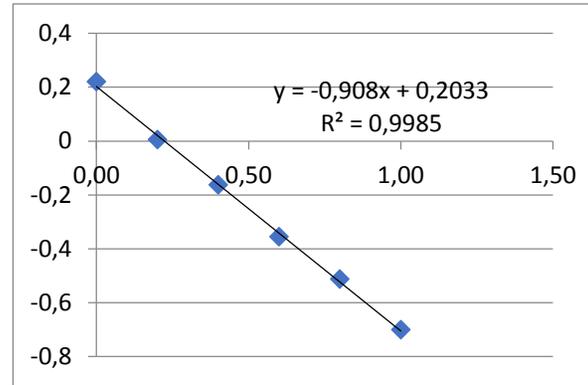
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.50	0.194	0.175	0.019
20	1.00	0.211	0.35	-0.139
30	1.50	0.2	0.525	-0.325
40	2.00	0.219	0.7	-0.481
50	2.50	0.206	0.875	-0.669



100% DPPH 0.221  
 50% DPPH 0.111  
 IC50 (ml) 0.282

Extracto 29

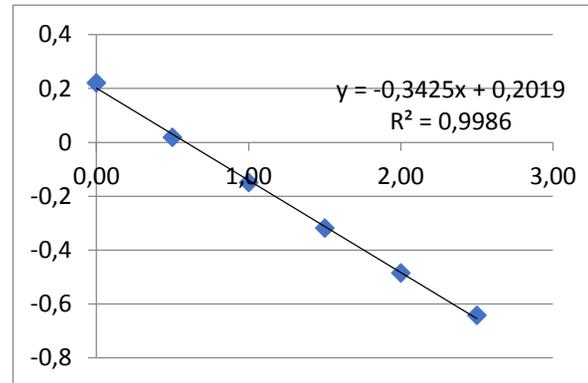
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	F Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.221	-	0.221
10	0.20	0.187	0.181	0.006
20	0.40	0.199	0.362	-0.163
30	0.60	0.188	0.543	-0.355
40	0.80	0.212	0.724	-0.512
50	1.00	0.204	0.905	-0.701



100% DPPH 0.221  
50% DPPH 0.111  
IC50 (ml) 0.102

Extracto 30

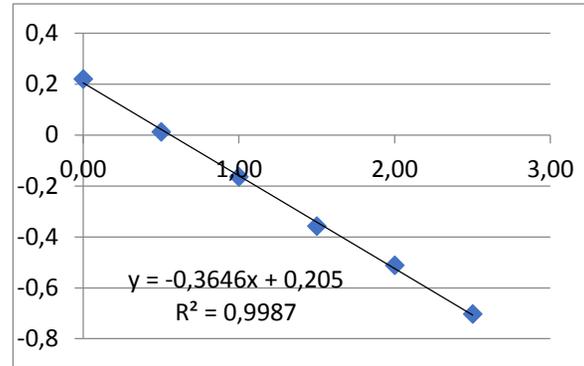
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	P70-7 Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.22	-	0.22
10	0.50	0.19	0.172	0.018
20	1.00	0.195	0.344	-0.149
30	1.50	0.198	0.516	-0.318
40	2.00	0.203	0.688	-0.485
50	2.50	0.217	0.86	-0.643



100% DPPH 0.22  
50% DPPH 0.11  
IC50 (ml) 0.268

Extracto 31

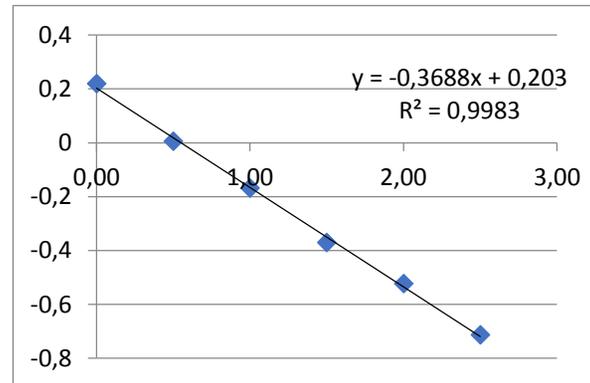
Muestra	Jugo sin diluir	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.22	-	0.22
10	0.50	0.195	0.183	0.012
20	1.00	0.202	0.366	-0.164
30	1.50	0.191	0.549	-0.358
40	2.00	0.22	0.732	-0.512
50	2.50	0.212	0.915	-0.703



100% DPPH 0.22  
 50% DPPH 0.11  
 IC50 (ml) 0.261

Extracto 32

Muestra	Jugo sin diluir	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.22	-	0.22
10	0.50	0.19	0.184	0.006
20	1.00	0.2	0.368	-0.168
30	1.50	0.182	0.552	-0.37
40	2.00	0.213	0.736	-0.523
50	2.50	0.207	0.92	-0.713

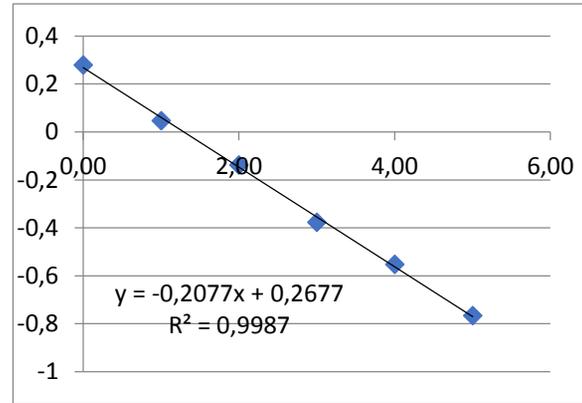


100% DPPH 0.22  
 50% DPPH 0.11  
 IC50 (ml) 0.252

Extracto 33

A1-cartucho vit.C 1/10

Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.279	-	0.279
10	1.00	0.238	0.191	0.047
20	2.00	0.244	0.382	-0.138
30	3.00	0.196	0.573	-0.377
40	4.00	0.211	0.764	-0.553
50	5.00	0.188	0.955	-0.767

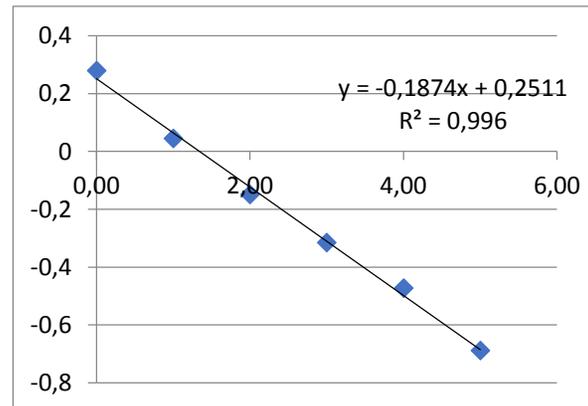


100% DPPH 0.279  
50% DPPH 0.14  
IC50 (ml) 0.617

Extracto 34

A2-cartucho vit.C

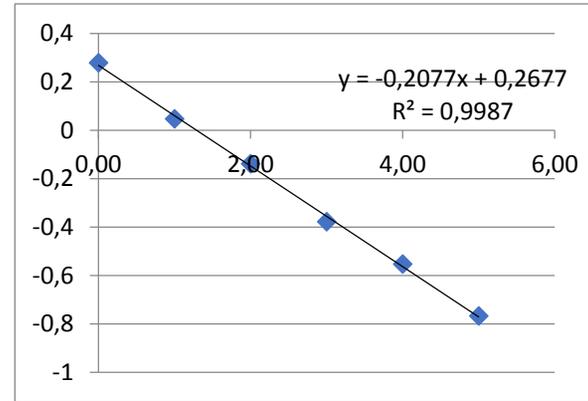
Muestra ul	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	Absorbancia real
control	0.00	0.279	-	0.279
10	1.00	0.227	0.183	0.044
20	2.00	0.217	0.366	-0.149
30	3.00	0.233	0.549	-0.316
40	4.00	0.259	0.732	-0.473
50	5.00	0.226	0.915	-0.689



100% DPPH 0.279  
50% DPPH 0.14  
IC50 (ml) 0.596

Extracto  
35

Muestra ul	A3-cartucho vit.C			Absorbancia real
	Jugo sin diluir ul	Absorbancia obtenida	Blanco de muestra	
control	0.00	0.279	-	0.279
10	1.00	0.229	0.183	0.046
20	2.00	0.239	0.366	-0.127
30	3.00	0.207	0.549	-0.342
40	4.00	0.217	0.732	-0.515
50	5.00	0.189	0.915	-0.726



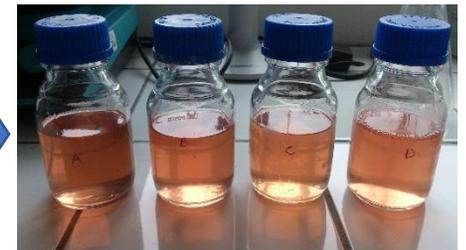
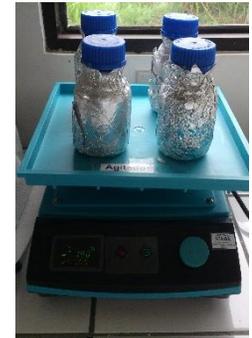
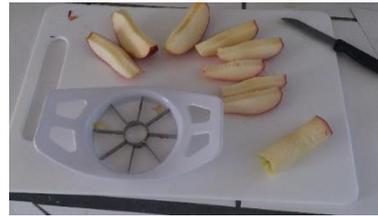
100%  
DPPH 0.279

50% DPPH 0.14

IC50 (ml) 0.617

## Anexo 7

### Diagrama de proceso de extracción de polifenoles



## Anexo 8

### Diagrama de proceso de elaboración de gomitas

