

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



TESIS COLECTIVA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA BEBIDA FUNCIONAL OBTENIDO CON DIFERENTES TIEMPOS DE INFUSIÓN DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa*) SECADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

EJECUTORES : BACH. THALÍA CUEVA FABIÁN
BACH. SEGUNDO AMANCIO MARTINEZ CARRASCO

ASESOR : DR. SERGIO GRIMALDO MUÑOZ GARAY

HUÁNUCO - PERÚ

2016

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios porque ha estado en cada paso que daba, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. A mis padres Hilda Fabián Apolinario y Armando Cueva Ureta, a mi abuelo Jacinto Libeto Fabián Tucto quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaban sin dudar ni un solo momento de mi inteligencia y capacidad. A mis amigos Marilyn Yesica Huanca Mendoza y Miguel Trujillo Luciano quienes fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo que escribía esta tesis

Thalía

En primer lugar doy gracias a Dios por la vida, a mis padres por su apoyo incondicional; por el presente trabajo de investigación que fue realizado aplicando el saber de mis docentes a quienes les gustaría expresar mi profundo agradecimiento por hacer posible la realización de este estudio. Gracias por su apoyo, por ser parte de la columna vertebral de mi tesis.

Amancio

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios y a mis padres. A la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán y a los docentes que con nobleza y entusiasmo, me brindaron conocimientos para la elaboración de la investigación. Al Ing. Michael Rubio Gabriel, por brindarnos su apoyo en la ejecución de la presente tesis.

Thalía

En primer lugar doy gracias a Dios por la vida, a mis padres por su apoyo incondicional; por el presente trabajo de investigación que fue realizado aplicando el saber de mis docentes a quienes me gustaría expresar mi profundo agradecimiento y a mi asesor por asesoramente en esta investigación.

A la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Hermilio Valdizán por darme la oportunidad de estudiar y ser profesionales.

Amancio

RESUMEN

La investigación se centró en hallar la actividad antioxidante de bebida funcional obtenido con diferentes tiempos de infusión de hojas de alfalfa (*medicago sativa*) secados con diferentes temperaturas. El estudio se desarrolló en dos etapas: La primera consistió en hallar la actividad antioxidante de las hojas secadas a diferentes temperaturas y la segunda parte comprendió determinar el mejor tiempo de infusión considerando la mayor actividad antioxidante y la aceptación de los panelistas.

Para la primera etapa seleccionamos las hojas de alfalfa para secarlo con temperaturas de 40°C, 50°C y 60°C con promedios de tiempo de secado de 2 horas, 1 hora con 50 minutos y 1 hora con 20 minutos respectivamente, considerando el tiempo de secado y usando el método DPPH con la herramienta informática Microsoft Excel y el método estadístico Duncan determinamos que el mejor tratamiento es el T₂. En la segunda etapa determinamos el mejor tiempo de infusión acuosa en caliente (60°C) y teniendo como tiempo de estudio 1, 2 y 3 minutos, no existiendo diferencia estadística entre el T₂ Y T₃. Con la evaluación sensorial el atributo aroma obtuvimos los mejores resultados en los tratamientos 1 y 2 no existiendo diferencia estadística entre ambos, mientras que en los atributos color y sabor el mejor tratamiento resulto el T₂. Teniendo al tratamiento 2 con las mejores características organolépticas. Se determinó el IC₅₀ que es la cantidad de muestra necesario para inhibir el 50% de radical DPPH, obteniendo 731.86 ug/mL de hojas de alfalfa triturado.

Después de realizar satisfactoriamente todos los procedimientos expuestas en el presente informe de tesis concluimos que la mejor temperatura de secado de las hojas de alfalfa es de 50°C y el tiempo óptimo de infusión acuosa que posee mayor actividad de antioxidantes es 2 minutos ya que entre los tratamientos con 2 y 3 minutos no hay diferencia estadística.

Palabra clave: Alfalfa, secado, infusión, aceptabilidad, sensorial y fisicoquímico.

ABSTRACT

The research focused on the functional antioxidant activity of alfalfa leaves (*medicago sativa*) dried at different temperatures. The study consisted of two stages: the first consisted in finding the antioxidant activity of the dried leaves at different temperatures and the second part included determining the best time of infusion considering the greater antioxidant activity and the acceptance of the panelists.

For the first stage, alfalfa leaves were selected for drying at temperatures of 40 ° C, 50 ° C and 60 ° C with drying time averages of 2 hours, 1 hour with 50 minutes and 1 hour with 20 minutes respectively, Drying time and using the DPPH method using the Microsoft Excel tool and the Duncan statistical method, we determined that the best treatment is T2.

In the second stage, we determined the best time of hot aqueous infusion (60 ° C) and having as study time 1, 2 and 3 minutes, there being no statistical difference between T2 and T3. With the sensory evaluation the flavor attribute obtained the best results in treatments 1 and 2, and there was no statistical difference between the two, whereas in the color and flavor attributes the best treatment resulted in T2. Taking the treatment 2 with the best organoleptic characteristics. The IC50, which is the amount of sample required to inhibit 50% DPPH radical, was determined to obtain 731.86 µg / mL of alfalfa leaves.

After satisfactory completion of all the procedures presented in this thesis report, we conclude that the best drying temperature of alfalfa leaves is 50 ° C and the optimum time of aqueous infusion having the highest antioxidant activity is 2 minutes since between the treatments with 2 and 3 minutes there is no statistical difference.

Keywords: Alfalfa, drying, infusion, acceptability, sensory and physicochemical.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
	2.1. FUNDAMENDACIÓN TEÓRICA.....	3
	2.1.1. Antioxidantes naturales.....	3
	2.1.2 Generalidades de la alfalfa (medicago sativa).....	3
	2.1.3. Taxonomía de la alfalfa.....	3
	2.1.4. Descripción morfológica.....	4
	2.1.5. Composición química de la alfalfa.....	7
	2.1.6. Variedades de alfalfa.....	8
	2.1.7. Beneficios de la alfalfa.....	9
	2.1.8. Secado de hierbas.....	11
	2.1.9. Factores que intervienen en el proceso de secado.....	16
	2.1.10. Actividad antioxidante.....	18
	2.1.11. Método de análisis.....	19
	2.1.12. Antocianinas.....	24
	2.1.13 Bebida funcional.....	30
	2.1.14. Infusión de filtrantes de hierbas.....	31
	2.2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	34
	2.3. HIPÓTESIS.....	36
	2.3.1. Hipótesis general.....	36
	2.3.2. Hipótesis específicos.....	36
	2.4. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	37
	2.4.1. Variables.....	37
	2.4.2. Operacionalización de variables.....	38
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
	3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN.....	39
	3.1.1. Tipo de investigación.....	39

3.1.2.	Nivel de investigación	39
3.2	LUGAR DE EJECUCION.....	39
3.3.	POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS	39
3.4.	TRATAMIENTOS EN ESTUDIO.....	40
3.4.1.	Para determinar la temperatura adecuada de secado de las hojas de alfalfa.....	40
3.4.2.	Para determinar el tiempo óptimo de infusión del filtrante obtenido a partir de las hojas secas de alfalfa	40
3.5.	PRUEBA DE HIPÓTESIS	41
3.5.1.	Para determinar la temperatura adecuada de secado de las hojas de alfalfa.....	41
3.5.2.	Para determinar el tiempo óptimo de infusión del filtrante obtenido a partir de las hojas secas de alfalfa	41
3.5.3.	Diseño de la investigación.....	42
3.5.4.	Datos a registrarse.....	45
3.5.5.	Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información	47
3.6.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	47
3.6.1.	Materiales de proceso	47
3.6.2.	Materiales de laboratorio	47
3.6.3.	Materiales de escritorio y otros	47
3.6.4.	Equipos	47
3.6.5.	Reactivos	48
3.6.6.	Materia prima.....	48
3.6.7.	Insumos.....	48
3.7.	CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	48
3.7.1.	Caracterización fisicoquímica de las hojas de alfalfa	49
3.7.2.	Determinación de la temperatura adecuada de las hojas de alfalfa y el tiempo óptimo de infusión de la bebida funcional	50
3.7.3.	Evaluación de actividad antioxidante.....	52
3.7.3.	Evaluación organoléptica de la bebida funcional	52

3.7.4. Caracterización fisicoquímico de la bebida funcional a partir de las hojas secas de alfafa	53
IV. RESULTADOS.....	54
V. DISCUSIONES.....	68
VI. CONCLUSIONES.....	70
VII. RECOMENDACIONES.....	71
VIII. LITERATURA CITADA.....	72
ANEXO.....	76

I. INTRODUCCIÓN

Conocer el potencial de los productos agrícolas es una necesidad si queremos innovar y tener presencia en el mercado ya que podríamos ofertar productos con características particulares diferenciándonos de la competencia.

La región Huánuco produce una gran cantidad de alfalfa, la cual posee propiedades que son beneficiosas para la salud humana que la mayoría de las personas desconoce, se conocen muchas fuentes de antioxidantes naturales y muchos de ellos se usan corrientemente en una variedad de productos alimenticios, por lo que es de interés la búsqueda de éstos, como alternativa al uso de antioxidantes sintéticos. Con la finalidad de contribuir con información sustentada sobre las propiedades antioxidativas de las hojas de alfalfa, como fuente de antioxidantes naturales en tal sentido decidimos estudiar y determinar los antioxidantes de las hojas de alfalfa en dicha investigación trabajamos con hojas de alfalfa secadas a temperaturas de 40°C, 50°C y 60°C y tiempos de infusión de 1, 2, y 3 minutos.

Para hallar la actividad antioxidante usamos el método DPPH, el cual es un método que consiste en inhibir con los radicales libre que es el DPPH con los antioxidantes extraídos de la muestra, la cantidad de radical inhibido usando el espectrofotómetro y con operaciones matemáticas básicas.

Los antioxidantes se desnaturalizan por acción de agentes que intervienen al interrumpir su estado natural y las condiciones naturales en el que se desarrolla una materia prima, entre los factores más determinantes de pérdidas de antioxidantes se encuentra la temperatura, por ende, se plantearon los siguientes objetivos:

-Determinar la temperatura adecuada para el secado de las hojas de alfalfa para la obtención de una bebida funcional con la mejor actividad de antioxidantes

- Determinar el tiempo óptimo de infusión para el mejor aprovechamiento de la actividad antioxidante del filtrante de hojas secas de alfalfa.
- Evaluar las características físico-químicos de la bebida funcional obtenida con el tiempo adecuado de infusión del filtrante de alfalfa
- Realizar la evaluación sensorial de la bebida funcional obtenida con el tiempo adecuado de infusión del filtrante de alfalfa

II. MARCO TEÓRICO

2.1 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1.1. Antioxidantes naturales

Aspectos generales

Los antioxidantes es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos, las propiedades antioxidantes no sólo deben estudiarse por sus interacciones químico – biológico, sino por su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa (Llacari, 2011)

2.1.2. Generalidades de la alfalfa (*Medicago sativa*).

La alfalfa, cuyo nombre científico es *medicago sativa*, es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia de las fabáceas o leguminosae, son hierbas perennifolias, sobre todo erectas a suberectas que alcanzan un tamaño de 30-60 cm de altura, pubescentes a subglabras. Las hojas de alfalfa mide alrededor de 5-35 mm de largo, 3-18 mm de ancho, obovadas a sublineal varía según la variedad de la alfalfa, lugar de procedencia y el manejo agronómico, obovadas a sublineal, dentados en el ápice, adpreso pubescentes; entera o dentada en la base. Inflorescencia en racimo pedunculado, el pedúnculo mucho más largo que el pecíolo. Corola de 6-12 mm de largo, violeta pálido lavanda. Las fruta o en una espiral floja de 11-4 giros, glabras a pilosas.(Canabio 2009)

2.1.3. Taxonomía de la alfalfa.

La alfalfa está clasificada de la siguiente manera:

Cuadro 1: Taxonomía de la alfalfa

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Genero	Medicago
Especie	Medicago sativa

Fuente: Roberts (2007).

2.1.4. Descripción morfológica

Tallo y corona

El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. No sólo tiene crecimiento primario, sino que también posee un crecimiento secundario que da origen a un eje leñoso o porción perenne, que forma parte de la corona. En su parte herbácea, presenta nudos desde donde nacen las hojas. El número de los tallos depende de la edad y el vigor de la planta, y puede llegar hasta 20. El crecimiento de los tallos es inducido por su utilización (pastoreo o corte) o por un nuevo ciclo fisiológico de crecimiento. Los tallos son usualmente de consistencia maciza, aunque en algunos casos pueden encontrarse tallos huecos, como en el ecotipo argentino Saladina. Existen también diferentes hábitos de crecimiento, fuertemente asociados al grado de reposo invernal. Como regla general, puede afirmarse que las alfalfas sin reposo invernal presentan tallos de porte erecto, en tanto que las alfalfas de reposo intermedio o marcado los poseen de porte semierecto o semirrastrero, respectivamente. A medida que el desarrollo de la planta continúa, el conjunto de la parte basal de tallos nuevos y viejos forma, entre la parte aérea y la raíz,

una estructura que recibe el nombre de corona. Más adelante, en la planta adulta, la corona incluirá la porción perenne de los tallos (Basigalup 2007).

La corona no es una estructura simple ni única sino que es una zona compleja que incluye varias estructuras separadas. De todas maneras, la delimitación morfológica exacta de la corona tiene muy poca importancia, ya que además de las partes involucradas de la planta es razonable suponer que la sequía estival, el frío invernal, las prácticas culturales, el ataque de plagas y enfermedades, el vigor general y la edad de las plantas influyen en la cantidad y el tipo de partes vegetativas que pueden intervenir en su conformación (Basigalup 2007).

Además de su constitución morfológica, es conveniente resaltar la importancia funcional de la corona como estructura almacenadora de sustancias de reserva y sede de yemas a partir de las cuales se producirán los nuevos rebrotes de la planta. El ciclo acumulación/utilización de sustancias de reservas es fundamental para la vida de la planta y condiciona las prácticas de manejo del cultivo (Basigalup 2007).

Hoja

La primera hoja de la plántula de alfalfa es unifoliolada y de forma orbicular. Las segundas y subsecuentes son pinnaticompuestas o imparipinnadas, y se originan en el ápice del tallo. Posteriormente, cuando la planta ya está desarrollada, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales ubicadas en los nudos de los tallos. Las hojas se unen al tallo por el pecíolo y son usualmente trifolioladas, vale decir que se componen de tres folíolos peciolulados. Los folíolos son normalmente oblongos u obovados, pero se pueden encontrar formas desde redondeadas a obovado-oblongas e incluso lineales (Basigalup 2007).

El borde de los folíolos es dentado usualmente sólo en el tercio superior, aunque también puede extenderse hasta la mitad superior o incluso el tercio inferior. La distribución de los bordes dentados guarda relación con la forma de

los folíolos. Las hojas se disponen a lo largo del eje del tallo en forma alternada. En el nacimiento de las hojas se observan las estípulas, que son unos apéndices delgados a modo de pequeñas hojas modificadas situadas en la base del pecíolo y adheridas a sus lados. Las estípulas son normalmente laciniadas, aunque también pueden ser lisas. La experiencia indica que las primeras se encuentran usualmente en hojas de plantas de varios años, y que las últimas se hallan casi exclusivamente en hojas de plantas jóvenes. Por lo tanto, puede concluirse empíricamente que la presencia de estípulas laciniadas o lisas se relacionaría más con la edad de las plantas que con algún otro factor (Basigalup 2007).

Los folíolos tienen una nervadura central prominente, que se extiende a lo largo de la lámina y de la cual parten nervaduras laterales pinnadas, que se subdividen formando una red. Las nervaduras son más notables en la cara abaxial (inferior) del folíolo, que es pubescente. Una observación microscópica de la hoja indica que los estomas (las aberturas o poros por donde se realiza el intercambio gaseoso de las hojas) son más numerosos en la cara superior y en el ápice del folíolo. Si bien la hoja trifoliada es la situación normal, se pueden encontrar hojas con 4 (tetrafoliadas), 5 (pentafofolioladas) o más folíolos y que por ello reciben el nombre genérico de hojas multifolioladas. Mucho más raros son los casos de hojas con folíolos divididos en lóbulos, o con colores distintos al verde (moteadas, amarillas, etc.) (Basigalup 2007).

Flor

La flor se desarrolla cuando el ápice del tallo pasa del estado de crecimiento vegetativo al reproductivo. Este cambio, que se llama transición, comienza con la aparición de una protuberancia en la axila del primordio foliar, adyacente al ápice del tallo. De cada primordio se origina una inflorescencia en forma de racimo simple (Basigalup 2007).

La corola está formada por cinco pétalos desiguales: el estandarte, que es el superior y el más grande de los cinco; las alas, que son dos pétalos más

pequeños que se ubican a ambos lados del estandarte; y la quilla, que está envuelta por las alas y que se forma por dos pétalos soldados que se ubican más internamente. Los estambres son 10 y están divididos en dos grupos: uno constituido por nueve, soldados en la base; y el restante formado por el décimo, que está libre y más cerca del estandarte. Esta disposición, que recibe el nombre de diadelfia, indica que los estambres de la alfalfa son diadelfos. Los filamentos de los 9 estambres soldados tienen distinta longitud y, al fusionarse para formar el tubo, se alternan los largos con los cortos. Por el interior del tubo que forman pasa el estilo, que remata en un estigma rodeado por las anteras de los estambres fusionados (Basigalup 2007).

2.1.5. Composición química de alfalfa

La alfalfa debe de estar seca (henificada) y su importante valor nutritivo dependerá del momento de la siega. Si se realiza cuando todavía no ha empezado la floración (1er. corte), el contenido de proteínas estaría alrededor del 6% y de hidratos de carbón sobre el 7%, y si es cosechada cuando empieza la floración, contendrá tres veces más de elementos nutritivos. El segundo corte se prefiere al primero porque no sale con tanta maleza (venenosa o mal tolerada). Una vez henificada, es decir, secada al sol, no se puede apreciar de qué corte es. Tiene que ser de un color verde aceituna con abundancia de hojas y tallos que es donde se encuentra la parte más alimenticia (Ponka 2007).

Cuadro 2. Composición nutricional para 100 g de hojas de alfalfa

CARACTERÍSTICAS	CANTIDAD
Sodio	150 mg
Potasio	2.000 mg
Fosforo	250 mg
Hierro	35 mg
Azufre	290 mg
Manganeso	5 mg
Magnesio	310 mg
Antioxidantes	400 mg
Niacina	58. 8 mg
Riboflamina	17.4 mg
Proteína bruta	24%
Grasa bruta	3.10%
Extracto no nitrogenado	45.80%
Fibra bruta	16.40%
Humedad	94 %
Cenizas	6%

Fuente: Lean (2006)

2.1.6. Variedades de alfalfa.

Cuadro 3: Contenido nutricional de harina de alfalfa por Variedades.

CARACTERÍSTICAS	VARIEDADES		
	Gènesis	Sceptre	SWL-8210
Humedad %	1.91	2.31	2.03
Cenizas %	9.93	10.13	9.87
E. Etereo %	2.8	2.66	2.89
Proteina %	27.15	25.67	25.17
Fibra %	22.73	25.87	25.19
Antioxidantes	370	400	450
Ca ppm	1.45	1.36	1.36
P %	0.28	0.28	0.27
Mg %	0.15	0.14	0.15
K %	2.85	3.12	3.06
Na %	0.05	0.05	0.06
Cu ppm	9	8	7
Fe ppm	182	148	152
Mn ppm	88	89	79
Zn ppm	31	37	32

Fuente: Gray (2006)

2.1.7. Beneficios de la alfalfa

Los beneficios para la salud de la alfalfa son extensos y cubren muchas condiciones diferentes y dolencias. En la medicina tradicional china, o la medicina tradicional china, los médicos utilizan esta hierba de la maravilla y sus hojas en el tratamiento de una amplia variedad de trastornos del sistema digestivo y los riñones.

Los médicos de Ayurvedic en la India antigua utiliza a menudo se trata de una ayuda digestiva y nutritiva. También utilizaban las semillas de la planta de alfalfa tópico como una cataplasma para los forúnculos y heridas. Además, fue utilizado para tratar la artritis y el edema (Rubenstein 2008).

En ese momento, la alfalfa se creía era útil para las personas que sufren de artritis y de retención de agua.

Ciertas condiciones médicas se dice que son los que se puede combatir en un régimen de alfalfa. Ellos son la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular, el cáncer, la diabetes y endometriosis (Ramón 2004).

2.1.7.1. Dependencia de drogas y de alcohol.

Los beneficios para la salud de la alfalfa también se extienden al alcohol y la dependencia de drogas - la hierba se utiliza para combatir estas condiciones debido a sus propiedades alcalinizantes, que promueven la desintoxicación. Uno de los beneficios de salud importantes de la alfalfa es el papel vital que desempeña como un controlador efectivo de colesterol. Las fibras y productos químicos en la alfalfa parecen pegarse al colesterol, evitando que permanezcan en la sangre o del depósito de sí mismo en las paredes arteriales, parece que la ingestión de alfalfa libera el cuerpo de los tipos de colesterol dañino, pero HDL (lipoproteína de alta densidad) es aparentemente al margen de los efectos de la alfalfa.

Por lo tanto, se cree que la alfalfa previene la formación de placa en las paredes arteriales, lo que como consecuencia la prevención de las

enfermedades del corazón y accidentes cerebrovasculares, además de ser responsable de disminuir los niveles de colesterol en la sangre. (Gray 2006).

2.1.7.2. Usos medicinales

El acelerado estilo de vida actual ha generado cambios en la alimentación a nivel mundial. Los nuevos y algunas veces poco saludables hábitos alimenticios de la población junto con factores como el sedentarismo y estrés, favorecen el incremento de enfermedades como diabetes, obesidad, hipertensión arterial y cáncer, entre otras, generándose así un problema de salud pública alrededor del mundo. Por otra parte, en países en desarrollo las desigualdades económicas hacen que gran parte de la población no acceda a los alimentos de calidad o en cantidad suficiente, ocasionando episodios de desnutrición y retraso en el desarrollo físico (Cortés-Sánchez, León-Sánchez, Jiménez-González, Díaz-Ramírez, Villanueva-Carvajal y Guzmán-Medina 2016).

La alfalfa ha sido generalmente un alimento destinado para la alimentación del ganado, sin embargo, en diversas investigaciones alrededor del mundo se ha reportado que contiene compuestos bioactivos –fitoquímicos–y proteínas con efecto estrogénico, antimicrobiano y antioxidante, así como también protector contra enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes, entre otras, clasificándola potencialmente como un alimento funcional (Cortés-Sánchez, León-Sánchez, Jiménez-González, Díaz-Ramírez, Villanueva-Carvajal y Guzmán-Medina 2016).

2.1.7.3. Cáncer

Los beneficios para la salud de la alfalfa se cree que alcanzan el cáncer, también. Los estudios de cáncer también han visto una correlación entre el

consumo de alfalfa y la incidencia de cáncer. Se ha informado de que la alfalfa ayuda a agentes carcinógenos se unen en el colon, y es eficaz en su pronta eliminación (Rubenstein 2008).

Además, durante el tratamiento del cáncer después de la quimioterapia con fármacos como el Cytosan y Neosar, la alfalfa se ha reportado para reducir y, a veces por completo revertir la depresión inmune causada por estas drogas contra el cáncer. Protección en contra de los antibióticos, los medicamentos contra el colesterol, anticonvulsivos y medicamentos esteroide. También, además de lo anterior, las relativas a un régimen de antibióticos como la amoxicilina, gentamicina, estreptomicina y la tetraciclina se beneficiarían en gran medida por el consumo de alfalfa, ya que restaura los niveles de vitamina K en el cuerpo. La vitamina K se agota cuando se utilizan estos antibióticos. También se sabe para beneficiar a aquellos que están tomando medicamentos anti-colesterol, medicamentos anticonvulsivos y esteroides. Todas estas reducir el nivel de vitamina K en el cuerpo, y la alfalfa ayuda a incrementar las reservas (Roberts 2007).

2.1.8. Secado de hierbas

El secado es el proceso que consiste en la eliminación de gran parte del agua inicialmente incluida en el producto, hasta un nivel de contenido de humedad aceptable para ser almacenados por largos períodos sin pérdidas significativas y sin reducir el valor comercial del producto. Este fenómeno tiene como finalidad la reducción del agua disponible y por lo tanto de la actividad de agua y la velocidad de las reacciones en el producto y en el desarrollo de los microorganismos (Soler 2007).

El proceso de secado se puede dividir en tres etapas, basándose desde el punto de vista de la transferencia de calor y masa; usando el parámetro de temperatura y velocidad del aire de secado, la humedad relativa dentro y

exterior del sistema de secado, la temperatura y presión estática de material de acuerdo a la altura de la capa de producto.

El inicio del secado es la primera etapa, en la cual ocurre una elevación gradual de la temperatura del producto y la presión interna de vapor de agua. Esta etapa finaliza cuando la transferencia de calor es equivalente a la transferencia de masa. En la segunda etapa el agua es el agua libre, y se caracteriza por la tasa constante de secado. Esta tasa será constante, mientras haya la cantidad de agua suficiente en la superficie del producto para acompañar la evaporación. Y, por último, la tercera etapa, donde la tasa de secado es decreciente. La reducción de la migración de la humedad de la superficie interior para la superficie del producto hace que la transferencia de calor no sea compensada con la transferencia de masa. Esto se debe a que la cantidad de agua presente en la superficie del producto es menor, reduciendo la transferencia de masa. El proceso finaliza cuando el producto llegue al punto de equilibrio del contenido de humedad en relación con el aire de secado (Carballo 2006).

La deshidratación de alimento es el proceso de extracción del agua que contiene mediante la circulación de aire caliente, lo que detiene el crecimiento de enzimas y microorganismos que lo deterioran. Además, muchos microorganismos son destruidos cuando la temperatura llega a 60°C. El objetivo de secar es preservar el alimento al disminuir su humedad hasta que el crecimiento microbiano de bacteria, levadura y moho, y las reacciones químicas por degradación enzimática se detengan y cesen de destruir el alimento durante su almacenaje. En el caso de las frutas, el objetivo adicional es aumentar el nivel de azúcar (Valdés 2008).

El secado artificial se realiza en secadores de conducción de aire caliente forzado o invernaderos, a baja humedad relativa. Esta técnica es la más utilizada en los países de clima húmedo y lluvioso. En función de la

sensibilidad de los componentes que las plantas poseen, se determina la temperatura óptima del aire de secado. Debido a su bajo coste y simplicidad de operación en comparación con otros métodos de conservación como apertización, irradiación, refrigeración, el secado es el proceso más comúnmente utilizado para conservar la calidad de los productos naturales. Este proceso tiene objetivos específicos como son: satisfacer las necesidades de la industria farmacéutica, reducir el contenido de agua haciendo disminuir drásticamente la actividad de agua de los productos para aumentar así la vida útil, facilitando su transporte, manejo y almacenamiento (Silva 2008).

De ahí también que los compuestos aromáticos presenten una estabilidad a temperatura ambiente durante mucho tiempo, y las enzimas oxidativas ofrecen protección, así pues se facilita la extracción de aceite esencial, eliminando un alto porcentaje de agua libre de las células y tejidos, la prevención de procesos enzimáticos de degradación y proporcionar la conservación y el segundo disminuye la posibilidad de proliferación de microorganismos. El mayor problema en el secado y el almacenamiento es la alta sensibilidad del principio biológicamente activo y su conservación en el producto final.

Si la temperatura es muy baja al comienzo, pueden desarrollarse microorganismos antes que el producto sea adecuadamente deshidratado. Si la temperatura es muy elevada y la humedad muy baja, la superficie del producto puede endurecerse manteniendo la humedad interna.

La temperatura para deshidratar alimentos es de 50° a 60°C. Mayor calor cocina el alimento, y si es aún mayor, cocina su exterior impidiendo que la humedad interna escape (Valdés 2008).

Según Silva (2008) la velocidad es otro parámetro muy importante en el proceso. Martinazzo hizo otro estudio donde también concluye que la temperatura de aire de secado a 50°C demuestra ser la más indicada para el secado de la especie *Cymbopogon Citratus*.

También Peter (2006) concluyó que el contenido de Citral en capim-limão se incrementó significativamente cuando las hojas se sometieron al tratamiento con respecto a las hojas frescas. Los autores consideran que este aumento puede atribuirse a la oxidación de Geraniol durante el proceso de secado al convertirse en un Geranial. El contenido de Nerol presentó un porcentaje menor que Geraniol en comparación con la planta fresca, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de secado, porque no tuvo un aumento en la oxidación de Nerol durante el secado, convirtiéndose en Neral.

El estudio que hizo trata de la influencia del secado de capim-limão en cuanto al contenido de aceite esencial y de Citral en estufas con temperaturas de 30°C, 50°C, 70°C, y 90°C. Los mejores resultados de la concentración de aceite fueron a 30°C (1,34%) y 50°C (1,43%). Pero el tratamiento a 30°C favorece el desarrollo de hongos. En la temperatura de secado a 70 y 90°C se obtuvieron contenidos de aceite 1,19 y un 1,06% respectivamente. Por lo tanto, la temperatura óptima del aire de secado es de 50°C. El secado y el almacenamiento son de gran importancia en el producto final, razón por la cual los productos de mala calidad están asociados con unos pasos de recolección, procesamiento y almacenamiento inadecuados. Por lo tanto, estos parámetros son fundamentales para lograr un producto de buena calidad, puesto si se produjera un fallo en cualquiera de estos dos pasos, la calidad del producto final se vería influenciada. Si el secado no se realiza adecuadamente, podría comprometer el contenido de principios activos y también podría influir en el color y olor, como en la calidad final (Ramón 2007.).

A continuación, se presenta el diagrama de proceso de secado de hierbas.

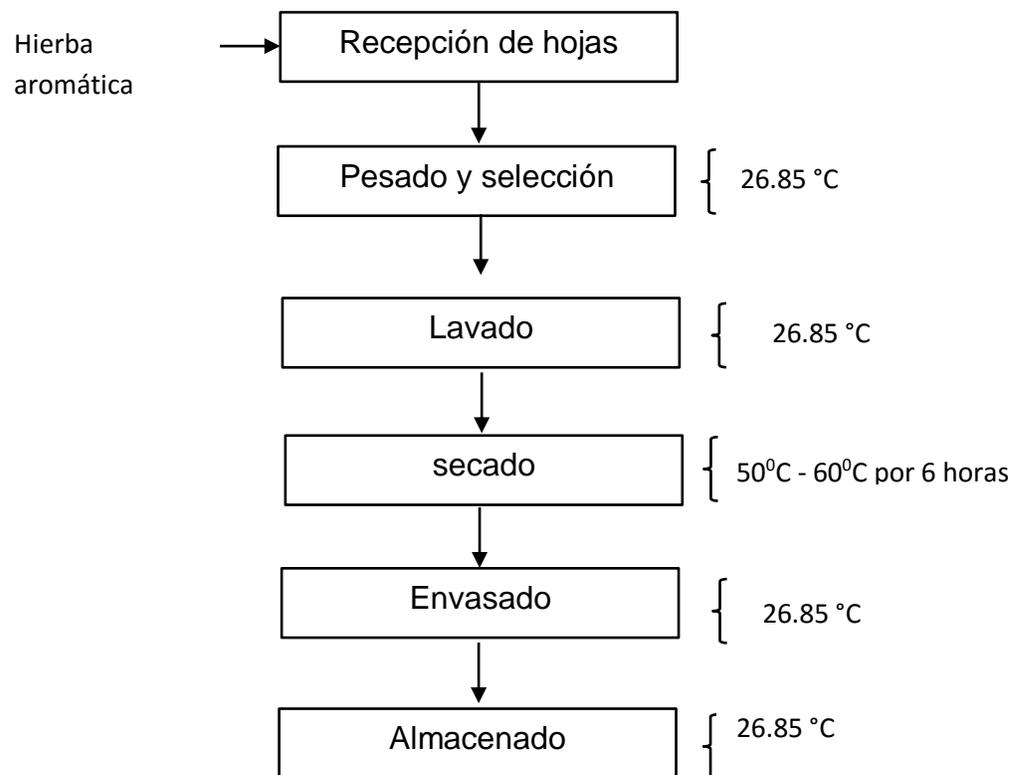


Figura 1: Flujo gramal de secado de hierbas aromáticas

Fuente: Taiwan Turnkey Project Association (2014)

- **Recepción de la materia prima**

Es la primera etapa en la elaboración del secado de hierbas, en este paso es fundamental observar y verificar ciertas características de color, olor, textura. (Revista Enlace 2014).

- **Selección y pesado**

En esta etapa le sacamos ramas, eliminamos las hojas picadas de insectos, en mal estado. Tomamos el peso inicial para después tomar el peso final cuando las hojas estén secas (UNESCO 2006).

- **Lavado**

Lavar con abundante agua para limpiar la suciedad de la superficie de las hojas a secar (UNESCO 2006).

- **Secado.**

Colocar las hojas preparadas sobre los tamices de secado en capas delgadas y regulares a una temperatura de 50°C – 60°C por seis horas. Durante el secado se debe controlar regularmente las hojas. Al finalizar el secado retirar los productos del secadero (UNESCO 2006).

- **Envasado.**

Después del secado los productos tienen que ser envasados rápidamente, para que no vuelvan a humedecerse por la humedad ambiental. Para el efecto se pueden utilizar recipientes de plásticas, cajas o latas herméticas de metal o bolsas de polipropileno (UNESCO 2006).

- **Almacenado.**

Para una buena conservación de los productos secos, debe almacenarlos en buenas condiciones. Guardar los productos en un lugar seco, airado, si es posible fresco y protegido. Este lugar debe ser limpio y protegido de insectos y ratones (UNESCO 2006).

2.1.9. Factores que intervienen en el proceso de secado

2.1.9.1. Temperatura del aire

La temperatura desempeña un papel importante en los procesos de secado. En forma general, conforme se incrementa el valor se acelera la eliminación de humedad dentro de los límites posibles.

En la práctica del secado, la elección de la temperatura se lleva a cabo tomando en consideración la especie que se vaya a someter al proceso (Fernando, 2006).

2.1.9.2. Temperatura superficial

Intermediate (2001) Indica que la temperatura superficial de la materia sometido al proceso de secado, se mide por medio de un sensor infrarrojo.

2.1.9.3. Humedad relativa del aire

La humedad relativa del aire se define como la razón de la presión de vapor de agua presente en ese momento, con respecto a la presión de saturación de vapor de agua la misma temperatura. Generalmente se expresa en porcentaje, a medida que se incrementa la temperatura del aire aumenta su capacidad de absorción de humedad y viceversa.

Cuando el aire contiene su máxima capacidad, se dice que se trata de un aire completamente saturado y por lo tanto incapaz de absorber más humedad, por el contrario, un aire no saturado tiene la posibilidad de absorber una cantidad determinada de humedad hasta lograr su saturación (Fernando 2006).

2.1.9.4. Velocidad del aire.

La velocidad del aire dentro del secador tiene como función principal, transmitir la energía requerida para extraer el agua contenido en el material, facilitando su desecación y transportando la humedad saliente del material.

La capa límite que existe entre el material a secar y el aire juega un papel importante en el secado. Cuanto menor sea el espesor de esta capa límite, más rápida será la remoción de humedad. Durante las primeras etapas del secado, la velocidad del aire desempeña un papel muy importante, sobre todo cuando el material contiene un alto contenido de humedad. A mayor velocidad, más rápido se extrae agua y el tiempo de secado será en menor tiempo (Fernando 2006).

2.1.10. Actividad antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles.

Los antioxidantes se encuentran contenidos en el olivo, ajo, arroz integral, café, coliflor, brócoli, berenjena, jengibre, perejil, cebolla, cítricos, tomates, aceite de semilla de la vid, té, romero, entre otras muchas sustancias. La capacidad antioxidante de algunos frutos, como es el caso de las berenjenas, es mayor durante sus estadios iniciales. También son parte importante constituyente de la leche materna.

Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, super óxido dismutasa y varias peroxidasas. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células (Muñoz 2007).

Cada vez que respiramos, 20% de lo que inhalamos es oxígeno. El oxígeno es una molécula esencial que pasa del aire en los pulmones a los glóbulos rojos en la sangre. Los glóbulos rojos transportan el oxígeno a cada célula de nuestro cuerpo. Así, el oxígeno proporciona vitalidad a las células al crear la energía necesaria para que las células funcionen. La oxidación es un proceso sin el cual no podríamos vivir. Este es el mismo proceso que

causa que una manzana partida y expuesta al aire se ponga café, o que el cobre se ponga verde con el tiempo. El proceso de oxidación crea radicales libres en nuestras células. Un radical libre es un átomo con un número impar de electrones o que tiene un electrón libre. En grandes proporciones, los radicales libres pueden causar daño a las células. El consumir alimentos ricos en antioxidantes puede inactivar los radicales libres del oxígeno y reducir los efectos dañinos de estos radicales libres (Tetteh 2012).

2.1.11. Métodos de análisis

2.1.11.1. Método del ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico).

El radical ABTS se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68V), pudiendo reaccionar con el radical, muchos compuestos fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados que pueden interferir en los resultados finales, lo cual, es un inconveniente. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso. Existen varios métodos de generación del radical ABTS:

Enzimáticamente (mioglobina, peroxidasa de rábano).

- Químicamente (Dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).
- Electroquímicamente.

En el presente estudio, se ha realizado el método ABTS generando el radical químicamente utilizando per sulfato potásico. La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en un tiempo de 12 a 16 h. El persulfato potásico y el ABTS reaccionan estequiométricamente (1:0.5). Una vez generado el radical la medida se realiza mediante un ensayo de post-adición. Este método se aplica en la determinación de la actividad antioxidante de frutas, verduras, bebidas estimulantes (Pérez 2006).

Preparación de reactivos.

- ABTS 7mM. Para 10 ml Disolver 0,0384 g de sal amónica cristalizada de ABTS en 10 ml de agua destilada.

- Solución persulfato potásico 2,45mM. Para 100 ml Disolver 0,0662 g del reactivo en 100 ml de agua destilada.

-Etanol al 96% v/v.- Preparación radical ABTS*. Mezclar a partes iguales la solución de ABTS 7mM y la de persulfato pototásico 2,45mM. La mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Esta solución es estable durante dos días. La solución de ABTS* se diluye con etanol para obtener una absorbancia de 0,8 730 nm. Esto se consigue mezclando 2,5 ml de la solución del radical con aproximadamente 100 ml de etanol. (Rao 2007)

-Recta de calibración con la disolución de TROLOX. La solución madre se prepara disolviendo 0,01 gr de Trolox en 5 ml de metanol y 5ml de agua destilada. A partir de esta solución se hacen las diluciones que serán los distintos puntos de la recta, con unas concentraciones de 19, 39, 59, 79, 99, 119, 159 y 199 μ M.

2.1.11.2. Radical DPPH°

El DPPH° es un reactivo muy usual para investigar la actividad de inhibición de radicales libres de los polifenoles (Yildirim, 2001). El

mecanismo de reacción consiste en sustraer un átomo de hidrógeno de un fenol donador para dar difenilpicrilhidrazina y un radical fenoxil (Lebeau, 2000). La reacción involucra un cambio de color de violeta a amarillo que fácilmente puede ser monitoreado midiendo el decaimiento de la absorbancia a 515 nm –Figura 1– (Brand., 2006).

El radical fenoxil puede sufrir posteriores reacciones tales como el acoplamiento y fragmentación, que resultan en productos complejos, y que modifica la reacción y los valores del coeficiente de Inhibición del 50% del radical, (IC_{50}), por alteración de la estequiometría (Lebeau, 2007).

El IC_{50} es un parámetro que describe en forma global la reacción con el radical, proporcionando información limitada del mecanismo de reacción. En el Cuadro 3 se muestran valores de IC_{50} para diferentes compuestos fenólicos. El valor de la constante de velocidad de la reacción (K_2) corrige las limitaciones de IC_{50} , incluyendo, además de la concentración, la velocidad de inhibición del radical $DPPH^\bullet$ (Espin, 2008). Esto permite diferenciar a los compuestos de acuerdo a sus reactividad intrínseca (Lebeau, 2007).

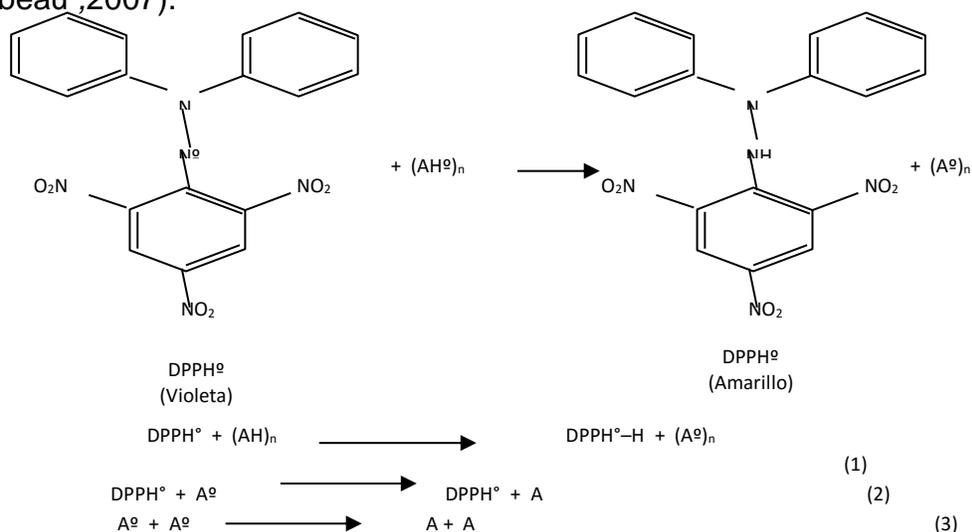


Figura 2. Química de la inhibición del radical libre por una especie antioxidante.

Fuente: Espin (2008).

Donde:

DPPH°-H = Radical DPPH° reducido

(AH°)_n = Especies radicales (n = indica la presencia de 1 ó más especies radicales).

Cuadro 4. Actividad antioxidante de polifenoles medido con DPPH°.

	IC ₅₀ después de 30 minutos
Pentagalailglucosa	3,2
Telimagrandina II	4,2
Pedunculagina	5,6
Geraniina	5,9
Acido chebulínico	5,3
Corigalina	6,8
Epigalocatequina galato	6,7
Epicatequina galato	2,0
Epigalocatequina	11,0
Epicatequina	31,0
(+)-catequina	34,0
Ácido gálico	16,0
Ácido ascórbico	39,0
α-tocoferol	37,0

Fuente: Hiramatsu (2007).

2.1.11.3. Análisis estadístico

Análisis de regresión no lineal

Los datos de absorbancia registrados para los modelos in vitro del radical DPPH° y para el peróxido de hidrógeno se sometieron a un análisis de regresión no lineal para determinar el IC₅₀ (Brand–William 2006).

Análisis de regresión lineal

Los datos de absorbancia registrados para los modelos in vitro del radical DPPH°, y catión ABTS°+, se sometieron a un análisis de regresión lineal para determinar el k₂ y EVC; y los datos de absorbancia de los polifenoles para expresar en términos de equivalentes de ácido gálico (EGA) por gramo de Cedrón (Espin 2008).

Estadística descriptiva

Los parámetros calculados en las pruebas de actividad antioxidante, polifenoles totales y estabilidad se expresaron como promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones (Ureña 2008).

Análisis de varianza

Los porcentajes del IP y AA se analizaron estadísticamente mediante un arreglo factorial de 3x4, bajo un Diseño Completamente al Azar –DCA– (ecuación 26), y se usó la prueba de Significancia de Duncan ($\alpha = 0,05$), con tres repeticiones, con el uso del software “Sistema de Análisis Estadístico” para Windows –SAS– Ver. 6.14 (Ureña 2008).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- i = 1, 2, 3 niveles del factor A (Temperatura).
- j = 1, 2, 3, 4 niveles del factor B (pH).

Y_{ijk} = Variable respuesta correspondiente a la k-ésima repetición que pertenece al j-ésimo nivel del factor B, correspondiente al i-ésimo nivel del factor A.

μ	=	Efecto de las medias.
α_i	=	Efecto del i-ésimo nivel del factor A.
β_j	=	Efecto del j-ésimo nivel del factor B.
$(\alpha\beta)_{ij}$	=	Efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel del factor A y el j-ésimo nivel del factor B.
ε_{ij}	=	Efecto del error experimental

2.1.12. Antocianinas (Cy; 3-gluc,3-rutin)

Las antocianinas se localizan principalmente en la piel de las frutas como Manzana peras, uvas, zarzamoras, ciruelas, de flores como Jamaica, rosas y verduras, col y cebolla morada. La diferencia de colores entre frutas y flores depende de la naturaleza y coloración de las antocianinas. (Del Valle 2006)

2.1.12.1. Efectos benéficos

Los efectos benéficos de los antioxidantes naturales, básicamente están dados por su capacidad de inhibir radicales libres ejerciendo acción en todos los procesos en los que se reduce o detiene el proceso de oxidación como: 1) hidrólisis enzimática de enlaces ésteres para remover ácidos grasos peroxidados de lípidos, 2) quelamiento de iones metálicos de transición y 3) reducción de peróxidos por catálisis enzimática (Thomas 2000).

Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo y que pueden existir independientemente (Clarckson y Thompson 2000), que los hace muy

inestable, extraordinariamente reactivos y de vida corta (Guerra 2001), con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente (Halliwell 1995) en la mayoría de los casos con la diversidad de moléculas integrantes de estructuras celulares: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez 2006).

Se forman en condiciones fisiológicas normales o por factores exógenos en proporciones controlables por los mecanismos de defensas celulares). En situaciones patológicas esta producción se incrementa substancialmente, ingresando al estado del estrés oxidativo (Thomas 2006).

Los radicales libres pueden capturar el electrón que les falta de las moléculas que están a su alrededor, y así tornarse estables (Clarckson y Thompson 2000). La molécula atacada (que ahora no tiene un electrón) se convertirá entonces en un radical libre y de este modo se inicia una reacción en cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen (González 2008).

Desde el punto de vista nutricional, la actividad antioxidante, se asocia con su papel protector contra enfermedades cardiovasculares y el cáncer; y consecuentemente en los procesos de envejecimiento (Vasconcellos 2008).

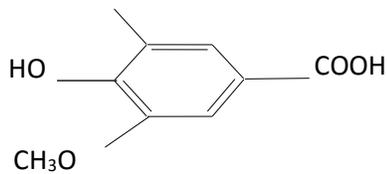
2.1.12.2. Polifenoles como antioxidante

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas distribuidos ampliamente en alimentos de origen vegetal –frutas, cereales, hortalizas y bebidas– (Richelle 2001). Poseen diferentes estructuras químicas y actividad (Martínez 2000). Gran parte de ellos presentan acción potencialmente beneficiosa para la salud humana (Cadenas 2001), asociados con el consumo de alimentos y bebidas ricos en polifenoles (Scalbert 2008).

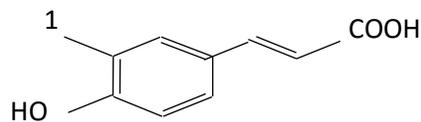
Los polifenoles que poseen actividad antioxidante son conocidos por ser principalmente ácidos fenólicos y flavonoides (Martínez 2000). Los ácidos fenólicos han sido repetidamente implicados como antioxidantes naturales en frutas, hortalizas y otras plantas, por ejemplo, el ácido cafeico, ferúlico y vanílico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Zheng y Wang 2001). Los flavonoides, quienes tienen el mismo carbono C₁₅ (C₆-C₃-C₆) ejercen actividad antioxidante en una variedad de compuestos fácilmente oxidables. En muchas plantas los principales flavonoides son las flavonol-aglyconas tales como la quercetina, myricetin (Fiorani 2002), kaempferol y sus glicósidos (Figura 3). En general, los flavonoides que contienen grupos hidroxilos tienen elevada actividad antioxidante frente a radicales peroxilos más que los ácidos fenólicos (Zhen 2006).

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, la cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores del oxígeno singulete; además de tener potencial para quelar metales (Hopia 1999), inhibir la lipoxigenasa y secuestrar radicales libres (Martínez 2007).

A



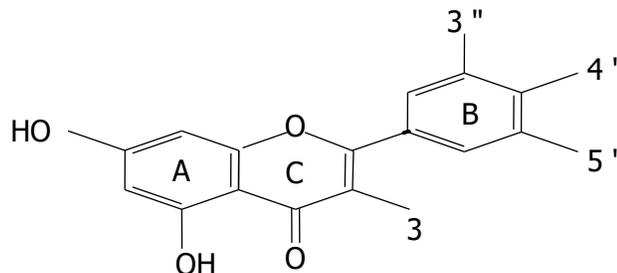
Acido Vanílico



Acido cafeico 1 = OH

Acido ferúlico 1 = OCH₃

B



Miricetina 3'' = OH 4'' = OH 5'' = OH 3 = OH

Quercetina 3'' = OH 4'' = OH 5'' = H 3 = OH

Kaempferol 3'' = H 4'' = OH 5'' = H 3 = OH

Figura 3. Estructura de los principales ácidos fenólicos y flavonoides.

Fuente: Zheng y Wang (2006)

Los polifenoles, como agentes reductores junto con otros agentes reductores de la dieta, como la vitamina C, vitamina E y los carotenoides protegen los tejidos del cuerpo contra el estrés oxidativo (Scalbert y Williamson 2000), por lo que el consumo de frutas y vegetales ricos en polifenoles, previenen muchas enfermedades, destacando el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Yildirim 2001), además inhiben daños contra el Acido Desoxirribonucleico (ADN) y bloquean la acción de enzimas específicas que causan la inflamación –ciclooxigenasa-I y ciclooxigenasa-II– (Vasconcellos 2008).

2.1.12.3. Estabilidad de polifenoles en modelos de bebida

La estabilidad de los polifenoles en sistemas alimenticios de origen vegetal, está relacionado con el grado de formación de pigmentos amarillos y marrones, debido a la actividad de las enzimas polifenoloxidasa (Martínez 2000) y tirosinasa en reacciones enzimáticas y a la del oxígeno en reacciones no enzimáticas "Reacción de Maillard" (Bradshaw 2007).

El desarrollo gradual del pardeamiento genera productos de la reacción de Maillard (MRPs), dependiendo de las condiciones intrínsecas del medio y de los factores como: estructura y concentración del sustrato (Chen 2007), pH, temperatura, actividad de agua y la presencia de agentes complejos –fenoles e iones metálicos– (Kitts 2001), los mismos que al ser sometidos a los diferentes tratamientos durante el procesamiento de manufactura de los alimentos, afectan a su actividad antioxidante y la evolución de los pigmentos pardos con la consecuente producción de los MRPs y otros productos en suspensión que tienden a producir precipitación –Figura 4–

(Nicoli 2009). Los MRPs pueden actuar como antioxidantes o pro-oxidantes (Nicoli 2009).

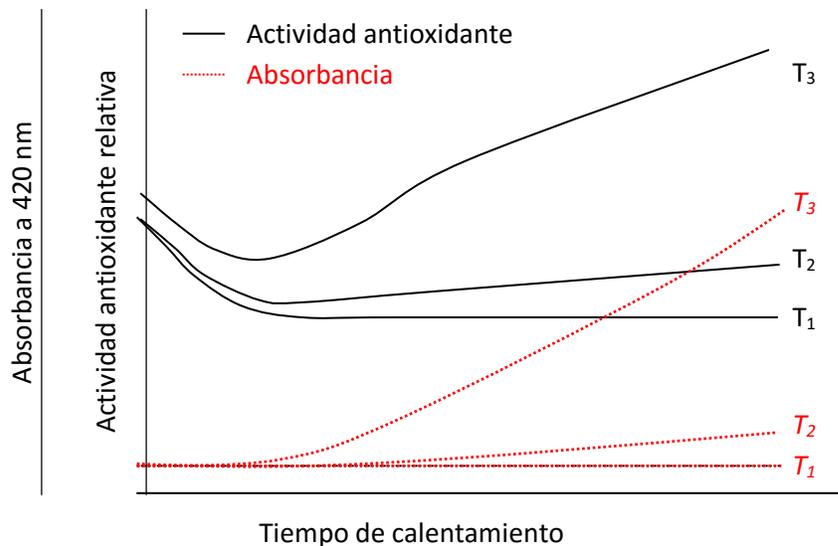


Figura 4. Cambios en la actividad antioxidante total y en la absorbancia de un modelo glucosa-fructosa y ácido glutámico, debido al desarrollo de diferentes productos de la Reacción de Maillard, $T_3 > T_2 > T_1$.

Fuente: Adaptado de Nicoli (2009).

Las catequinas del té verde en solución acuosa y en condiciones aceleradas de almacenamiento, son más estables a 37°C que a 98°C (Figura 5) y a bajos valores de pH (Figura 6A). Además, es importante considerar la presencia de otros ingredientes en el sistema alimenticio, ya que de esto depende la relativa vida útil del producto –Figura 5B– (Chen 2007).

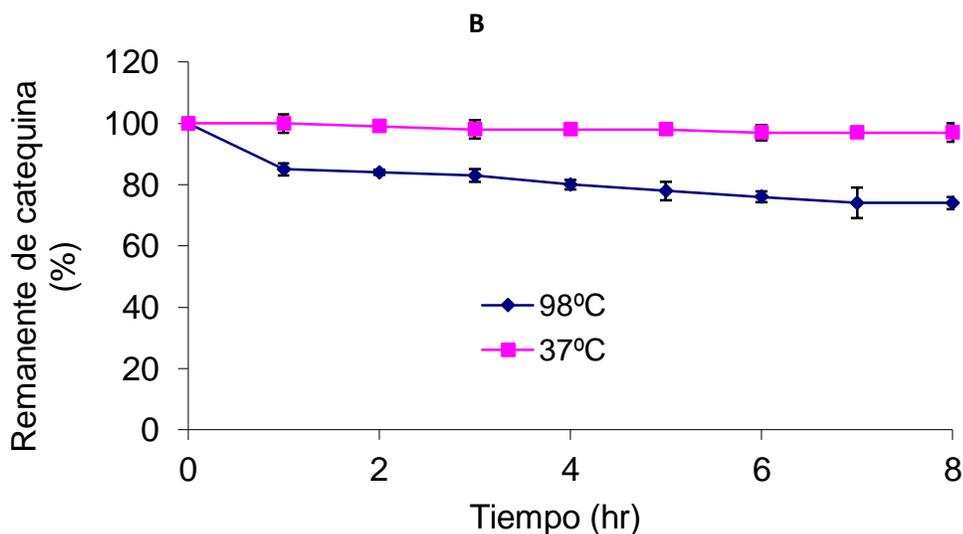


Figura 5. Estabilidad de las catequinas del té verde en solución acuosa.

Fuente: Adaptado de Chen (2007).

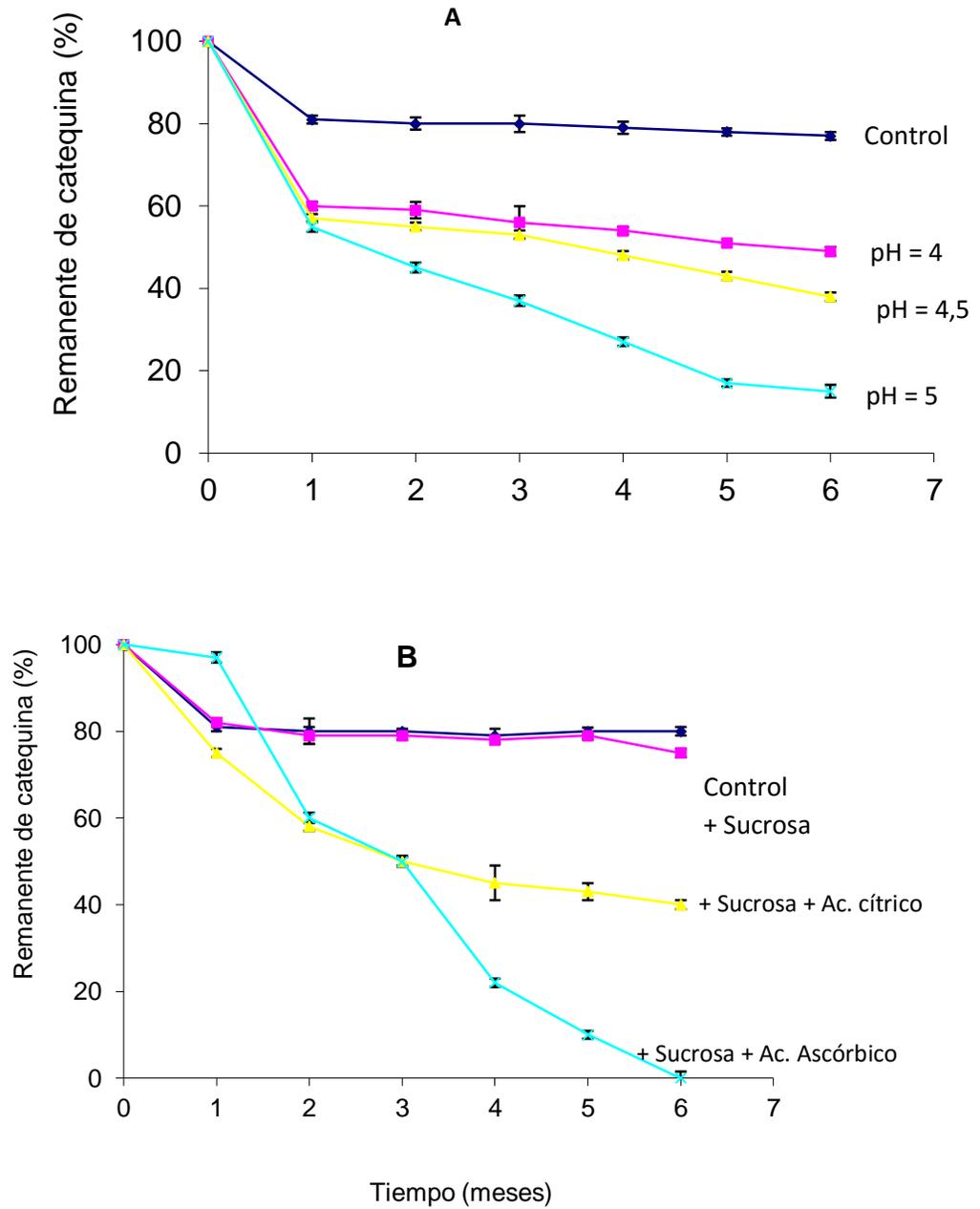


Figura 6. Estabilidad de catequinas del té verde en solución acuosa. (A) a diferentes niveles de pH. (B) en presencia de otros ingredientes.

Fuente: Chen (2007).

2.1.13. Bebida funcional

Debido a la inconsistencia de una definición internacionalmente aceptada de funcionales alimentos, es muy difícil acceder a los números confiables que describen el alimento funcional en todo el mundo mercados. La demanda de alimentos funcionales varía de país a país, sobre la base de la alimentación hábitos, la legislación forzada y la cultura. Los mayores mercados de alimentos funcionales están en Japón y los EE.UU., mientras que los mercados europeos, muy por detrás de ellos. La cuota de mercado actual de alimentos funcionales en Europa sigue siendo inferior al 1% del total del mercado de alimentos y bebidas. Alemania, Francia, el Reino Unido y los Países Bajos tienen un mayor consumo de alimentos funcionales que otros países europeos, y Alemania tenían la mitad de las empresas en el mercado europeo de alimento funcional en 2004. Los mercados de alimentos funcionales están aumentando y los nuevos productos están poniendo en marcha de forma continua y la competencia es cada vez más intensa [13]. El desarrollo y la comercialización de un alimento funcional es diferente que uno convencional, porque el desarrollo de un alimento funcional necesita científica demuestra de manera diferente especialista como nutricionista, tecnología de los alimentos están involucrados en el desarrollo y la producción (Emine 2012).

De lactosa y caseína, productos que causan alergias e intolerancias Aporta un 13% de calcio y además se considera una de las sales más neutrales en cuanto a su sabor. Otro ingrediente utilizado en bebidas funcionales es la sucralosa, que es un endulzante grado alimenticio 600 veces más dulce que el azúcar. Los beneficios que aporta son que su molécula, al ser inerte, pasa por el cuerpo sin alterarse, sin metabolizarse, y es eliminada después de

consumida. Además, es no calórica, no requiere etiqueta de advertencia o declaraciones de información respecto a intolerancia en los productos que la usan y no promueve la formación de caries dentales (Hernán 2008).

2.1.14. INFUSIÓN DE FILTRANTES DE HIERBAS

El arte de la preparación de infusiones tiene una tradición de miles de años. Cada cultura fue perfeccionando el método de elaboración de sus bebidas típicas, para obtener el mejor sabor y los aromas más seductores. El secreto para alcanzar el punto óptimo es conocer la temperatura adecuada del agua y su tiempo de cocción (Díaz 2006).

- Para preparar exquisitos tés verdes la temperatura ideal del agua debe ser de: 60-65 °C. El tiempo de infusión: 1-1½ minutos.
- Para confeccionar té negro se recomienda una temperatura del agua de 95 °C y un tiempo de infusión de 4-6 minutos.
- En el caso del té blanco, lo mejor sería conseguir una temperatura del agua de 80-85 °C. El tiempo de infusión recomendado debería ser de 4-6 minutos.
- Para preparar té verde tostado la temperatura del agua debe ser de 70-75 °C y el tiempo de infusión aproximado debe ser de 2-3 minutos.

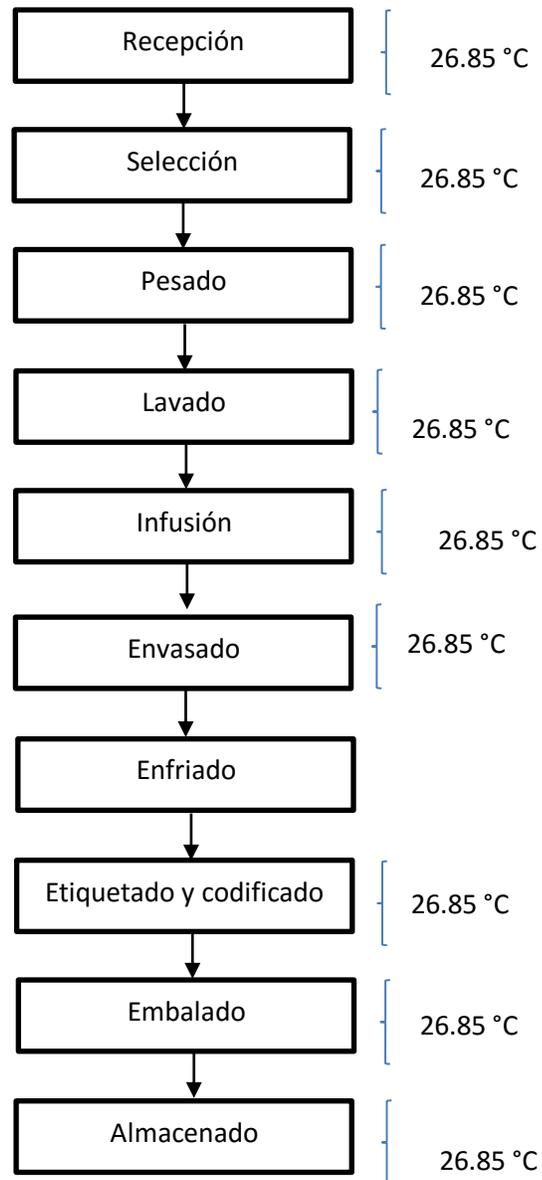


Figura 7: Diagrama de flujo general para la elaboración de la bebida hortacha embotellada.

Fuente. (Marcillo y Naranjo, 2012)

1. Recepción: Se realizará la recepción de todas las materias primas, el azúcar y el ácido cítrico serán almacenados, en una bodega, mientras

que las hierbas pasarán a la siguiente etapa, la recepción de las hierbas será diaria.

2. Selección y acondicionamiento: tiene como objetivo eliminar las hierbas que no se encuentren en óptimas condiciones, además de acondicionar las plantas cortando tallos retirando, piedras u objetos extraños. Esta etapa se realizará en mesas de acero inoxidable.
3. Formulación o pesado: Consiste en pesar cada uno de los ingredientes de acuerdo a la fórmula propuesta.
4. Lavado: el lavado se ejecutará en tinas cilíndricas en las cuales las hierbas ingresarán mediante unas canastillas con perforaciones. El agua en esta etapa será tratada con cloro con el fin de reducir la carga microbiana.
5. Infusión: el agua para esta etapa previamente pasará por un filtro pulidor. Se llevará la infusión hasta aproximadamente 80°C. el líquido circulará tantas veces como sea necesario dentro de un tanque donde se encontrarán las hierbas. En el mismo tanque se realizará el mezclado de los demás ingredientes.
6. Envasado: el envasado se realizará en una máquina llenadora, de la cual acera el líquido por gravedad. El llenado tiene que ser a mínimo 70°C.
7. Enfriado: se enfriarán en unas bandas transportadoras con aspersion de agua para que disminuya la temperatura a 45°C aproximadamente.
8. Etiquetado y codificado: máquina etiquetadora manual y se colocará lote y fechas respectivas con la codificadora.
9. Embalado: se colocará en plásticos termo contraíbles.

10. Almacenado: se almacenará en una bodega a temperatura ambiente.

(Marcillo y Naranjo, 2012)

2.2 Antecedentes del estudio

- a. Molina (2006), en su trabajo de investigación titulado “OBTENCIÓN DE UN FILTRANTE DE ANÍS DE MONTE (*Tagetes filifolia lag.*) EDULCORADO CON HOJAS DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana bertonii*)”. Demostró que empleando 80 a 85% hojas + flores de anís de monte y 15 a 20% de hojas de estevia se obtiene un filtrante edulcorado con adecuadas características organolépticas. Concluyendo lo siguiente:
- El empleo de 80 a 85% de hojas + flores de anís de monte y 15 a 20% de hojas de estevia fueron las formulaciones apropiadas para obtener un filtrante de anís de monte edulcorado con hojas de estevia con un adecuado grado de aceptabilidad.
 - Los filtrantes elaborados con tallos de anís de monte, mostraron un color amarillo; asimismo, se registró mayores valores de tiempo de infusión (180 segundos) y menores valores en las calificaciones de sabor por parte de los panelistas (5: bueno).
 - La perspectiva futura del producto es emprender una MYPE direccionada al campo de los filtrantes; pues este trabajo es una base para seguir estableciendo formulaciones con nuevas plantas aromáticas nativas con cualidades sensoriales y beneficios funcionales, esto debido a que la región Amazonas es proveedora de un sinnúmero de hierbas con propiedades funcionales aún sin estudiar; además, fomentar la alimentación saludable, disminuyendo el consumo excesivo de azúcares convencionales.

b. Vargas (2012), en su trabajo de investigación titulado “ELABORACIÓN DE TÉ AROMÁTICO A BASE DE PLANTAS CEDRÓN (*Aloysiacitrodora*) Y TORONJIL (*Mellisaofficinalis*) PROCESADO CON STEVIA (*Stevia rebaudiana bertonii*) ENDULZANTE NATURAL, UTILIZANDO EL MÉTODO DE DESHIDRATACIÓN”. Demostró que las mejores concentraciones de plantas aromáticas para la elaboración del té fueron: 10g de cedrón, 7g de toronjil y 3g de stevia las mismas que se utilizaron para la catación y para la elaboración del producto final. Concluyendo lo siguiente:

- Las características físicas y organolépticas de las plantas aromáticas (cedrón, toronjil y stevia) son muy importantes para la elaboración del té, puesto que de esto depende la duración del producto final.
- Las características físico – químicas se realizaron con el fin de determinar las propiedades de los tratamientos seleccionados con respecto a esto el T₂ fue el de mejores características, seguido por el T₃, se determinó que los 13 °Brix del T₂ es el más alto y esto ayuda a que el té aromático tenga buena aceptabilidad por el consumidor.
- Los análisis microbiológicos demostraron que los dos mejores tratamientos estaban dentro de los márgenes normales los mismos que establecen coliformes totales y mohos en los rangos permitidos por las normas INEN.

c. Olivares (2014), en su trabajo de investigación titulado “CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Averrhoa carambola* L. (CARAMBOLA)”. se evaluaron sus propiedades mediante reacciones con el radical libre estable DPPH*, el TPTZ-Fe+3 y su capacidad para reducir el ferricianuro de potasio. Concluyendo lo siguiente:

- El radical libre estable DPPH*. El IC₅₀ (Concentración Inhibitoria del extracto que logra atrapar el 50% de los radicales libres DPPH* de la solución preparada a 0.5 mM), es igual a 3.75 mg/mL para el fruto y 2.91

mg/mL para la hoja de carambola, es decir, la hoja tiene una mejor capacidad antioxidante frente al radical libre estable DPPH*.

- Utilizando la técnica FRAP, se observa que el fruto de Averrhoa carambola L. (carambola) muestra un valor FRAP de 1.288 mmoles de Fe+2/100 gramos de fruto fresco, mientras que la hoja muestra un valor FRAP igual a 1.618 mmoles de Fe+2/100 gramos de hoja fresca, mostrando una alta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.000$) con un $\alpha < 0.001$

a. HIPÓTESIS

2.3.1 Hipótesis general

Si estudiamos la actividad antioxidante de la bebida funcional obtenido con diferentes tiempos de infusión de hojas de alfalfa (*medicago sativa*) secados a diferentes temperaturas, entonces obtendremos una bebida funcional a partir de las hojas de alfalfa, con características organoléptica aceptables en el mercado.

2.3.2 Hipótesis específicas

- Si determinamos la temperatura adecuada para el secado de las hojas de alfalfa para la obtención de una bebida funcional con la mejor actividad de antioxidantes entonces obtendremos hojas secas en óptimas condiciones
- Si determinamos el tiempo óptimo de infusión para el mejor aprovechamiento de la actividad antioxidante del filtrante de hojas secas de alfalfa entonces adquiriremos un filtrante de alfalfa con alta capacidad de antioxidante.
- Si evaluamos las características físico-químicos de la bebida funcional obtenida con el tiempo adecuado de infusión del filtrante de alfalfa

entonces obtendremos un producto que será aceptado satisfactoriamente por el consumidor.

- Si realizamos la evaluación sensorial de la bebida funcional obtenida con el tiempo adecuado de infusión del filtrante de alfalfa obtendremos un producto que será aceptado satisfactoriamente por el consumidor.

2.4. VARIABLES

2.4.1 Independiente

X_1 = Temperaturas

X_{11} : 40°C

X_{12} : 50°C

X_{13} : 60°C

X_2 = Tiempos

X_{21} : 1 minuto

X_{22} : 2 minutos

X_{23} : 3 minutos

2.4.2 Dependiente

Y_1 = Características físicas del tratamiento mejor aceptado sensorialmente.

$Y_{1,1}$ = Ph

$Y_{1,2}$ = Ceniza

$Y_{1,3}$ = Grados Brix

$Y_{1,4}$ = Acidez titulable

$Y_{1,5}$ = Proteínas

$Y_{1,6}$ = Carbohidratos

$Y_{1,7}$ = C50

Y_2 = Bebida funcionas con buena evaluación sensorial

$Y_{2,1}$ = Color

$Y_{2,2}$ = Olor

$Y_{2,3}$ = Sabor

2.4.3. Operacionalización de variables

En el siguiente cuadro se muestra la operacionalización de las variables en estudio.

Cuadro 5. Operacionalización de variables.

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
Independiente:		
X_1 = Temperaturas de secado de las hojas de alfalfa.	Parámetros	T°: X_{11} : 40°C X_{12} : 50°C X_{13} : 60°C
		t: X_{21} : 1 minuto X_{22} : 2 minutos X_{23} : 3 minutos
X_2 = Tiempos de infusión		
Dependiente:		
Y_1 = Características físicas - químicas de la bebida funcional a partir de las hojas de alfalfa.	Físico-químico	- C50 - Ph - Ceniza - Grados Brix - Acidez titulable - Proteínas - Carbohidratos
		Y_2 = Bebida funcional con buena característica organoleptica

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

De acuerdo a la naturaleza del estudio, la investigación es de tipo Aplicada (Zorrilla 2006).

3.1.2. Nivel de investigación

Es experimental, porque intencionalmente se manipuló las variables independientes: Tiempo de secado de las hojas de alfalfa y tiempo de infusión del filtrante.

3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en la planta de productos alimentarios, en el laboratorio de operaciones unitarias, laboratorio de bromatología pertenecientes a la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Hermilio Valdizan, y las pruebas fisicoquímicas de la materia prima y del producto final se realizaron en el laboratorio de de Bio Vital y la evaluación sensorial de la EAP de Ingeniería Agroindustrial., durante el periodo comprendido entre los meses de julio del 2015 hasta marzo del 2016.

3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

Población.

La población que se estudió estuvo constituida por 150 kg las hojas secas de alfalfa frescas procedentes del distrito de Santa María Del Valle.

Muestra.

La muestra para evaluar la capacidad antioxidante de la bebida funcional a partir de las hojas alfalfa secado con diferentes temperaturas fue de 100 g y estuvo constituido por 3 tratamientos con 3 repeticiones, los tratamientos

serán con concentraciones de 30, 100 y 1000 microgramos por cada ml de agua apta para la infusión.

Unidad de análisis.

Filtrante a partir de las hojas secas de alfalfa

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

3.4.1. Para determinar la temperatura adecuada de secado de las hojas de alfalfa.

En los tratamientos de estudio que se muestra en el cuadro 5, se evaluó la temperatura óptima de secado de las hojas de alfalfa para obtener un filtrante, las temperatura fueron 40 °C por 2 horas, 50°C por 1 hora y 50 minutos y 60°C por 1 hora con 20 minutos.

Cuadro 6. Tratamientos para determinar la temperatura óptima de secado de hojas de alfalfa

Tratamientos	Temperatura
T ₁	40°C
T ₂	50°C
T ₃	60°C

Se realizó cada tratamiento a una humedad constante del 6%.

3.4.2. Para determinar el tiempo óptimo de infusión del filtrante obtenido a partir de las hojas secas de alfalfa.

En los tratamientos de estudio que se muestra en el cuadro 5 se evaluó el tiempo óptimo de infusión del filtrante obtenido a partir de la infusión acuosa a temperatura de 60 °C.

Cuadro 7. Tratamientos para determinar el tiempo óptimo de infusión del filtrante obtenido a partir de las hojas secas de alfalfa.

Tratamientos	Tiempo
T ₁	1 minutos
T ₂	2 minutos
T ₃	3 minutos

Se realizó cada tratamiento a una temperatura constante de 60°C.

3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS

3.5.1. Para determinar la temperatura adecuada de secado de las hojas de alfalfa.

Hipótesis nula

H₀: Con las diferentes temperaturas de secado de las hojas de alfalfa se obtienen igual actividad antioxidante.

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 0$$

Hipótesis de investigación

H₁: Al menos una de las temperaturas de secado de las hojas de alfalfa se otorga diferente actividad antioxidante.

$$H_1: \text{Al menos un } \tau_i \neq 0$$

3.5.2. Para determinar el tiempo óptimo de infusión del filtrante obtenido a partir de las hojas secas de alfalfa.

a. Actividad antioxidante

Hipótesis nula

H₀: Los diferentes tiempos de infusión del filtrante a partir de las hojas secas de alfalfa otorgan la misma actividad antioxidante en la bebida funcional.

H₀: $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 0$

Hipótesis de investigación.

H₁: Al menos uno de los tiempos de infusión del filtrante a partir de las hojas secas de alfalfa otorga diferente actividad antioxidante en la bebida funcional.

H₁: Al menos un $t_i \neq 0$

b. Evaluación sensorial

Hipótesis nula.

H₀: Los diferentes tiempos de infusión del filtrante a partir de las hojas secas de alfalfa otorgan la misma aceptación en los panelistas.

H₀: $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 0$

Hipótesis de investigación.

H₁: Al menos uno de los tiempos de infusión del filtrante a partir de las hojas secas de alfalfa otorga diferente aceptación en los panelistas.

H₁: Al menos un $t_i \neq 0$

3.5.3 Diseño de la investigación.

a. Para determinar el secado adecuado de las hojas de alfalfa.

El diseño experimental a utilizar para determinar el secado óptimo de las hojas de alfalfa y el tiempo óptimo de infusión del filtrante será el diseño completamente al azar (DCA), con 3 tratamientos y 3 repeticiones.

Las técnicas estadísticas utilizados fueron:

Para la prueba de hipótesis el Análisis de Varianza (ANVA) a un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

Para la comparación de promedios de los tratamientos se utilizó la Prueba de TUKEY a un nivel de significación del 5%.

El modelo aditivo lineal de un DCA es:

$$b. Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Contenido de (sólidos solubles, pH, acidez titulable, carbohidrato, proteínas, manganeso, antioxidantes) observada en la j - ésima repetición del i - ésimo tratamiento.

μ : Medida general

T_i : Efecto de i - ésimo tratamiento (dosis y velocidad de agitación).

E_{ij} : Error experimental.

Cuadro 7. Esquema de análisis de varianza para el DCA

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad
Tratamiento	(t-1)
Error Experimental	t (r - 1)
Total	rt - 1

Fuente: Steell y Torrie (2007)

También se hizo el uso del método del 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH), donde los resultados fueron expresados en términos de IC50 en el programa de MICROSOFT EXCEL.

Se determinó mediante un análisis de regresión de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH (Brand 1995).

El porcentaje de remanente del radical DPPH fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ INH DPPH} = \left[\frac{(\text{DPPH})_i - (\text{DPPH})_f}{(\text{DPPH})_i} \right] * 100$$

Donde (DPPH)_f es la absorbancia del radical DPPH al final de la reacción, (DPPH)_i es la absorbancia del radical al inicio de la reacción.

El valor de IC₅₀, se obtendrá, reemplazando 50 en el eje de Y, en la ecuación que se obtenga al final de procesar los datos ($Y = ax + b$).

También se usó el método estadístico ANOVA de la prueba Tukey con el programa estadístico SPSS.

b. Para el estudio de las características organolépticas de bebida funcional a base de hojas alfalfa.

Para la evaluación sensorial se trabajó con la prueba no paramétrica de Friedman a un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y su correspondiente prueba de clasificación de tratamientos (Anzaldua 2004).

El procedimiento de la prueba de Friedman se resume de la siguiente manera:

Suma de los rangos de cada condición (tratamiento).

$$R_t = \sum_{j=1}^b R_{ij}$$

Cálculo del estadístico de la prueba (T_2).

$$A_2 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^b R_{ij}^2$$

$$B_2 = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^k Ri^2$$

$$T_2 = \frac{(n-1) \left[B_2 - \left(\frac{bk(k+1)^2}{4} \right) \right]}{A_2 - B_2}$$

$$T_2 = \frac{(k-1) \left[bB - \left(\frac{b^2k(k+1)^2}{4} \right) \right]}{A_2 - \frac{bk(k+1)^2}{4}}$$

Cuando la hipótesis nula es rechazada, la prueba de Friedman presenta un procedimiento para comparar a los tratamientos por pares. Se dirá que los tratamientos i y j difieren significativamente si satisfacen la siguiente desigualdad

$$t_{(1-\frac{\alpha}{2}), ((b-1)(k-1))} \sqrt{\frac{2b(A_2 - B_2)}{(b-1)(k-1)}}$$

Para las múltiples comparaciones los criterios de decisión son:

$$|R_i - R_j| > F \quad \text{se rechaza la } H_0$$

$$|R_i - R_j| \leq F \quad \text{se acepta la } H_0$$

El diseño experimental obedece y se ajusta a la prueba estadística no paramétrica de FRIEDMAN. Para evaluar los resultados de acuerdo a la prueba de Friedman se utilizó el software SPSS.

3.5.4. Datos a registrar.

En la investigación se registraron los siguientes datos: en la caracterización de las hojas de alfalfa todos los análisis fisicoquímicos (humedad, acidez

titulable, antioxidantes, proteína, carbohidrato, pH). También la caracterización organoléptica de la bebida funcional. Y de la misma forma se registraron los análisis de la caracterización fisicoquímica del mejor tratamiento.

3.5.5. Técnicas instrumentos de recolección y procesamiento de la información.

a. Técnicas de investigación documental o bibliográfica

- ❖ **Análisis documental:** Nos permitió el análisis del material a estudiar y precisarlo desde un punto de vista formal y luego desde su contenido.
- ❖ **Análisis de contenido:** Se estudió y analizó de una manera objetiva y sistemática el documento leído.
- ❖ **Fichaje:** Se usó para construir el marco teórico y la bibliografía de dicho proyecto de investigación.

b. Técnicas de campo

- ❖ **Observación:** Nos permitió recolectar los datos directamente del proceso para la obtención del filtrante a partir de hojas secas de alfalfa y las evaluaciones organolépticas y fisicoquímicas.
- ❖ **Instrumento de investigación documental:** Se utilizó lo siguiente:
 - **Fichas de investigación o documentación:** Comentario, resumen y combinadas.
 - **Fichas de registro o localización:** Bibliográficas, Hemerografías e internet.
- ❖ **Instrumento de recolección de información en laboratorio:** Libreta de apuntes (laboratorio), cámara fotográfica.
- ❖ **Procesamiento y presentación de los resultados:** Los datos obtenidos serán ordenados y procesados por una computadora utilizando el software Microsoft Office con sus hojas: de texto Word y cálculos Excel. De acuerdo al diseño de investigación propuesto la presentación de los resultados será en cuadros, tablas, gráficos según corresponda; y para el procesamiento de los datos estadísticos se utilizará el software estadístico SPSS 19.

3.6. MATERIALES Y EQUIPOS

3.6.1. Materiales de proceso

Envases de vidrio de 300 ml, Bandejas, jarras de ½ y 1 litro, cucharones, vasos descartables, cocina semi industrial de 2 hornillas, ollas de 10 y 15 litros y gas

3.6.2. Materiales de laboratorio

Vasos de precipitado de 200 ml, tubos de ensayo, pipetas de 10 ml, micro pipeta y tips, gradillas, papel filtrante (fundas de polietileno–polipropileno), botellas de vidrio con tapa rosca, embudos, espátula, termómetro y equipo de titulación.

3.6.3. Materiales de escritorio y otros

Libreta de apuntes, Lapiceros, tajador, resaltador, memoria USB, corrector, Lápices de carbón 2B, 4 millares de papel bond A4 de 80 gramos, ½ millar de papel bulky y Cámara fotográfica digital, cocina eléctrica, micropipeta de 10 µL a 100 µL y micropipeta de 100 µL a 1000 µL.

3.6.4. Equipos.

- Equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) modelo LC-10AVP (Shimadzu Scientific, MD, USA.). Equipado con: Desgasificador modelo FCV – 10AL VP, Bomba modelo LC – 10ATVP, Columna cromatográfica C18-110R Gemini, Horno de columna modelo CTO – 10ASVP, Detector UV-VIS modelo SPD – 10AVVP, Controlador Modelo SCL – 10AVP, Software de interfase CLASS – VP, Computadora compatible USB – 52X.
- Espectrofotómetro UV/VIS Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation)
- Centrífuga modelo MIKRO R22 (Hettich Zentrifuge)
- Estufa: Marca Mermet Universal®, modelo TV-90, Alemania.
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven)
- Mufla. (Marca: FUMANCE 1300)

- Refractómetro: Abbe®; Bleeker, 0-100% de sacarosa. Holanda.
- Potenciometro Crison®, pHmeter digit 505.
- Balanza analítica: modelo AE 163 (METTER TOLEDO, Switzerland) Mettler® Cap. 160 g exactited 0,001 g.
- Desionizador: Hidropure, pesa 12 kgs, capacidad de trabajo antes de cambiar de cartuchos de 2400 litros uso ergonómico ya se puede colgar en la pared en un rincón.
- Refrigeradora: Modelo 51 – 03B cuenta con dos compresores de 1/3 HP con un amperaje de 5.5 unida eléctrica a 110v compresor monofásico, temperatura promedio de conservación +5 °c y de congelación 10oc a -12 °c y cuenta con cuerpo y puerta aisladas con 100% ´poliuretano inyectado
- Vortex - Homogenizador de soluciones VORTEX
- Secadora de lecho fluidizado SLF-150 (NOVA.S.A.)
- Molino de martillos 30-35 MMJ (NOVA.S.A.)

3.6.5. Reactivos

Metanol; Alcohol; sigma chemical; hidróxido de sodio (NaOH), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), fenolftaleína, ácido acético, etanol y otros considerados en la metodología de análisis.

3.6.6. Materia prima

Se utilizará como materia prima las hojas de alfalfa

3.6.7. Insumos

Ácido Cítrico

Sorbato de potasio

3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

El presente trabajo de investigación, estará enfocado en la determinación de la temperatura adecuada del secado de las hojas de alfalfa y el tiempo de óptimo de infusión para la obtención de una bebida funcional al cual se evaluó su característica organoléptica y fisicoquímica como se muestra en la figura 7.

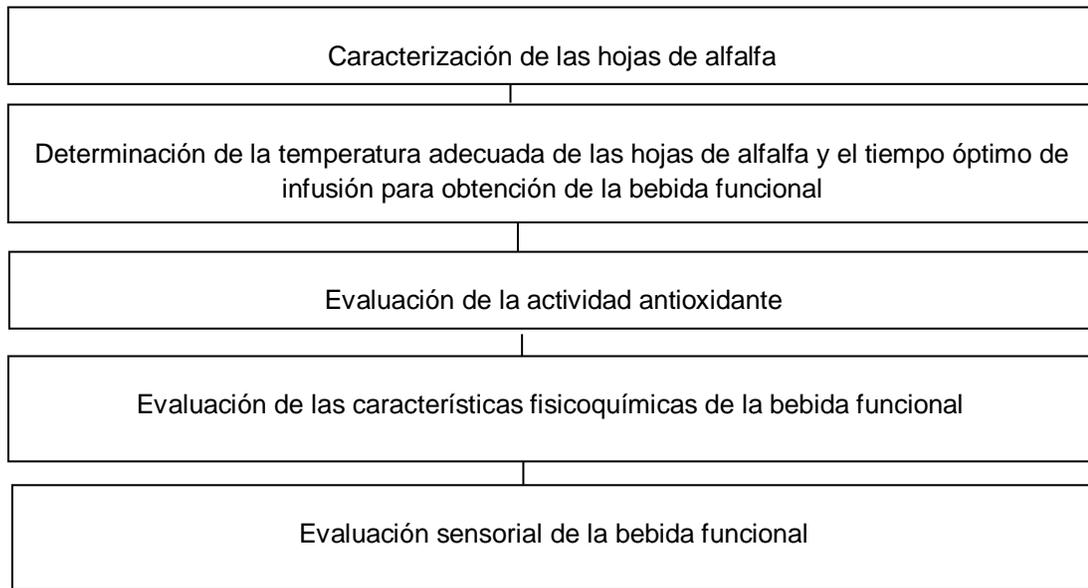


Figura 7. Esquema experimental para la conducción del trabajo de investigación

3.7.1. Caracterización fisicoquímica de las hojas de alfalfa

A. Determinación Biométrica.

Se tomaron las medidas biométricas de las hojas de alfalfa que comprendió en la determinación de: peso, longitud y diámetro de la hoja el cual se efectuó con una balanza analítica, pie de rey, cinta métrica.

B. Determinación Físico - Químico.

Se realizaran los siguientes análisis fisicoquímicos.

- **pH:** método de potenciometría (AOAC 2001).
- **Sólidos solubles:** por refractómetro (AOAC 2001).
- **Cenizas totales:** por incineración directa, con el método gravimétrico (AOAC 2001).
- **Humedad:** por diferencia (AOAC 2001).

3.7.2. Determinación de la temperatura adecuada de las hojas de alfalfa y el tiempo óptimo de infusión para obtención de la bebida funcional.

3.7.2.1. Procedimiento para la obtención de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa seca.

A continuación se presenta el flujograma para el proceso de obtención de la bebida funcional a partir de la alfalfa.

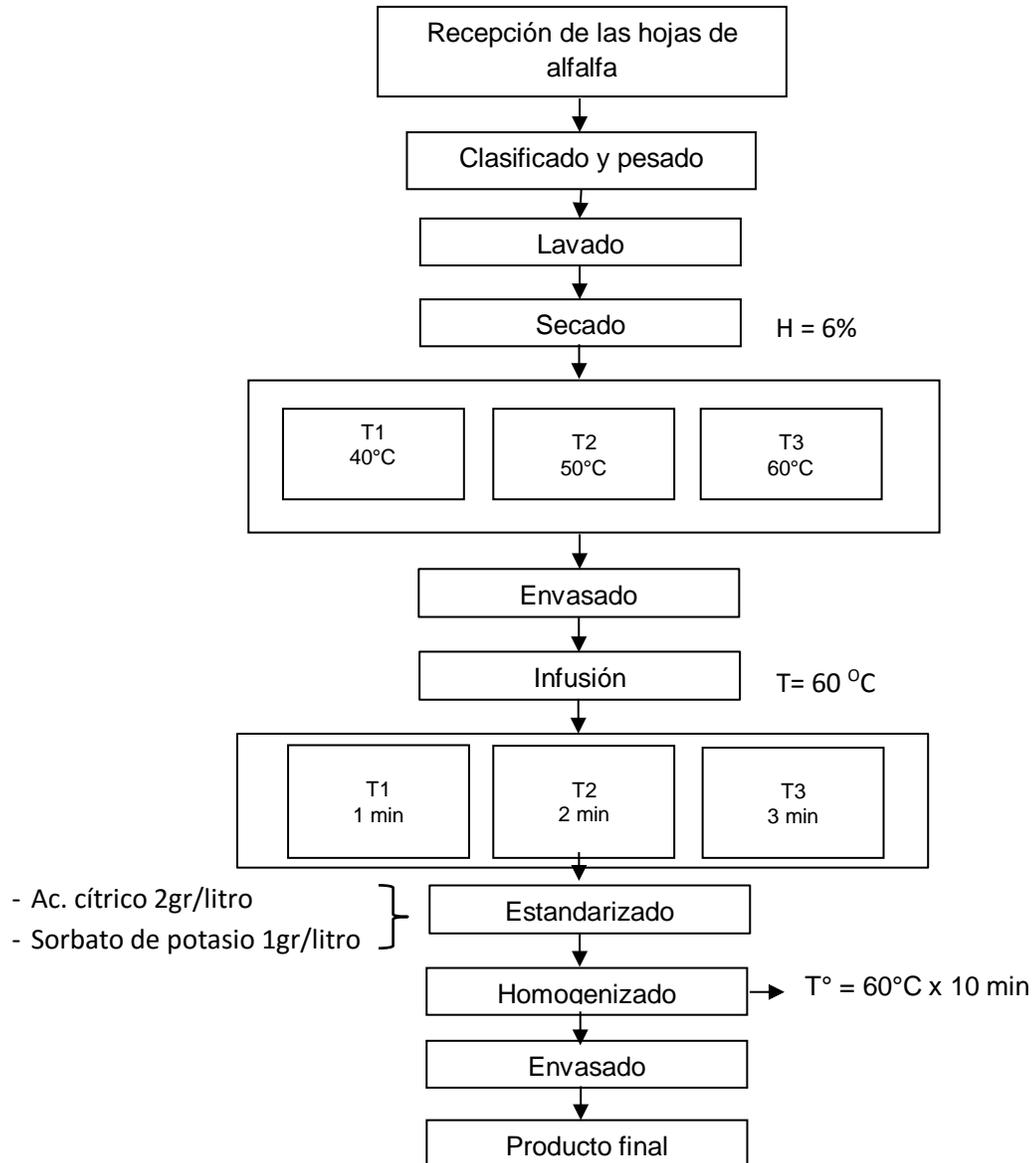


Figura 8. Flujograma para la elaboración de la bebida funcional a partir de hojas secas de alfalfa

Recepción de las hojas de alfalfa: en esta operación se recepcionará las hojas de alfalfa cumpliendo los requisitos de calidad.

Clasificado y pesado: En esta etapa le sacamos ramas, eliminamos las hojas picadas de insectos, en mal estado. Tomamos el peso inicial para después tomar el peso final cuando las hojas estén secas.

Lavado: Las hojas de alfalfa se lavarán con abundante agua para eliminar la tierra adherida a la superficie y otros residuos indeseables presentes. La desinfección se realizó con una solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm para eliminar todo el resto de microorganismos que estén adheridos a la muestra.

Secado: En esta operación se realizó el secado de cada tratamiento en estudio de las hojas de alfalfa: T₁ a 40°C y 6% de humedad; T₂ a 50°C y 6% de humedad y T₃ a 60°C y 6% de humedad.

Envasado de hojas secas: Después del secado los productos tienen que ser envasados rápidamente, para que no vuelvan a humedecerse por la humedad ambiental. Para el efecto se pueden utilizar recipientes de plásticos, cajas o latas herméticas de metal o bolsas de polipropileno.

Infusión: En esta operación se realizó la infusión y se evaluó el tiempo en cada tratamiento en estudio de las hojas secas de alfalfa: T₁, 1 min con temperatura de 60°C; T₂, 2 min con temperatura de 60°C y T₃, 3 min con temperatura de 60°C.

Estandarizado: En esta operación se realizó el estandarizado al mejor tratamiento obtenido ajustando el pH y el °Brix de acuerdo a las normas técnicas.

Homogenizado: La bebida funcional será homogenizada a una temperatura de 60°C durante 10 minutos.

Envasado final: La bebida nutricional de será envasado en envases de vidrio para su análisis organoléptico.

3.7.3. Evaluación de la actividad de antioxidantes

Se determinó mediante el método del 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH) de tal manera para poder determinar la temperatura adecuada de las hojas de alfalfa y el tiempo óptimo de infusión que conserva la mayor cantidad de antioxidantes. El procedimiento que realizamos fue lo siguiente:

- Preparación de soluciones de trabajo. Se preparó las siguientes soluciones:
 - o 100 mL de 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (100 μ M) en metanol
 - o Soluciones de trabajo de filtrante de hojas de alfalfa secas que fueron secados a temperatura 40°C, 50°C, 60°C y cada filtrante se sometió en agua que se encontraba a una temperatura de 60°C por 1 minuto, 2 minutos y 3 minutos a concentraciones de 30, 100, 1000 μ g/mL, con un factor de dilución de 10 (FD: 10)
- Se hizo reaccionar 100 μ L de muestra con 900 μ L de DPPH (100 μ M), la absorbancia será registrada a 517 nm, a intervalos de 30 segundos durante 90 segundos. Para la determinación de la actividad antioxidante, los resultados serán expresados en términos de IC50.
- Coeficiente de inhibición (IC50)

Se determinó mediante un análisis de regresión de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH.

3.7.4. Evaluación sensorial de la bebida funcional

La evaluación organoléptica de las muestras se realizó con un panel de degustadores semi-entrenados compuesto de 15 personas. Se evaluó diferentes atributos como el sabor, aroma y color característicos; para ello utilizaremos el método de análisis comparativo con escalas hedónicas de 1 a 7 puntos, establecido por Anzaldúa (2004).

Los panelistas juzgarán su “nivel de agrado” para el atributo sabor, aroma y color utilizando la escala hedónica. El panel de catadores, estará

conformado por estudiantes de la EAP Ingeniería Agroindustrial, de ambos sexos de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán.

Cuadro 8. Escala hedónica para la determinación de los atributos (sabor, olor y color).

Valor	Sabor	Aroma	Color
7	Excelentemente agradable	Excelentemente agradable	Excelente
6	Muy agradable	Muy agradable	Muy bueno
5	Agradable	Agradable	Bueno
4	Indiferente	Indiferente	Regular
3	Desagradable	Desagradable	Malo
2	Muy desagradable	Muy desagradable	Muy malo
1	Pésimamente desagradable	Pésimamente desagradable	Pésimo

Fuente: Anzaldúa y Morales (2006).

3.7.5. Caracterización fisicoquímica de la bebida funcional a partir de las hojas secas de alfalfa

Se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos.

- **Proteínas:** Por el método de Kjeldahl. (AOAC 2001).
- **Acidez titulable:** por el método de titulación. (AOAC 2001).
- **Carbohidratos:** Por diferencia (AOAC 2001).
- **Grasa:** por el método de Soxhlet (AOAC 2001).
- **Humedad:** por el método gravimétrico (AOAC 2001).
- **pH:** método de potenciometría (AOAC 2001).
- **Sólidos solubles:** por refractómetro (AOAC 2001).
- **Antioxidantes:** por el método del ABTS (AOAC 2001).
- **Cenizas totales:** por incineración directa, con el método gravimétrico (AOAC 2001).

IV. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACION DE LAS HOJAS DE ALFALFA

4.1.1 Determinación Biométrica.

Los resultados de las determinaciones de: peso, largo y ancho de la hoja de alfalfa se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados de las determinaciones biométricas.

PESO PROMEDIO (g)	LARGO (cm)	ANCHO DE LA HOJA DE ALFALFA (cm)
0.0695	3.5	1.8

4.1.2 Determinación Físico - Químico.

Se realizó la determinación de: humedad y cenizas por el método AOAC. Para determinar las cenizas totales pesamos 2gr de hoja de alfalfa en un crisol que fue colocada en una mufla por un tiempo de 8 horas. Los resultados se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la determinación físico – químico en 100 gr de alfalfa

HUMEDAD (%)	CENIZAS TOTALES (%)
94.4	5.6

4.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ADECUADA DE LAS HOJAS DE ALFALFA Y EL TIEMPO ÓPTIMO DE INFUSIÓN PARA OBTENCIÓN DE LA BEBIDA FUNCIONAL MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES.

4.2.1. Temperatura optima de secado.

Se secó las hojas de alfalfa en la secadora perteneciente al laboratorio de operaciones unitarias a una humedad de 6% a temperaturas de 40 °C, 50°C Y 60°C con promedios de tiempo de secado 2 horas, 1 hora con 50 minutos y 1 hora con 20 minutos respectivamente

Se utilizó la prueba de hipótesis el Análisis de Varianza (ANVA) a un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Para la comparación de promedios de los tratamientos se utilizó la Prueba de TUKEY a un nivel de significación del 5%.

Cuadro 11. Resultados del porcentaje de efectividad de antioxidantes con diferentes temperaturas.

TIEMPO DE SECADO	TEMPERATURA	% EFECTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES
2 horas	40 °C	38.863
		41.293
		41.541
1 hora con 50 minutos	50 °C	38.804
		38.656
		41.476
1 hora con 20 minutos	60°C	29.506
		29.342
		29.970

Se determinó los porcentajes de efectividad de las temperaturas de 40°C, 50°C y 60°C, mediante el método de DPPH y los resultados obtenidos se muestra en el cuadro 11.

Cuadro 12. Resultados estadístico por el método de ANOVA de la actividad antioxidante

ANOVA					
Actividad antioxidante					
	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	221,750	2	110,875	69,084	,000
Dentro de los grupos	9,630	6	1,605		
Total	231,379	8			

En el cuadro 12 se observa que el nivel de significancia es menor de 0,05 por lo tanto podemos deducir que hay diferencia significativa, la efectividad de antioxidantes es diferente en cada temperatura.

Cuadro 13. Determinación de la mejor temperatura de secado por el método estadístico TUKEY.

Actividad antioxidante			
Tukey HSD			
Temperatura de secado	N	Subconjunto de alfa = 0,05	
		1	2
40°C	40,5657	a	
50°C	39,6453	a	
60°C	29,6060		b

Medios para se muestran grupos en subconjuntos homogéneos.

Mediante este método se pudo determinar que la mejor temperatura que posee mayor cantidad de actividad antioxidante es la temperatura de 40°C con porcentaje de efectividad de 40,565 % de efectividad, lo cual se muestra en el cuadro 13.

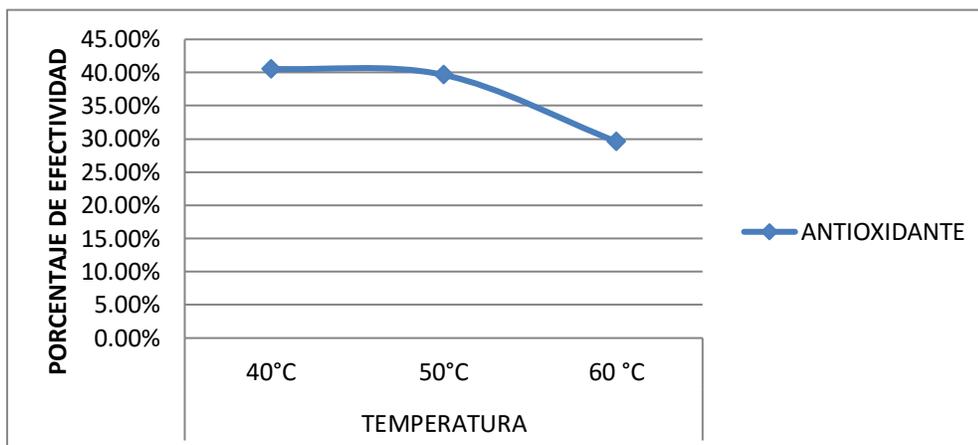


Figura 9. Porcentaje de efectividad de las hojas de alfalfa secado a diferentes temperaturas.

Se observa que el porcentaje de efectividad de las hojas de alfalfa secadas a temperatura de 40°C, 50°C y 60°C es 40.57%, 39.65% y 29.61%, resultando que las hojas secadas a temperatura 40°C tiene el mejor porcentaje de efectividad pero elegimos la temperatura de 50°C la mejor temperatura para garantizar la efectividad de cantidad de antioxidantes.

4.2.2. Tiempo de infusión óptimo

Se procedió a triturar las hojas de alfalfa secadas a temperatura de 50°C, luego se sumergió los filtrantes obtenidos en el agua que se encontraba a una temperatura de 60°C teniendo como tiempo de estudio para la infusión 1, 2 y 3 minutos.

Se utilizó la prueba de hipótesis el Análisis de Varianza (ANVA) a un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

Para la comparación de promedios de los tratamientos se utilizó la Prueba de TUKEY a un nivel de significación del 5%.

Cuadro 14. Resultados del porcentaje de efectividad de antioxidantes con diferentes tiempos de infusión con la mejor temperatura de secado.

TEMPERATURA DEL AGUA	TIEMPO DE INFUSIÓN	% EFECTIVIDAD DE ANTIOXIDANTES
60°C	1 min	27,86
		28,80
		28,51
	2 min	41,29
		38,66
		41,34
	3 min	41,54
		41,48
		42,97

Se determinó los porcentajes de efectividad de los tiempos de infusión de 1 minuto, 2 minutos y 3 minutos, mediante el método de DPPH y los resultados obtenidos se muestra en el cuadro 14.

Cuadro 15. Resultados estadístico por el método de ANOVA de la actividad antioxidante de los diferentes tiempos de infusión.

ANOVA					
Actividad antioxidante					
	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Sig.
Entre grupos	332,483	2	166,241	150,848	,000
Dentro de los grupos	6,612	6	1,102		
Total	339,095	8			

En el cuadro 15 se observa que el nivel de significancia es menor de 0,05 por lo tanto podemos deducir que hay diferencia significativa en los tiempos de infusión.

Cuadro 16. Determinación del mejor tiempo de infusión por el método estadístico TUKEY.

Actividad antioxidante			
Tukey HSD			
Temperatura de secado	N	Subconjunto de alfa = 0,05	
		1	2
3min	41,9957	a	
2min	40,4303	a	
1min	28,3910		b

Mediante este método se pudo determinar que el mejor tiempo de infusión que contiene la mayor cantidad de actividad antioxidante es el tiempo de infusión de 3 minutos con porcentaje de efectividad de 41,996 % de efectividad, lo cual se muestra en el cuadro 16.

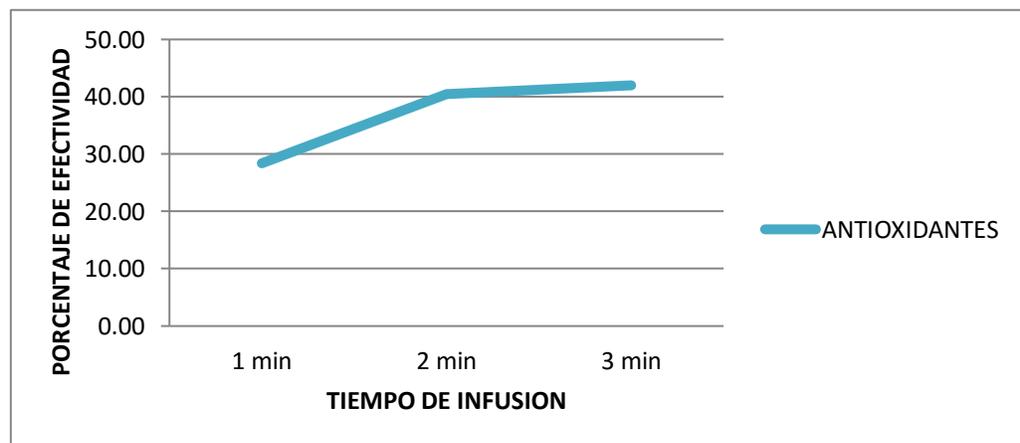


Figura 10. Porcentaje de efectividad del tiempo de infusión

Se observa que el porcentaje de efectividad del tiempo de infusión de 1 minuto, 2 minutos y 3 minutos es 28,39 %, 40,43% y 41,99%, resultando

que el tiempo de infusión de 3 minutos tiene el mejor porcentaje de efectividad, debido que las características sensoriales no agrada al consumidor el cual se evaluó en la evaluación sensorial que se realizó por ende se eligió que 2 minutos es el mejor tiempo de infusión.

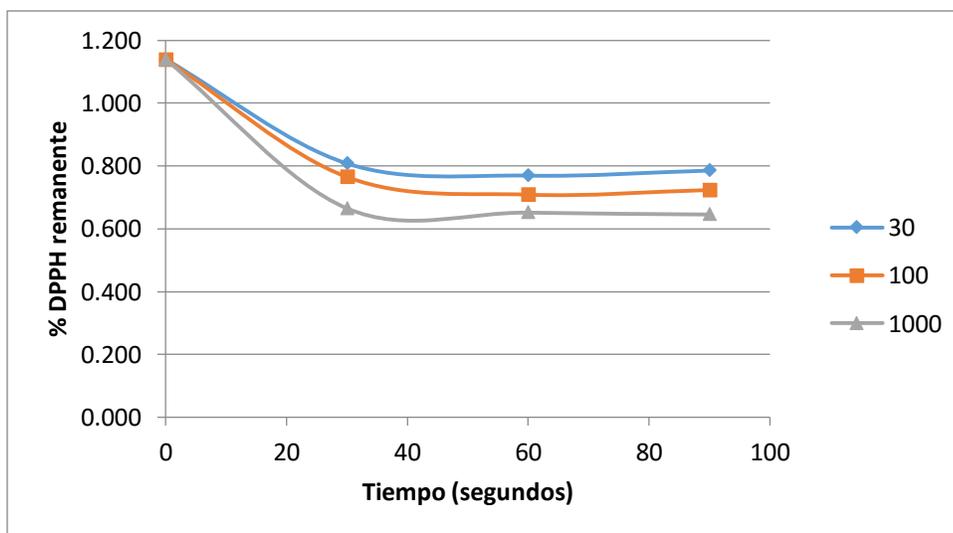
4.2.3. Actividad antioxidante.

Se realizó las soluciones de alfalfa a concentraciones de 30, 100, 1000 µg/mL, con un factor de dilución de 10 (FD: 10), se hizo reaccionar 100 de muestra con 900 µL de DPPH (100 µM), la absorbancia fue registrada a 517 nm, a intervalos de 30 segundos durante 1 minuto y 30 segundos en la figura 11,12 y 13 se muestra el porcentaje del DPPH remanente, porcentaje de inhibición y la cinética de inhibición.

Se determinó mediante un análisis de regresión de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH

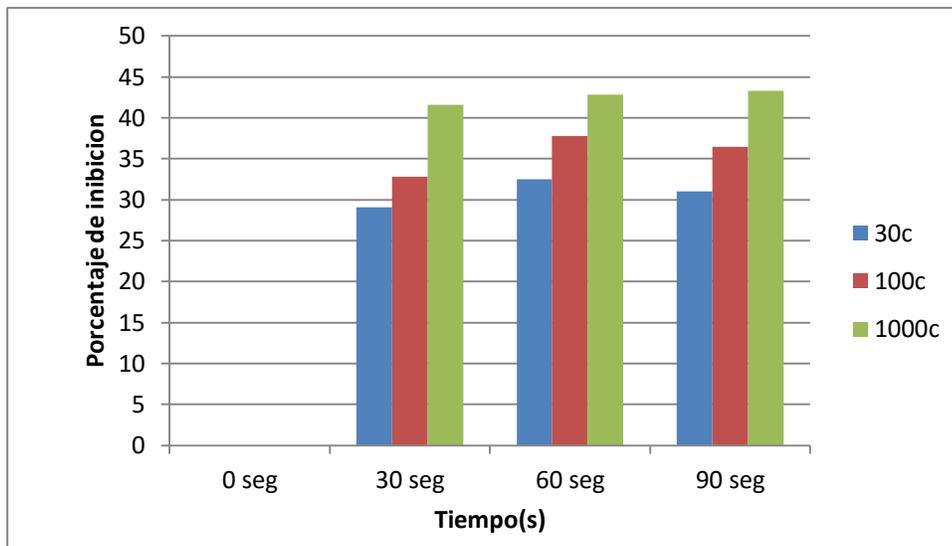
El porcentaje de remanente del radical DPPH fue calculado de la siguiente manera:

$$\%INH\ DPPH = \frac{((DPPH)_i - (DPPH)_f)}{(DPPH)_i} * 100$$



En la figura 11. Se muestra el porcentaje del DPPH remanente de las hojas de alfalfa.

Se muestra que el porcentaje de DPPH remanente de concentraciones de 30, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$ es 0.876 %, 0.834% y 0.775%, en el cual se observa que la concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$ tiene mejor porcentaje de remanencia.



En la figura 12. Se muestra el porcentaje de inhibición de las hojas de alfalfa.

El porcentaje de inhibición que se observa a concentraciones de 30, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$ es 23.152%, 26.772% y 31.936%, de las cuales tiene el mejor porcentaje la concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$.

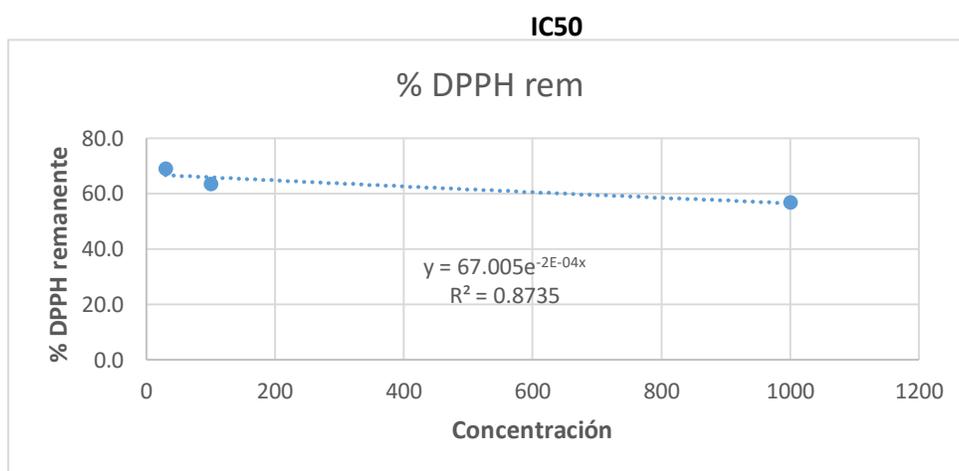


Figura 13. Cinética de inhibición del DPPH y línea de tendencia exponencial mostrando la ecuación de la curva y el r^2

La cinética de inhibición DPPH que se muestra en la figura 15 de concentraciones de 30, 100, 1000 µg/mL es 68.9%, 63.5% y 56.7%.

Para obtener la cantidad de alfalfa seca capaz de inhibir el 50% del radical DPPH procedimos de la siguiente manera utilizando los datos de la ecuación de la curva que se puede observar en la figura 15, haciendo uso del modelo matemático se calculó el coeficiente de extinción que se muestra en la siguiente ecuación:

$$X \text{ (ug/mL)} = \frac{\text{Ln} (67.005) - \text{Ln} (50)}{0.0004}$$

$$X \text{ (ug/mL)} = 731.8605951$$

4.2.4. Procedimiento para la obtención de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa seca.

A continuación se presenta el flujograma que se utilizó en el proceso de obtención de la bebida funcional a partir de la alfalfa.

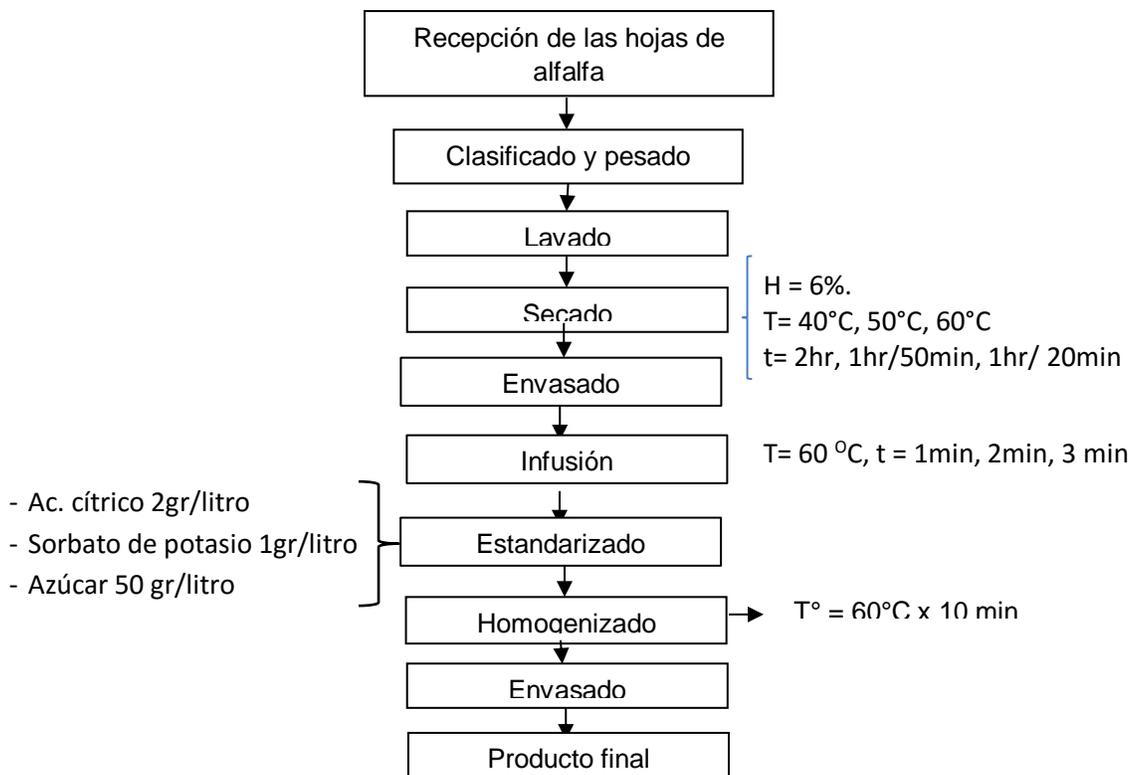


Figura 16. Flujograma para la elaboración de la bebida funcional a partir de hojas secas de alfalfa

Recepción de las hojas de alfalfa: En esta operación se recibió las hojas de alfalfa cumpliendo los requisitos de calidad.

Clasificado y pesado: En esta etapa deshojamos las hojas de alfalfa, eliminamos las hojas picadas de insectos, en mal estado. Tomamos el peso inicial para después tomar el peso final cuando las hojas estén secas.

Lavado: Las hojas de alfalfa se lavaron con abundante agua para eliminar la tierra adherida a la superficie y otros residuos indeseables presentes. La desinfección se realizó con una solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm para eliminar todo el resto de microorganismos que estén adheridos a la muestra.

Secado: Las hojas de alfalfa ya seleccionadas y lavadas se procedió a secarlas en una secadora perteneciente al laboratorio de operaciones unitarias a una humedad de 6% a temperaturas de 40 °C, 50°C Y 60°C con promedios de tiempo de secado 2 horas, 1 hora con 50 minutos y 1 hora con 20 minutos respectivamente.

Envasado de hojas secas: Después del secado los productos fueron envasados rápidamente, para que no vuelvan a humedecerse por la humedad ambiental.

Infusión: Se procedió a triturar las hojas de alfalfa secadas, luego se sumergió los filtrantes obtenidos en el agua que se encontraba a una temperatura de 60°C teniendo como tiempo de estudio para la infusión 1, 2 y 3 minutos.

- **Estandarizado:** Se realizó el estandarizado al mejor tratamiento con la temperatura óptima obtenida (50°C) adicionando ácido cítrico 2gr/litro, sorbato de potasio 1gr/ litro y azúcar 50gr/litro.

Homogenizado: La bebida funcional fue pasteurizada a una temperatura de 60°C durante 10 minutos.

Envasado final: La bebida funcional fue envasado en envases de vidrio para su análisis organoléptico.

4.3. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA FUNCIONAL.

Se realizó la evaluación sensorial en una de las aulas ambientadas para dicha prueba el panel de catadores, estaba conformado por 25 estudiantes de la EAP Ingeniería Agroindustrial, de ambos sexos de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán, dichos panelistas juzgaron su “nivel de agrado” para el atributo sabor, aroma y color utilizando la escala hedónica.

Se obtuvo los resultados del análisis del atributo aroma, color y sabor de los tratamientos con diferentes tiempos de infusión (1 minuto, 2 minutos y 3 minutos) con la mejor temperatura de secado, lo cual se observa en el cuadro 17, 18 y 19

4.3.1. Atributo de aroma

Cuadro 17: resultado por el método de Friedman respecto al atributo de aroma de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa.

Estadísticos de prueba.

N	25
Chi-cuadrado	12,667
Gl	2
Sig. Asíntota	,002

Prueba Friedman

El valor de la tabla Chi cuadrada con $\alpha = 0.05$ y $gl = 2$ es $X_{(0.05, 2)} = 5,99$. Como el estadístico de la prueba resulta mayor que el valor de tabla se rechaza la H_0 y se concluye que existe suficiente evidencia estadística

para aceptar que al menos uno de los tratamientos presenta diferente aroma.

Comparando los tratamientos por pares.

Tratamientos Comparados	N	Significancia
T1	5.84	a
T2	5.64	a
T3	4.62	b

Se observa que T1 y T2 son los mejores tratamientos no existiendo diferencia estadística entre ambos.

4.3.2. Atributo de color

Cuadro 18: resultado por el método de Friedman respecto al atributo de color de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa.

Estadísticos de prueba.

N	25
Chi-cuadrado	15,540
Gl	2
Sig. Asíntota	,000

Prueba Friedman

El valor de la tabla Chi cuadrada con $\alpha = 0.05$ y $gl = 2$ es $X_{(0.05, 2)} = 5,99$. Como el estadístico de la prueba resulta mayor que el valor de tabla se rechaza la H_0 y se concluye que existe suficiente evidencia estadística para aceptar que al menos uno de los tratamientos presenta diferente color.

Comparando los tratamientos por pares.

Tratamientos Comparados	N	Significancia
T2	5.84	a
T1	4.52	b
T3	4.44	b

Tenemos al T2 como mejor tratamiento.

4.3.3. Atributo del sabor.

Cuadro 19: resultado por el método de Friedman respecto al atributo de sabor de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa.

Estadísticos de prueba.

N	25
Chi-cuadrado	12,095
Gl	2
Sig. Asíntota	,002

Prueba Friedman

El valor de la tabla Chi cuadrada con $\alpha = 0.05$ y $gl = 2$ es $X_{(0.05, 2)} = 5,99$. Como el estadístico de la prueba resulta mayor que el valor de tabla se rechaza la H_0 y se concluye que existe suficiente evidencia estadística para aceptar que al menos uno de los tratamientos presenta diferente sabor.

Comparando los tratamientos por pares.

Tratamientos Comparados	N	Significancia
T2	5.92	a
T1	4.92	b
T3	4.92	b

Se observa que el T2 es el mejor tratamiento.

4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA BEBIDA FUNCIONAL A PARTIR DE LAS HOJAS SECAS DE ALFALFA

Se obtuvieron los datos de las características fisicoquímicas de 300 ml de muestra de bebida funcional a base de hojas de alfalfa secas con la mejor temperatura de secado y tiempo de infusión óptima, fue realizada en el laboratorio BIOVITAL y se presenta a continuación: cenizas 0.05%, carbohidratos 4.1%, acidez 1.5%, proteínas 0.01%, pH 3.5 y grados brix de 12.5, se puede observar en el cuadro 20.

Cuadro 20: Resultado del análisis fisicoquímico en el laboratorio.

Características fisicoquímicas	Tratamiento con la mejor temperatura de secado (50°C) y el tiempo de infusión óptimo (2min)
Cenizas	0.05%
Carbohidratos	4.1%
Acidez	1.5%
Proteínas	0.01%
PH	3.5
Grados Brix	12.5

V. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACION DE LAS HOJAS DE ALFALFA

5.1.1 Determinación Biométrica.

Las hojas de alfalfa mide alrededor de 5-35 mm de largo, 3-18 mm de ancho, obovadas a sublineal varía según la variedad de la alfalfa, lugar de procedencia y el manejo agronómico. (Conabio 2009), el cual podemos contrastar con los resultados del presente trabajo de investigación (cuadro 9).

5.1.2 Determinación Físico - Químico.

Según Lean (2006) la humedad de la hojas de alfalfa es de 94% y cenizas 6% lo cual se muestra en el cuadro 2 del marco teórico, dicho datos coinciden con nuestros resultados los cuales fueron 94.4 % de humedad y 5,6% de ceniza que se observa en cuadro 10, por ende se encuentran en el rango mencionado por el autor.

5.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ADECUADA DE LAS HOJAS DE ALFALFA Y EL TIEMPO ÓPTIMO DE INFUSIÓN PARA OBTENCIÓN DE LA BEBIDA FUNCIONAL MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES.

5.2.1. Temperatura optima de secado.

Según Ramón (2007) en el estudio que hizo trata de la influencia del secado de capim-limão a temperaturas de 30°C, 50°C, 70°C, y 90°C. Teniendo como mejor resultado al 30°C por lo que desarrolla hongos fue descartado por lo tanto, la temperatura óptima de secado es de 50°C. Lo cual respalda nuestros resultados que fue la mejor temperatura para el secado de las hojas de alfalfa de 50°C.

5.2.2. Tiempo de infusión óptimo.

Obtuvimos 2 minutos como tiempo de infusión óptima de las hojas de alfalfa secas lo cual coincide con lo mencionado con el autor (Díaz 2006) el cual menciona que para preparar té la temperatura de agua ideal es de 60 – 65 °C en un tiempo de infusión de 1 – 1 ½ minutos

5.2.3. Actividad antioxidante.

Según Brand (2006) que fácilmente puede ser monitoreado midiendo el decaimiento de la absorbancia a 515 nm para poder determinar el IC50 lo coincide con la absorbancia utilizada en la investigación.

Olivares (2014), en su trabajo de investigación titulado “CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Averrhoa carambola* L. (CARAMBOLA)”, el radical libre estable DPPH*. El IC50 (Concentración Inhibitoria del extracto que logra atrapar el 50% de los radicales libres DPPH* de la solución preparada a 0.5 mM), es igual a 3.75 mg/mL para el fruto y 2.91 mg/mL para la hoja de carambola, es decir, la hoja tiene una mejor capacidad antioxidante frente al radical libre estable DPPH*.

Lo cual coincide con la utilización del método de DPPH para determinar el IC50 el cual utilizamos en nuestra investigación obteniendo como resultado 731.86 mg/mL de hojas de alfalfa seca teniendo menos antioxidantes que las hojas de carambola.

5.2.4. Procedimiento para la obtención de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa seca.

El Flujo grama para la elaboración de la bebida funcional a partir de hojas secas de alfalfa que se observa en la figura 16 coincide con las etapas de proceso mencionas por los autores (Taiwan Turnkey Project Association 2014) y (Marcillo y Naranjo 2012) que se muestra en la figura 1 y figura 7 del marco teórico.

5.3. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA FUNCIONAL.

Según Anzaldua y Morales (2006) En la escala hedónica para la determinación de los atributos (sabor, olor y color) se debe usar los 7 valores para poder determinar de manera precisa el mejor producto lo cual coincide con los valores que utilizados para poder determinar el mejor tratamiento que fue el tratamiento 2, de tal manera respaldando nuestra metodología utilizada para la determinación de los atributos de la bebida funcional a base de hojas de alfalfa secas.

5.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA BEBIDA FUNCIONAL A PARTIR DE LAS HOJAS SECAS DE ALFALFA

Según Vargas (2012), en su trabajo de investigación titulado “ELABORACIÓN DE TÉ AROMÁTICO A BASE DE PLANTAS CEDRÓN (*Aloysiacitrodora*) Y TORONJIL (*Mellisaofficinalis*) PROCESADO CON STEVIA (*Stevia rebaudiana bertonii*) ENDULZANTE NATURAL, UTILIZANDO EL MÉTODO DE DESHIDRATACIÓN” Las características físico – químicas se realizaron con el fin de determinar las propiedades de los tratamientos seleccionados con respecto a esto el T₂ fue el de mejores características, seguido por el T₃, se determinó que los 13 °Brix del T₂ es el más alto y esto ayuda a que el té aromático tenga buena aceptabilidad por el consumidor.

Nuestros resultados fue de 12.5°brix de nuestro producto, no teniendo mucha diferencia en los °Brix obtenidos por el investigador lo cual respalda nuestra investigación.

VI. CONCLUSIONES

- El IC50 (Concentración Inhibitoria del extracto que logra atrapar el 50% de los radicales libres DPPH* de la solución preparada a 0.5 mM), es igual a 731.86 mg/mL para las hojas de alfalfa secas, es decir, la hoja seca de alfalfa tiene una buena capacidad antioxidante frente al radical libre estable DPPH.
- La temperatura óptima es de 50°C con tiempo de secado de 1 hora con 50 minutos, con esta temperatura y tiempo se conserva mejor los antioxidantes que contiene las hojas de alfalfa.
- El tiempo de infusión óptimo es de 2 minutos con temperatura de 60°C, con el cual se conserva la actividad antioxidante y los atributos de sabor, color y olor.
- En la evaluación sensorial se obtuvo como mejor tratamiento al T2 (hojas de alfalfa secadas a 50°C con tiempo de infusión de 2 minutos), por ser aceptables en el atributo color y sabor por los panelistas.

En los análisis fisicoquímico realizado a 300 ml de muestra de bebida funcional a base de hojas secas de alfalfa elaborado con la mejor temperatura de secado y tiempo de infusión, en condiciones óptimas la composición es: cenizas 0.05%, carbohidratos 4.1%, acidez 1.5%, proteínas 0.01%, pH 3.5 y grados brix de 12.5

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de la capacidad antioxidante en hierbas selectas de la zona de Huánuco, que son de uso culinario y medicinal, a fin de disponer de información sustentada sobre nuevas fuentes de antioxidantes naturales
- Implementar el laboratorio de bromatología con reactivos diversos que faltan para poder realizar los diferentes análisis fisicoquímico que requieran realizar los alumnos para la ejecución de su respectiva tesis.
- Coordinar oportunamente con los jefes de práctica el uso de los ambientes de laboratorios para la realización de las pruebas que involucre el desarrollo normal de la tesis.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Brand, W. 2007. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. Pag. 15-17
2. Carballo, C. 2006. Desinfección química de plantas medicinales II. *Plantago lanceolata* L. Rev Cubana Plant Med.
3. Chen, Y. 2007. Degradation of green tea catechins in tea drinks. J. Agric. Food Chem. Vol 49, pag 477–482.
4. Díaz, J. 2006. Uso de las Plantas Medicinales de México. México. Imeplam. Pag. 150 - 230.
5. Espin, C. 2008. Anthocyanin-based: A new source of antiradical activity for foodstuff. J. Agric. Food Chem. Pag. 1588-1591.
6. González, R. 2008. Daño oxidativo y antioxidantes. Bioquímica. Vol. 25 N°1–98.
7. Lean, J. 2006 .Unsaponifiable substance from alfalfa for pharmaceutical and cosmetic use. Pharmaceuticals. Pag .81- 339.
8. Lebeau, N 2006. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. Free Radical Biology & Medicine. Col 29. Pag. 900-912.
9. Llacari, A. 2011. Valoración de nutrientes y antioxidants en la salud humana e industria alimentaria. Universidad Peruana Unión. I Congreso de investigación. Perú - Lima
10. Martínez, G. 2006. Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. ALAN. Vol 50. N° 1. Pag. 5 – 15.
11. Muñoz. A.; Ramos, F.; Ortiz, C. y Castañeda, B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina Humana. Universidad San Martín de Porres. Lima (Perú) Rev. Soc. Quím. Perú v.73 n.3 Lima jul./ set. 2007.

12. Nicoli, M. 2006. Influence of processing on the antioxidants properties of fruit and vegetables. Review. Food Science & Technology. Pag. 94–100.
13. Peter, M. 2006. “La biblia de las Hierbas” Ediciones Konemann.
14. Ponka, A. 2007. Salmonella in alfalfa sprouts. Lancet. Pag. 462-463.
15. Ramón, F. 2007. “Atlas de las plantas medicinales y Curativas” .Edición “Cultural S.A.” España
16. Rao A V, S Agarwal. (2007) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. J. Am. Coll. Nutr. Pag.19.
17. Roberts, J. 2007. Exacerbation of SLE associated with alfalfa ingestion. N Engl. J. Med. Pag 308 – 315.
18. Rubenstein, C. 2008. Manganese-induced hypoglycemia. Lancet. Pag. 1348-1351.
19. Silva, P. 2008 . Botánica Médica. Principios de Fitoterapia
20. Taiwan Turnkey Project Association. 2014. Visto en la página web:
21. Thomas, J. 2009. The Role of free radicals and antioxidants. Nutrition V. 16. Pag. 19 - 25
22. Ureña, H. 2008. Evaluación sensorial de los alimentos. UNALM. Lima–Perú. Pag. 16- 19
23. Vasconcellos, A. 2008. Alimentos Funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. Institute Food Technology (IFT). California. U.S.A.
24. Zhen, Y. 2006. Antioxidant activity and phenolic compounds in select herbs. J. Agric. Food Chem. 49. Pag 5165 – 5170.
25. Zorrilla arena, L. Santiago. 2006. Introducción a la metodología de la investigación. Edit. Ediciones cal y arena.

Webgrafía

1. Alejandro De Jesús Cortés-Sánchez, José Rubén León-Sánchez, Francisco Javier Jiménez-González,2 Mayra Díaz-Ramírez, Adriana Villanueva-Carvajal y Cynthia A. Guzmán-Medina. 2016. Alimentos

- funcionales, alfalfa y fitoestrógenos. Mexico. Consultado el 04 de octubre del 2016. Disponible en: <http://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1110>
2. Asli Emine Özen. 2012. Assessment of functional food and beverage consumption among the balearic islands population: gender, socio-demographic and lifestyle determinants. Islas Baleares. España. Consultado 01 septiembre 2016. Disponible en: <file:///c:/users/lenovo/desktop/taoz1de1.pdf>.
 3. Conabio. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City. Consultado 03 de septiembre del 2016. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Medicago_sativa
 4. Daniel H. Basigalup. 2007. El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. Argentina. Consultado el 01 de septiembre del 2016. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_el_cultivo_de_la_alfalfa_en_la_argentina.pdf
 5. Halliwell, C. 2007. Free radical and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work?. Critical Reviews in Food Science and Nutrition .Pag. 7–20. <http://turnkey.taiwantrade.com.tw/en/>
 6. Marcillo Andrade Eva María, Naranjo Mendoza Dennise Faviola. 2012. Diseño de la linea de produccion de una bebida de hiervas denominada hortacha. Generalidades. Guayaquil-Ecuador. Consultado el 1septiembre 2016. Disponible en: <http://es.slideshare.net/carloscazal35/tesis-sobre-horchata>.
 7. Matt Shubat, 2015. Técnicas agronómicas para el cultivo de la alfalfa. Consultado el 01 de 20 de septiembre del 2016. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR17204.pdf>.
 8. Myra Marie Tetteh. 2012. Environmental Health Fact Sheet. Consultado 23 de septiembre del 2015. Disponible en: <http://ehscc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf>.

9. UNESCO. 2006. Fundación Celestina Pérez de Almada. Visto en la
Página web:
[http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Montevideo/
pdf/ED-Guiasecaderosolar.pdf](http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Montevideo/pdf/ED-Guiasecaderosolar.pdf)
10. Valdés Marín Patricio. 2008. MANUAL DE DESHIDRATACIÓN I. Frutas
y hortalizas. Chile. Consultado el 1 de septiembre del 2016. Disponible
en: <http://manualdeshidratacion.blogspot.pe/>.

ANEXO

ANEXO

EVALUACIÓN SENSORIAL

Atributo sabor, según tratamiento, de bebida funcional elaborado a partir de hojas de alfalfa.

Trat	PANELISTAS																								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25
T ₁	6	5	6	7	7	5	5	7	6	6	5	6	6	5	6	5	7	5	5	7	6	6	5	6	6
T ₂	6	6	5	6	6	5	6	7	6	5	6	5	6	5	5	6	6	5	5	7	6	5	6	5	5
T ₃	5	6	4	6	4	6	6	5	5	3	4	5	5	3	4	6	4	6	6	5	5	3	4	5	3

Atributo color, según tratamiento, de bebida funcional elaborado a partir de hojas de alfalfa.

Trat	PANELISTAS																								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25
T ₁	3	5	4	7	3	5	5	4	6	6	5	6	6	5	6	5	3	3	5	3	3	6	3	3	3
T ₂	7	6	7	6	6	5	6	7	6	5	6	7	6	5	5	6	6	5	5	7	6	5	6	5	5
T ₃	4	6	4	6	4	6	6	5	5	3	4	5	5	3	4	6	4	3	3	5	5	3	4	5	3

Atributo color, según tratamiento, de bebida funcional elaborado a partir de hojas de alfalfa.

Trat	PANELISTAS																								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25
T ₁	5	5	4	3	5	5	5	4	6	6	5	6	6	5	6	5	5	3	3	5	5	6	5	5	5
T ₂	7	6	7	4	6	5	6	6	5	5	6	7	6	7	5	6	6	5	5	7	6	5	6	7	7
T ₃	4	6	4	5	4	6	6	7	5	5	7	5	5	5	4	6	4	3	3	5	5	5	4	5	5

PANEL FOTOGRAFICO

PROCESO DE SECADO DE LAS HOJAS DE ALFALFA



Figura 17. Selección de las hojas de alfalfa



Figura 18. Desojado de las hojas de alfalfa



Figura 19. Preparando las hojas para introducir a la secadora



Figura 20. Secando las hojas en la secadora

EVALUACIÓN SENSORIAL



Figura 21. Panelista 1



Figura 22. Panelista 2

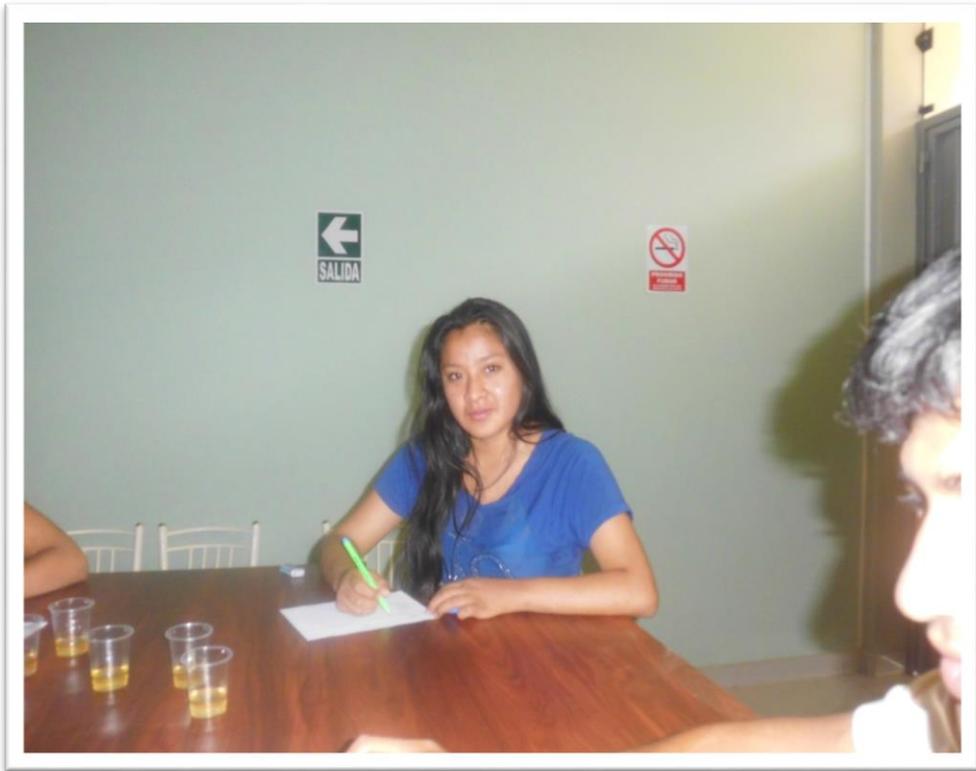


Figura 23. Panelista 3



Figura 24. Panelista 4