

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
MAGISTER EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS



**DESARROLLO DE EXTRACTOS SECOS CON PROPIEDADES
ANTIOXIDANTES Y ANTIBACTERIANAS DE CASCARA Y
SEMILLA DE PALTA HASS (*Persea americana*) RECUBIERTOS
CON ALMIDÓN MODIFICADO.**

**TESIS DE MAGISTER PARA OPTAR A GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE
LOS ALIMENTOS.**

CATALINA PAZ ASENJO AVENDAÑO

**DIRECTOR DE TESIS:
JAIME ORTIZ VIEDMA (PhD)**

2018

Dedicatoria

A mi Familia.

“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños.”

Eleanor Roosevelt.

“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar.”

Hipatia de Alejandría

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad de Chile, por haberme abierto las puertas a esta prestigiosa casa de estudio

Al profesor Jaime Ortiz, por su apoyo y ayuda incondicional.

A mis compañeros y colegas, que me ayudaron a hacer posible este proceso.

A mi familia que siempre me entrego su confianza y compañía.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	13
	ABSTRACT	15
	INTRODUCCIÓN	16
	CAPITULO I	17
1	Antecedentes Generales	17
1.1	Palta Hass	17
1.1.2	Producción en Chile	17
1.2	Morfología de la fruta	19
1.2.1	Exocarpio	19
1.3	Madurez	21
1.4	Componentes bioactivos derivados de residuos de palta	22
1.4.1	Cascara de Palta	22
1.4.2	Componentes bioactivos de semilla de palta	23
1.5	Capacidad antibacteriana de residuos de palta	25
1.5.1	Cascara de palta	25
1.5.2	Semilla de palta	26

1.6	Generalidades sobre capacidad antioxidante	27
1.6.1	Actividad antioxidante	27
1.6.2	Polifenoles	29
1.6.2.1	Mecanismos de acción de los fenoles	30
1.7	Generalidades sobre actividad antibacteriana	30
1.7.1	Microorganismos generados de ETAS's	31
1.7.1.1	<i>E. Coli</i> no patógena	32
1.7.1.1.1	Síntomas <i>E.coli</i> no patogena	32
1.7.1.2	<i>E.coli</i> 0:157	32
1.7.1.2.1	Síntomas <i>E.coli</i> 0:157	32
1.7.1.3	<i>Salmonella Enteritidis</i>	33
1.7.1.3.1	Síntomas <i>Salmonella Enteritidis</i>	34
1.7.1.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.7.1.4.1	Síntomas <i>S. aureus</i>	35
1.7.1.5	<i>Bacillus cereus</i>	38
1.7.1.5.1	Síntomas <i>Bacillus cereus</i>	38
1.7.1.6	<i>Listeria Inocua</i>	39
1.7.1.6.1	Síntomas <i>L.inocua</i>	40
1.8	Extracción de compuestos Fenolicos con solvente.	41

1.9	Método de preservación de extractos líquidos.	41
1.9.1	Secado por atomización (Spray Dried)	41
1.9.2	Recubrimiento de extractos secos en lecho Fluidizado	42
1.9.3	Tipos de polímeros utilizados como recubrimiento	44
	CAPITULO II	48
2	Material y Métodos	48
2.1	Materia prima	48
2.2	Preparación de las muestras	48
2.3	Secado muestras por liofilización	48
2.4	Extracción química de polifenoles	50
2.5	Secado por aspersión	50
2.6	Recubrimiento con Capsul® en lecho Fluidizado	51
2.7	Rehidratación de los extractos microencapsulados	52
2.8	Análisis químicos y microbiológicos	53
2.8.1	Análisis proximal de la cáscara y semilla de Palta Hass	53
2.8.1.1	Análisis de la fracción lipídica de cascara y semilla	53
2.8.1.2	Determinación de carotenoides	54
2.8.2	Determinación de fenoles totales por método Folin Ciocalteau	54
2.8.2.1	Capacidad antioxidante	54

2.8.3	Determinación de la capacidad antibacteriana de los extractos.	55
2.9	Análisis estadístico	56
	CAPITULO III	58
3	Resultado y Discusión	58
3.1	Composición nutricional de semilla y cascara de palta Hass	58
3.2	Composición lipídica	60
3.3	Polifenoles totales de los extractos de cascara y semilla	64
3.3.1	Contenido de polifenoles y capacidad antiradicalaria de la cascara	64
3.3.2	Contenido de polifenoles y capacidad antiradicalaria de la semilla	66
3.4	Recubrimiento de los extractos	68
3.5	Aplicación de extractos en cultivos microbiológicos	70
	CAPITULO IV	74
4	Conclusiones	74
	CAPITULO V	
	Referencias	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición nutricional de la pasta de palta (g/100g de parte comestible)	18
2	Factor de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3	Condiciones para la extracción por solvente	50
4	Composición nutricional de semilla y cáscara de palta hass obtenidos en este estudio y su composición con datos de literatura	59
5	Composición lipídica* de semilla y cascara de palta has	61
6	Contenido de Tocoferoles de semilla y cascara de palta	62
7	Contenido de carotenoides presentes en el extracto oleoso	63
8	Contenido de polifenoles y capacidad antiradicalaria (DPPH) de cascara y demilla obtenidos por Wang(2010) y por Rodriguez-Carpena(2011) para cascara y semilla	65
9	Cuadro de diluciones utilizadas para la aplicación sobre bacterias Gram+ y Gram-	71
10	Concentracion minima inhibitoria (CMI; mgEAG/100g) para extracto en cepas bacterianas	79

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGUR		Página
A		
1	Superficie total cultivada por región al año de 2011	17
2	Árbol de palto	19
3	Pistilo de Palta modificado de Tomer et al (1976)	19
4	Fruto de Palta modificado de Cummings y Shroeder (1942)	20
5	Presionometro	21
6	Cascara de palta hass	22
7	Semilla de palta hass	24
8	<i>Escherichia coli</i>	31
9	<i>Salmonella enteritidis</i>	33
10	<i>Staplylococcus aureus</i>	34
11	<i>Bacillus cereus</i>	38
12	<i>Listeria innocua</i>	38
13	Distintos modos de contacto entre e lecho de partículas y el fluido a) Lecho fijo; (b) Lecho en comienzo de fluidización; (c) Lecho con fluidización no burbujeante; (d) Lecho con fluidización burbujeante.	43
14	Metodología utilizada en la investigación	49

15	Secado por aspersión SD-06AG	51
16	Lecho Fluidizado AGSENS	52
17	Ejemplificación de posicionamiento de orificios donde va la disolución	56
18	Polifenoles totales obtenidos en semilla y cascara de palta como extracto liquido secado con y sin encapsulante por spray y/o recubierto por lecho Fluidizado	69
19	Estufa WTB Binder	95
20	Rota vapor Büchi	96
21	Espectrofotómetro	96
22	Cromatografo de gases	97
23	HPLC	97

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Método de determinación de humedad (AOAC, 1995)	86
2	Método de determinación de cenizas (AOAC, 1995)	86
3	Método Kjeldahl para determinación de proteínas totales	87
4	Método Antrona para determinación de carbohidratos totales	88
5	Método Bligh y Dyer (1959) para determinación de lípidos	89
6	Método de determinación de ácidos grasos (AOCS, 1993)	89
7	Método de determinación de tocoferoles HPLC (AOCS, 1993)	90
8	Método de pigmentos carotenoides	90
9	Método folin-ciocalteau, procedimiento para extracción de polifenoles	91
10	Determinación de capacidad antioxidante por DPPH	91
11	Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de fenoles por método follin ciocalteau	93
12	Equipos Utilizados	94
13	Análisis estadístico para aplicación de polifenoles en cascara pre-encapsulado	98

14	Análisis estadístico para aplicación de polifenoles en semilla pre-encapsulado	101
15	Análisis estadístico para aplicación de polifenoles en cascara post-encapsulado	105
16	Análisis estadístico para aplicación de polifenoles en semilla post-encapsulado	108
17	Análisis de media para polifenoles pre y post tratamiento térmico	112
18	Aumento o disminución de los polifenoles según el tratamiento térmico o recubrimiento en lecho Fluidizado	113

RESUMEN

En la actualidad, la cantidad de residuos que deja la industria alimentaria ha generado una necesidad constante de investigar las diferentes utilidades que puedan tener estos residuos.

En este sentido, hoy en día la palta Hass (*Persea americana* Mill) ocupa un lugar importante en la comercialización y producción industrial de fruta fresca, pulpa molida (huacamole) y aceite, por ende deja residuos de alto valor biológico que pueden ser reutilizados por la industria.

En la presente investigación se obtuvieron extractos polifenólicos a partir de los residuos de cáscaras y carozo de Palta Hass, a los cuales se determinó su capacidad antioxidante-antiradicalaria, y su capacidad antibacteriana en bacterias de tipo Gram (-) y Gram (+). Los extractos fueron probados en forma líquida y seca por sistema Spray.

Primero se realizó una extracción con solventes químicos, etanol y agua, para la cáscara se utilizó 50/50 y para el semilla o semilla 75/25 respectivamente. Una vez obtenidos estos extractos se procedió a secar en un secador spray, para posteriormente rehidratar y secar en un Lecho Fluidizado añadiendo capsul como recubrimiento.

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto puro sin recubrir de cáscara y semilla, y de las partículas microencapsuladas de ambas partes de la Palta. Posteriormente se evaluó estos extractos en 6 bacterias como son: *E. coli* (no patógena), *E. coli* 0:157, *Salmonella Enteritidis*, *S. aureus* ATTC, *B. cereus* y *Listeria innocua*.

En base a la concentración mínima inhibitoria, la cáscara como extracto puro sin microencapsular fue efectivo para todas las cepas, exceptuando *E. coli* No patógena y el semilla o semilla en todas las bacterias.

Con respecto al extracto microencapsulado, el extracto de la cáscara sólo fue efectivo para *E. coli* 0:157, *S. aureus* ATTA, *B. cereus*., y en cambio, la semilla fue efectiva en todos menos en *B. cereus* y *L. innocua*.

Según lo anterior, se puede concluir que debido a los extractos polifenólicos y al utilizar menor concentración o diluciones del producto, se entiende que el extracto del caroso como compuesto polifenólico tiene más capacidad inhibitoria que la cáscara de Palta Hass.

ABSTRACT

Currently, the amount of waste left by the food industry has generated a constant need to investigate the different uses that may have this waste. In this sense, nowadays the Hass avocado (*Persea americana* Mill) occupies an important place in the commercialization and industrial production of fresh fruit, ground pulp (huacamole) and oil, therefore it leaves residues of high biological value that can be reused by the industry.

In the present investigation, polyphenolic extracts were obtained from Hass avocado peel and coconut residues, which were determined for their antioxidant-antiradical capacity, and their antibacterial capacity in Gram (-) and Gram (+) bacteria. The extracts were tested in liquid form and dried by Spray system.

First an extraction with chemical solvents, ethanol and water was carried out, for the shell 50/50 was used and for the shell or seed 75/25 respectively. Once these residues were obtained, they were dried in a spray dryer, and then rehydrated and dried in a Fluidized bed by adding capsul.

The antioxidant capacity of the pure husk and shell extract, and of the microencapsulated particles from both parts of the Avocado was determined. Subsequently these extracts were applied in 6 bacteria such as: *E. coli* (non-pathogenic), *E. coli* 0: 157, *Salmonella Enteritidis*, *S. aureus* ATTC, *B. cereus* and *Listeria inocua*.

Dried spray dried helped to concentrate the polyphenols but did not present a considerable increase of the total values in mgEAG / 100g; but when coating with capsul and drying by fluidized bed there was an increase in the total values of polyphenols. On the other hand, the final drying of the extracts generated a loss in the inhibitory capacity of the seed extracts being practically inefficient for *B. cereus* and *L. inocua*. On the other hand, the dried husk extract could not inhibit nonpathogenic *E. coli*, *Samonella ent.* and *L. innocuous*

According to the above, it can be concluded they polyphenolic extract and the use of lower concentrations or dilutions of the product, the use of these extracts could be projected as protective ingredients of food safety, or industrial hygiene agents among others applications.

1. Introducción

En la actualidad, el desarrollo de la industria Agro-Alimentaria ha aumentado considerablemente generando consecuencias devastadoras para el medio ambiente debido a la generación de residuos naturales y/o sintéticos.

En Chile se producen más de 50 mil toneladas de residuos agroindustriales provenientes del procesamiento de actividades agrícolas de cosecha, pérdidas de materia prima y descartes del procesamiento de vegetales (Caballero-Valdes, 2011). Por esto, continuamente se están generando avances científicos como implementación de nuevas tecnologías y métodos para el aprovechamiento de dichos residuos. Así, cada residuo generado en el proceso agro-industrial puede ser aprovechado en: (1) otras aplicaciones industriales; (2) obtención de ingredientes funcionales destinados a la mejora de alimentos para consumo humano o animal (Chávez et al., 2011). Gracias a esto, existe un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales de antioxidantes y, el estudio de sus efectos una vez que son adicionados en distintos productos alimentarios, en especial cuando estos contienen lípidos en su matriz. Como resultado de la preocupación de los consumidores respecto a la inocuidad de estos productos, se ha presentado un incremento por los productos naturales en lugar de los sintéticos. Una de las razones se debe a que se considera que los productos sintéticos podrían causar impactos negativos en la salud (Rodríguez Carpena et al., 2011). En consecuencia, el gran desarrollo que ha alcanzado la actividad agroindustrial ha repercutido negativamente en el medioambiente. No obstante, la palta contiene residuos bioactivos como la cáscara, la cual contiene fenoles que presentan propiedades antibacterianas y antioxidantes (Rodríguez Carpena et al., 2011; Chavez et al., 2011) por lo cual, esta biomasa podría ser empleada en el desarrollo de ingredientes fenólicos, bioactivos, que actúen como preservantes de carácter antioxidante y antimicrobiano asegurando la calidad e inocuidad de diferentes tipos de productos de la industria de alimentos.

Capítulo I

1 Antecedentes generales

1.1 Palta Hass

La Palta Hass (*Persea americana*), es uno de los productos de mayor sustentabilidad económica en Chile, presentando un constante crecimiento de sus exportaciones anuales. La palta Hass, también conocida como palta, es una fruta tropical y subtropical rica en aceite, nativa del sur de México. En la actualidad, se cultivan en lugares como Australia, América, África del Sur y España. Se reconocen 3 grupos ecológicos de palta (Morton, 1987): mexicana, guatemalteca y antillana.

1.1.1 Producción en Chile

Chile se ha transformado en el principal exportador de frutas del hemisferio sur y el segundo mayor productor y exportador de paltas del mundo. Debido a la gran diversidad y volúmenes que exporta; Chile posee algo más de 40.000 mil hectáreas plantadas con paltos, siendo la zona central la más productiva (Chávez et al., 2011).

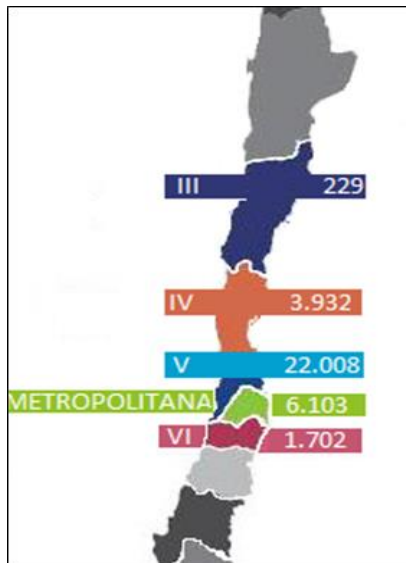


FIGURA 1. Superficie total cultivada por región al año de 2011

Así mismo, la palta es una fuente de energía y vitaminas, también provee beneficios fisiológicos, nutrientes específicos que pueden ayudar a la salud, como por ejemplo: ácidos grasos monoinsaturados (ácido Oleico), vitamina E o tocoferoles, vitamina C, complejo B, pigmentos carotenoides, fitoesteroles y azúcares (heptulosa) (Gómez-López. 1998). Su composición nutricional se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición nutricional de la pasta de palta (g/100g de parte comestible)

Componentes	Cantidad (%)
Humedad	71,6
Proteínas	1.3
Lípidos	18,6
Carbohidratos	5,5
Cenizas	1,6

Fuente: Tabla de Composición Química de Alimentos Chilenos. U. de Chile, 1992

El palto (FIGURA 2) por su parte, es un árbol de hoja perenne, nativo del área de América central, donde existen zonas selváticas en las que diferentes especies de árboles deben competir permanentemente por luz y espacio.



FIGURA 2. Árbol Palto

1.2 Morfología de la fruta

1.2.1 Exocarpio

Cummings y Schroeder (1942) mencionaron que el exocarpio está formado por tejidos epidérmicos.

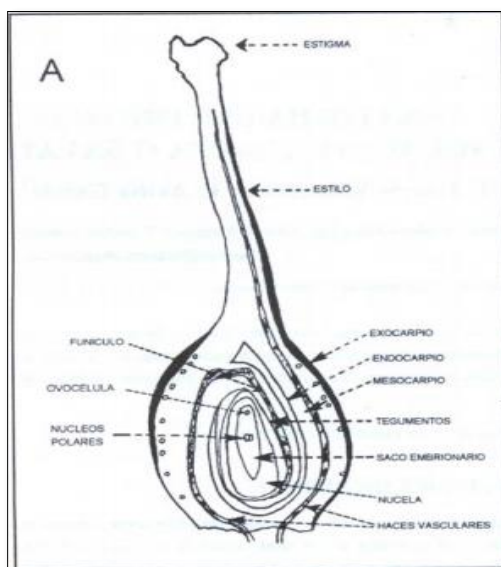


FIGURA 3. A) Pistilo de Palta modificado de Tomer et al. (1976)

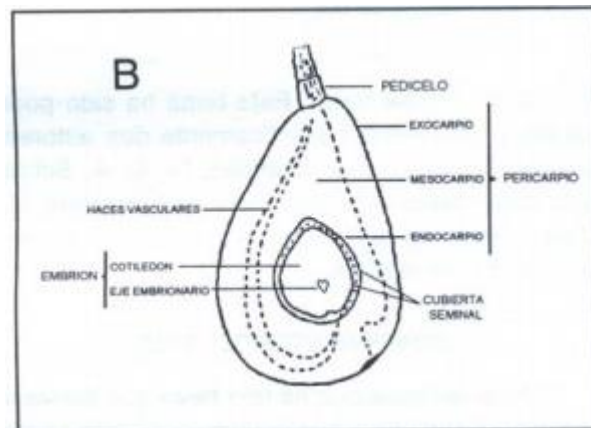


FIGURA 4. B) fruto de Palta modificado de Cummings y Schroeder (1942).

Parenquimatosos y esclerenquimatosos (hipodermis), y es la capa que es removida cuando el fruto se pela, que comúnmente se conoce como cáscara, lo cual coincide con lo que reportó Roth (1977), Schroeder (1950), y León (2008). El exocarpio (cáscara) puede ser rugoso e irregular como en los cvs. Hass, Pinkerton, y Whitsell, o completamente liso como en el caso de varios tipos de la raza Mexicana. No se sabe si dicha irregularidad en los frutos es determinada completamente por cuestiones anatómicas. Lo que sí se sabe es que está influida fuertemente por el ambiente: bajo condiciones de clima más fresco, se pierde a cierto nivel esta rugosidad y, en climas más cálidos es más rugoso el exocarpio. El grosor del exocarpio en las tres razas de palta es de la siguiente manera: raza Guatemalteca >raza Antillana>raza Mexicana, en la raza Guatemalteca hemos registrado hasta un grosor de 0.5 cm y en donde el estado de madurez de consumo de tales frutos es difícil de determinar al tacto y la única manera de saberlo es presionando en la base de la unión del fruto al pedicelo que es la parte más blanda del fruto.

Morfológicamente en la palta la Cera y Cutina se encuentran sobre la superficie de la epidermis (FIGURA 3), tal capa primaria de cera mide aproximadamente 6 μm de grosor y es más o menos continua y homogénea. Frecuentemente se distingue una segunda capa externa de cera que está sobre la primera capa y es más irregular en apariencia, ya que es

caracterizada por parches irregulares de cera y por fisuras (FIGURA 4), además es muy fácil de removerse al frotarse (Schroeder, 1950; Cummings y Schroeder, 1942).

1.3 Madurez.

Desde el momento en que se corta el fruto de palta, hasta su presentación en el mercado, transcurre un lapso de tiempo considerable durante el cual, el fruto puede sufrir diferentes tipos de daños mecánicos y fisiológicos. El manejo del palto durante y después de la cosecha debe ser cuidadoso para garantizar al consumidor la calidad e inocuidad de la fruta que ellos requieren; la palta es un fruto climatérico (Seymour et al., 1993), es decir, después de cosechado el fruto continúa los procesos de maduración (incremento de azúcares, reducción de acidez, cambio de color, etc.).

Otro método para conocer la madurez es el texturómetro de barra, el cual permite medir la fuerza que se debe aplicar a la fruta para ser penetrada; utiliza medidas de kg/m^2 y éste, se usa como índice de madurez de la fruta. La medida se toma manualmente, haciendo presión, hasta que la fruta es penetrada.

El presionómetro (FIGURA 5) sirve para medir la firmeza o dureza en todo tipo de frutas; los presionómetros son ideales para determinar el momento óptimo de recolección o para controlar la evolución de la maduración de gran cantidad de frutas. En el caso de la palta Hass el periodo de madurez, en que la fruta está lista para consumo se define cuando la resistencia a la presión es equivalente a 2 lb.



FIGURA 5. Presionómetro.

1.4 Componentes bioactivos derivados de residuos de palta

La explotación de los fitoquímicos de los materiales de desecho de palta, tales como cáscara y semilla puede conducir a nuevos productos alimenticios de mejor calidad, generando un impacto significativo tanto en la industria aceitera como en las industrias de los alimentos procesados.

1.4.1 Cáscara palta

El cultivar de palta Hass produce un fruto piriforme, de cáscara gruesa, un poco rugosa y de color verde que se torna negro conforme a su maduración.



FIGURA 6. Cascara de Palta Hass.

Las cáscaras concentran compuestos biológicamente activos como los fenoles; de los cuales, existen los siguientes antecedentes sobre sus propiedades antioxidantes y antibacterianas:

Rodríguez-Carpena et al. (2011), analizaron la cáscara, la pulpa y la semilla a partir de dos variedades de palta: 'Hass' y 'Fuerte', por su contenido fenólico; con los cuales, la cáscara de Hass, obtuvo por método de extracción de solvente con acetona un contenido fenólico de 8977 ± 3103 mg EAG/100g de materia seca; con metanol es de 7841 ± 2447 mg EAG/100g de

materia seca y con acetato de etilo 3293 ± 925 mg EAG/100g de materia seca y, para analizar la actividad antioxidante, por método de CUPRAC con acetato de etilo $56,4 \pm 21,19$ mmol Trolox/g de materia fresca, acetona $218,04 \pm 42,42$ mmol Trolox/g de materia fresca y con metanol es de $145,98 \pm 69,25$ mmol Trolox/g de materia fresca. Por el método de DPPH con acetato de etilo $17,85 \pm 7,07$ mmol Trolox/g de materia fresca, acetona $88,94 \pm 48,22$ mmol Trolox/g de materia fresca y con metanol es de $71,92 \pm 28,93$ mmol Trolox/g de materia fresca.

Chávez et al. (2011), en la universidad de Concepción, investigaron que, a partir del epicarpio del fruto de *Persea americana* (palta) se obtuvo un extracto polifenólico (77 % de EAG), rico en procianidinas derivadas de epicatequina, con un grado de polimerización DPM = 6,10. La capacidad antioxidante fue evaluada mediante TEAC-DPPH, TEAC-CUPRAC, TEAC-FRAP, TEAC-crocina.

1.4.2 Componentes bioactivos de la semilla de Palta

Muchas frutas tropicales comestibles se procesan como jugos naturales, concentrados, jaleas, pastas, y extractos principalmente. En estos procesos, las semillas y cáscaras son habitualmente desechadas como residuos, provocando problemas ambientales. La palta Hass es una baya con mesocarpio y endocarpio carnosos que contiene una sola semilla (García et al., 2015). Algunos pocos estudios se han centrado en la composición fitoquímica de las paltas y sus desechos industriales. Estudios realizados por Soong y Barlow (2004) acerca de la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de la semilla del fruto de palto en relación con la actividad antioxidante de las partes comestibles de la palta, han determinado que la contribución de las semillas de las frutas a la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos fue mayor al 70%.

La palta se cosecha en base a sus sólidos totales y no cuando están maduras, ya que ésta sólo madura después de ser cortada del árbol, por lo tanto, tiene la ventaja de que puede ser dejado en el árbol durante la temporada de cosecha. Es así que, antes de que se consuman en el estado maduro, la fruta (cáscara, semilla y pulpa) puede tener diferente composición fitoquímica dependiendo de los diferentes momentos de cosecha del año; además, no se conoce mucho sobre la evolución de los compuestos bioactivos durante el paso de una palta

verde a una madura (Qing-Yi Lu et al., 2009), pero se sabe que se produce un mayor volumen de desechos de fruta madura que de fruta verde.



FIGURA 7. Semilla de Palta Hass.

Soong y Barlow (2004) afirma que las semillas de palta tienen más actividad antioxidante y contenido de polifenoles que la pulpa. Estudios fitoquímicos sobre semillas de palta han identificado varias clases de compuestos naturales tales como fitosteroles, triterpenos, ácidos grasos, ácidos furanoico, ácido abscísico, proantocianidinas, y polifenoles (Dabas, 2011).

Extractos de hierbas, frutas, especias, y otros materiales vegetales ricos en compuestos fenólicos son de creciente interés en la industria alimentaria debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos y de ese modo mejoraría la calidad y el valor nutritivo de los alimentos.

Un antioxidante, es definido como una sustancia que relativamente en bajas concentraciones, inhibe efectivamente el grado de reacción con el oxígeno (Zheng y Wang, 2001).

Un antioxidante reacciona con cualquiera de los radicales libres iniciales o con uno formado en las etapas tempranas dando un intermediario que no es capaz de continuar con la reacción en cadena.

Los radicales libres se pueden definir como sustancias químicas reactivas que tienen un único electrón desemparejado en una órbita externa. La mayoría de los radicales libres que pueden dañar los sistemas biológicos son los radicales libres de oxígeno, conocidos normalmente como “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Las ROS pueden producirse durante la irradiación de la luz UV, por rayos-X y por rayos- γ , y también pueden ser producidas durante las reacciones de catálisis de un metal. Los radicales libres tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. El término “radical libre” enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones).

1.5 Capacidad Antibacteriana de residuos de palta

1.5.1 Cáscara de Palta

La cáscara de la palta permite hacer un laxante casero de mucha utilidad para aquellas personas de digestión lenta y con síndrome de colon irritable (Calderón, 2006). Además Téliz (2000), mencionó que tanto el fruto, como las hojas y semillas, son utilizados en la medicina natural para eliminar microbios y parásitos internos. Los compuestos polifenólicos, actuaron como potentes antioxidantes e inhibidores de la ureasa, uno de los factores de colonización más importantes de *H. Pylori*. Así, se concluyó que un producto de bajo valor agregado como el epicarpio de palta Hass puede ser utilizado como una fuente abundante de polifenoles bioactivos (Chavez, et al., 2011).

Por otro lado, Andrade et al. (2010), demostraron que los compuestos contenidos en la cáscara de la palta tienen actividad antibacteriana; el extracto más efectivo fue el clorofórmico ya que presentó muy buena actividad antibacteriana sobre *Escherichian coli*, *Staphylococcus aureus* y una actividad moderada respecto a *Streptococcus pneumoniae* presentando un halo inhibitorio de 2,6 cm; el extracto más inocuo fue el metanólico, mientras que los extractos de acetato de etilo un halo inhibitorio de 2,7 cm y hexano con un halo inhibitorio de 1,3 cm tuvieron una actividad moderada. La revista Chilena de Flora y Vegetación “*Chloris chilensis*”, (1999) publicó que la cáscara del fruto en infusión en Colombia, tiene aplicaciones como anti disentérico y vermífugo (sirve para expulsar lombrices intestinales); también se estima que combate la blenorragia (lavados). Un pedazo

húmedo sobre la piel operaría como vulnerario (saneamiento de llagas) y resolutivo. En Bolivia, Cuba y Honduras, la infusión de la cáscara en ayunas es vermífuga. En México, la cáscara fresca o seca y molida tendría igual aplicación, siendo también empleada como anti disentérico (*Chloris chilensis*, Revista Chilena de flora y Vegetación, 1999).

1.5.2 Semilla de Palta

Rodríguez-Carpena, (2011) realizó un estudio sobre la capacidad antibacteriana de un extracto semilla de palta Hass obtenido por extracción con acetona y determinó que tiene un efecto antibacteriano sobre microorganismos patógenos tales como: *Listeria monocytógenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus glaucus* y *Penicillium notarum*, pero no presentó efecto sobre *E. coli* y *Pseudomonas fluorescens*. Por otro lado, Curaqueo (2014) determinó halos de inhibición para *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytógenes*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp* en semillas de palta chilena utilizando el mismo solvente que Rodríguez-Carpena, (2011).

La semilla de palta posee algunos principios anti nutricionales como ácido cianhídrico, glucósidos cianogénicos, polifenoles condensados y algunos taninos, que podrían actuar adversamente sobre la posibilidad de su utilización. Sin embargo, la gran mayoría de dichas sustancias son termolábiles, por lo que un tratamiento adecuado de calor (cocción) las destruiría (OEA, 1978).

1.6 Generalidades sobre Actividad Antioxidante

1.6.1 Actividad antioxidante

Zheng y Wang (2001) definen que antioxidante es una sustancia que, relativamente en bajas concentraciones, inhibe efectivamente el grado de reacción con el oxígeno. Son sustancias presentes o adicionadas en los alimentos que disminuyen significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, siendo capaces de retardar la oxidación de los compuestos lipídicos de los alimentos, disminuyendo así su deterioro durante su almacenamiento y conservando las propiedades organolépticas del alimento por largos períodos de tiempo, actuando en diferentes niveles en la secuencia oxidativa de las

moléculas lipídicas, ya sea disminuyendo la concentración de oxígeno (interceptando al oxígeno), previniendo la reacción de iniciación por un radical hidróxilo, secuestrando metales y/o degradando los productos de oxidación primarios a compuestos estables.

Actualmente el interés por encontrar antioxidantes naturales en las plantas ha incrementado, debido a que éstos protegen al cuerpo humano del ataque de radicales libres, retardando el avance de la gran mayoría de las enfermedades crónicas, además de su potencial utilización en alimentos (Chou et al, 2003; Anwar et al, 2006; Cao et al, 1996; Patil y Pike, 1995; Lampe, 1999).

En general, el término antioxidante natural alude a aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y los animales y aquellos que se forman durante la cocción o el procesamiento de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales (Yanishlieva, 2001).

Iglesias (2009) considera los antioxidantes naturales más importantes tecnológicamente empleados en aceites, los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles), los extractos de especias, el ácido ascórbico y cítrico y sus sales, los carotenoides, los aminoácidos y ciertas proteínas son otros constituyentes del reino vegetal y animal con potencial actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos son los principales antioxidantes naturales utilizados en alimentos. Estudios han demostrado su capacidad de evitar el oxígeno derivado de los radicales libres por donación de átomos de hidrógeno (Sánchez-Escalante et al, 2003). Además, de acuerdo con Karakaya *et al.* (2001), la presencia de componentes fenólicos pueden tener un importante efecto en la estabilidad oxidativa y en la inocuidad microbiana.

Según Frankel (1996) el antioxidante natural más abundante y el más activo biológicamente es el α -tocoferol. Este inhibe la formación de radicales libres al reaccionar con el radical peroxil deteniendo la cadena de propagación y con el radical alcoxil inhibiendo la descomposición de los hidroperóxidos y disminuyendo la formación de aldehídos.

El uso de especias y hierbas como antioxidantes en alimentos procesados constituyen una alternativa prometedora al uso de antioxidantes sintéticos (Madsen, 1998).

Por otro lado, los Antioxidantes sintéticos, son definidos como conservadores alimenticios que retardan específicamente el deterioro, rancidez o decoloración, debido a la oxidación lipídica. Los más conocidos son los que se derivan de las estructuras fenólicas o los que tienen un grupo fenólico dentro de su estructura molecular, tales como BHA, BHT y TBHQ. Iqbal y Bhanger (2007) citan que publicaciones recientes señalan que los antioxidantes sintéticos pueden estar implicados en problemas de salud, incluyendo carcinogénesis en animales de experimentación.

Estudios con TBHQ, registraron a dosis altas efectos negativos en animales de experimentación, tales como tumores gástricos y daño al DNA. Este antioxidante sintético se encuentra prohibido para su uso en alimentos en Japón, Canadá y Europa. De la misma forma, BHA y BHT han sido removidos de la lista de compuestos seguros para estas naciones (Iqbal y Bhanger, 2007).

El uso de los antioxidantes sintéticos está restringido por las leyes alimentarias de cada país, por consiguiente existe una lista de estas sustancias permitidas en Chile, la que se presenta en los artículos 143 y 144 del Reglamento Sanitario de los alimentos (RSA), en donde se indican las sustancias antioxidantes y las sustancias secuestrantes y sinérgicas de antioxidantes con sus concentraciones permitidas, respectivamente.

1.6.2 Polifenoles

Los polifenoles constituyen un grupo muy amplio de compuestos presentes en la naturaleza, los cuales poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidróxilos. Estos compuestos son, en su mayoría, potentes antioxidantes, necesarios para el funcionamiento de las células vegetales (Burgos, 2012). Se pueden clasificar en ácidos fenólicos y flavonoides. Dentro de los ácidos fenólicos encontramos el ácido hidroxicinámico y el ácido hidroxibenzoico y sus derivados: ácido caféico, ferúlico, p-cumárico y sináptico. Por otra parte, los flavonoides incluyen flavanonas, antocianinas, flavonoles (quercitina, mirecitina, kampferol), flavonas (luteolina, apigenina, diosmetina), flavanoles, y por último las isoflavonas.

Kuskoski (2004) explica que los polifenoles son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la

posición de los grupos hidróxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones.

Según lo planteado por Burgos (2012), los polifenoles pueden actuar por varios mecanismos, entre los principales están:

- Como inhibidores, activadores o protectores de enzimas específicas.
- Como antioxidantes, propiamente tal, actuando como atrapadores de radicales libres. Los distintos polifenoles tienen distinta especificidad para las diversas especies oxidantes.
- En forma indirecta, como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir, uniéndose a estos iones y reduciendo la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres.

Cada polifenol actuará por uno o más de estos mecanismos según sus propiedades particulares (Hernández y Prieto, 1999).

1.6.2.1 Mecanismo de acción de los polifenoles

Los polifenoles constituyen un grupo muy amplio de compuestos presentes en la naturaleza, los cuales poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidróxilos. Estos compuestos son, en su mayoría, potentes antioxidantes, necesarios para el funcionamiento de las células vegetales (Burgos, 2012).

A Nivel general, estos compuestos producen un desordenamiento estructural de la membrana citoplásmica, que interfiere con su funcionamiento normal. Esto provoca la pérdida de pequeños metabolitos del medio intracelular y dificulta tanto el transporte activo como el metabolismo energético.

Los mecanismos de acción de los fenoles son varios:

- Alteración de la permeabilidad celular (por su liposolubilidad se unen a la membrana)
- Alteración directa de las proteínas y enzimas bacterianas
- Alquilación intracelular de las materias indispensables para la síntesis de proteínas.

Su actividad mayor es sobre gramnegativos que sobre grampositivos. En general tienen una gran actividad, principalmente sobre formas vegetativas, menos activos ante micobacterias y esporas. La materia orgánica no las altera mucho. Se inactivan por detergentes catiónicos y algunos tipos de plásticos. (Arias, 2012)

El producto más simple es el fenol, cuya propiedad bactericida fue descubierta por Lister en 1867, es uno de los desinfectantes más usados (no pura, sino como derivados). El fenol puro se utiliza como referencia de poder de desinfectantes. Es un ácido débil. Se emplea diluido en agua o alcohol al 2-5%. Al agregarles radicales, se aumenta la polaridad del OH y así la molécula se hace por un lado muy lipofílica lo que permite solubilizarse en la membrana bacteriana y por otra parte, muy hidrofílica por lo que puede actuar sobre componentes del citoplasma. (Vignoli, 2006).

1.7 Generalidades sobre Actividad Antibacteriana

1.7.1 Microorganismos generadores de ETA's

Se considera a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), como una importante carga de enfermedad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en países menos desarrollados, las ETA son la principal causa de enfermedad y muerte, asociadas a una carga socio-económica significativa (Olae, 2012).

Las ETA's pueden manifestarse a través de:

- Infecciones transmitidas por alimentos: son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos. Por ejemplo: salmonelosis, hepatitis viral tipo A y toxoplasmosis.
- Intoxicaciones causadas por alimentos: ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado.
- Toxi-infección causada por alimentos: es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades las

cuales son capaces de producir o generar toxinas una vez que son ingeridos. Ej.: cólera. (Rosas 2012)

1.7.1.1 *Escherichia Coli* no patógena

La *E. coli* como se muestra en la FIGURA 8 es una bacteria que compone el 80 % de la flora intestinal, donde está naturalmente presente. Impide que otras cepas de bacterias patógenas (causantes de enfermedades) colonicen la flora intestinal y participa en la producción de la vitamina k, que ayuda a la coagulación sanguínea.

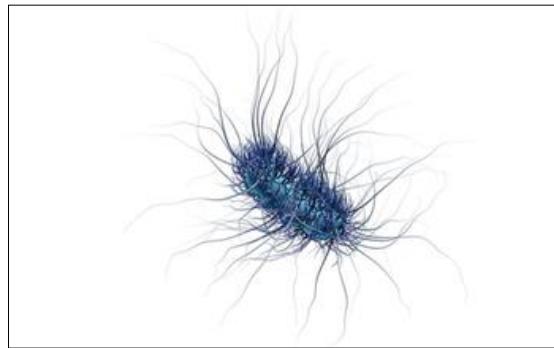


FIGURA 8. *Escherichia coli*

Aunque generalmente son inofensivas, algunas *E. coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y el medioambiente.

E. coli, es una bacteria que se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su alta presencia en el intestino, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos. Consideradas comensales inofensivos, las cepas de *E. coli* constituyen alrededor del 1% de la población microbiana normal del intestino. Si bien la mayoría de las cepas dentro del intestino son agentes patógenos gastrointestinales beneficiosos para el ser humano, también existen otros que son muy perjudiciales (FAO, 2012).

1.7.1.2 Síntomas *Escherichia Coli* No patógena

Las diferentes cepas de *E. coli* que producen enfermedades se clasifican de acuerdo con el tipo de síntomas que pueden producir en los seres humanos. La *E. coli*, Provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta una grave que se suma con sangre. En casi el 10% de los pacientes (especialmente niños pequeños y adultos mayores), la infección puede transformarse en una enfermedad con riesgo vital, como el síndrome hemolítico urémico (SHU) (FAO, 2012).

1.7.1.2 *Escherichia coli* 0:157

Las *E. coli* patógenas se caracterizan de acuerdo con el tipo de síntomas clínicos que producen. La patogenicidad es determinada por su genoma. Las *E. coli* fácilmente pueden intercambiar genes y generar variaciones de enfermedades.

Las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad de provocar graves enfermedades como resultado de su información genética para la producción de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de células huéspedes, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos.

1.7.1.2.1 Síntomas *E. coli* 0:157

Las *E. coli* patógenas son excretadas en las heces de huéspedes enfermos o sanos.

Las diferentes cepas de *E. coli* que producen enfermedades se clasifican de acuerdo con el tipo de síntomas que pueden producir en los seres humanos. Estos tipos de cepas se pueden dividir en seis grupos o variedades, a pesar de que las características no son exclusivas y pueden ser compartidas por más de un grupo (variedad). La *E. coli shigatoxigénica* (STEC) es una de estas variedades. Provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta una grave con sangre. En casi el 10% de los pacientes (especialmente niños pequeños y adultos mayores), la infección puede transformarse en una enfermedad con riesgo vital, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). Las *E. coli enterohemorrágicas* (EHEC) son un subconjunto de STEC asociadas generalmente a diarrea con sangre y SHU, que producen citotoxinas, conocidas como verotoxinas (VT) o shigatoxinas (Stx). En relación con la salud

pública, la cepa de *E. coli* (O157:H7) es el serotipo EHEC más importante ligado a las enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muertes por enterohemorrágicas cada año (FAO, 2012).

1.7.1.3 *Salmonella Enteritidis*

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos rectos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos (FIGURA 9). *Salmonella* tiene 2 especies *Salmonella*; entérica con 6 subespecies (*entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) y *Salmonella bongori*; el género *Salmonella* posee en la actualidad más de 2500 serovariedades diferentes, contenidos en el Esquema de Kauffmann- White, publicado por el “Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París, institución responsable de mantener actualizada la diferenciación taxonómica.

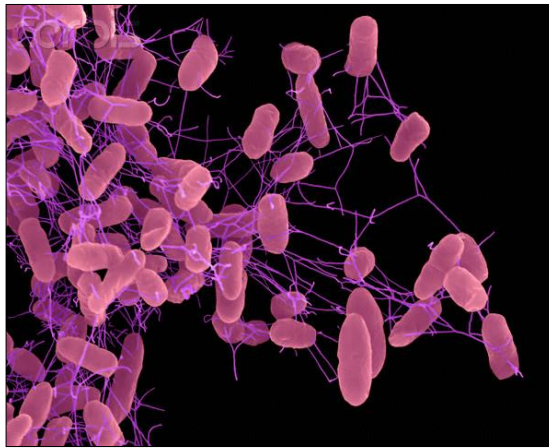


FIGURA 9. *Salmonella Enteritidis*

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se les encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Las serovariedades se pueden clasificar en tres

grupos: 1) que no tienen preferencia por un huésped específico, infectan tanto a hombres como a animales; 2) que infectan solo al hombre, y 3) adaptados a un huésped no humano.

1.7.1.3.1 Síntomas *Salmonella Enteritidis*

Instituto de Salud Pública (2010) indica que la enfermedad se caracteriza por un cuadro agudo de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos, por lo general está limitada a síntomas gastrointestinales que evolucionan satisfactoriamente al cabo de unos días. Ocasionalmente pueden presentarse cuadros más graves en que la bacteria invade el torrente sanguíneo ocasionando cuadros sistémicos que pueden llegar a comprometer otros órganos como meninges, pulmón, riñón y huesos.

1.7.1.4 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (FIGURA 10). Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los *estafilococos* producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), característica utilizada para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos.



FIGURA 10. *Staphylococcus aureus*

Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos.

Estudios recientes demuestran que el género *Staphylococcus* se encuentra más cercano a los géneros *Bacillus* y *Streptococcus*. El género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la flora de otros mamíferos y aves.

Algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza. Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *S. aureus* y *Staphylococcus lugdunensis*; en tanto que en animales se encuentra además de *S. aureus* a *Staphylococcus intermedius*. (Kloss, Sahleir y Gortiz. 1992), Kloss y Bamerman (1995) indican que el *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus saprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo éstos menos infecciosos que *S. aureus* (Lowy et al., 1998).

1.7.1.4.1 Síntomas *S. aureus*

Las infecciones causadas por *S. aureus* se producen por lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración de la bacteria desde la piel a los tejidos profundos. Las infecciones por *S. aureus* son supurativas y tienden a producir abscesos (Tabla 2). Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales.

En la tabla 2 se pueden encontrar factores de virulencia, la acción de los factores de virulencia, genes que codifican estos factores y posteriormente los síndromes y síntomas clínicos presentación por infecciones con *Staphylococcus Aureus*.

Tabla 2. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Factores de virulencia de <i>Staphylococcus Aureus</i>			
Factor de virulencia	Acción de los factores de virulencia	Genes que codifican los factores de virulencia	Síndromes clínicos
MSCRAMMS Factor de agregación (clumping factor), proteínas de unión a: fibronectina, colágeno y sialoproteínas de unión a hueso.	Unión a diferentes proteínas del hospedero.	Del hospedero clfA, clfB, fnbA, fnbB, cna, sdr, bbp.	Endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, infecciones de prótesis, catéteres y sondas.
Biofilm (biopelícula), acumulación de polisacárido, formación de pequeñas colonias (variantes).	Involucradas en la acumulación de polisacárido, adhesión, persistencia, colonización e invasión a otros sitios del cuerpo.	Ica, hemB.	Fibrosis quística, infecciones recaídas.
Proteína A, cápsula serotipos 5 y 8, leucocidina Panton-	Involucradas en la evasión y destrucción de las	Luk-PV, lukF-PV, hlg, cap5, psm- α , chp, eap.	Infecciones de piel y tejidos blandos,

Valentine (PVL), modulinas solubles en fenol, proteínas inhibidoras de la quimiotaxis, toxina-g.	defensas del sistema inmune del hospedero.		neumonía necrotizante (cepas adquiridas en la comunidad), abscesos.
Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasas C, elastasas (metaloproteasas), coagulasa.	Involucradas en la invasión y penetración a los tejidos del hospedero.	v8, hysA, hla, plc sepa, arc.	Destrucción de tejidos e infecciones metastásicas.
Enterotoxinas, toxina del choque tóxico-1(TSST-1), toxina exfoliativa A y B, toxina α -peptidoglicano, ácidos lipoteicocicos.	Involucrado en el desarrollo de diferentes enfermedades y sepsis.	Sea-q (no sef), tstH, eta, etb, hla.	Intoxicación alimentaria, envenenamiento, síndrome del choque tóxico, síndrome piel escaldada, impétigo y sepsis.
Bacteriocinas, ACME.	Inhibición de otras bacterias, inhibición de los radicales de O ₂ .	Conjunto de genes arc, genes opp-3, bsa.	Inhiben factores del sistema inmune.

1.7.1.5 *Bacillus cereus*

B. cereus es una bacteria perteneciente al género *Bacillus*. Vista al microscopio, es un bastón alargado, gram positivo que es mótil por medio de flagelo peritricos. Las células son de 1,0-1,2 μm en el diámetro x 3,0-5,0 μm de largo. Una endospora simple puede formarse en posición central o paracentral sin hinchar el esporangio (FIGURA 11).

El organismo esporula libremente en muchos medios bajo condiciones bien aireadas, aunque las células vegetativas pueden crecer anaeróbicamente. *B. cereus* es capaz de utilizar glucosa, fructuosa y trehalosa pero no las pentosas ni muchos azúcares alcoholes. La mayoría de las cepas hidroliza activamente el almidón, la caseína y la gelatina.



FIGURA 11. *Bacillus cereus*

Existen muchas razones que pueden explicar los problemas causados por *B. cereus*. Este es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente y que puede contaminar fácilmente cualquier sistema de producción y procesamiento de alimentos. Debido a la formación de endosporas, esta bacteria puede sobrevivir a la pasteurización y el calentamiento, incluso a la irradiación con rayos gamma, usados para reducir los patógenos en los alimentos.

1.7.1.5.1 Síntomas *Bacillus cereus*

Se ha demostrado que este microorganismo produce siete tipos de toxinas: la cereulida (toxina emética), la cual ha sido ampliamente caracterizada en los últimos años. Agata, Ohta, Mori Y Isobe (1995) plantean que hay tres enterotoxinas (hemolisina BL o HBL, no-hemolítica o NHE y enterotoxina T o EntT), (Andersen, Skeie, Sorhaug y Labgsrud. 2001) las cuales lo hacen responsable de dos síndromes, el síndrome emético y el diarreico, además de tres fosfolipasas (Mckillip et al., 2000).

En este sentido, la cantidad de expresión de toxinas de *B. cereus* depende del medio de cultivo, así como de factores como el pH, aireación y presencia y concentración de ciertos carbohidratos.

Wijnands, Dufrenne y Van Leusden (2001) indican que el síndrome emético está caracterizado por náuseas agudas y vómitos similares a los producidos por intoxicación con *Staphylococcus aureus*. Estos síntomas se desarrollan notablemente entre 1-5 h después del consumo del alimento contaminado conteniendo la toxina preformada. Ésta es un dodecadepsipéptido llamado cereulida que provoca emesis al estimular la vía vago aferente a través de su unión con el receptor de la serotonina.

La forma diarregénica de la intoxicación con *B. cereus* se desencadena por la acción de al menos dos tipos de enterotoxinas de tres componentes producidas durante la fase exponencial del crecimiento vegetativo de la bacteria, en el intestino delgado del huésped (Beecher, Schoeni, Wong y Cols., 1995).

1.7.1.6 *Listeria innocua*

Listeria innocua es una de las seis especies pertenecientes al género *Listeria*. Se encuentra ampliamente en el medio ambiente (como el suelo) y fuentes de alimentos. Puede sobrevivir en pH, temperaturas extremas y alta concentración de sal (Buchrieser, Cossart, Kunst, Glaser and Rusniok. 2003).

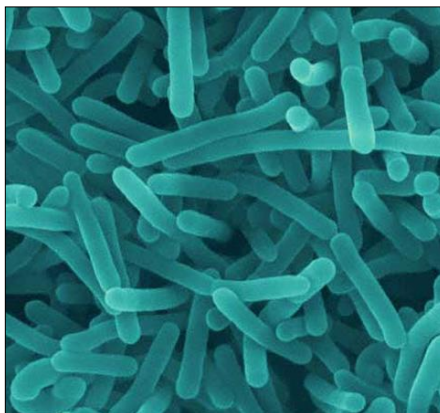


FIGURA 12. *Listeria innocua*

En términos de apariencia, es una bacteria Gram-positiva en forma de varilla, no formadora de esporas. Puede vivir individualmente u organizarse en cadenas con otras bacterias *Listeria innocua*. Es un mesófilo, funcionando en un rango óptimo de la temperatura de 30-37 grados de Celsius. *Listeria innocua* se parece mucho a sus otros miembros de la familia, es decir, la patógena *Listeria monocytogenes* (Buchrieser, Cossart, Kunst, Glaser and Rusniok. 2003). *Listeria innocua* es importante porque es muy similar al patógeno transmitido por los alimentos *L. monocytogenes*, pero de carácter no patógeno. Así, su genoma fue secuenciado con el fin de compararlo con el genoma de *L. monocytogenes* para saber lo que hace que este último patógenos.

Listeria innocua, al igual que otros miembros de su género, son anaerobios facultativos, lo que significa que pueden metabolizar la glucosa (y otros azúcares simples) en condiciones aerobias y anaerobias. Bajo el metabolismo aeróbico de la glucosa, *L. innocua* forma ácido láctico y ácido acético. Sin embargo, en condiciones anaerobias, el metabolismo de la glucosa sólo produce ácido láctico (Brooks, Daneshvar, M., Malcolm, Pine. 1998).

1.7.7.1 Síntomas *Listeria innocua*

Listeria innocua, como su nombre indica, es inofensiva para otros organismos. Le falta el locus de virulencia de 10 kb que se necesita para la patogenicidad. De las seis especies de *Listeria*, sólo *L. monocytogenes* provoca una enfermedad llamada listeriosis en especies humanas y animales (Jemmy and Stepahn et al., 2006). La listeriosis tiene una alta tasa de letalidad y se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte por intoxicación alimentaria. La capacidad de *L. monocytogenes* para resistir a condiciones de procesamiento de alimentos y temperaturas de refrigeración, la convierte en una amenaza para la salud pública a través de la contaminación de carne, aves, mariscos y productos lácteos (Jemmy and Stepahn et al., 2006).

Algunos síntomas asociados con listeriosis incluyen fiebre, dolores musculares, diarrea, vómitos y náuseas. Si la infección se ha propagado al cerebro o la columna vertebral, los síntomas adicionales incluyen confusión, rigidez del cuello, dolor de cabeza y pérdida de equilibrio. Por su parte, las mujeres embarazadas, neonatos, ancianos y personas con sistemas inmunológicos deprimidos son más susceptibles a la listeriosis, que se manifiesta como

septicemia, meningitis o meningoencefalitis. Además, en mujeres embarazadas, la enfermedad puede provocar abortos espontáneos (Jemmy and Stepahn et al., 2006).

1.8 Extracción de compuestos fenólicos con solventes

La extracción por solventes es una operación de transferencia de masas en un sistema de 2 fases líquidas, que consiste en usar un solvente (un líquido capaz de disolver otra sustancia) para separar o retirar una sustancia de interés o un contaminante de manera selectiva.

La separación de un compuesto por extracción con solvente se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida. El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. La extracción de polifenoles se realizará según una extracción química en la cual se utilizó agua y etanol, las concentraciones utilizadas fueron las mejores en cuanto a tesis realizadas anteriormente por Velázquez (2014) y Zwirtes (2015).

1.9 Métodos de preservación de extractos líquidos

1.9.1 Secado por atomización (Spray drying)

El secado por atomización ha sido una tecnología ampliamente usada por la industria debido a su reproducibilidad y economía. Su aplicación principal se ha usado para enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas. El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión que contenga al compuesto a encapsular y el material polimérico, el cual es pulverizado sobre un gas caliente que generalmente es aire, promoviendo así la evaporación instantánea del agua, permitiendo que el principio activo presente quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Las micropartículas en polvo obtenidas son separadas del gas a bajas temperaturas. Una de las grandes ventajas de este proceso es, además de su simplicidad, que es apropiado para materiales sensibles a altas temperaturas debido a que los tiempos de exposición son muy cortos (5 a 30 s) (Martín-Villena *et al.*, 2009; López-Hernández, 2010).

A pesar, que la suspensión o emulsión a pulverizar con la técnica de secado por atomización se ha limitado a formulaciones acuosas, trabajos recientes han demostrado que la combinación de distintos biopolímeros de fuentes naturales como las gomas (carregenato, goma arábica y alginato), proteínas (suero, caseinatos y gelatina), maltodextrinas, dextrosas, ceras y sus mezclas, crean nuevas matrices poliméricas altamente versátiles, y que por tanto, facilitan ser empleadas con otras formulaciones. La preparación de microparticulas con esta técnica requiere primeramente, la selección del tipo de atomizador considerando la viscosidad de la solución, así como el tamaño de gota deseado a fin de generar la mayor superficie de contacto entre el aire caliente y el líquido, la forma de contacto entre las gotas y el aire caliente, dependiendo de la sensibilidad al calor del producto, el tiempo de contacto gota-aire, la temperatura del aire y por último el tipo de método de separación de los sólidos secos (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Básicamente su aplicación con alginato se resume en tres etapas: dispersión del principio activo en el alginato, atomización de la mezcla y deshidratación (Zuidam y Shimoni, 2010).

1.9.2 Recubrimiento de extractos secos en lecho fluidizado

La fluidización es el fenómeno por el cual un lecho de partículas sólidas se suspende en el seno de un gas o un líquido, adquiriendo un comportamiento semejante al de un fluido, es decir, si un fluido en movimiento ascendente a baja velocidad atraviesa un lecho de finas partículas, en principio éste se filtra a través de los espacios de entremedio que permanecen estacionarias; este estado se denomina de lecho fijo (FIGURA 13(a)). En cambio, con un incremento en la velocidad del fluido, las partículas se mueven de forma independiente por medio de pequeñas vibraciones. Si se sigue aumentando la velocidad, se alcanza un punto donde todas las partículas se encuentran suspendidas por el flujo ascendente de gas o líquido. En este punto la fuerza de fricción entre el fluido y las partículas se equilibra con el peso de éstas, desapareciendo entonces la componente vertical de la fuerza de compresión entre partículas adyacentes. De este modo, la pérdida de carga a través de un volumen determinado de lecho es igual al peso de las partículas existentes por unidad de área.

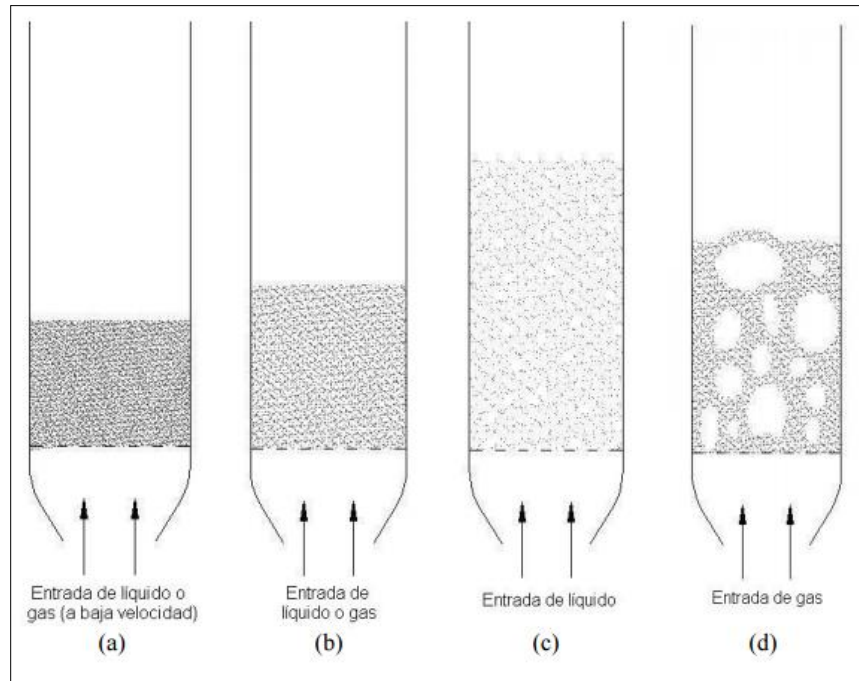


FIGURA 13. Distintos modos de contacto entre el lecho de partículas y el fluido [1]:

- (a) Lecho fijo; (b) Lecho en comienzo de fluidización; (c) Lecho con fluidización no burbujeante; (d) Lecho con fluidización burbujeante.

Este estado se denomina de lecho en comienzo de fluidización (FIGURA 13 (b)) y marca la transición entre el lecho fijo y el lecho plenamente fluidizado. La velocidad superficial del fluido en este punto se denomina velocidad de mínima fluidización (U_{mf}). En sistemas fluidizados por líquido, un incremento en la velocidad por encima de la correspondiente a la mínima fluidización, normalmente da lugar a una suave y progresiva expansión del lecho. Las posibles inestabilidades provocadas por un flujo irregular se amortiguan y, en condiciones normales, no se observan heterogeneidades ni formación de burbujas en el lecho. Uno con estas características se denomina fluidización particulada, no burbujeante u homogénea (FIGURA 13(c)). En sistemas fluidizado por gas resulta poco frecuente observar este comportamiento de fluidización homogénea, teniendo lugar sólo en ciertos casos de partículas muy ligeras con gas denso a alta presión. Generalmente, el comportamiento de los sistemas fluidizados por gas es bastante diferente.

Es así como al producirse un incremento en la velocidad del gas por encima de la correspondiente a la mínima fluidización, se observan grandes inestabilidades con aparición de burbujas y canales. A mayores velocidades, la agitación pasa a ser más violenta y el movimiento de las partículas más vigoroso; además, el lecho no se expande mucho más de su volumen de mínima fluidización. Un lecho con este comportamiento se denomina de fluidización agregativa, burbujeante o heterogénea (FIGURA 13(d)).

1.9.3 Tipos de polímeros utilizados como recubrimiento

Dependiendo del compuesto a encapsular, se pueden seleccionar materiales encapsulantes naturales y sintéticos. Estos deben tener una buena solubilidad, buenas propiedades emulsificantes, además de poseer baja viscosidad en soluciones concentradas. Se han utilizado diferentes agentes encapsulantes para la microencapsulación por secado por atomización, estos incluyen polisacáridos (almidón, maltodextrinas de diferente equivalente de dextrosa (DE), jarabes de maíz), gomas (goma arábica), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, caseína, suero de leche, soya y trigo), siendo las maltodextrinas las más utilizadas (Krishnan et al., 2005a b; Lokuwan, 2007; Saénz et al., 2009). Las maltodextrinas permiten obtener una buena retención y estabilidad oxidativa de los aceites, pero tienen escasa capacidad emulsificante (Gharsallaoui et al., 2007), por lo cual usualmente se mezclan con proteínas y gomas.

El almidón es un biopolímero sintetizado por las plantas, compuesto por dos unidades (amilosa y amilopectina), es de bajo costo, de gran disponibilidad y resiste el procesamiento térmico (Kaplan, 1998). Algunos estudios han utilizado almidón modificado (octenil succinato) como alternativa para reemplazar total o parcialmente la goma arábica que tiene un costo mayor (Trubiano y Lacourse, 1988; Sootitawat et al., 2005; Shaikh et al., 2006; Kanakdande et al., 2007). Capsul® es un almidón modificado químicamente, derivado de maíz ceroso, que incorpora en su estructura un componente lipofílico. Presenta propiedades emulsificantes, por lo cual es útil para obtener emulsiones del tipo aceite en agua de alta estabilidad (Reineccius, 1991; Shahidi et al., 1993; Marchal et al., 1999; Finotelli y Rocha, 2005). Por otra parte, su baja viscosidad permite la preparación de emulsiones con alto contenido en sólidos, obteniéndose micropartículas con alta retención del compuesto activo

(Kolanowski et al., 2004; Jonsdottir et al., 2005). El Capsul® se ha utilizado principalmente en la encapsulación de sabores, aromas, vitaminas y especias.

HIPÓTESIS

Es factible desarrollar extractos secos con propiedades antioxidantes y antibacterianas de cascara y semilla de palta Hass (Persea americana) recubiertos con almidón modificado

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar extractos secos con capacidad antioxidante y antibacteriana a partir de extractos polifenólicos líquidos de cáscara y semilla de palta Hass, mediante recubrimiento con almidón de maíz modificado (Capsul) en lecho Fluidizado.

Objetivo específicos

- 1- Caracterización proximal, lipídica y de componentes insaponificables de la cáscara y semilla de palta Hass.
- 2- Obtención de extractos crudos de cáscara y semilla de palta Hass mediante extracción con mezcla etanol: agua (50/50 v/v) (75/25 v/v) y cuantificación de sus polifenoles totales.
- 3- Secado por aspersión de los extractos crudos de cáscara y semilla de palta Hass y su microencapsulación con el agente encapsulante Capsul mediante sistema de lecho fluidizado.
- 4- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos líquidos y microencapsulados de cáscara y semilla de palta Hass.
- 5- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos líquidos y microencapsulados frente a las cepas de microorganismos específicas; *E.coli* (no patógena), *E.coli* 0:157, *Salmonella Enteritidis*, *S.aureus* ATTC, *B.cereus* y *Listeria inocua*.

Capítulo II

2 Material y Métodos

2.1 Materia prima

La materia prima usada, cáscara y semilla de palta, corresponden a residuos obtenidos de la *Agroindustria Razeto Limitada*, quien actualmente produce aceite de Palta. Esta agroindustria está localizada en la ciudad de Quillota, V Región de Chile.

2.2 Preparación de las muestras

Al tener los residuos de paltas se procedió a extraer la cáscara y la semilla, posteriormente se lavaron para limpiar el excedente de pulpa. Las muestras de cáscara y semillas extraídas fueron molidas en una mini-pimer marca PHILIPS NL9206AD-4 de 650 Watts. Posteriormente, estas fueron congeladas a -80°C por 24 h, sometiéndolas al frío mediante la difusión de secado en bandejas (45 cm x 90 cm) con un espesor de 2-3 mm.

2.3 Secado muestras por liofilización

La cáscara molida se liofilizó a -30°C , y se secará en un sistema en frío de liofilización (Modelo Lyodried LT5B, sistema Lyophilization, EE.UU.). El secado se realizó a 200-300 μm de vacío con una temperatura de secado programado desde -20°C a 25°C . Una vez secadas las muestras, se sometieron a una segunda molienda y un tamizado con tamiz n° 20 hasta quedar todas las partículas en un tamaño de 0.8 mm aproximadamente.

En la FIGURA 14 se podrá observar la metodología de trabajo utilizada en la investigación.

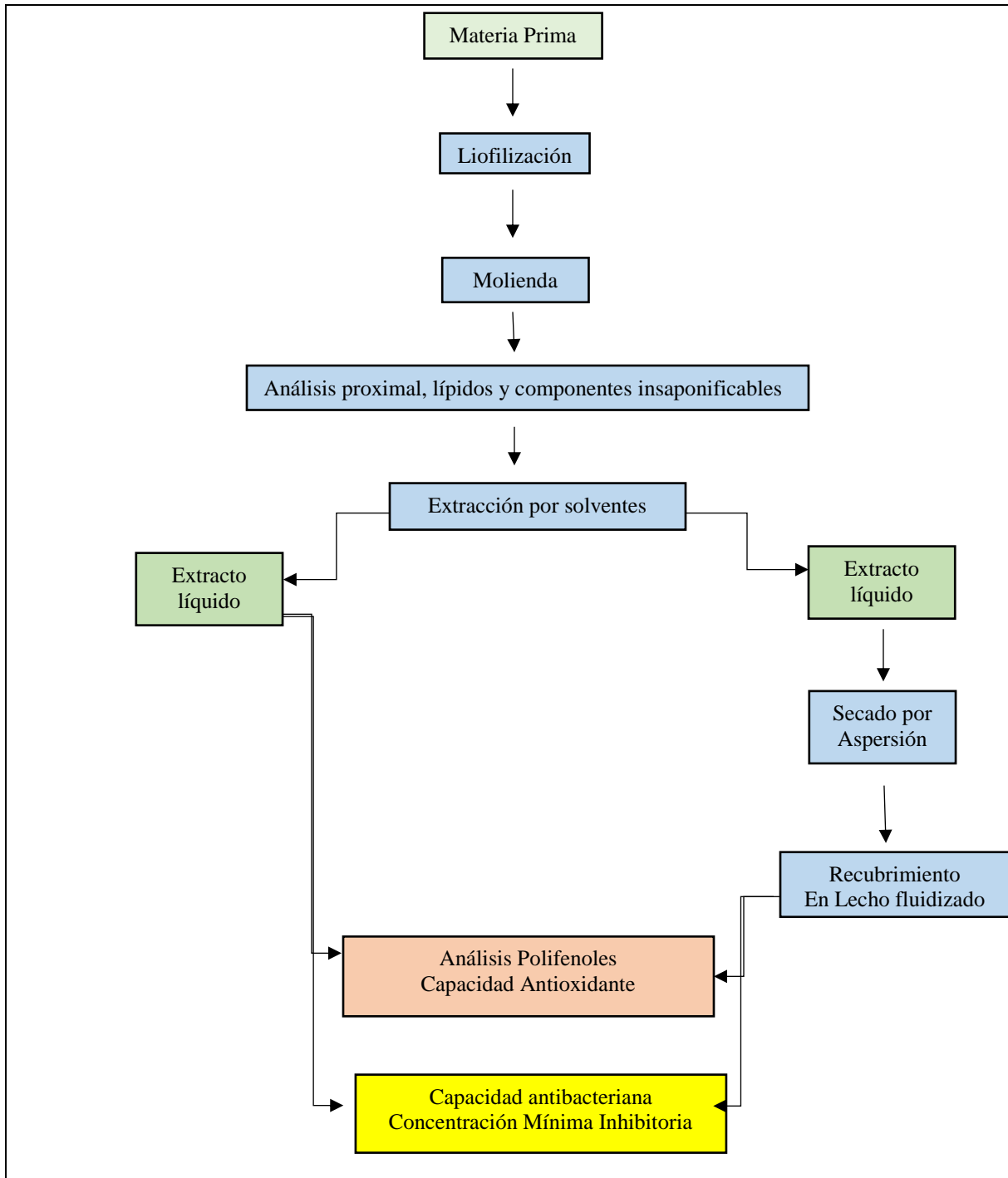


FIGURA 14. Metodología utilizada en la investigación.

2.4 Extracción química de polifenoles

Estas extracciones fueron realizadas mediante una extracción sólida: líquido utilizando solventes hidrofílicos para lo cual se aplicarán mezclas de agua y etanol. Las relaciones de solvente y peso de muestra utilizadas se determinaron previamente mediante una optimización según método de diseño experimental estadístico propuestos por Velázquez (2014) y Zwirtes (2015). Las relaciones de mezclas de solvente ensayadas son las presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la extracción por solventes

	Peso muestra (gramos)	Concentración etanol/agua	Tiempo de agitación
Cáscara	3,33	50/50	1 hora
Semilla	3,33	75/25	2 horas

2.5 Secado por aspersión

El secado de los extractos fenólicos se realizó con el objetivo de obtener 6 muestras diferentes correspondientes a la siguiente nomenclatura que se utilizar más adelante;

- 1.- CSC: Extracto de cáscara secado por spray dried sin adición de capsul
- 2.- SSC: Extracto de semilla secado por spray dried sin adición de capsul
- 3.- CEA: Extracto acuoso de cáscara
- 4.- SEA: Extracto acuoso de semilla
- 5.- CCC: Extracto de cáscara secado por lecho fluidizado con adición de capsul
- 6.- SCC: Extracto de semilla secado por lecho fluidizado con adición de capsul

Se prepararon 400 mL de cada extracto de semilla de palta Hass. Éstos fueron secados en secador spray (SD-06AG Laboratory Spray Dyer, Labplant, UK) a la temperatura de 150

°C, siendo el caudal de alimentación (V_q : 485 mL/h), velocidad del ventilador (V_v : 3.9 m/s) y velocidad de atomizador (Deblocker V_d : Medio) constantes. El Deblocker es el sistema en donde se realiza el proceso de atomización por pistón. La relación de temperatura a 150°C de secado se obtuvo previamente mediante una optimización según método de diseño experimental estadístico propuestos por Cisterna (2015)



FIGURA 15. Secador por aspersión SD-06AG Laboratory Spray Dyer, Labplant, UK.

Una vez terminado cada proceso de secado, se guardarán los extractos secos en frascos (Schott, Alemania) envueltos en aluminio y sellados herméticamente, para su posterior cuantificación de polifenoles totales.

2.6 Recubrimiento con Capsul en lecho fluidizado

Una vez obtenido los extractos puros y secos por aspersión estos fueron humedecidos y microencapsulados con Capsul®. Esto es un agente encapsulante en base a almidón de maíz modificado. Se utilizó una proporción de extracto/agente encapsulante de 1:3 (p/p) Capsul® (0.12 gramos de extracto seco por aspersión se le agrega 15 ml de agua, por cada 0.12 gramos se triplica la cantidad de Capsul®), se añadió al extracto puro a temperatura ambiente y fue sometido a un tiempo de agitación de 10 minutos para su homogenización y posteriormente la mezcla fue secada en el sistema de lecho Fluidizado (AGSENS, Burkard FBD-200S) a una temperatura de 35°C y por un tiempo de 20 min. Los gramos de extraco por ml de agua,

tiempo y temperatura, también fueron utilizados en base al diseño experimental estadístico propuestos por Cisterna (2015)



FIGURA 16. Lecho Fluidizado AGSENS, Burkard FBD-200S

2.7 Rehidratación de los extractos microencapsulados

Posterior a lo mencionado anteriormente, el extracto microencapsulado fue rehidratado con agua destilada agitándolo (Agitador Magnético Lab Disc, Ika-Werke, Alemania) a temperatura ambiente por un tiempo de 10 minutos hasta que el extracto seco quede completamente rehidratado. Para esto se tomó un 25% del total de peso seco obtenido. Una vez homogenizado el extracto se realizó los respectivos análisis de cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante para determinar si estas características se ven disminuidas significativamente por los procesos de secado aplicados, la rehidratación se hizo en base procedimiento realizado por Cisterna (2016), el realizó diferentes pruebas experimentales en base a volumen de agua (mL) y a temperatura de secado obteniendo el valor óptimo para cada rehidratación.

2.8 Análisis químicos y microbiológicos

2.8.1 Análisis proximal de la cáscara y semilla de Palta Hass

- **Humedad:** se realizó según el método descrito por la AOAC (1995), el cual consiste en una desecación en estufa con aire caliente a 105°C, hasta que las cáscaras de palta alcancen peso constante (n° 1).
- **Cenizas:** para la cuantificación de cenizas se utilizó el método gravimétrico 920 153 AOAC (1995). La técnica se basa en la calcinación o mineralización de la muestra y posterior determinación gravimétrica del residuo (Anexo N°2).
- **Proteínas:** la metodología empleada es kjeldahl AOAC (1995). Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, dando como resultado sulfato de amonio, el cual en presencia de hidróxido de sodio libera amoniaco (Anexo N°3).
- **Carbohidratos:** determinación colorimétrica por el método de la antrona, previa hidrólisis con ácido perclórico. (Anexo N°4).
- **Lípidos:** método de extracción Bligh y Dyer (1959), Manual métodos de análisis físicos-químicos de alimentos, aguas y suelos del instituto de salud pública (ISP), 1998 (Anexo N°5).

2.8.1.1 Análisis de la fracción lipídica de cáscara y semilla

En base a los resultados obtenidos por Velázquez (2014) y Zwirtes (2015), al aceite extraído de la cáscara y semilla se le realizaron dos análisis, los cuales se desarrollaron por triplicado para determinar los siguientes compuestos:

- **Ácidos grasos:** A.O.C.S. Ce 1-62. 1993. Fatty Acid Composition by Packed Column Gas Chromatography. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists` Soc, 3th Edition, Champaign, Illinois. USA. (Anexo 6)
- **Tocoferoles:** A.O.C.S. Ce 8-89. 1993. Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC. Official Methods and Recommended

Practices of the American Oil Chemists` Soc, 3th Edition, Champaign, Illinois. USA. (Anexo 7).

2.8.1.2 Determinación de carotenoides

Se determinó el contenido de Luteína y β -caroteno mediante las siguientes etapas: extracción con acetona en Ultraturrax, partición del extracto a éter etílico/ éter de petróleo, concentración en evaporador rotatorio ($< 35^{\circ}\text{C}$) y posterior cuantificación mediante espectrofotometría por triplicado, según el método propuesto por Rodríguez-Amaya (2010). (Anexo 8).

2.8.2 Determinación de fenoles totales por método Folin Ciocalteau

Se determinará el contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos según el método Folin-Ciocalteau (Borden y Scarpa; 2000). Este mide la capacidad reductora total de una muestra que contiene los compuestos fenólicos que protegen de la oxidación del reactivo Folin-Ciocalteau (mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico), lo que da una coloración azul. Esto es medido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Previo a lo anterior, se prepara una curva patrón de ácido gálico la que se utiliza para transformar los datos a EAG mg/L, permitiendo cuantificar los fenoles presentes (Anexo 9) , para el caso de los extractos microencapsulados se realizó una dilución del 25% del peso post secado en 15 ml de agua. Los resultados obtenidos para los extractos líquidos y microencapsulados fueron comparados entre sí para determinar si estas características se ven disminuidas significativamente por los procesos de secado aplicados. Para la semilla se utilizó la siguiente proporción: por cada 3.33 gramos de muestras se agregó 75% de etanol y 25% de agua y para la cáscara 50% etanol y 50% de agua. Del extracto obtenido se tomó 0.1 ml de muestra y se procedió con el análisis.

2.8.2.1 Capacidad antioxidante

Se realizó la determinación de la capacidad antioxidante por el siguiente método:

DPPH. Se utilizó el método 2, 2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Este método descrito por Brand-Williams (1995) utiliza el radical libre estable DPPH, el cual posee una absorción medible a 515 nm que luego decrece a medida que se reduce por un compuesto antioxidante (Anexo 10). El porcentaje de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libre) se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Porcentaje (\%)} \text{ Decoloración} = 100 - (A \text{ muestra} / A \text{ control}) \times 100$$

Se considera como parámetro comparativo entre los antioxidantes, el valor de IC₅₀ definido como la concentración de extracto que decolora el 50% a la solución de DPPH (Anexo 11).

2.8.3 Determinación de la capacidad antibacteriana de los extractos

Los extractos líquidos, así como los microencapsulados rehidratados, fueron cultivados en diferentes medios con las siguientes bacterias patógenas:

1. *E.coli* (no patógena)
2. *E.coli* 0:157
3. *Salmonella Enteritidis*
4. *S.aureus* ATTC
5. *B.cereus*
6. *Listeria innocua*.

Las cepas 1, 2, 3, 4 y 5 se sembraron en Agar MH (Mueller Hinton Agar). La cepa 5 se sembró en Agar Nutritivo. La cepa 6 se sembró en Agar Palcam. A cada placa sembrada con los microorganismos se le hicieron pequeños orificios donde se agregará la disolución de cada tipo extractos.

Las disoluciones de los extractos fueron:

Blanco: corresponde el extracto sin diluir.

Primera dilución: 1/2

Segunda dilución: 1/4

Tercera dilución: 1/16

Cuarta dilución: 1/32

Quinta dilución: 1/64

Las mediciones se realizaron en base a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), por ende, se observará la presencia de halo inhibitorio en las placas sembradas.

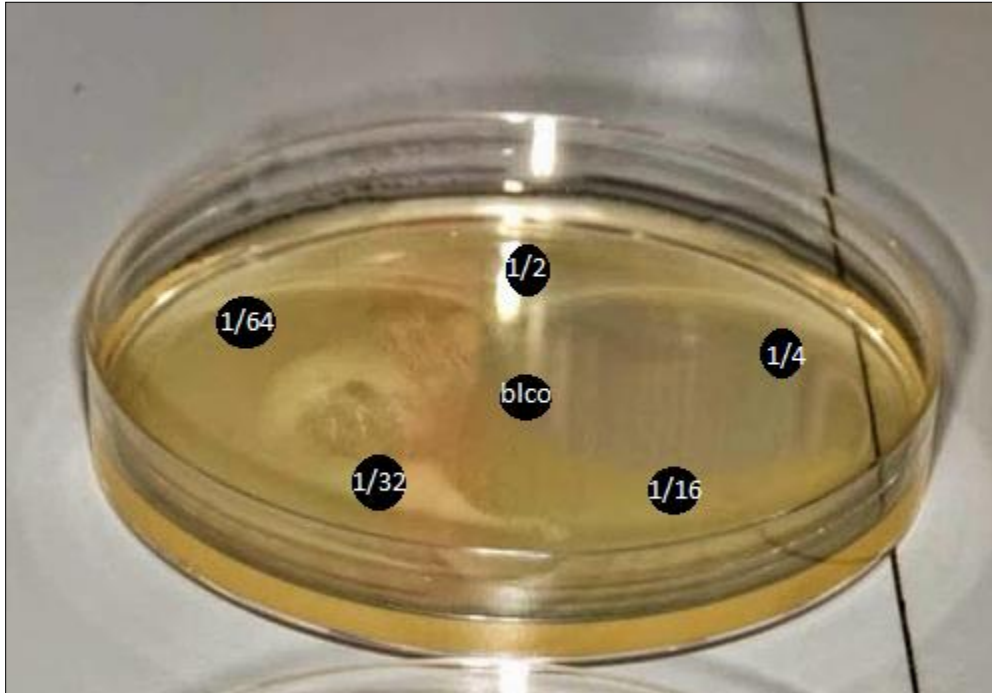


FIGURA 17. Ejemplificación de posicionamiento de orificios donde va la disolución del extracto ya sea líquido o micro encapsulado.

Los resultados obtenidos para los extractos líquidos y microencapsuladas fueron comparados entre sí para determinar si estas características se ven disminuidas significativamente por los procesos de secado aplicados.

2.9 Análisis estadístico

Se determinó la existencia de posibles diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los triplicados para un mismo análisis; para ello, se efectuó uno de varianza (ANDEVA) de una vía; en el caso que no exista diferencias ($p > 0,05$). Para analizar los resultados de la

caracterización de tipos de muestras y de extractos de fenoles, efecto antioxidante y antimicrobiano; determinando la posible existencia de diferencias significativas entre las variables de respuesta analizadas, se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XV.

Capítulo III

3 Resultado y Discusión

3.1 Composición nutricional de semilla y cáscara de palta Hass

La Tabla 4 muestra la composición química la semilla Hass (SH) de este estudio junto a la de otras semillas de diferentes variedades de palta propuesta por otros autores. A partir de los resultados, fue posible determinar que el nivel de proteína, lípidos y cenizas de semilla Hass fue mayor que el determinado por Curaqueo (2013) para semilla de la variedad chilena Negra de la Cruz. Por otro lado, la composición nutricional determinada en este estudio para semilla Hass coincide con el valor presentado por la mayoría de los nutrientes de semillas de diferentes variedades y orígenes (Rodríguez-Carpena et al., 2011, Pahua-Ramos et al., 2012, Wang et al., 2010). En general, se ha observado que la composición nutricional de los diferentes tipos de semillas es menor que la reportada para las otras fracciones de componentes de la fruta. Por ejemplo, Vinha et al., 2013 ha demostrado que el contenido lipídico de la semilla es más bajo que el de la pulpa, que puede estar entre 20 y 44% en la fruta madura pero Rodríguez.Carpena et al., 2011 propone que el contenido lipídico de su investigación puede ser igual o más alto que el de la cascara. Por otro lado, el contenido reportado para proteínas de semilla de diferentes variedades se asemeja al de la cáscara y normalmente es más alto que el reportado para la pulpa (Pahua-Ramos et al., 2012). Finalmente el contenido de carbohidratos fue muy parecido entre las semillas, con un valor promedio mayor en comparación con el que posee la pulpa, avalando un posible uso como alimento para humanos y animales (Undurraga y Col., 2008).

Tabla 4. Composición nutricional de semilla y cascara de palta Hass obtenidos en este estudio y su comparación con datos de literatura.

Variedad	Component (g/100 g sample fresh)					
	Humedad	Proteína	Lípidos	Cenizas	Carbohidratos*	Fibra
<i>Semillas</i>						
SH	57,6 ± 3,6	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,0	32,0 ± 1,7	5,0 ± 0,2
SNC Curaqueo, (2013)	58,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,3 ± 0,6	1,0 ± 0,0	33,5 ± 1,5	4,9 ± 2,7
SH Vinha et al., (2013)	54,4 ± 2,3	2,2 ± 0,1	14,7 ± 0,3	1,3 ± 0,0	27,4 ± 1,3	—
SH (Pahua-Ramos et al. (2012)	4,0 ± 0,8	4,7 ± 0,0	4,3 ± 0,8	2,2 ± 0,1	79,1 ± 0,8	6,3 ± 0,5
SF	56,0 ± 2,5	1,9 ± 0,1	1,87 ± 0,3	1,87 ± 0,2	33,1 ± 2,73	5,1 ± 1,1
<i>Cascara</i>						
CH	76,5 ± 3,5	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,3	19,3 ± 1,5	-
CH Rodríguez.Carpaena (2011)	75,9 ± 1,5	1,7 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,85 ± 0,3	20,5 ± 0,8	-
CF Rodríguez.Carpaena (2011)	76,7 ± 1,1	1,9 ± 0,3	4,3 ± 0,8	1,35 ± 0,1	15,7 ± 1,8	-

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (n = 3). SH = semilla Hass. SNC = semilla "Negra de la Cruz". SF = semilla Fuerte. *Calculado por diferencia

3.2 Composición lipídica

En la Tabla 5, se presenta el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de semilla y cascara de la palta Has. El contenido de ácidos grasos saturados fue superior en el aceite de la semilla en comparación con el de la cáscara, destacando la cantidad de ácido palmítico (C16:0) por sobre el resto, con un 22,43 %. Así también fue superior al de la pulpa de la variedad Hass, la cual posee un contenido de 11,76% de ácido palmítico C16:0 (Mella, 2015).

El aceite de la semilla y cáscara en estudio presentó una cantidad variable en el contenido de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Destacando el aceite de la semilla en el contenido de omega 9 (ácido oleico) con un 41,38% y omega-3 (ácido α linolénico) con un 5,02%, sin embargo, el aceite de la cáscara sobresalió en la composición del omega-7 (ácido palmitoleico) con un 6,77% y omega 6 (ácido linoleico) con un 33,58%. Por otro lado, se ha reportado que el aceite de semilla de palta posee una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que el de la pulpa (Undurraga y Col, 2008). Por esta razón, este aceite podría ser utilizado también en la industria de la cosmética como ingrediente en cremas para la piel y el cabello.

El aceite de la pulpa del cultivar Hass posee un valor similar de ácido palmitoleico, que el aceite de la semilla de la misma variedad, con un 3,93%, pero presenta valores mucho menores en el contenido de los otros ácidos grasos enunciados con anterioridad. También es necesario señalar, que el ácido margárico (C17:0) y ácido mirístico (C14:0) se presentaron en la cáscara y semilla respectivamente.

El contenido del ácido esteárico, oleico y linoleico presente en el aceite de las semillas en estudio, fue muy similar al expresado por Gutfinger y Letan (1974) de acuerdo al aceite de semilla de palta variedad Hass, asimismo fue semejante al contenido de ácidos grasos manifestado por Born, et al. (2001), e incluyendo los niveles expresados de ácido palmítico y linolénico para la semilla del cultivar Fuerte. Estos resultados le otorgarían a los aceites propiedades benéficas para la salud, principalmente por la cantidad de ácidos esenciales omega-6 y omega-3 que presentan, ya que estos son precursores de ácidos de mayor tamaño e instauraciones, los cuales son requeridos para el desarrollo y funcionalidad de los sistemas nervioso y visual. Por consiguiente, estas importantes características ya son utilizados para enriquecer algunos alimentos, como por ejemplo productos en polvo, los que incluyen

fórmulas infantiles, leches reconstituibles, alimentos infantiles y para la tercera edad, entre otros (Gil H., 2010). De esta manera, se podrían aislar los ácidos grasos esenciales presentes en estos aceites y ser utilizados, o encapsularse el aceite por completo y ser utilizado como suplemento alimenticio.

Tabla 5. Composición lipídica* de semilla y cascara de palta Hass

Ácidos grasos (%)	Semilla	Cascara
Saturados		
C14:0	1,05 ± 0,003	-
C16:0	18,41 ± 1,8	22,43 ± 0,6
C17:0	-	2,20 ± 0,04
C18:0	1,70 ± 0,03	3,28 ± 0,002
Total	21,16	27,91
Mono insaturados		
C16:1 ω 7	3,50 ± 0,04	6,77 ± 0,5
C18:1 ω 9	41,38 ± 0,5	28,27 ± 0,6
Total	44,88	35,04
Poliinsaturados		
C18:2 ω 6	28,94 ± 2,03	33,58 ± 0,9
C18:3 ω 3	5,02 ± 0,05	3,42 ± 0,01
Total	33,96	37,00

* Los datos se expresan como de porcentaje promedio de esteres metílicos \pm desviación estándar (n = 3)

La Tabla 6, presenta el contenido de Tocolos. Se destaca el contenido de α -tocopherol y α -tocotrienol en el aceite de la semilla y cáscara en comparación con el de los otros tocoles, sobresaliendo en los dos la cantidad presente en el aceite de la cáscara con 9816,08 ug/g y 1346,8 ug/g, respectivamente. Este valor es muy superior al que presenta en el aceite de la pulpa de la variedad Hass con 182,96 ug/g, según Campos-Hernández et al (2011), para el α tocoferol. Además, otros valores destacables son los del δ tocoferol, prevaleciendo nuevamente el aceite de la cáscara, asimismo resulta superior al 27,59 ug/g que presenta el aceite de la pulpa expresado por el mismo autor, mencionado con anterioridad.

Tabla 6. Contenido* de Tocolos de semilla y cascara de palta Hass

Tocol (ug/g)	Porción de la fruta	
	Semilla	Cascara
α tocoferol	425,7 \pm 36,1	9816,08 \pm 23
β tocoferol	---	1185,61 \pm 165
γ tocoferol	2,3 \pm 0,15	1122,1 \pm 145
δ tocoferol	19,9 \pm 1,5	3540,53 \pm 78
α tocotrienol	78,9 \pm 11,2	1346,8 \pm 148
δ tocotrienol	---	32,9 \pm 47

*Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar (n=3).

Por otro lado, el γ tocoferol se presentó tanto en aceite de semilla como en cáscara, del mismo modo el β tocoferol y δ tocotrienol, los cuales sólo se presentaron en el aceite de la

semilla. Este último tocotrienol al igual que el α -tocotrienol no se encuentran en el aceite de la pulpa de palta Hass. En síntesis, el alto contenido α tocoferol y α tocotrienol presente en el aceite de la cáscara, lo convierte en un aceite con un elevado poder antioxidante (capaces de interceptar radicales libres y así evitar una reacción en cadena), sólo comparable con el aceite de germen de trigo muy empleado dentro del campo de la cosmética (Sayago et al, 2007). De igual forma, el contenido del isómero α -tocotrienol avalaría un posible uso como un producto fitoterapéutico, debido a que aparte del poder antioxidante, también tendría otras propiedades funcionales (no antioxidantes), como la capacidad para reducir el contenido de colesterol en el plasma y es más, presenta una potente acción neuroprotectora en neuronas del sistema nervioso central (Núñez-Pizarro, 2007).

Tabla 7. Contenido de Carotenoides presentes en el extracto oleoso

Carotenoides ($\mu\text{g/g}$)	Porción de la fruta	
	Semilla	Cascara
β caroteno	$104,9 \pm 7,0^*$	$64,8 \pm 7,6^*$
Luteína*	$120,03 \pm 11,5^*$	$69,7 \pm 6,5^*$

*Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar.

El contenido de luteína y β -caroteno (Tabla 7) presente en el aceite de la semilla, fue mucho mayor en comparación con el de la cáscara. Por el contrario, el aceite de la pulpa presenta un contenido de luteína y β caroteno de 2.93 $\mu\text{g/g}$ y 0,6 $\mu\text{g/g}$ respectivamente según lo manifestado por Qing-Yi Lu *et al.* (2004). Lo que resulta muy inferior a las cantidades que presentaron los aceites en estudio. Sin embargo, los valores de referencia del aceite de la pulpa se obtuvieron mediante otro método de análisis (HPLC).

Aparte de los datos encontrados se puede inferir que el color obtenido en los extractos de las semillas (el cual era amarillo) concuerda con los otorgados por los carotenoides, ya que estas estructuras son unas de las responsables de otorgar el color amarillo a frutas y verduras.

Además, el contenido de β -caroteno (precursor de vitamina A) presente en el aceite de la semilla que se destaca, sugeriría que el consumo de éste podría llevar a sintetizar una mayor cantidad de vitamina A en el organismo, y por último, este aceite tendría un mayor poder antioxidante debido a que se ha descubierto que los carotenoides son capaces de bloquear reacciones mediadas por radicales libres, de esta manera jugaría un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas (Rodríguez-Amaya, 2001).

3.3 Polifenoles totales de los extractos de cascara y semilla

3.3.1 Contenido de polifenoles y capacidad antiradicalaria de la cáscara

El contenido de polifenoles del extracto hidroalcohólico obtenido de la cáscara de palta Hass (Tabla 8) presentó un valor de 13.9 (mg GAE/g bs) para el extracto líquido. El extracto líquido presentó un contenido semejante de polifenoles al determinado por Wang (2010). Por otro lado, Rodríguez-Carpena et al., (2011), analizó en su estudio el contenido de fenoles totales presente en tres extractos de cáscara de palta Hass, los cuales fueron: acetona (8997 mg GAE/g base seca), metanol (7841 mg GAE/g base seca) y acetato de etilo (3293 mg GAE/g base seca), en este caso se obtuvo una mayor concentración para el extracto cetónico. Estos valores encontrados por Rodríguez-Carpena sobrepasan por mucho a los valores encontrados en este estudio para el contenido fenólico de la cascara, por lo que este resultado podría deberse a diferencias, tales como: el origen o condiciones agroclimáticas del cultivo, período de cosecha, nivel de madurez de la fruta, afinidad de los compuestos fenólicos con los solventes, etc.

Chew et al., (2011), encontró que se tienen mejores resultados de extracción cuando se adiciona cierta cantidad de etanol al agua. Sin embargo, también se concluyó que una mezcla sobre un 60% de etanol reduce el rendimiento de la extracción, siendo lo óptimo un 50%; al igual como lo demostró Velásquez (2014) en sus estudios. Con respecto a los valores obtenidos de la cáscara en el estudio, se observó un aumento de un 90.9% sobre el valor obtenido por Wang W. et al., 2010.

La Tabla 8, Contenido de polifenoles y capacidad antiradicalaria (DPPH*) en cáscara y semilla obtenidos por Wang (2010) y por Rodríguez-Carpena (2011) para Cáscara y Semilla. Se puede observar que los extractos obtenidos con cascara, por liofilización y extraídos por

método de solvente, presentaron una mejor actividad antioxidante, debido a que requieren una menor concentración de fenoles para decolorar el DPPH.

Tabla 8. Contenido de polifenoles y capacidad antiradicalaria (DPPH*) en cáscara y semilla obtenidos por Wang (2010) y por Rodríguez-Carpena (2011) para Cáscara y Semilla.

Porción	Contenido total de Polifenoles (mg EAG/g)	IC ₅₀ (mg EAG/g bs)
Semilla		
<i>Asenjo (2018)</i>	72,6 ± 12,2	54,8 ± 8,2
<i>Wang, (2010)</i>	51,6 ± 1,6	164,6 ± 5,1
<i>Rodriguez-Carpena (2011)</i>		
Extracto Acetato etilo	16,9 ± 4,0	20,3 ± 7,1
Extracto cetónico	60,8 ± 8,6	69,12 ± 16,7
Extracto metanólico	35,1 ± 9,8	41,6 ± 10,4
Cáscara		
<i>Asenjo (2018)</i>	13,9 ± 2,2	51,4 ± 6,1
<i>Wang, (2010)</i>	12,6 ± 0,3	189,8 ± 10,8
<i>Rodriguez-Carpena (2011)</i>		
Extracto Acetato etilo	32,9 ± 9,2	40,54 ± 10,1
Extracto cetónico	89,9 ± 31,0	172,1 ± 14,4
Extracto metanólico	78,4 ± 24,4	137,7 ± 25,5

*Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar.

El extracto obtenido en este estudio por 50/50 v/v (etanol/agua), tiene un valor de IC₅₀ de 51.4 mg GAE/g base seca, adquiriendo resultados semejantes a los logrados por Velázquez (2014) y cercanos a los de Rodríguez-Carpena (2011).

Resultados previos (proyecto Innova 11CEII-9568, 2012) en donde se analizó la capacidad antioxidante de extractos metanólico de la cáscara de palta Hass, determinaron un IC₅₀ de 56,0 mg EAG/g levemente mayor a los obtenidos en este estudio. El solvente utilizado es determinante a la hora de cuantificar sustancias con actividad antioxidante, ya que, la afinidad de las mismas con el medio fue directamente proporcional a la cantidad y tipo de sustancias extraídas. Algunos autores han demostrado que el etanol es menos eficiente que el metanol en la extracción de sustancias antioxidantes (Iqbal y Bhangar, 2007). Burgos (2012), observó que algunos extractos etanólicos presentaron una actividad antiradicalaria menor a lo esperado.

3.3.2 Contenido de polifenoles y Capacidad antiradicalaria de la semilla

El contenido de polifenoles del extracto hidroalcohólico obtenido de la semilla de palta Hass se muestra en la Tabla 8. El valor obtenido fue de 72,6 (mg GAE/g), mientras que el valor obtenido por Wang (2010) fue de 51,6 (mg GAE/g). Por otro lado, Rodríguez-Carpena. et al., (2011) en los extractos cetónico (70/30 v/v), metanólico (70/30 v/v) y acetato de etilo, obtuvo una mayor concentración en el primero de estos con un valor de 60,82 mg GAE/g, datos menores al obtenido en este estudio, que indica un valor de 72.6 (mg GAE/g) como se indica anteriormente. Según Wang (2010) el contenido de polifenoles totales en diferentes variedades de semilla de palta oscilaría entre 19,2 a 51,6 mg EAG/g.

Por último, cabe destacar que los compuestos fenólicos que posee la semilla de la variedad Hass serían: monómeros flavanoles, proantocianidinas, ácido hidroxicinámico, según Konsinska et al. (2012) también catequinas y ácido hidroxibenzoico como indica Rodríguez-Carpena, et al. (2011).

Las variaciones en la concentración de polifenoles que presentan los extractos de semilla de un mismo cultivo, pueden deberse a las distintas zonas geográficas de cultivo de la palta, su estado de madurez, el suelo, entre otras condiciones ecológicas (Silva, 1994). Por otro lado, este resultado se debería a la diferencia del tipo de muestra, y a que en este experimento las

muestras pasaron por un pre tratamiento diferente donde los polifenoles pueden haber sido concentrados, aumentando su contenido.

Además, en estudios de extracción de polifenoles realizados en semillas de otras frutas, tales como, semilla de uva (Pekic et al., 1997), se observó el aumento significativo de las concentraciones de polifenoles cuando se utilizó una mezcla de agua con diferentes solventes en especial con acetato de etilo. Esto es atribuido a un aumento de la permeabilidad del solvente en la semilla de uva.

En general, la gran mayoría de los estudios actuales aplican la mezcla etanol/agua por la afinidad de los polifenoles con los solventes polares, por la fácil disponibilidad de estos solventes y por ser compatible con los alimentos, ya que han sido declarados GRAS (Generally Recognized As Safe) por las autoridades competentes en materia alimentaria como son la FDA, por lo cual, se consideran ideales para la utilización en la industria alimentaria (Soong y Barlow, 2004; León, 2008).

La Tabla 8 presenta además, los valores IC_{50} para extracto puro de semilla de palta Hass obtenido por extracción química. En donde se pudo observar, que el extracto obtenido por 75/25 etanol/agua en la semilla, presenta una mayor capacidad antiradicalaria (valor $IC_{50}=54.8$ meq EAG/ml) lo que indica que se necesita una menor cantidad de este extracto para poder alcanzar una inhibición del 50% de decoloración del radical DPPH. Estos valores se complementan con los análisis obtenidos por Zwirtes (2015), que obtuvo una capacidad de captura de radicales libres de $IC_{50}=49.9$ EAG/ml un poco menor a los obtenidos en los estudios actuales.

Por otro lado, Curaqueo (2012) en un estudio de caracterización de compuestos bioactivos de palta Hass y Negra de la Cruz, también encontró que la extracción con mezcla etanol/agua (50/50 v/v) obtuvo valores mejores para IC_{50} frente a los extractos conseguidos con extracción de metanol/agua (50/50 v/v).

3.4 Recubrimiento de extractos

En la FIGURA 18, se pueden observar las diferencias en cuanto a concentraciones de polifenoles totales de cascara y semilla, presente en los extractos líquidos y en los extractos secados por sistema spray y recubiertos mediante secado en lecho fluidizado.

La cantidad de polifenoles presentes en el extracto de cascara aumentan notoriamente con los procesos de secado y recubrimiento. Para la cascara como extracto líquido con un valor inicial de 138,7 mgEAG/g, luego de ser secado por spray dry llegó a un valor de 89,2 mgEAG/g y finalmente el recubrimiento con capsul en lecho Fluidizado llegó a un valor de 2117,9 mgEAG/g.

Como los mayores valores de contenido de polifenoles totales los poseen los extractos de polvo, esto se debería a que durante el proceso de secado por atomización, los polifenoles condensados y/o conjugados se hidrolizan aumentando el número de grupos hidroxilos que reaccionen con el reactivo de folin-ciocalteau (kim et al., 2006).

En el caso de la semilla como extracto líquido se obtuvo un valor inicial de 72.6 mgEAG/g, para el secado spray dry se llegó a un valor de 69.6 mgEAG/g y finalizando en lecho Fluidizado recubierto con capsul en un valor de 3867,3 mgEAG/g.

Esto se explicaría por qué durante los tratamientos térmicos se reduce el contenido de agua y se concentran los componentes bioactivos y además se generan compuestos derivados de reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos (reacción de Maillard). Estas reacciones generan distintos productos que pueden contribuir en la actividad antioxidante, sabor y color de los alimentos, y son agentes reductores que pueden ser detectados por el método Folin-Ciocalteu (Oliviero et al., 2009), por lo que, en presencia de este tipo de reacción, podríamos tener una sobreestimación del contenido de polifenoles totales.

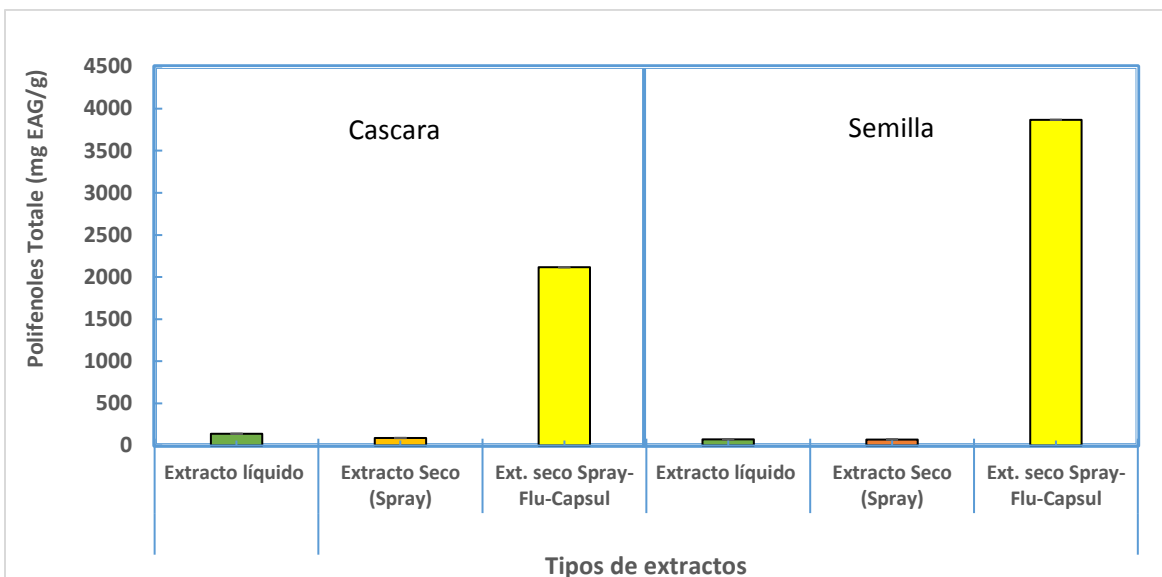


FIGURA 18. Polifenoles totales obtenidos en semilla y cáscara de palta como extracto líquido, secado con y sin encapsulante por spray y/o recubierto por lecho fluidizado. Los datos de extracto de cáscara seco por spray dried son los entregados por Fritz (2016) y de semilla secado por spray dried por Cisterna (2014).

En base a los resultados obtenidos en el análisis de estabilidad por temperatura, se esperaba una disminución de la concentración de polifenoles totales en los extractos secados por lecho fluidizado con Capsul y aspersion sin Capsul, aun así se pudo observar en base a los datos entregados por Fritz (2016) y Cisterna (2014) que hay una baja en la concentración de polifenoles cuando se trata de un tratamiento térmico que no tenga ningún recubrimiento de las partículas, aun así la técnica de recubrimiento utilizado en el lecho fluidizado ayudó a mitigar el efecto de la temperatura en la disminución de los polifenoles totales en los procesos de secado; sin embargo, éstos beneficiaron considerablemente la capacidad antioxidante de los polifenoles totales presentes, siendo el proceso de lecho fluidizado el que obtuvo el mejor valor IC₅₀ (que determina la capacidad antioxidante), aun así no hubo diferencia significativa en el tratamiento que se les dio a ambas muestras (anexo 17).

Al igual que el estudio realizado por Cisterna (2016) aquí sólo fue posible determinar el valor IC₅₀ a los extractos puros (sin Capsul®), ya que los extractos con encapsulante (Extracto de semilla microencapsulada y extracto de cáscara microencapsulada) presentaban valores

negativos, situación que en este caso, se debería a una interferencia por la presencia del compuesto encapsulante, haciendo inestable la reacción con el DPPH arrojando absorbancias erróneas.

Por otro lado, los resultados podrían ser explicados en base a un estudio realizado sobre retención de antocianinas de cáscara de berenjena por Arrazola et al. (2014), quien determinó que los valores medios de retención de antocianinas en los polvos microencapsulados con maltodextrina presentaron diferencias significativas en función del contenido de agente encapsulante (maltodextrina). Además, Silva et al. (2013) reportaron la óptima retención de antocianinas al emplear maltodextrina al 30% a una temperatura de entrada del aire de secado de 180 °C.

Tonon et al. (2010) encontraron que la maltodextrina por ser un material altamente soluble, forma partículas huecas durante el proceso de secado en el que la corteza es una matriz que contiene tanto el agente portador y el compuesto atrapado. Por lo tanto, la mayor capacidad de retención del encapsulante genera una mayor concentración de polifenoles y actividades atrapadora de radicales libres.

3.5 Aplicación de extractos en cultivos microbiológicos.

Se realizaron dos aplicaciones de los extractos, uno como extracto acuoso y otro con extracto recubierto sobre cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-). Como se indica en el punto 2.8.3 se utilizó 3 agares diferentes para Gram (+) agar MH, Gram (-) agar MH, AN y PALCAM.

Se pudo observar en la Tabla 9, que los extractos acuosos de semilla presentaron un efecto inhibitorio en todas las bacterias con unas diluciones entre 0,02 a 0,5 con un CMI de 1,135 mgEAG/g para *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y un CMI de 36,317 mgEAG/g para *E.coli no patógena*, *E.coli 0:157* y *Listeria innocua* respectivamente.

Por otro lado, el proceso de secado y recubrimiento provocó pérdida de la capacidad inhibitoria de este extracto siendo ineficiente frente a *B. cereus* y *L. innocua* siendo activa para las demás bacterias en un rango de dilución 0,13 a 0,5 equivalente a un CMI de 264,733 mgEAG/g y 1058,932 mgEAG/g.

En la tabla 10 se puede observar el cuadro de diluciones, concentraciones en mg/ml disueltas y las respectivas concentraciones de polifenoles que cada una tiene.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI; mgEAG/g) para extractos en cepas bacterianas.

		Cepas						
		<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>B.</i>	<i>L.</i>	
		<i>no</i>	<i>0:157</i>	<i>Enteritidi</i>	<i>ATTA</i>	<i>cereus</i>	<i>inocua</i>	
		<i>patógena</i>						
CMI	Extracto	Semilla	36,317	36,317	1,135	1,135	1,135	36,317
	Acuoso	Cáscara	-	17,342	-	69,369	69,369	3867,331
CMI	Extracto	Semilla	1058,932	264,733	1058,932	1058,932	-	-
	Recubierto	Cáscara	-	3867,331	-	1933,666	3867,331	-

CMI; Diluciones equivalentes mgEAG/100g

Tabla 10. Cuadro de diluciones y extractos utilizados para la aplicación sobre bacterias Gram+ y Gram-

diluciones	Semilla				Cascara			
	liquido semilla		extracto seco		Extracto liquido		Extracto seco	
	mg/ml	mgEAG/g	mg/ml	mgEAG/g	mg/ml	mgEAG /g	mg/ml	mgEAG/g
1	0,084	72,633	0,425	2117,865	0,128	138,738	0,424	3867,331
0,50	0,042	36,317	0,213	1058,932	0,064	69,369	0,212	1933,666
0,25	0,021	18,158	0,106	529,466	0,032	34,685	0,106	966,833
0,13	0,011	9,079	0,053	264,733	0,016	17,342	0,053	483,416
0,06	0,005	4,540	0,027	132,367	0,008	8,671	0,027	241,708
0,03	0,003	2,270	0,013	66,183	0,004	4,336	0,013	120,854
0,02	0,001	1,135	0,007	33,092	0,002	2,168	0,007	60,427

Los extractos acuoso de cascara, solo fueron eficaces frente a *E. coli* O:157, *B. cereus*, *St. Aureus* y *L. innocua* en un rango de dilución de 0,13 a 1 correspondiente el mejor efecto sobre *E.coli* O:157 con una dilución de 0,13 con un CMI equivalente a 17,342 mgEAG/g, sin afectar a *E. coli* no patógena y a *S. enteritidis*. En cuanto al extracto recubierto y secado por lecho Fluidizado no tuvo efecto para *E.coli no patógena*, *Salmonella* y *L. innocua*. Teniendo un mayor efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* con un CMI de 1933,666 mgEAG/g equivalente a una dilución de 0,5.

De acuerdo a antecedentes de la literatura, algunos compuestos polifenólicos poseen reconocida actividad bactericida, dada probablemente por mecanismos inespecíficos que no necesariamente guardan relación con su actividad antioxidante (citoprotectora) sobre las células del epitelio gástrico (Puupponen-Pimia et al., 2001).

A pesar de que los análisis con respecto a la concentración de polifenoles dio mayor en extractos encapsulados, el extracto acuoso sigue siendo más efectivo en base a su actividad antibacteriana, se infiere que el encapsulado debe crear una barrera sobre los extractos interfiriendo en su capacidad antibacteriana, así generando una inhibición con una mayor dilución o concentración de polifenoles.

Una de las hipótesis que se ha aceptado como paradigma, es que los polifenoles ejercen parte de su actividad antibacteriana mediante interacciones inespecíficas con componentes de la membrana plasmática (Mori et al., 1987; Haraguchi et al., 1998; Funatogawa et. al., 2004).

Sin embargo, en un estudio sobre *Helicobacter pilori* se detectó que dentro de un mismo grupo de compuestos fenólicos existen diferentes grados de actividad sobre este, lo que sugiere que los mecanismos de acción no son tan inespecíficos como se pensaba. Por ejemplo, numerosos estudios realizados con flavonoides, concluyen que la mayor solubilidad en lípidos se asocia con un efecto bactericida más potente (Hashimoto et al., 1998; Shin et al., 2005; Ustün et al., 2006).

Una hipótesis recientemente planteada para explicar el por qué sólo ciertos antioxidantes polifenolicos se muestran activos contra *H. pilori*, considera el potencial efecto pro oxidante que muestran ciertos polifenoles. La forma en que los polifenoles podrían actuar como generadores de especies reactivas del oxígeno fue abordada por varios investigadores (Aragawa et al., 2003; Arakawa et al. 2002, 2004), y utilizando como modelo de polifenol,

catequinas de té verde (cuya propiedad bactericida es conocida), los autores demostraron que a pH 7-8 (o superiores), es capaz de generar cantidades significativas de peróxido de hidrógeno. De acuerdo a los autores, la generación de peróxido de hidrógeno podría explicar el efecto bactericida de los flavan-3-oles. La habilidad de las catequinas para generar peróxido de hidrógeno sería favorecida por el arreglo de grupos hidroxilo en este tipo de moléculas, lo que permitiría la disociación del H^+ en solución y 43 electrones en el fenol que reduce al oxígeno, generándose en consecuencia anión superóxido. El anión superóxido posteriormente sufre reducción por la catequina (ej. EGCG), lo que lleva a la formación de O_2^{*} adicionalmente, el protón se combina con el superóxido generando H_2O_2 . Este mecanismo no sólo explicaría la generación de H_2O_2 producida por catequinas puras sino también por parte de infusiones de té negro, té verde y té Oolong correspondientes a 1.5×10^{-4} , 2.4×10^{-4} y 0.87×10^{-4} mol/l respectivamente. Estos niveles de H_2O_2 serían suficientes para ejercer una acción bactericida en cepas Gram positivas y negativas (Arakawa et al., 2004).

Capítulo IV

4. Conclusiones

En esta investigación se pudo concluir que:

Desde el punto de vista de composición nutricional, se obtuvo una mayor cantidad de proteína, lípidos, carbohidratos y fibra para la semilla de la variedad Hass, en relación a su cascara. Los valores determinados fueron próximos a los presentados por otros autores (Rodríguez-Carpena et al., 2011, Pahuá-Ramos et al., 2012, Wang et al., 2010 y Vihna et al., 2013).

Del punto de vista de compuestos lipofílicos, la comparación de perfil de ácidos grasos determinados en cascara y semilla coincidió con los valores obtenidos por los autores Gutfinger y Letan (1974), corroborando que el contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla destacan los siguientes compuestos; Omega 3, Omega 9. En cuanto a la cascara sobresalió Omega 7, Omega 6. En semilla los saturados presentaron un valor mayor en comparación con la cascara. Por otro lado, en los aceites de ambas materias primas, se determinaron altos niveles a alfa tocoferol. El contenido de carotenoides, beta caroteno y luteína fue mayor en el aceite de semilla.

Del punto de vista del contenido de polifenoles totales se determinó un mayor valor en los extractos de semilla. El secado spray dried realizado ayudo a concentrar los polifenoles eliminando el agua que estos tienen presente como extracto acuoso. Durante esta concentración se pudo observar un gran aumento en los niveles de polifenoles totales en el extracto seco.

Del punto de vista del efecto antimicrobiano los resultados indicaron que el extracto seco de la Semilla presentó una mayor capacidad inhibitoria que el extracto seco de la cascara de Palta Hass. Esto pudo, ser debido a la diferente interacción de los polifenoles de la cascara en relación a los de la semilla, dada por el tipo y naturaleza química de los polifenoles presentes naturalmente, en cada extracto. En el secado final de los extractos se generó una

perdida en la capacidad inhibitoria de los extractos siendo prácticamente ineficiente para *B. cereus* y *L. innocua*.

CAPITULO V

Referencias

1. "CHLORIS CHILENSIS", Revista Chilena de Flora y Vegetación. 1999. disponible en <http://www.chlorischile.cl/mozambique/PALTOweb.htm>, leído el 16 marzo 2013.
2. A.O.A.C, 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. 376-384.
3. A.O.C.S. "Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists". Fourth Edition. 1993.
4. AACC. 1994. "Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists", 9th Ed. St. Paul, MN, USA.
5. AACC. 2001. "AACC Dietary Fiber Technical Committee. The definition of dietary fiber". Cereal Foods World. 46: 112–126.
6. AGATA N, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 1995; 129:17-20
7. ANA. VINHA, J Moreira y S. Barreira. 2013, Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition.
8. ANDERSEN GI, Skeie M, Sørhaug T, Langsrud T, Granum PE. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. Int J Food Microbiol. 2001; 69:237-46.
9. ANDRADE L., GUTIERREZ T., ALVA A. 2010. Evaluación antibacteriana de persea Americana sobre bacterias del tracto digestivo y respiratorio. XXI Congreso de investigación CUAM-ACMOR. Morelos, México. Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea Americana*)
10. ANWAR, F., ABDUL, Q., HUSSAIN, I., IQBAL, S. 2006. Antioxidant Activity of Various Plant Extracts Under Ambient and Accelerated Storage of Sunflower Oil. Pakistán. Grasas y Aceites. 57(2): 189-197, Abril-Junio.
11. AOAC. 2005. "Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists". 18th edition. Gaithersburg, MD, USA.

12. ARAGAWA M., Shigemitsu T., Suyama K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biochem Biotech.* 2003, 67(12): 2632-2640.
13. ARAKAWA H., Kanemitsu M., Tajima N., Maeda M. Chemiluminescence assay for catechin based on generation of hydrogen peroxide in basic solution. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 472: 75-82.
14. ARAKAWA H., Maeda M., Okubo S., Shimamura T. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol Pharm Bull.* 2004, 27(3): 277-281.
15. Arias, L. E. H., Gómez, J. H. P., & Salazar, J. A. (2012). Application of the matrixes engineering on the development of minimally processed Hass avocado (*Persea americana* Mill) with additions of vitamin C and calcium. *Revista Lasallista Investigación*, 9(2), 44–54. Retrievd from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69525875016>
16. BEECHER DJ, Schoeni JL, Wong ACL. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immunol.* 1995; 63:4423-8.
17. BORDEN, E. Y SCARPA, J. “Análisis químico del vino”. Ediciones Universidad Católica de Chile, 2000. 219-221p
18. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.* 28: 25-30.
19. BROOKS, J., Daneshvar, M., Malcolm, G., Pine, L. “Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species”. *Canadian Journal of Microbiology.* 1989. Volume 35.p.245-54. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2501014&dopt=Citation
20. BUCHRIESER, C., Cossart, P., Kunst, F. Glaser, P. and Rusniok, C. “Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity”. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2003. Volume 35. p. 207-13. <http://www.femsmicrobiology.org/website/nl/default.asp>
21. BURGOS, K.A.B. 2012. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas de Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni., spp) y su efecto en la conservación de Salmón atlántico (*Salmo Salar*). Memoria de Ingeniero en industria alimentaria. Santiago. Universidad Tecnológica Metropolitana, Facultad de Ciencias Naturales, Matemáticas y del Medio Ambiente. 147p.

22. Caballero-Valdes, E. (2011). Immobilization strategies to use non regiospecific lipases as biocatalysts on interesterification reaction to produce a structured lipid as human fat milk substitutes. Centro regional de estudios en alimentación saludable. FONDECYT
23. CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L. 1996. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. Estados Unidos. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(11): 3426-3431.
24. CHÁVEZ, F.; ARANDA, M.; GARCÍA, A.; PASTENE, E. 2011. Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10 (3): 265 – 280
25. CHEW, K., KHOO, M., NG, S., THOO, Y., WAN AIDA, W., 2011. Effect of etanol concentration, extraction time and extraction temperatura on the recovery of phenolic compound and antioxidant capacity of orthoshiponstamineus extracts. International food research journal. Vol 18. Pp 1427-1435
26. CHOU, S.T., CHAO, W.W., CHUNG, Y.C. 2003. Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus radiates* L. Var Aurea). Taiwán, República de China. Journal of Food Science. 68(1): 865-869.
27. CISTERNA A., 2014. Obtencion y concentracion de polifenoles con propiedades antioxidants a partir de residuos de la industria de aceites de palta hass. Tesis para optar la titutlo de ingeniero en industria alimentaria con licenciatur aen ciencias de la ingenieria. Universidad tecnologica metropolitana, Santiago, Chile.
28. CUMMINGS, K.; C. A. SCHROEDER. Anatomy of the avocado fruit. California Avocado Society Yearbook 1942. 26: 56-64.
29. CURAQUEO, A. 2014. Caracterización de compuestos bioactivos, evaluación de la capacidad antioxidante y antibacteriana del extracto crudo de la semilla de dos variedades de palta (*persea americana* mill cv. Hass y negra de la cruz). Tesis de licenciatura 86pp.
30. Dabas, D., Ryan, E., Joshua, L., y Ziegler, G. (2011). A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. Journal of Food Science 76, 1335-1341.
31. FINOTELLI, P. y ROCHA-LEAO, M. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray drying. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. 1-11, 2005.

32. FRANKEL, E. Lipids oxidation: mechanisms, products and biological significance. JAOCS. 12. 1996. pág. 1908-1916.
33. FRITZ, C. Efecto de la adición de extracto de cascara y hojas de palto sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol. Departamento Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile.2016.
34. FUNATOGAWA K., Hayashi S., Shimomura H., Yoshida T., Hatano T., Ito H., Hirai Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 2004. 48(4): 251-261.
35. GAMALIER, L. FERREYRA, L. , P. MALDONADO, P. TOLEDO, C. BARRERA, C. y CELEDON, J. 2005. El cultivo de palto. *Revista INIA. Boletín* núm. 129
36. GÁRATE H. R. A. 2012. Unidad de Investigación: Composición en ácidos grasos, fenoles y capacidad antioxidante de diferentes variedades de paltas Chilena”. Departamento Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Laboratorio Química de Análisis de Alimentos y Materias Grasas, Universidad de Chile.
37. GARCIA, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Departamento de Tecnología de Alimentos, ETSIAMN. Universitat Politècnica de València. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>.
38. GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An overview. *Food Research International*, 10: 1107-1121, 2007.
39. GHARSALLAOUI, Adem; Roudaut, G  elle; Chambin, Odile; Voilley, Andr  e and Saurel, R  mi. 2007. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*. 40(9):1107-1121.
40. GIL, P., Sep  lveda, P., Maldonado, P., Toledo, C., Barrera, C.,2010. El Cultivo del Palto. *Bolet  n INIA N   129*, 3era ed., pp. 9e12
41. GOMEZ-LOPEZ, V. M. (1999). Characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) varieties of low oil content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2707–2710.

42. HARAGUCHI H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 1998, 48(1): 125-129.
43. HERNÁNDEZ, M. Y PRIETO, E. 1999. Plantas que contienen Fenoles. Antioxidantes Dentro del Estilo de Vida. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 18(1):12-14.
44. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf
45. INSTITUTO DE SALUD PUBLICA, 2010. Viancia de *Salmonella* spp. Laboratorio de referencia. Santiago, Chile.
46. IQBAL, S. Y BHANGER, M.I. 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Pakistan. Food Chemistry*. 100:246-254.
47. JEMMI, T., and Stephan, R. “*Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator”. *Review Science Magazine*. 2006. Volume 25. p. 571-80. < <http://www.oie.int/eng/publicat/rt/2502/review25-2BR/09-jemmi571-580.pdf>.>
48. JONSDOTTIR, R., BRAGADOTTIR, M., ARNARSON, G. Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *Journal of Food Science*. 70(7): 433-440, 2005.
49. KANAKDANDE, D., BHOSALE, R., SINGHAL, R. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrates Polymers*. 67: 536-541, 2007.
50. KAPLAN, DL. *Biopolymers from renewable resources*. Berlín: Springer, 1998.
51. KIM, S.-Y., Jeong, S.-M., Park, W.-P., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S.- C. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food chemistry*, 97: 472–479.
52. KLOSS WE, Bamerman TL. *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM PressM; 1995.
53. KLOSS WE, Schleir KH, Goirtz F. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. *The Prokaryotes*, 2nd Ed. New York, Spring-Verlag; 1992.
54. KOLANOWSKI, W., LAUFENBERG, G., KUNZ, B. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 55(4):333-43, 2004.

55. KOSINKA, A. KARAMAC, M., ESTRRELLA, I., HERNANDEZ, T., BEGOÑA, B., DIKES, G. 2012. Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of Persea Americana Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of agricultura and food chemistry*. Pp 4613-4619.
56. KRISHNAN, S., BHOSALE, R., SINGHAL, and R. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum Arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate polymers*. 61: 95-102, 2005a.
57. KUSKOSKI, E. Marta et al. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 24(4), 691-693.
58. LAMPE, J.W. 1999. Health Effects of Vegetables and Fruit: Assessing Mechanisms of Action in Human Experimental Studies. *American Journal Of Clinical Nutrition*. 70(3): 475-490.
59. LEÓN, J.A. 2008. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Tesis de Doctorado. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 225p.
60. LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca a starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*. 21: 928-935, 2007.
61. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, Orestes Darío. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*. 44(3):381-389.
62. LOWY FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med*. 1998; 339: 520-532. 8. Moreillon P, Que Y, Glauser M. Staphylococcus aureus. In Mandell GL, Bennett JE, Olin R. Principles and practice of infectious diseases. 6a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2005.
63. LU, QING-YI; Zhang, Yanjun, Yue Wang, David Wang, Ru-po Lee, Kun Gao, Russell Byrns, and David Heber. California Hass Avocado: Profiling of Carotenoids, Tocopherol, Fatty Acid, and Fat Content during Maturation and from Different Growing Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., Vol. 57, No. 21, 2009.
64. MADSEN, H. L., SORENSEN, B., SKIBSTED, L. H. Y BERTELSEN, G. 1998. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness. *Food Chemistry*, 63(2): 173-180

65. MARCHAL, L., BEEFTINK, H., TRAMPER, J. Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 397-406, 1999
66. MARTÍN-VILLENA, M.J.; Morales-Hernández, M.E.; Gallardo-Lara, V. y Ruíz-Martínez, M.S. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*. 50(1):43-50.
67. MCKILLIP JL. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2000; 77:393-9. Mill.). Vol. 5, No. 12; 2013
68. MELLA E. C.2015.; Calidad del aceite de palta Hass (*persea americana*) en diferentes estados de maduración extraído con CO2 supercrítico previamente secada por liofilización y microondas. Tesis para optar a grado de ingeniero en alimentos, Universidad tecnológica metropolitana, Facultad de ciencias naturales, matemáticas y de medio ambiente. 87p.
69. MORI A., Nishino C., Enoki N., Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 1987, 26: 2231-2234
70. MORTON, J. F. (1987). Avocado. In *Fruits of warm climates* (pp. 91–102).
71. ODEPA. Oficina de estudios y políticas agrarias 2010. Características generales de las paltas [en línea]. Massaro Caterina J. Chile, 2010.. [consulta: septiembre 2013]. Disponible en: < <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2307.pdf> >
72. OLEA, A., DÍAZ, J., FUENTES, R., VAQUERO, A., GARCÍA, M. 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 29 (5): 504-510.
73. OLIVEIRA, S.C., CIRILO, A.T.O., BASTOS, V.S., AQUINO, A.C.M.S., CASTRO, A.A., NARAIN, N. 2011. Estudo da extração e estabilidade dos carotenoides em amostras de salmão (*Salmo salar*) cru resfriado e congelado durante o armazenamento. *Scientia plena*. 7(5):1-6.
74. PAHUA-RAMOS, M. E., Ortiz-Moreno, A., Chamorro-Cevallos, G., Hernández-Navarro, M. D., Garduño-Siciliano, L., Necochea-Mondragón, H., & Hernández-Ortega, M. (2012). Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. *Plant Foods Human Nutrition*, 67, 10–16. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-012-0280-6>

75. PEKIĆ, B., Kovać, V., Alonso, E., y Revilla, E.(1997). Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry* 6, 201-206.
76. PUUPPONEN-PIMIA R. Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldenty KM. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90: 494-507.
77. REINECCIUS, G. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology.* 45: 144-146, 1991.
78. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, Departamento de Ciencia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP., Brasil 2010.
79. RODRÍGUEZ-CARPENA, J.G., MORCUENDE, D., ANDRADE, M.J., KYLLI, P., ESTEVEZ, M. 2011. Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59(10): 5625–5635
80. ROSAS, M., SOLIS, F., CERVANTES, C., ORTEAGA, C., ROMERO, E. 2012. Control sanitario en la preparación de alimentos en el Centro de Internamiento Especial para Adolescentes (CIEPA), de la población de Palmasola Municipio de Alto Lucero Veracruz México. *Rev Med UV.* Pp 33-36.
81. ROTH, I. 1977. *Fruits of Angiosperms.* Gebrüder Borntraeger. Berlin, Germany.
82. SAÉNZ, C., TAPIA, S., CHÁVEZ, J., ROBERT, P. Microencapsulacion by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry.* 114 (2): 616-622, 2009
83. SANCHEZ- ESCALANTE, A., DJENANE, D., TORRESCANO, G., BELTRÁN, J.A., RONCALES, P. 2003. Antioxidant action of borage, Rosemary, oregano and acorbic in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science.* 68(1): 339-341.
84. SCHROEDER, C. A. 1950. The structure of the skin or rind of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 34: 169- 176.
85. SEYMOUR, G. Y TUCKER, G. 1993. *Avocado. Biochemistry of fruit ripening.* Chapman & Hall, London. Pp. 53-81.
86. SHAHIDI, F. y HAN, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition.* 33 (6): 501-547, 1993.

87. SHAIKH J., BHOSALE R., SINGHAL R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*. 94: 105-110, 2006.
88. SHIN JE, Kim JM, Bae EA, Hyun YJ, Kim DH. In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med.* 2005, 71(3):197-201.
89. SILVA, Carlos P. 1994. Composición y evolución de los componentes químicos de la palta (*Persea americana* Mill) durante su maduración. *Revista de la sociedad chilena de tecnología de alimentos*, 19(5-6): 88-101.
90. SILVA, P., P. Stringheta, R. Teófilo y I. Nolasco, Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*. artículo en impresión (2013)
91. SOONG Y. y BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3): 411-417. 2004.
92. SOOTTITANTAWAT, A., TAKAYAMA, K., OKAMURA, K., MURANAKA, D., YOSHII, H., FURUTA, T., OHKAWARA, M., LINKO, P. Microencapsulation of lmenthol by spray drying and its release characteristics. *Innovative Food Science and Emerging technologies*. 6 (2): 163-170, 2005.
93. TOMER, E.; M. GOTTREICH; S. GAZIT. 1976. Defective ovules in avocado cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101(5): 620-623.
94. TONON, R., C. Brabet y M. Hubinger, Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43 (3): 907-914 (2010).
95. TRUBIANO, P. y LACOURSE, N. Emulsionstabilizing starches. In: RISCH, S.J.; Reineccius G.A. *Flavor encapsulation*. Washington, DC: ACS, 1988. 45-54. (ACS Symposium Series, 370).
96. UNDURRAGA, P.L. et al. 2008. Posibles usos de semilla y cáscara del fruto del palto (*Persea americana* Mill.) Memoria de Ingeniero Agrónomos. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, 23p
97. USTUN O., Ozcelik B., Akyon Y., Abbasoglu U., Yesilada E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, 108(3): 457-461.
98. VELÁZQUEZ BERDÓN D., 2013. Efecto de las propiedades antioxidantes y antibacterianas de extractos polifenólicos de la cascara de palta Hass en la

- conservación e inocuidad del salmón Atlántico. Tesis Magister en alimentos mención gestión, calidad e inocuidad de Alimentos., Santiago. Chile.
99. WANG, W. Et al. 2010. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. Pp. 1193-11
100. WIJNANDS LM, Dufrenne JB, van Leusden FM. The pathogenic mechanism of the diarrheal syndrome caused by *Bacillus cereus*. RIVM report [Internet]. 2001/2002 [citado 6 Ene 2006]. Available from: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912001.pdf>
101. YANISHLIEVA, N., MARINOVA, E. 2001. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 752-767,
102. ZHENG, W., WANG, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5165-5170,
103. ZUIDAM, Nicolaas Jan and Shimoni, Eyal. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. (pp. 3-29). New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC.
104. ZWIETES CAVALHEIRO F., 2013. Efecto de las propiedades antioxidantes y antibacterianas de extractos polifenólicos de semilla de palta Hass en la conservación e inocuidad del salmón Atlántico. Tesis Magister en alimentos mención gestión, calidad e inocuidad de Alimentos., Santiago. Chile

ANEXOS

Anexo 1. Humedad

Procedimiento:

Llevar dos cápsulas de aluminio a estufa a 105° C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, trasladar con la ayuda de una pinza las cápsulas a una desecadora, dejar enfriar hasta que alcancen la temperatura ambiente para así registrar el peso en una balanza analítica. Pesar en ellas 2 g de muestra y trasladar a la estufa a 105°C durante 2 horas. Cumplido este tiempo, trasladar las cápsulas a la desecadora durante 15-20 minutos para luego pesar y registra su valor. Ubicar nuevamente las cápsulas a la estufa esta vez por 30 minutos, repetir este procedimiento hasta alcanzar peso final constante. Por diferencia de masa se obtiene el porcentaje de humedad, según:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} * 100$$

Dónde:

m₁: masa de la cápsula vacía (g)

m₂: masa de la cápsula vacía y la muestra, antes del secado (g)

m₃: masa de la cápsula vacía y la muestra desecada (g).

Anexo 2. Cenizas

Procedimiento

Consiste en pesar en balanza analítica cerca de 1 g de muestra triturada en una cápsula de porcelana previamente tarada. Se calcina con mechero Bunsen bajo campana de extracción hasta que no se desprendan humos de ningún tipo. Luego se traslada la cápsula a la mufla para calcinar la muestra a 550 °C, por un tiempo aproximado de 8 h.

Para pesar se traslada la cápsula con pinzas al desecador y luego a la balanza analítica. La masa final en el tiempo debe ser constante. Por diferencia de masa se obtiene la cantidad de cenizas en el total de muestra, luego se calcula la masa de cenizas por cada 100 g de alimento fresco, según:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} * 100$$

Dónde:

m_1 : masa de la cápsula (g)

m_2 : Masa de la cápsula más muestra fresca (g)

m_3 : Masa de la cápsula más la muestra calcinada (g).

Anexo 3. Proteínas

Procedimiento:

El procedimiento consiste en pesar alrededor de 1,5 g de muestra en balanza analítica y colocarla en un tubo digestor. Agregar al tubo digestor 12,6 g de mezcla (12 g de K_2SO_4 + 0,6 g de $CuSO_4$). Agregar bajo campana 20 mL de H_2SO_4 concentrado. Llevar el tubo de digestión a ebullición en la unidad de digestión Büchi, abriendo completamente la llave de vacío y dejando reaccionar por 6 h o hasta que desaparezca el color negro. Dejar enfriar hasta que no salgan vapores blancos, ni queden residuos negros en las paredes, desprenderlos con agua destilada y devolver el tubo al equipo digestor hasta obtener un líquido claro. Agregar al tubo agua destilada hasta 1/3 de su altura y 1 mL de indicador de fenofaleína. Hacer andar el equipo de destilación Büchi sólo con agua con el fin de limpiarlo, esta operación se debe realizar al comienzo, entre cada muestra y al final de la destilación. Conectar el tubo de digestión en la unidad de destilación Büchi y abrir la llave de agua de enfriamiento.

Programar el equipo como sigue:

- Agua 0 mL
- NaOH 30%: 80-90 mL
- Delay: 5 segundos
- Tiempo de destilación: 9 minutos aprox. o tiempo necesario para obtener 150 mL de destilado.

Recolectar los vapores de NH₃ a la salida del destilador en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenga 50 mL de H₂SO₄ y 4 gotas de indicador rojo de metilo. Valorar el exceso de ácido con NaOH 0,1 N hasta viraje a color amarillo débil. Determinar mg de nitrógeno reaccionantes con la siguiente fórmula:

$$mg N = (V_1 \times N_1 - V_2 \times N_2) \times 14$$

Luego:

$$\% \text{ proteina} = \frac{mg N * 5,7}{m} * 100$$

Dónde:

N1V1: Normalidad y volumen inicial de H₂SO₄

N2V2: Normalidad y volumen gastado de NaOH

m: Masa de muestra (g)

Anexo 4. Carbohidratos totales. Método colorimétrico de reacción de Antrona

Procedimiento:

Se pesó 2 gr de muestra húmeda en un matraz Erlenmeyer con tapa. Se agrega 10 ml de agua destilada y se agita con una varilla de vidrio hasta su completa homogenización. Agregar 15 ml de ácido perclórico al 52%, agitar y tapar. Dejar por 12 horas para que hidroliza la muestra. Agregar agua al matraz hasta complementar 100 ml aproximadamente. Filtrar la solución con embudo analítico y papel filtro, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 250 ml. Lavar el precipitado, el matraz y el papel filtro con agua destilada, recibiendo siempre la solución en el matraz de 250ml. Aforar. Tomar una alícuota de 10 ml y trasladarla a un matraz de 100ml y aforar con agua destilada. Tomar una alícuota de 1 ml de esta solución y colocarla en un tubo de ensayo con tapa. Agregar 5 ml de solución antrona, agitar. Llevar a baño de agua a ebullición por exactamente 12 minutos y enfriar inmediatamente con agua fría. Leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630nm. Paralelamente realizar la reacción a 1 ml de glucosa (0,1%) y a un blanco (1 ml de agua destilada).

Calcular con la siguiente fórmula:

$$\%H \text{ de } C = 25 * b / a * p$$

Donde:

P= peso de la muestra.

A= absorbancia del patrón diluido.

B= absorbancia de la muestra.

Anexo 5. Método de Extracción Bligh & Dyer

Pesar en un vaso precipitado con 50 gramos de muestra, llevar a licuadora con 30 mL de agua destilada, 200 mL de metanol y 100 mL de cloroformo, homogenizar durante 2 minutos. Posteriormente adicionar 100 mL de agua destilada y 100 mL de cloroformo, esta vez agitar por 30 seg.

La mezcla obtenida se filtra a través de un embudo Büchner con la aplicación de vacío. Finalizada esta etapa transferir filtrado a un frasco de vidrio (realizar pequeños lavados con cloroformo al sólido y el kitasato), dejar reposar el filtrado hasta que se genere la separación de las dos fases. Una vez transcurrido esto con la ayuda de una pipeta eliminar la fase superior del frasco. La fase clorofórmica se traslada a un balón previamente tarado el cual se lleva al rota vapor el cual se encuentra a 40° C. La extracción finaliza una vez eliminado la totalidad del cloroformo. Dejar enfriar el balón y registrar en balanza analítica el peso obtenido.

Anexo 6. Determinación de perfil de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos se determinó a través de cromatografía de gases. Primero se preparó la muestra, donde el aceite fue sometido a una metilación a temperatura de ebullición, añadiendo NaOH 0,5N calentando por 5 minutos, para luego adicionar trifloruro de boro en metanol al 12,5% que nuevamente se llevó a ebullición a través de un baño termostático por 3 minutos para finalmente agregar éter de petróleo y Na₂CO₃ saturado. Obteniendo los ésteres de metilo de los ácidos grasos, que posteriormente fueron inyectados en el equipo cromatógrafo de gases (GCL) para su identificación.

Anexo 7. Determinación de alfa-tocoferol por HPLC

Se determinaron los tocoferoles de los extractos de lípidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección por fluorescencia, siguiendo los métodos estándar AOCS (AOCS ce 8-89, 1993).

Este método se utiliza para materias vegetales en donde los lípidos son disueltos en un solvente orgánico (n-hexano) que posteriormente se separan a través de la cromatografía. Mediante estándares de tocoferoles se identificaron los tocoferoles de la muestra analizada, en este caso de alfa-tocoferol.

En matraces ámbar de 10 mL se pesó 0,1 g de aceite de palta, el cual fue disuelto con n-hexano esta solución se filtró utilizando tamaños de poros de 0,45 μm y posteriormente fue inyectada una alícuota de 80 μL al equipo de HPLC.

Anexo 8. Determinación de pigmentos carotenoides.

La determinación de la concentración de luteína se llevó a cabo por el método propuesto s por Rodríguez (1999), el cual se basa en diluir la muestra en dietil éter y leer en espectrofotómetro a una longitud de onda 428-432 nm. Donde presenta mayor absorbancia. En un matraz de 10 mL se pesó 0,5 g de aceite, en el cual se aforo con éter di etílico para leer en espectrofotómetro, haciendo un barrido desde 250 nm a 600 nm de longitud de onda.

Finalmente el contenido de luteína se determinó con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de luteína} = \frac{A * Y * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * 100}$$

Donde:

A: absorbancia en el pick máximo

Y: volumen en solución (mL)

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$: Coeficiente de absorción en el disolvente utilizado (2480 para luteína de éter di etílico).

Para calcular el contenido de luteína en ppm, se divide el resultado anterior en los gramos de muestra inicia.

$$ppm \text{ de luteína} = \frac{\mu g}{g}$$

Anexo 9. Fenoles totales (Método Folin Ciocalteu)

Reactivos:

- Solución reactivo Folin-Ciocalteu Merck p.a.
- Solución estándar de ácido gálico.
- Solución de carbonato de sodio anhidrido al 20% p/v: utilizar agua destilada caliente para disolver 20 g de carbonato, aforar a 100 ml. Filtrar y guardar en oscuridad.

Procedimiento:

- Se adiciona 0,1 mL de muestra de extracto de semilla o cascara de palta Hass en un matraz aforado de 10 mL, se añade 4,9 mL de agua destilada y 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, dejando reposar por 3 minutos.
- Luego agregar 1,7 mL de solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃), mezclar y completar el aforo a 10 mL con agua destilada.
- Dejar reposar 30 minutos. Conjuntamente se prepara un blanco, sin la muestra, para lograr el auto cero del equipo.
- Se lee la absorbancia en espectrofotómetro a 765 nm y se utiliza una curva de calibración de Ácido Gálico para transformar los datos a mg EAG/L.

Anexo 10. Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH.

Reactivo: Solución metanólica de radical 2,2 difenil- 1- picrilhidrazilo hidratado (DPPH).

Procedimiento:

Para determinar la capacidad antioxidante de los distintos extractos se prepara una solución metanólica de radical 2,2 difenil- 1- picrilhidrazilo hidratado (DPPH) de 20 mg/L. Se pesa

0,005g de DPPH y se afora a 250 mL de metanol. Luego se lee contra un blanco (metanol) a 517 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia del DPPH debe ser mayor a 0,5 y menor a 0,8.

Posteriormente a la batería de tubos se les agrega 25 µL de cada solución de extractos de cáscara de palta Hass y 975 µL de DPPH (Brand-Williams, 1995). En el caso del blanco de cada muestra, también se agrega 25 µL de cada solución de extractos de cáscara de palta Hass y 975 µL de metanol. En ambos casos (tubos con las muestras y blanco), la reacción se prepara en triplicado, los tubos se dejan en oscuridad a 30°C por 30 minutos; transcurrido este tiempo se lee en espectrofotómetro.

Además, se realiza un control, que consiste en un tubo al cual se agrega 25 µL de metanol y 975 µL de DPPH. Este también se lee a 517 nm en base a metanol (Brand-Williams, 1995). Los volúmenes adicionados en las celdas, para el control, el blanco y la muestra, corresponden a los siguientes:

	Control	Blanco	Muestra
Extracto	0 µL	25 µL	25 µL
DPPH	975 µL	0 µL	975 µL
Metanol	25 µL	975 µL	0 µL
Volumen total	1000 µL	1000 µL	1000 µL

El cálculo del % de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) se determina empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Decoloración} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}}) / (Abs_{\text{control}})] * 100$$

Un valor igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libre y un valor cercano a 0 indica una reducida capacidad. El grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como capturadoras de radicales libres.

Anexo 11 Curva de calibración de estar de ácido gálico para cuantificación de fenoles por métodos de follin ciocalteau

La curva de calibración de ácido gálico se realiza pesando 25mg de ácido gálico en matraz aforado de 25ml, agregando 1ml de etanol para disolver el ácido gálico y se afora con agua destilada. Se preparan soluciones patrones entre 50 y 400µg de ácido gálico/ml. Se realiza la reacción de Folin-Ciocalteau con cada solución.

Preparación de estándar de calibración desde solución madre de ácido gálico en etanol:

A los datos de la tabla se les aplica regresión lineal, obteniéndose la ecuación:

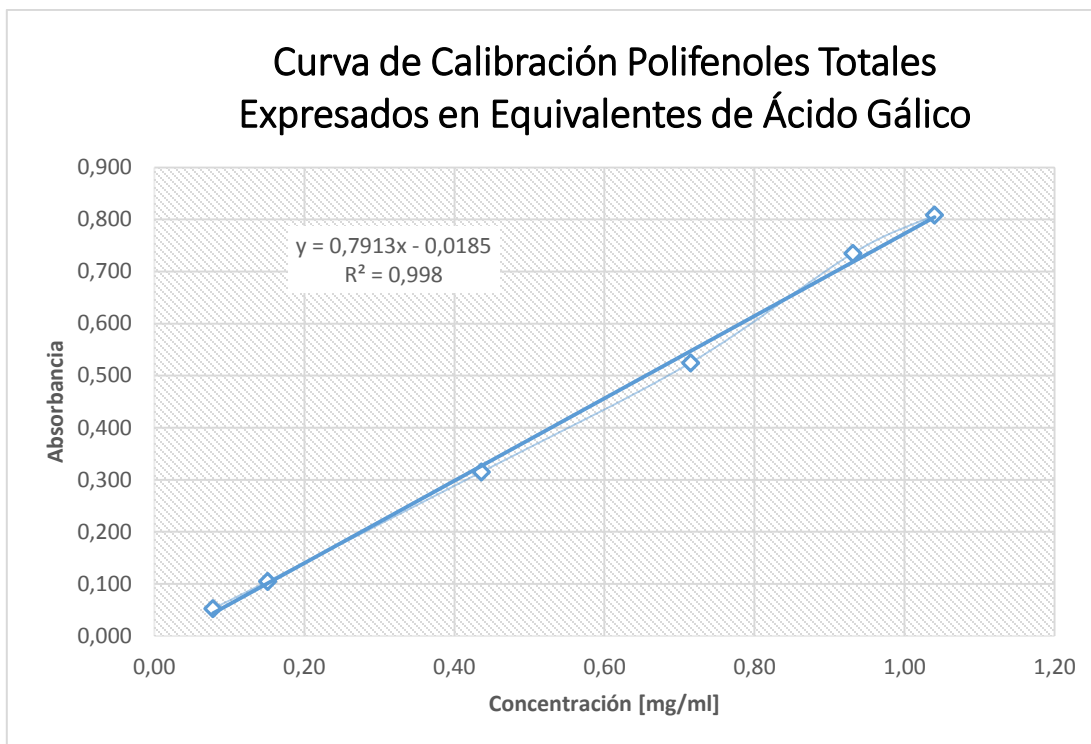
$y = 0.7913x + 0.0185$	con $R^2 = 0,998$
------------------------	-------------------

Donde:

y = absorbancia medida a 765 nm

x = concentración de fenoles totales (mgEAG / mL)

Concentración [mg/ml]	Absorbancia
0,0525	0,078
0,1050	0,151
0,3150	0,436
0,5250	0,715
0,7350	0,931
0,8085	1,040



Anexo 12 Equipos utilizados

- Liofilizador Modelo Lyodried LT5B, sistema Lyophilization, EE.UU.
- Estufa WTB Binder, región de temperatura de 0°C a 300°C (FIGURA 19)
- Rotavapor R-205 Büchi VWR Scientific, Inc, Atlanta, GA (FIGURA 20)
- Espectrofotómetro ATI Unicam UV/Vis Spectrometer UV3-200 (FIGURA 21)
- En cromatografía gaseosa se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 serie II, con detector de ionización de llama, usando H₂ como gas portador, unido a un integrador Hewlett-Packard 3395. La columna capilar utilizada fue de sílica fundida BPX-70 de 100m de largo y 0,25 mm de diámetro interno, con espesor de película de 0,2 μm. La temperatura del horno fue programada entre 160°C a 220°C, con una velocidad de calentamiento de 2°C/min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 250°C (FIGURA 22).

- En cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se utiliza una columna Lichrocart Superspher Si 60 (5 μ m tamaño de partícula, de 4 mm id x 25 cm; Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil 2-propanol en hexano (0,5:99,5 v / v) a una velocidad de flujo de 1ml/min. El sistema HPLC consiste en una bomba Merck-Hitachi L-6200A (Merck, Darmstadt, Alemania), un inyector Rheodyne 7725i con 20 μ l de muestra bucle, un detector de fluorescencia Merck-Hitachi F-1050 y un cromato-integrador Merck-Hitachi D-2500. Usando longitudes de onda de excitación y emisión de 290 nm y 330 nm, respectivamente. Los tocoles se identifican utilizando estándares externos (Merck, Darmstadt, Alemania) (FIGURA 22).



FIGURA 19 Estufa WTB Binder



FIGURA 20 Rota vapor BÜCHI



FIGURA 21 Espectrofotómetro



FIGURA 22 Cromatografo de Gases



FIGURA 23 HPLC

Anexo 13 Análisis estadístico para Aplicación de polifenoles en Cascara Pre-encapsulado.

Las cepas fueron integradas como: “1” para E.coli no patógena; “2” para E.coli 0:157; “3” Salmonella enteritidis; “4” Staphylococcus aureus; “5” Bacillus cereus; “6” Listeria inocua.

Resumen estadísticos para las CEPAS utilizando Cascara como compuesto inhibitorio.

<i>CMI con cascara</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
0,5	1	2,0		%	2,0	2,0
0,02	3	4,0	1,0	25,0%	3,0	5,0
0,5	2	3,5	3,53553	101,015%	1,0	6,0
Total	6	3,5	1,87083	53,4522%	1,0	6,0

<i>CMI con cascara</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0,5	0		
0,02	2,0	0	
0,5	5,0		
Total	5,0	0	-0,6

Dispersión por Código de Nivel

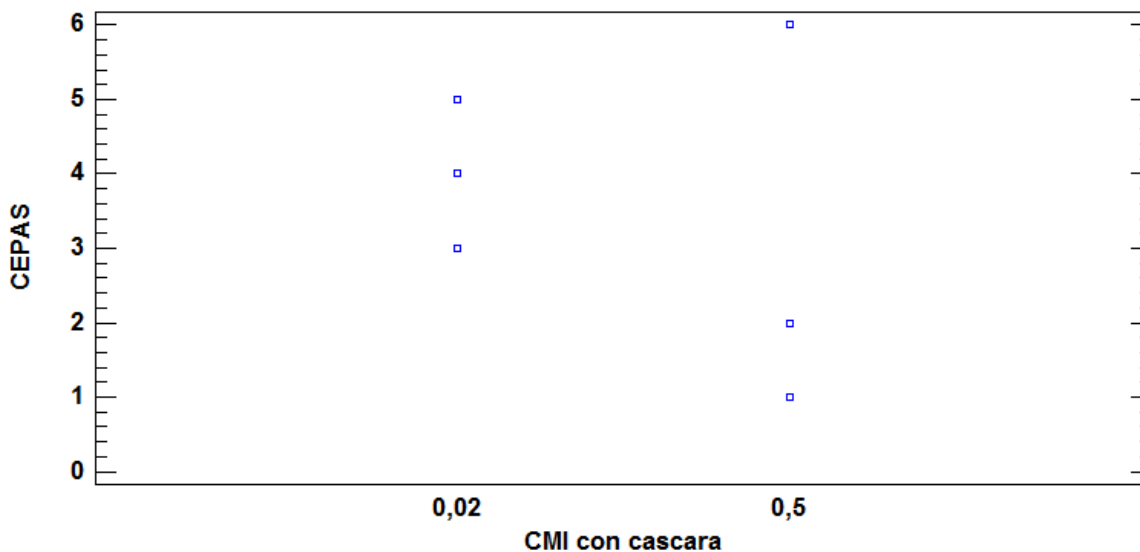
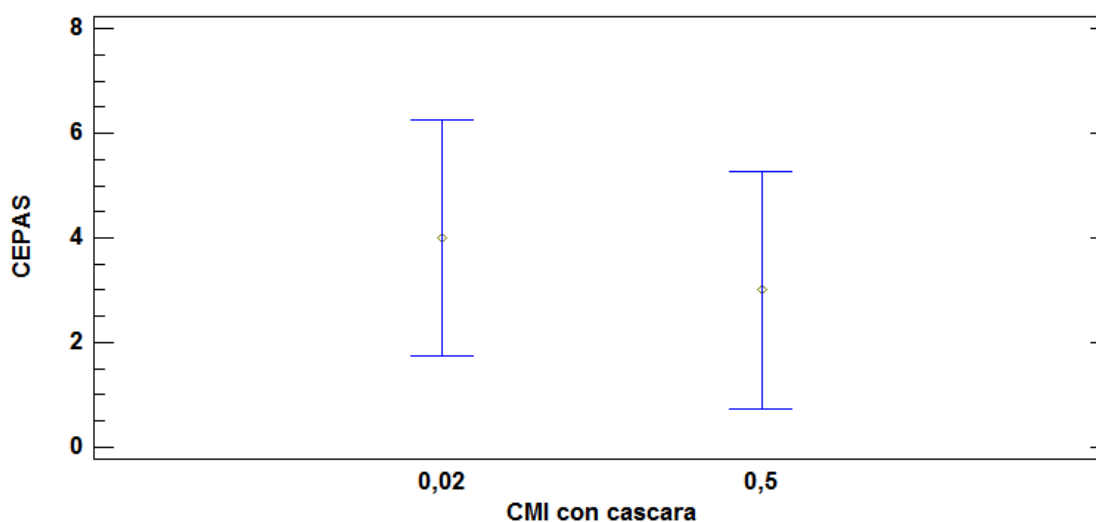


Tabla de Medias para CEPAS por CMI con cascara con intervalos de confianza del 95,0%

			Error Est.		
<i>CMI con cascara</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0,5	1	2,0	2,19848	-2,94732	6,94732
0,02	3	4,0	1,2693	1,14366	6,85634
0,5	2	3,5	1,55456	0,00171775	6,99828
Total	6	3,5			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para CEPAS por CMI con cascara

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>CMI con cascara</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,5	3	3,0	X
0,02	3	4,0	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0,02 - 0,5		1,0	4,53393

* indica una diferencia significativa.

Verificación de Varianza

	<i>Pruebas</i>	<i>Valor-P</i>
Levenes	4,0	0,116115

<i>Comparación</i>	<i>Sigma 1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
0,02 / 0,5	1,0	2,64575	0,142857	0,2500

Prueba de Kruskal-Wallis para CEPAS por CMI con cascara

<i>CMI con cascara</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
0,02	3	4,0
0,5	3	3,0

Estadístico = 0,428571 Valor-P = 0,51269

Prueba de la Mediana de Mood para CEPAS por CMI con cascara

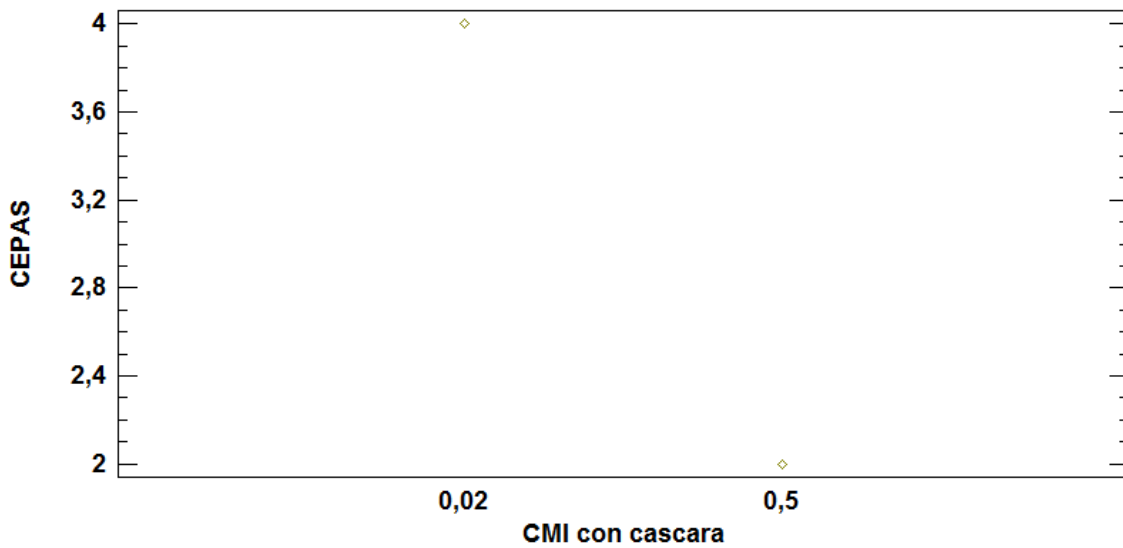
Total n = 6

Gran mediana = 3,5

<i>CMI con cascara</i>	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>n<=</i>	<i>n></i>	<i>Mediana</i>	<i>LC inferior 95,0%</i>	<i>LC superior 95,0%</i>
0,02	3	1	2	4,0		
0,5	3	2	1	2,0		

Estadístico = 0,666667 Valor-P = 0,414215

Gráfico de Medianas



Anexo 14 Análisis estadístico para Aplicación de polifenoles en Semilla Pre-encapsulado.

Resumen Estadístico para CEPAS

<i>CMI con Semilla</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
0	2	2,0	1,41421	70,7107%	1,0	3,0
0,13	1	2,0		%	2,0	2,0
0,5	2	4,5	0,707107	15,7135%	4,0	5,0
1	1	6,0		%	6,0	6,0
Total	6	3,5	1,87083	53,4522%	1,0	6,0

<i>CMI con Semilla</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	2,0		
0,13	0		
0,5	1,0		
1	0		
Total	5,0	0	-0,6

Dispersión por Código de Nivel

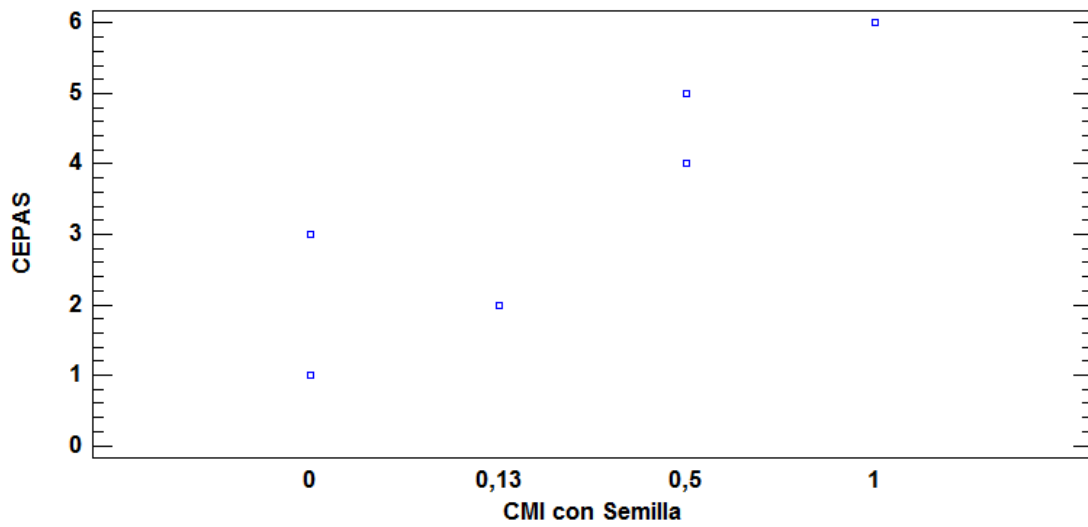
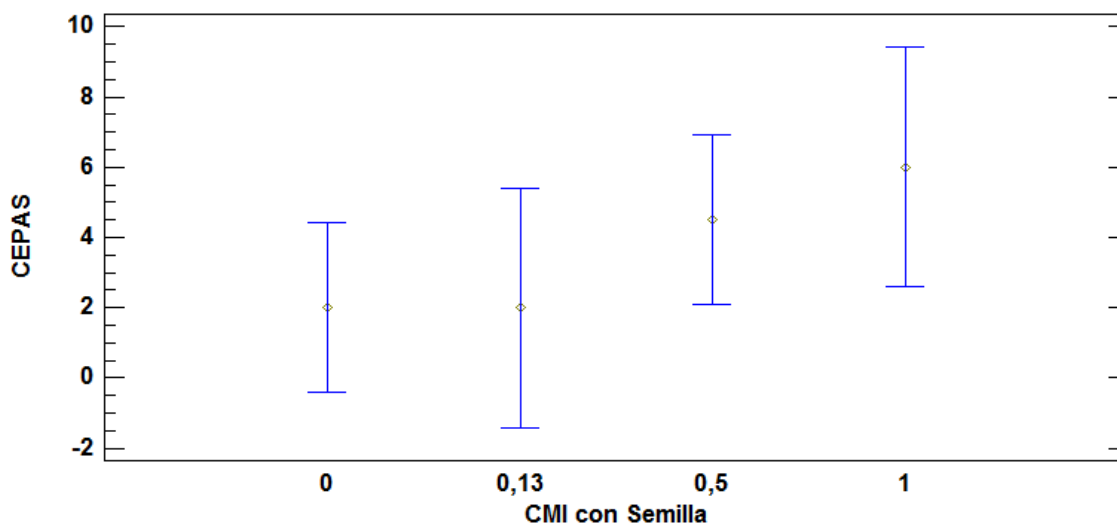


Tabla de Medias para CEPAS por CMI con Semilla con intervalos de confianza del 95,0%

<i>CMI con Semilla</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	2	2,0	0,790569	-0,405256	4,40526
0,13	1	2,0	1,11803	-1,40155	5,40155
0,5	2	4,5	0,790569	2,09474	6,90526
1	1	6,0	1,11803	2,59845	9,40155
Total	6	3,5			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para CEPAS por CMI con Semilla

Método: 95,0 porcentaje LSD

CMI con Semilla	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	2	2,0	X
0,13	1	2,0	X
0,5	2	4,5	X
1	1	6,0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 0,13		0	5,89165
0 - 0,5		-2,5	4,81051
0 - 1		-4,0	5,89165
0,13 - 0,5		-2,5	5,89165
0,13 - 1		-4,0	6,80309
0,5 - 1		-1,5	5,89165

* indica una diferencia significativa.

Verificación de Varianza

Prueba	Valor-P
--------	---------

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
-------------	--------	--------	---------	---------

0 / 0,5	1,41421	0,70710	4,0	0,5903
		7		

Prueba de Kruskal-Wallis para CEPAS por CMI con Semilla

<i>CMI con Semilla</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
0	2	2,0
0,13	1	2,0
0,5	2	4,5
1	1	6,0

Estadístico = 4,28571 Valor-P = 0,232216

Prueba de la Mediana de Mood para CEPAS por CMI con Semilla

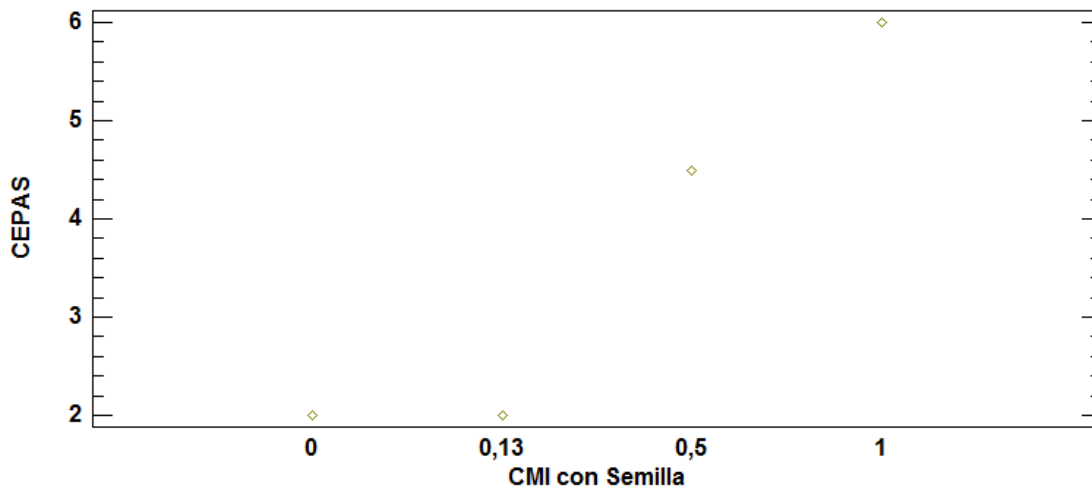
Total n = 6

Gran mediana = 3,5

<i>CMI con Semilla</i>	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>n<=</i>	<i>n></i>	<i>Mediana</i>	<i>LC inferior 95,0%</i>	<i>LC superior 95,0%</i>
0	2	2	0	2,0		
0,13	1	1	0	2,0		
0,5	2	0	2	4,5		
1	1	0	1	6,0		

Estadístico = 6,0 Valor-P = 0,111608

Gráfico de Medianas



Anexo 15 Análisis estadístico para Aplicación de polifenoles en Cascara Post-encapsulado.

Resumen Estadístico para CEPAS

<i>CMI con cascara encapsulada</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>
0	3	3,33333	2,51661	75,4983%
0,5	1	4,0		%
1	2	3,5	2,12132	60,6092%
Total	6	3,5	1,87083	53,4522%

<i>CMI con cascara encapsulada</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	1,0	6,0	5,0	0,41407	
0,5	4,0	4,0	0		
1	2,0	5,0	3,0		
Total	1,0	6,0	5,0	0	-0,6

Dispersión por Código de Nivel

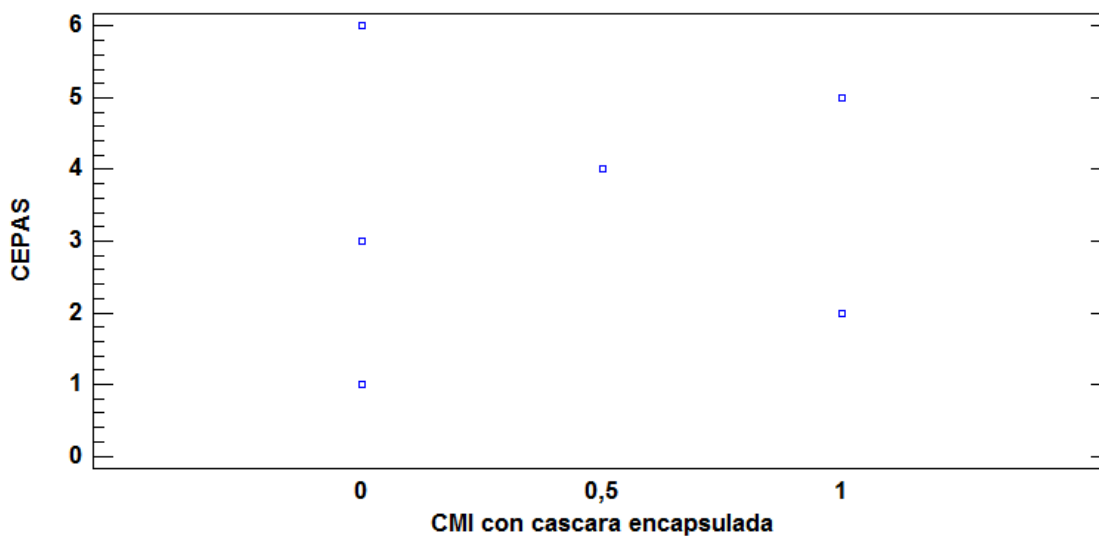
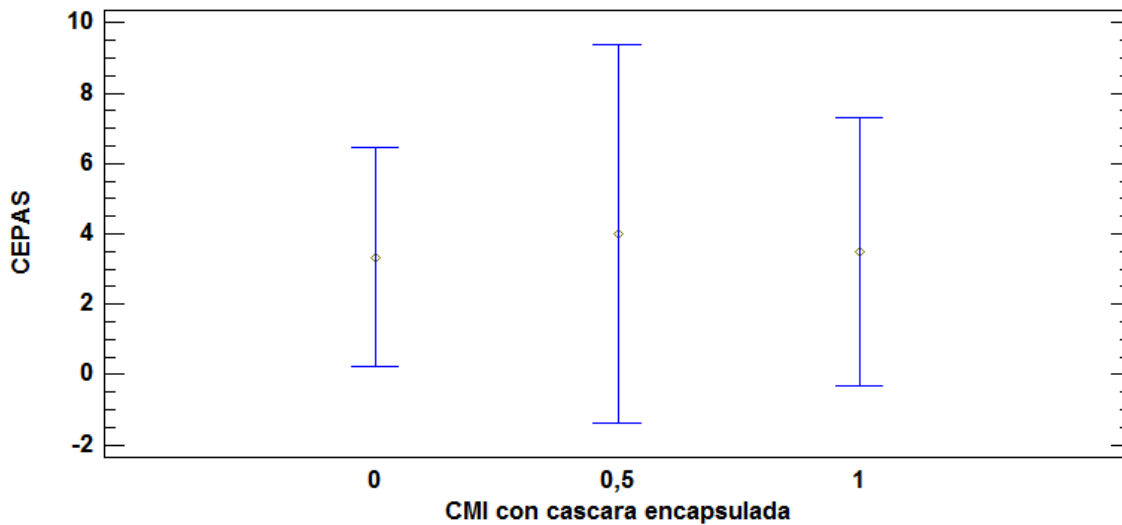


Tabla de Medias para CEPAS por CMI con cascara encapsulada con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	3	3,33333	1,38109	0,225425	6,44124
0,5	1	4,0	2,39212	-1,38306	9,38306
1	2	3,5	1,69148	-0,306395	7,30639
Total	6	3,5			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para CEPAS por CMI con cascara encapsulada

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	3	3,33333	X

1	2	3,5	X
0,5	1	4,0	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/-</i>
<i>e</i>		<i>a</i>	<i>Límites</i>
0 - 0,5		-	8,79049
		0,666667	
0 - 1		-	6,94949
		0,166667	
0,5 - 1		0,5	9,32373

* indica una diferencia significativa.

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levenes	1,13372	0,429817

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
0 / 1	2,51661	2,12132	1,40741	0,9920

Prueba de Kruskal-Wallis para CEPAS por CMI con cascara encapsulada

<i>CMI con cascara encapsulada</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
0	3	3,33333
0,5	1	4,0
1	2	3,5

Estadístico = 0,0952381 Valor-P = 0,953497

Anexo 16 Análisis estadístico para Aplicación de polifenoles en Semilla Post-encapsulado.

Resumen Estadístico para CEPAS

<i>CMI con semilla encapsulada</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coeficiente de Variación</i>
0	2	5,5	0,707107	12,8565%
0,13	1	2,0		%
0,5	3	2,66667	1,52753	57,2822%
Total	6	3,5	1,87083	53,4522%

<i>CMI con semilla encapsulada</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	5,0	6,0	1,0		
0,13	2,0	2,0	0		
0,5	1,0	4,0	3,0	-0,6613	
Total	1,0	6,0	5,0	0	-0,6

Dispersión por Código de Nivel

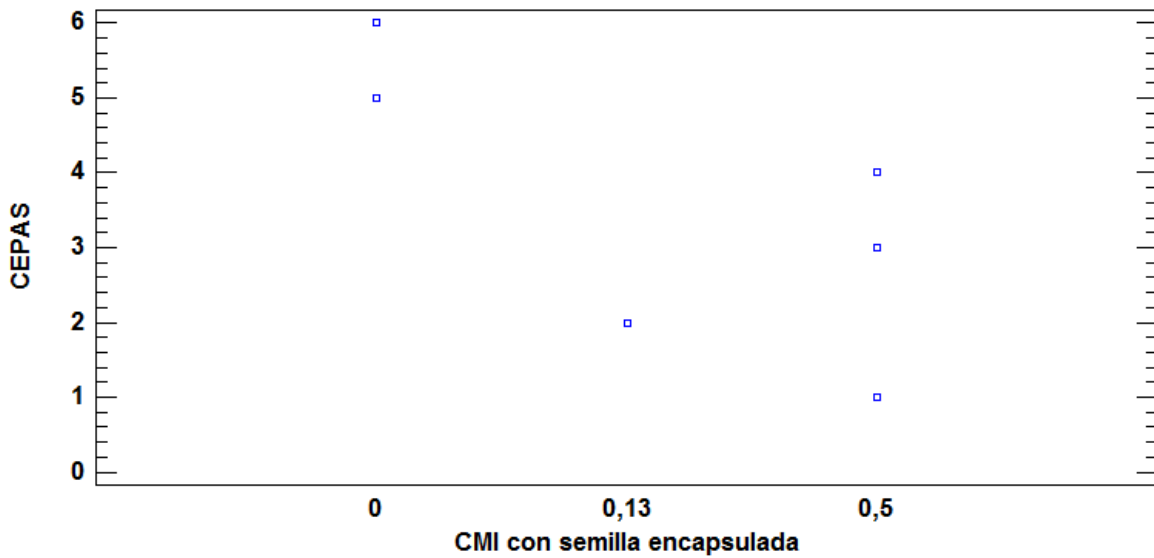
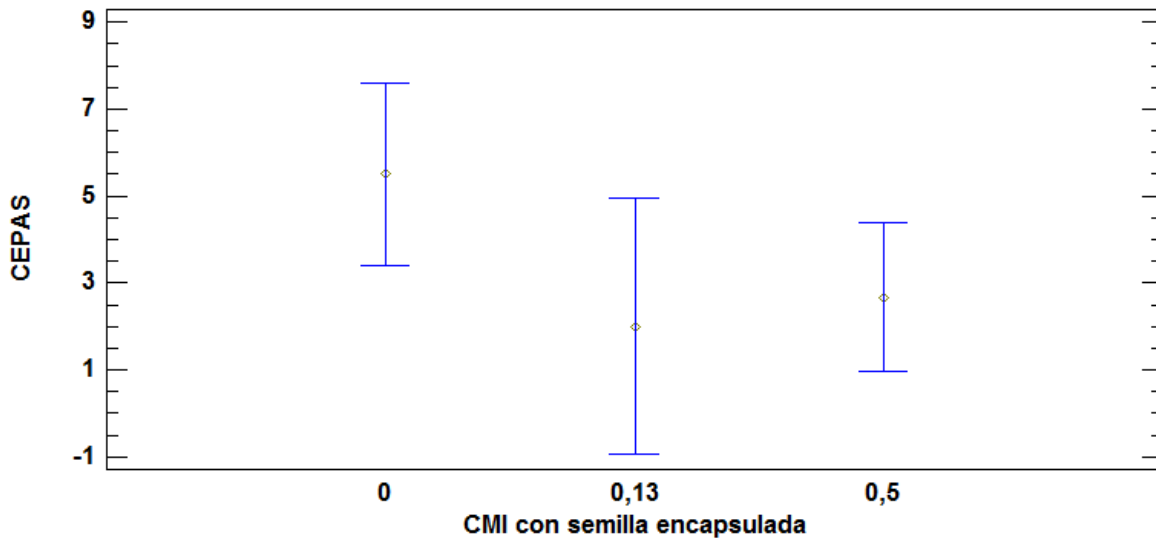


Tabla de Medias para CEPAS por CMI con semilla encapsulada con intervalos de confianza del 95,0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	2	5,5	0,927961	3,41178	7,58822
0,13	1	2,0	1,31233	-0,953188	4,95319
0,5	3	2,66667	0,757677	0,961643	4,37169
Total	6	3,5			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para CEPAS por CMI con semilla encapsulada

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,13	1	2,0	X
0,5	3	2,66667	X
0	2	5,5	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 0,13		3,5	5,11507
0 - 0,5		2,83333	3,81255
0,13 - 0,5		-0,66667	4,82254

* indica una diferencia significativa.

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,67308	0,325024

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
0 / 0,5	0,70710	1,52753	0,21428	0,6222
	7		6	

Prueba de Kruskal-Wallis para CEPAS por CMI con semilla encapsulada

<i>CMI con semilla encapsulada</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
0	2	5,5
0,13	1	2,0
0,5	3	2,66667

Estadístico = 3,52381 Valor-P = 0,171717

Anexo 17 Análisis de media para polifenoles pre y post tratamiento térmico.

Resumen Estadístico

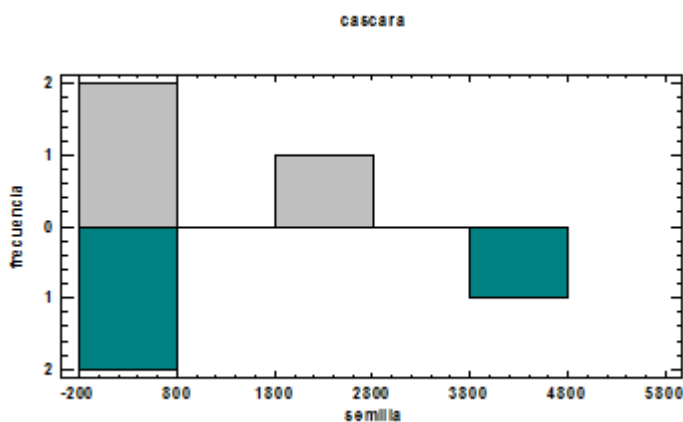
	<i>cascara</i>	<i>semilla</i>
Recuento	3	3
Promedio	781,667	1336,67
Desviación Estándar	1156,7	2191,33
Coefficiente de Variación	147,979 %	163,94%
Mínimo	89,0	70,0
Máximo	2117,0	3867,0
Rango	2028,0	3797,0
Sesgo Estandarizado	1,22217	1,22474

Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar las pruebas que comparan las desviaciones estándar. En este caso, ambos valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro del rango esperado.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de cascara: 781,667 +/- 2873,41 [-2091,74, 3655,08]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de semilla: 1336,67 +/- 5443,57 [-4106,91, 6780,24]



Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

Suponiendo varianzas iguales: -555,0 +/- 3972,01 [-4527,01, 3417,01]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: $t = -0,387947$ valor-P = 0,717816

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Anexo 18 Aumento o disminución de los polifenoles según el tratamiento térmico o recubrimiento en lecho Fluidizado

	Cascara			Semilla		
(mgGAE/g)	Extracto líquido	Extracto Seco (Spray)	Ext. seco Spray-Flu-Capsul	Extracto líquido	Extracto Seco (Spray)	Ext. seco Spray-Flu-Capsul
	139	89	2117	73	70	3867
Diferencia (%)	100	-36	1423	100	-4	5224