



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE,
CONTENIDO DE PIGMENTOS Y ESTUDIO DE CINÉTICA
DE SECADO DE DESCARTES DE HOJA DE APIO (*Apium
graveolens L. var. dulce*)**

Memoria para optar al título de Ingeniera en Alimentos

BEATRIZ JULIA MARÍA VICENCIO PÉREZ

Director de Memoria y Patrocinante

Dr. Luis Puente Díaz

Directora de Memoria

Dra. María Carolina Zúñiga
López

Santiago de Chile, 2016

...A mis padres...

AGRADECIMIENTOS

Luego de transitar por el largo sendero universitario colmado de aprendizajes, me queda más que agradecer a cada una de las personas que aportaron de una u otra forma a terminar este lindo proceso de crecimiento profesional y personal.

En primer lugar agradecer a los profesores de la comisión evaluadora: a las profesoras Andrea Bunger y Alicia Rodríguez por todos los conocimientos que me entregaron a lo largo de mi formación profesional y en especial por la buena disposición para resolver mis dudas, en particular a la profesora Andrea Bunger, por encaminarme en la buena realización de la evaluación sensorial.

A mi director, Dr. Luis Puente Díaz por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto de memoria, sin duda con usted, aprendí en lo académico pero también en lo laboral y personal. A mi directora, Dra. María Carolina Zúñiga López por todo su tiempo, apoyo, paciencia, dedicación, disposición y confianza en mí para sacar adelante este proyecto de tesis, sin duda que fue una gran mentora para poder finalizar este proceso de buena manera. Valoro de todo corazón su generosa ayuda brindada.

A la empresa Biofresco por la oportunidad de poder trabajar en la solución de un problema real aplicado a la industria agroalimentaria chilena. Además, agradecer la disponibilidad de materia prima y el apoyo financiero.

A todos aquellos que me brindaron apoyo en la facultad: al Dr. Claudio Olea por brindarme tan buena acogida en el laboratorio de electro-analítica y por toda la ayuda y palabras de aliento a lo largo de este año; al profesor Eduardo Castro por tan buena acogida en el laboratorio de ingeniería de procesos y por toda su preocupación para culminar este proceso de titulación; al profesor Claudio Inostroza por su tiempo y disposición en la gestión de compra de materiales necesarios para la realización de experimentos de mi memoria. También agradecer a los técnicos del laboratorio de Ingeniería de Procesos; Don Carlos Zamora y Don Sergio

Marconi, por todo el tiempo, buena onda y disposición y buena voluntad para poder sacar adelante experimentos complejos de realizar, gracias por todo.

Agradecer también a todos mis compañeros del laboratorio de electro-analítica: Nía, Camilo, Gaby, Jorge, Manuel, Pancho Mura, Ale, Karina, Mauricio, Pancho Antártico, siempre que los necesité estuvieron ahí presente, gracias por enseñarme con paciencia y cariño, por hacer los días más felices con tallas y risas, por todo el goloseo con helados y chocolates, por darme una palabra de aliento, gracias por darme una cálida acogida en el laboratorio. Sin duda conocí lindas personas en este lugar de trabajo, los quiero.

Agradecer muy especialmente a mi familia, en particular a mis padres; Eliana Pérez y Jorge Vicencio, por haberme dado todo para ser lo que soy hoy, por el inmenso apoyo, cariño y comprensión, en el transcurso de la carrera. A mi hermana por estar siempre a mi lado, con su palabra de aliento y apoyo. Y a mis hermanos por su apoyo y preocupación. ¡Los amo inmensamente! A mi pareja Leonardo, por el apoyo incondicional, palabras de aliento, confianza, comprensión, cariño, amor y preocupación por mí en todo momento, especialmente en los más difíciles, gracias por contenerme y caminar a mi lado. Todos ustedes han sido la base y soporte para afrontar este gran desafío y crecimiento como persona.

A mis amigas de la universidad: Hogle, Camila, Jennifer y Valeska, que definitivamente no sé cómo hubiera sido el camino universitario sin ustedes; grandes personas, apañadoras en todo, siempre con una palabra de ánimo para seguir adelante, las quiero mucho.

Agradecer a mis amigos de la casa: Daniela, Marión, Coto, Pancho, Cristian, Viko, Marlene, Caro, por siempre estar preocupados de cómo iba el proceso de tesis, por el cariño y las palabras de aliento.

Sin el cariño, buena onda, apoyo, tiempo y paciencia de todos ustedes no hubiese podido culminar de tan buena forma este camino universitario.

¡Gracias Totales!

ABREVIATURAS

AP: apigenina.

CA: capacidad antioxidante.

CATA: Check All That Apply, test utilizado para la evaluación sensorial.

D₀: factor de Arrhenius.

D_{eff}: difusividad efectiva.

DPPH: radical 1,1 difenil-2-picrilhidrazilo.

E_a: energía de activación.

EAG: equivalente de ácido gálico.

ET: mecanismo antioxidante de transferencia de electrones / equivalente trolox.

FC: ensayo de Folin Ciocalteu.

FL: fluoresceína.

HAT: mecanismo antioxidante de transferencia de átomo de hidrógeno.

min.: minutos.

MR: Moisture Rate (razón de humedad).

ORAC-PGR: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando como sonda pirogalol.

ORAC-FL: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando como sonda fluoresceína.

pf: peso fresco.

PGR: pirogalol.

PROP: proporciones.

ps: peso seco.

PT: polifenoles totales.

RMSE: estadístico raíz cuadrada de los errores al cuadrado.

SSE: estadístico suma de los errores al cuadrado.

X²: estadístico CHI-cuadrado.

X_{b.h}: humedad en base húmeda.

X_{b.s}: humedad en base seca.

X_{eq}: humedad de equilibrio.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES DE <i>APIUM GRAVEOLENS</i> L.....	1
1.2. SECADO DE ALIMENTOS	4
1.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	5
1.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	7
1.5. MECANISMOS ANTIOXIDANTES	9
1.6. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	10
1.7. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	11
1.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	12
1.9. ANÁLISIS SENSORIAL.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. OBJETIVOS GENERALES.....	15
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. MATERIALES.....	16
5.1.1. <i>Muestras de Apium graveolens L. var. dulce</i>	16
5.1.2. <i>Reactivos</i>	16
5.2. MÉTODOS	16
5.2.1. HUMEDAD.....	16
5.2.2. SECADO DE HOJAS DE APIO	17
5.2.2.1. <i>Modelado de las curvas de secado</i>	19
5.2.2.2. <i>Cálculo de la difusividad efectiva y energía de activación</i>	19
5.2.3. <i>Análisis estadístico para ajustes de curvas a modelos matemáticos de secado</i>	21
5.2.3. PREPARACIÓN DE LAS INFUSIONES	22
5.2.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES TOTALES	22
5.2.4.1. <i>Capacidad antioxidante</i>	22
a. <i>Capacidad de absorbancia de radicales oxígeno (ORAC)</i>	22
a.1. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-FL.....	22
a.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-PGR	23
b. <i>Determinación de la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH</i>	24
5.2.5. POLIFENOLES TOTALES.....	24
5.2.5.1. <i>Ensayo Folin Ciocalteu</i>	24
5.2.6. DETERMINACIÓN DE APIGENINA POR HPLC-DAD	25
5.2.7. ANÁLISIS SENSORIAL DE LA INFUSIÓN	26
5.2.8. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENRIQUECIDO EN CLOROFILA.....	28
5.2.9. DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA DE CLOROFILA EN EXTRACTO DE HOJA DE APIO FRESCA	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. HUMEDAD.....	31
6.2. SECADO DE HOJAS DE APIO	31
6.2.1. <i>Modelado de curvas de secado</i>	36

6.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA INFUSIÓN DE HOJA DE APIO A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN.....	38
6.3.1. <i>Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-FL y ORAC-PGR</i>	38
6.3.2. <i>Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH</i>	42
6.4. DETERMINACIÓN POLIFENOLES TOTALES DE LA INFUSIÓN POR MÉTODO FOLIN C	44
6.5. DETERMINACIÓN DEL FLAVONOIDE APIGENINA EN INFUSIONES POR HPLC-DAD.....	45
6.6. RESUMEN DE ANÁLISIS QUÍMICO PARA EL DESARROLLO DE UNA INFUSIÓN DE HOJA DE APIO	46
6.7. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS INFUSIONES.....	47
6.7.1. <i>Test Check All That Apply (CATA)</i>	49
6.7.2. <i>Aceptabilidad, adición al consumo habitual e intención de compra</i>	52
6.8. EXTRACTO ENRIQUECIDO CON CLOROFILA.....	54
7. CONCLUSIONES	55
8. REFERENCIAS.....	57
9. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2: REACTIVOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACIÓN.	16
TABLA 3: MODELOS MATEMÁTICOS UTILIZADOS PARA AJUSTE DE CURVAS DE SECADO.	19
TABLA 5: VALORES DE DIFUSIVIDAD EFECTIVA A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO.	34
TABLA 6: COMPARACIÓN DE ENERGÍA DE ACTIVACIÓN CON VALORES DE LA LITERATURA.	35
TABLA 8: CONSTANTES DE LOS AJUSTES DE LOS DATOS EXPERIMENTALES A LOS MODELOS MATEMÁTICOS PRESENTADOS.	37
TABLA 14: CANTIDAD DE APIGENINA LIBRE EN LAS INFUSIONES REALIZADAS CON HOJA SECADA A 35°C, A LOS 4 TIEMPOS DE EXTRACCIÓN.	46
TABLA 15: DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS POR ATRIBUTO Y POR MUESTRA EVALUADA, OBTENIDAS POR LA PRUEBA Q DE COCHRAN.	49
TABLA 16: RESUMEN DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL.	52
TABLA 17: INTENCIÓN POSITIVA DE COMPRA Y DE AGREGAR A LA CANASTA HABITUAL LOS PRODUCTOS EVALUADOS.	53
TABLA 1: ÁCIDOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E ISOFLAVONAS ENCONTRADAS EN LA HOJA DE APIO FRESCA (SOROUR ET AL., 2015).	62
TABLA 4: GRADIENTE DE ELUSIÓN CROMATOGRÁFICA.	63
TABLA 7: COMPARACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DE LOS AJUSTES A MODELOS MATEMÁTICOS.	65
TABLA 9: VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA) POR MÉTODO ORAC-FL A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO PARA REALIZAR LAS INFUSIONES.	65
TABLA 10: VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA) POR MÉTODO ORAC-PGR A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO PARA REALIZAR LAS INFUSIONES.	67
TABLA 11: VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA) POR MÉTODO DPPH A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO PARA REALIZAR LAS INFUSIONES.	68
TABLA 12: VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE PT POR MÉTODO FOLIN C A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO PARA REALIZAR LAS INFUSIONES.	68
TABLA 13: LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD), LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ) Y LONGITUD DE ONDA MÁXIMA DEL FLAVONOIDE APIGENINA.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: PARTES DE LA PLANTA: A) PLANTA APIUM GRAVEOLENS L. VAR. DULCE. B) INFLORESCENCIAS. C) SEMILLAS. D) TALLO.	1
FIGURA 2: ESTRUCTURA QUÍMICA GENERAL DE LOS FLAVONOIDES.....	8
FIGURA 3: EJEMPLOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS SIMPLES: A) ÁCIDO HIDROXIBENZOICO, B) ÁCIDO HIDROXICINÁMICO.....	9
FIGURA 5: CANASTILLOS PARA EL SECADO, CON SUS RESPECTIVAS MUESTRAS DISPUESTAS EN CAPA FINA.	18
FIGURA 7: OBTENCIÓN EXTRACTO ENRIQUECIDO EN CLOROFILA: A) HOJAS DE APIO ANTES DE LA EXTRACCIÓN CON ETANOL 95%. B) EXTRACTO OBTENIDO EN LOS PRIMEROS 10 MINUTOS DE MACERACIÓN. C) EXTRACTO OBTENIDO DESPUÉS DE LA SEGUNDA MACERACIÓN. D) HOJAS DESPUÉS DEL PROCESO COMPLETO DE MACERACIÓN. E) EXTRACTO FINAL.....	29
FIGURA 8: GRÁFICO DE CURVAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO A LAS TEMPERATURAS DE 35, 45 Y 55° C.....	32
FIGURA 9: GRÁFICO QUE REPRESENTA LA VARIACIÓN DE LA VELOCIDAD DE SECADO EN FUNCIÓN DE LA RAZÓN DE HUMEDAD.....	33
FIGURA 12: VARIACIÓN DE LA CA POR ORAC-FL A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y A LAS DISTINTAS TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO.	38
FIGURA 15: VARIACIÓN DE LA CA POR ORAC-PGR A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN Y A LAS DISTINTAS TEMPERATURAS DE SECADO DE LA HOJA DE APIO.	41
FIGURA 16: VARIACIÓN DEL % DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH, EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN A CADA TEMPERATURA DE SECADO DE LAS HOJAS.....	43
FIGURA 17: POLIFENOLES TOTALES DE LAS INFUSIONES OBTENIDAS A LOS TIEMPOS DE EXTRACCIÓN 3, 5, 7 Y 10 MINUTOS CON HOJA DE APIO SECADA A 35, 45 Y 55°C.	44
FIGURA 4: REACCIÓN ENTRE EL RADICAL DPPH Y UN COMPUESTO ANTIOXIDANTE.....	62
FIGURA 6: DIFERENCIA GRÁFICA ENTRE ORAC-FL Y ORAC-PGR: A) GRÁFICA DE ORAC-FL, LA CUAL PRESENTA UN TIEMPO DE INDUCCIÓN, AL INICIO DEL DECAIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA (ENCERRADO EN UN CÍRCULO ROJO) Y B) GRÁFICA ORAC-PGR, LA CUAL NO INICIA CON UN TIEMPO DE INDUCCIÓN SINO QUE EL DECAIMIENTO SE PRODUCE DE FORMA INMEDIATA.....	63
FIGURA 10: LOGARITMO DE LA RAZÓN DE HUMEDADES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE LAS HOJAS DE APIO A 35°C, 45°C Y 55°C.....	64
FIGURA 11: GRÁFICO DEL LOGARITMO NATURAL DE LA DIFUSIVIDAD EFECTIVA A 35°C, 45°C Y 55°C VERSUS 1/T (1/°K).	64
FIGURA 13: CURVA DE CALIBRACIÓN DE TROLOX QUE REPRESENTA UTILIZADA PARA ENSAYO ORAC-FL.....	66
FIGURA 14: CURVA DE CALIBRACIÓN DE TROLOX UTILIZADA PARA ENSAYO ORAC-PGR. 66	
FIGURA 18: CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDAR ÁCIDO GÁLICO PARA EXPRESIÓN DE RESULTADOS FINALES DEL ENSAYO FOLIN C.	69

FIGURA 19: CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDAR DE APIGENINA LIBRE, PARA SU CUANTIFICACIÓN EN LAS INFUSIONES DESARROLLADAS.....	69
FIGURA 21.- FRECUENCIA DE CONSUMO DE TÉ O HIERBAS POR PARTE DE LOS CONSUMIDORES ENCUESTADOS.....	70
FIGURA 23: CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDAR CLOROFILA.....	71

RESUMEN

La empresa Biofresco, procesadora de hortalizas, genera desechos orgánicos, siendo uno de los principales residuos las hojas de apio (*Apium graveolens L. var. dulce*). Sabiendo que éstas poseen fitoquímicos con propiedades antioxidantes y pigmentos como la clorofila, el principal objetivo de la siguiente investigación, fue el aprovechamiento de este desecho agrícola, por medio del estudio de la cinética de secado por convección con aire caliente, para el desarrollo de una infusión con aporte de antioxidantes, y por otro lado, con la hoja fresca, el desarrollo de un extracto enriquecido en clorofila para posterior uso como colorante natural. Para el estudio de secado de las hojas se trabajó a tres temperaturas (35, 45 y 55°C). Se realizó un ajuste de los datos experimentales, utilizando 6 modelos matemáticos establecidos en la literatura. Basándose en análisis estadístico, el modelo Page Modificado presentó el mejor ajuste. Los valores de la difusividad efectiva del agua se estimaron en el rango de $6,5 \times 10^{-10}$ - $2,8 \times 10^{-9}$ (m²/s) y el valor de la energía de activación fue de 61,83 (kJ/mol). Para el desarrollo de la infusión se trabajó con hoja secada a 35, 45 y 55°C con 4 tiempos de extracción (3, 5, 7 y 10 min). Siendo la infusión obtenida con la hoja secada a 35°C, por un tiempo máximo de contacto de la muestra con el agua caliente de 7 min, la que entregó el mejor valor agregado de acuerdo a las propiedades antioxidantes. Un metabolito secundario de la hoja de apio; apigenina, fue cuantificado por HPLC-DAD, encontrándose una cantidad entre 1,5 – 2 mg AP/100 g hoja de apio ps en las infusiones con hoja seca a 35°C. Finalmente, para el desarrollo integral de la infusión se realizó una evaluación sensorial con consumidores, los cuales en general, mostraron un grado de indiferencia hacia el producto. Por otra parte, el desarrollo del extracto enriquecido en clorofila se obtuvo por medio del método de maceración con etanol 95% como solvente extractante. Este análisis presentó una cantidad de 25,1 g de clorofila a/Kg de hoja pf. Por lo tanto, con el desarrollo de estos alimentos con propiedades funcionales, se logró valorizar los residuos de hoja de apio.

SUMMARY

Biofresco company, a vegetable processor, generates organic waste like celery leaves (*Apium graveolens L. var. dulce*), one of the main residues that this industry produces. Knowing that these celery leaves have phytochemicals with antioxidant properties and pigments such as chlorophyll, the main objective of the following research was to take advantage of these organic waste, through the study of hot air convection drying kinetics of celery leaf, by the development of an infusion with antioxidant contribution and, on the other hand, an extract enriched in chlorophyll for later use as a natural colorant using fresh leaves. For the study of the drying process of the leaves it has been worked at three temperatures (35, 45 and 55°C). An adjustment of the experimental data was made using 6 established-in-literature mathematical models. Based on statistical analysis, the Modified Page model presented the best fit. The values of the effective diffusivity of the water were estimated in the range of 6.5×10^{-10} to 2.8×10^{-9} (m²/s) and the value of the activation energy was 61.83 (kJ/mol). For the infusion development it has been worked with leaf dried at 35, 45 and 55° Celsius with 4 extraction times (3, 5, 7 and 10 minutes). The best value added according to antioxidant properties was obtained with the leaf dried at 35° C, with a maximum contact time between leaf and hot water of 7 minutes. A secondary metabolite of the celery leaf, apigenin, was quantified by HPLC-DAD, finding quantities between 1,5 and 2 mg AP/100 g celery leave dw. Finally, a sensory evaluation was performed with consumers for the integral development of the infusion, which in general showed a degree of indifference to the product. On the other hand, the development of the extract enriched in chlorophyll has been obtained through the maceration method with 95% ethanol as extractant solvent. This analysis showed an amount of 25.1 g of chlorophyll a/kg of fresh leaf weight. Therefore, with the development of these foods with functional properties, it was possible to value the residues of celery leaf.

1. Introducción

1.1. Antecedentes de *Apium graveolens* L.

Apium graveolens L., comúnmente conocido como apio es una planta que pertenece a la familia de las Apiaceae, anteriormente denominada Umbelíferae (Sambamurty, 2005). Existen dos variedades botánicas de *Apium graveolens*. La variedad *Dulce*, que posee hojas y tallos florecidos y la variedad *Rapaceum*, también denominado apio nabo que tiene pequeñas hojas de color verde oscuro y una raíz de gran tamaño (Gauri et al., 2015).

Esta hortaliza ha sido utilizada desde épocas muy antiguas, como verdura y planta medicinal (antidiurética), tanto por los egipcios y los griegos (Segura et al., 2009). En la Figura 1 se puede apreciar el detalle de la planta (a), con una altura promedio de 100 cm, un fuerte aroma y con un tallo sólido. Sus hojas tienen un tamaño que oscila entre 10 a 50 mm, con forma triangular o forma de diamante; sus inflorescencias (b), que poseen un color blanco verdoso; su semilla (c), pequeños cremocarpos de color marrón oscuro, con un sabor picante y aroma agradable contenidas en los frutos de la planta y por último, un corte transversal de su tallo (d) (Gauri et al., 2015; Kooti et al., 2014).

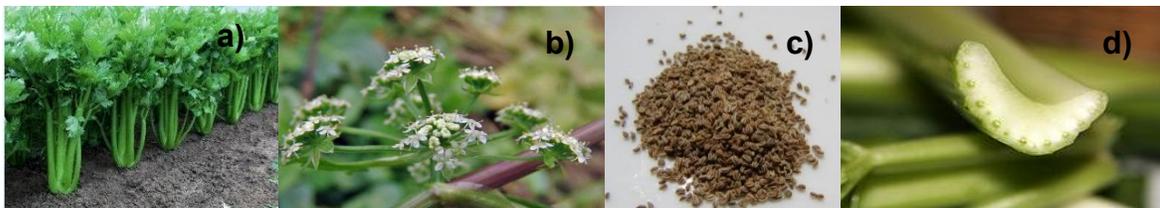


Figura 1: Partes de la planta: a) Planta *Apium graveolens* L. var. dulce. b) Inflorescencias. c) Semillas. d) Tallo.

La planta es capaz de crecer en suelos arcillosos ricos en compuestos orgánicos, con pH de entre 6 a 7 y temperaturas entre 16 – 21 °C (Gauri et al., 2015; Kooti et al., 2014; Malhotra, 2012).

El apio nace de una planta silvestre en zonas pantanosas distribuidas ampliamente en Europa y Asia. Actualmente es consumido en la mayoría de los países alrededor

del mundo (Kooti et al., 2014, Malhotra, 2012). Esta hortaliza, además de ser consumida, también es cultivada por sus semillas y aceites esenciales, que son utilizados como saborizante por su aroma característico, y a menudo como especia. A pesar que el consumo se centra principalmente en el tallo, sus hojas son ricas en compuestos bioactivos que tienen usos medicinales y se utiliza comúnmente como un alimento en la dieta mediterránea. Éstas son una fuente importante de flavonoides naturales y contienen grandes cantidades de antioxidantes capaces de reducir radicales libres (Kooti et al., 2014). Dentro de los antioxidantes de la hoja de apio, se ha reportado gran variedad de ácidos fenólicos, flavonoides e isoflavonas (Véase Tabla 1, Anexo 1) (Mencherini et al., 2007; Jingli et al., 2013; Wolski et al., 2002). Entre estos antioxidantes, los flavonoides; luteolina y apigenina son los que se encuentran en mayor concentración. Este último compuesto antioxidante posee propiedades benéficas para la salud, tales como: capacidad anti-inflamatoria, anticancerígenas, antivirales, y antioxidante (Qian et al., 2011; Malhotra., 2012).

De las secciones de la planta, se ha reportado que las hojas son las que poseen mayor capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales (Wolski et al., 2002). Según la base de datos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) para frutas y hortalizas, el tallo posee una capacidad antioxidante de 5800 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g ps}$ (ORAC) y una cantidad de polifenoles totales de 180 mg EAG/100 g ps (Speisky, 2008).

En cuanto al uso del apio como producto industrial, mundialmente, son varios los productos que se obtienen, tales como: Apio deshidratado por aire caliente o por liofilización, para ser usado en sopas, rellenos, enlatados y ensaladas; mezclas de jugo de apio (se mezcla el jugo de apio con otras hortalizas tales como; la zanahoria, para la obtención de una bebida saludable); y apio enlatado (para tener disponibilidad de éste fuera de la temporada de cosecha) (Malhotra, 2012).

Otro producto comúnmente obtenido a partir del apio son ensaladas preparadas. Éstas, con el tiempo, han aumentado su demanda, tanto en Chile como en el resto del mundo, siendo productos frescos, saludables, fáciles de preparar o listos para su consumo. Estos alimentos son clasificados en Chile como hortalizas

mínimamente procesadas en fresco (MPF) o también conocidos a nivel mundial como productos de la IV gama o Fresh-Cut (Pefaur, 2014; Rico et al., 2007). Para la obtención de los productos mencionados anteriormente, se debe realizar un proceso agroindustrial que genera desechos orgánicos, principalmente la hoja, los cuales actualmente no son reutilizados, sino que descartados en vertederos, perdiendo materia prima con valor nutricional. En los vertederos ocurren reacciones de descomposición de la materia orgánica, que generan gases, tales como metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂), que contribuyen con el efecto invernadero y por otro lado, también se produce la contaminación de aguas subterráneas. Esto último debido a que se produce la descomposición de estos desechos a través de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, generando aguas denominadas “aguas de lixiviación” acumuladas en la parte inferior del vertedero, pudiendo filtrarse hacia las aguas subterráneas, por lo que, el aprovechamiento de estos descartes para la elaboración de nuevos productos disminuiría estos dos focos de contaminación (Castaño, 2016). Además, permitiría el desarrollo sustentable del sector agroindustrial, aumentando sus ingresos, con éstos nuevos productos generados a partir de estos desechos (Carmona, 2013).

Bajo este marco, la empresa procesadora de hortalizas llamada Biofresco, presentó la problemática de acumulación de desechos provenientes principalmente del apio (*Apium graveolens L. var. dulce*), produciendo al mes una cantidad aproximada de 28 toneladas de descarte en hojas, tallos y raíz, de las cuales 12 toneladas corresponden a hojas, por lo que estos descartes podrían ser aprovechados para la obtención de productos a nivel industrial como snacks, harinas, colorantes, especias, etc.

Es por esto que se propuso utilizar los descartes de la hoja de apio, para el desarrollo de dos productos: infusión con aporte de antioxidantes y un extracto enriquecido en clorofila, para un posterior uso como colorante natural.

1.2. Secado de alimentos

Uno de los procesos más utilizado industrialmente para el desarrollo de un sector importante de nuevos productos alimenticios, es la etapa de secado. Dentro de los tipos de secado, se encuentra el secado convencional por aire caliente, que es el más utilizado, por lo tanto es de interés analizar el comportamiento de los alimentos expuestos a este tipo de operación unitaria. Existe poca información acerca de la cinética de secado de la hoja de apio, por lo que estudiar las variables a diferentes temperaturas, será una contribución para la elaboración de nuevos productos a partir de esta hortaliza.

El secado de alimentos es uno de los métodos más antiguos y frecuentemente usados para la preservación de los mismos. El secado de frutas y verduras al sol, el ahumado de pescado y carne, son procesos ampliamente conocidos y originados en la antigüedad. Siendo el secado por energía solar uno de los métodos principalmente empleados en las culturas milenarias como la persa o china, quienes ya secaban frutas y vegetales al sol hace 5000 años atrás (Araya, 2009).

El secado o deshidratación es definido como un proceso de eliminación de agua para alcanzar niveles bajos de humedad, que permitan controlar los diferentes procesos de deterioro. En este proceso ocurre una transferencia de masa y calor simultánea. La transferencia de calor desde el ambiente al alimento, evapora el agua de la superficie de éste, generando así una transferencia interna de agua en el alimento, donde ésta puede ser transportada a la superficie de éste, tanto en estado líquido, como en forma de vapor (Okos et al., 2007).

Los equipos de deshidratación utilizan generalmente conducción, convección y/o radiación para transferir energía desde una fuente de calor al material alimenticio. El calor se transfiere directamente de un gas caliente (convección o radiación) o indirectamente a través de una superficie de metal (conducción) (Okos et al., 2007). El secado por convección es el método comúnmente utilizado en el período de post-cosecha de productos agrícolas. Existen diferentes equipos para llevar a cabo esta operación, dentro de los más utilizados por la industria alimentaria se encuentran:

el secador tipo spray, el secador de lecho fluidizado, liofilizador, secadores de tambor, entre otros; basándose todos en la transferencia de energía mediante convección.

El método de secado por convección con aire caliente a altas temperaturas provoca pérdida de calidad de las frutas y verduras, tales como: sabor, color y contenido nutricional. Por otra parte, este tipo de proceso consume grandes cantidades de energía. Si se desea obtener un producto con bajo contenido de humedad, se puede utilizar temperaturas más bajas para así evitar la pérdida de compuestos termosensibles de interés, pero se debe mantener la muestra expuesta al aire caliente por un tiempo más prolongado, generando por consiguiente un mayor gasto energético (Chayjan et al., 2013).

Para predecir el comportamiento del secado de alimentos, se han desarrollado varios modelos matemáticos. Éstos se dividen en tres grupos: modelos teóricos (segunda ley de difusión de Fick), semi-teóricos (como por ejemplo los modelos Lewis, Page, Page modificado, entre otros) y empíricos (Wang-Singh) (Krokida et al., 2003; Kaleta y Górnicki, 2010).

Dentro del proceso de secado, las variables importantes que deben ser medidas para el modelado, diseño y optimización del proceso de secado por aire caliente (convectivo) son: (i) la difusividad efectiva de la humedad (D_{eff}), que es una medida utilizada para controlar la tasa de transferencia de vapor de agua (humedad) desde el interior de los materiales hacia la superficie externa (Senadeera et al., 2000 y 2003) y (ii) la energía de activación (E_a) que corresponde a la mínima cantidad de energía requerida para comenzar el proceso de secado (Aghbashlo et al., 2008).

1.3. Métodos de extracción

Existen múltiples tipos de métodos para realizar diferentes tipos de extractos, los cuales varían principalmente según el tipo de solventes, temperaturas, tiempo, entre otras variables. El método de extracción será elegido, dependiendo del tipo de muestra y producto que se quiera obtener.

Dentro de las extracciones clásicas existe, (i) extracción líquido-líquido; en donde la matriz que contiene los compuestos de interés es un líquido. Éste es mezclado con un solvente inmiscible, que tiene afinidad por dichos compuestos, para luego realizar la separación de ambas fases. Este tipo de extracción, no es comúnmente utilizada en la industria alimentaria, ya que usualmente se utilizan solventes tóxicos. (ii) Extracción sólido-líquido, en este tipo de extracción la matriz es sólida, la cual se pone con contacto con un solvente con afinidad a los compuestos de interés contenidos en la matriz. Esta es una operación unitaria ampliamente utilizada para extraer importantes componentes desde los alimentos, como por ejemplo: la sacarosa de la caña o remolacha; lípidos, proteínas y fitoquímicos desde las plantas; hidrocoloides funcionales a partir de algas y entre otros ejemplos (Ignat et al., 2011). Este último método, también recibe el nombre de maceración, cuando los tiempos de contacto entre la matriz sólida y el solvente son prolongados.

Por otro lado, existen métodos de extracción modernos que utilizan equipos de alta tecnología, conllevando un alto costo, como por ejemplo; extracción por fluidos supercríticos; extracción con agua sub-crítica, extracción con solvente acelerado (ASE) (Wang et al., 2006; Ibañez et al., 2006).

Debido a que la matriz de este estudio es sólida, se realizará extracción sólido líquido, con dos solventes; (i) con agua caliente para la obtención de la infusión, la cual tiene por definición, según el European Tea Committee (ETC) y la European Herbal Infusions Association (EHIA): “las infusiones de frutas o hierbas son hechas con plantas o partes de ellas que no tengan su origen en la planta del Té (*Camelia sinensis*) y son destinadas para uso alimenticio reposando dichas partes en agua recién hervida” (ETC y EHIA, 2014) y (ii) con etanol al 90%, para la extracción del pigmento clorofila, el cual abunda en hojas y otros tejidos vegetales, siendo éste responsable de la coloración verde. Este pigmento se encuentra en los cloroplastos, existiendo varios tipos de clorofilas: a, b, c, d y bacterioclorofilas (Mancilla et al., 2012).

1.4. Capacidad antioxidante

Dentro de las propiedades importantes a evaluar en uno de los productos desarrollados (infusión), se encuentra la capacidad antioxidante, sustentada por la presencia de compuestos antioxidantes presentes en los descartes de hoja de apio, mencionados en la sección 1.1.

El término "capacidad antioxidante" (CA) se utiliza para referirse a la capacidad de los antioxidantes para atrapar radicales, pero en otros casos se habla de la capacidad de inhibir la oxidación. Estos dos conceptos de "capacidades antioxidantes" son diferentes, por lo que la capacidad de los antioxidantes se debe determinar mediante dos factores que deben evaluarse claramente y estos son la velocidad del *scavenging* y la cantidad de radicales libres atrapados (Galleano et al., 2010; Huang et al., 2005).

Un radical libre, químicamente, es cualquier especie (átomo, molécula o ion) que posee al menos un electrón desapareado, y que sea a su vez capaz de existir de forma independiente. La presencia de este electrón desapareado en dicha especie, lo vuelve inestable, confiriéndole la habilidad para reaccionar con otros átomos y/o moléculas presentes en su entorno, siendo por ejemplo, en el organismo humano lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Al generarse un exceso de especies oxidantes, como los radicales libre, condición conocida como "estrés oxidativo", éstos oxidantes comienzan a reaccionan con biomoléculas del organismo, produciendo enfermedades de alta complejidad como diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neuronales, la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo, la enfermedad de Parkinson, aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Jensen, 2003; Alam et al., 2013).

En el organismo son varias las especies reactivas que se forman a partir del metabolismo aeróbico en la mitocondria celular, dentro de estas se encuentran; (i) especies reactivas derivadas del oxígeno, (ROS, de la sigla en inglés Reactive Oxygen Species), tales como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), peroxilo (ROO^{\cdot}) y alcoxilo (RO^{\cdot}) y (ii) especies reactivas centradas su reactividad en otro tipo de átomo

como el nitrógeno (RNS, de la sigla en inglés Reactive Nitrogen Species) tales como óxido nítrico (NO[•]) y dióxido nítrico (NO₂[•]) (Jensen, 2003).

En la acción de estabilizar una especie reactiva presente en el organismo, los antioxidantes son los protagonistas. Estos se pueden clasificar como: (i) Endógenos; dentro de estos se encuentran antioxidantes bio-sintetizados por el organismo, como las enzimas con capacidad antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, entre otros) y antioxidantes no enzimáticos (glutatión, ácido úrico, ácido dihidrolipóico, entre otros), (ii) Exógenos; dentro de esta clasificación, se encuentran los antioxidantes provenientes de fuentes externas, como la dieta. Dentro de ellos es posible mencionar: vitaminas-antioxidantes (ácido ascórbico, α - tocoferol y la vitamina A); carotenoides (como luteína, betacaroteno, zeaxantina y licopeno) y polifenoles (flavonoides y no flavonoides). Éstos últimos, son compuestos bio-sintetizados por las plantas confiriéndoles a las frutas y verduras capacidad antioxidante (Jensen, 2003).

Todos los polifenoles poseen en su estructura, a lo menos, uno o más grupos hidroxilos (HO-) unidos a un anillo aromático, es decir, presentan algún grupo fenólico (Galleano et al., 2010; Rice-Evans et al., 1996). Los polifenoles, se clasifican en dos grupos:

- I) Flavonoides: su estructura consta de dos anillos aromáticos que se encuentran unidos entre sí por un heterociclo formado por tres átomos de carbono y uno de oxígeno (Figura 2). Los flavonoides se subdividen en cinco grupos: antocianidinas, flavanoles, flavonas, flavonoles, e isoflavonas.

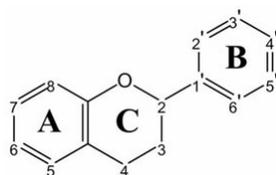


Figura 2: Estructura química general de los flavonoides.

- II) No flavonoide: este grupo se subdivide en cuatro tipos; ácidos hidroxicinámicos, ácidos Benzoicos, estilbenos y taninos hidrolizables. Los ácidos Benzoicos constituyen la mayor parte de este grupo, encontrándose derivados de éste, tales como; los ácidos protocatecuico, gálico y p-hidroxi-benzoico; otros componentes mayoritarios son los derivados del ácido hidroxicinámico, tales como; ácido clorogénico, cafeico, ferúlico y p-cumárico (Figura 3).

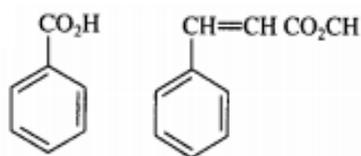


Figura 3: Ejemplos de ácidos fenólicos simples: a) ácido hidroxibenzoico, b) ácido hidroxicinámico.

Todos los polifenoles poseen propiedades antioxidantes, pero además, estudios han establecido que algunos de estos compuestos exhiben, entre otras, propiedades anti-inflamatorias, anti-agregantes plaquetarias, antibacterianas y anticancerígenas (Scalbert et al., 2011)

1.5. Mecanismos antioxidantes

Para la determinación de la capacidad antioxidante existen variadas técnicas que se basan principalmente en dos mecanismos de reacción: transferencia de electrones (ET, *Electron Transfer*) y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*) (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005) Sin embargo existen también mecanismo mixtos, en los cuales existe la transferencia de un protón seguida a la transferencia de un electrón o caso contrario, la transferencia del electrón seguida de un protón. El mecanismo HAT se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno al radical libre como se muestra en la siguiente reacción:



Donde AH, es el antioxidante que donará su átomo de hidrógeno al radical R^{*}, A^{*} es el radical generado del antioxidante y RH es el radical luego de haber recibido el átomo de hidrógeno.

El mecanismo ET consiste en la transferencia de un electrón desde la molécula antioxidante hacia la especie radicalaria, reduciendo a esta última. El mecanismo involucra la siguiente reacción:



1.6. Determinación de polifenoles totales

Además de determinar la capacidad antioxidante de las infusiones es interesante realizar una cuantificación de los polifenoles totales (PT) contenidos en estos extractos, siendo el método más conocido y ampliamente utilizado para esta medición el ensayo de Folin Ciocalteu (FC). Éste es un método colorimétrico basado en las reacciones de transferencia de electrones entre el reactivo de Folin-C y polifenoles presentes en la muestra. (Sánchez-Rangel et al., 2013; Dudonné et al., 2009).

Estudios reportan que el reactivo de FC contiene una mezcla de sales de tungstato de sodio (Na₂WO₄•2H₂O) y molibdato de sodio (Na₂MoO₄•2H₂O), que junto a otros reactivos, generan una solución color amarillo intenso compuesta de heteropolifosfotungstatos/molibdatos. La naturaleza química exacta de la reacción de FC, que conduce a la formación de una especie azul (posiblemente: (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻) es desconocida debido a su complejidad, pero si se ha reportado que el molibdeno es reducido desde un estado de oxidación VI al V. (Sánchez-Rangel et al, 2013).

La medición de PT a extractos naturales puede contener sustancias interferentes, ya que otros compuestos reductores de la muestra pueden reaccionar con el reactivo sesgando los resultados obtenidos por este método. Entre estos compuestos se encuentran azúcares reductores y aminoácidos (Sánchez-Rangel et al, 2013).

1.7. Métodos de determinación de capacidad antioxidante

Debido a que la infusión es un alimento con una matriz compleja, la cual tiene una gran cantidad y variedad de antioxidantes, una manera de cuantificar en conjunto, considerando interacciones, sinergias entre ellos y por otro lado, los pro-oxidantes presentes, es medir la capacidad antioxidante.

En la literatura son varios los métodos descritos para analizar la capacidad antioxidante de muestras como: alimentos, extractos vegetales, antioxidantes comerciales, entre otros. Dentro de los métodos basados en el mecanismo HAT, se encuentran el método ORAC (*Oxygen Radicals Absorbance Capacity*) y el TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) y dentro de los mecanismo ET, se encuentran el método DPPH, TEAC (del inglés *Trolox equivalent antioxidant capacity*) y FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter*) (Huang et al., 2005)

Entre estas metodologías se destaca el ensayo DPPH, el cual permite evaluar directamente las propiedades del antioxidante mediante el *scavenging* del radical DPPH[•], el cual posee un electrón de valencia desapareado sobre un átomo de nitrógeno, su forma oxidada posee una tonalidad violeta oscuro que se caracteriza por una banda de absorción en aproximadamente 517 nm, decolorándose a amarillo pálido por la reacción con un antioxidante. Al utilizar un solvente prótico como el metanol en este ensayo, el mecanismo antioxidante es por transferencia de electrones (ET) (Véase Figura 4, Anexo 2) (Alam et al., 2013; Villaño et al., 2007; Dudonné et al., 2009).

También se destaca el ensayo ORAC el cual mide la capacidad de atrapamiento de radicales peroxilo (OOH[•]) por parte de un antioxidante (AH), compitiendo con una molécula sonda. Al generarse la reacción, se registra el decaimiento de la fluorescencia (sonda: fluoresceína) o absorción (sonda: pirogalol rojo). La generación del radical se realiza por medio de la termólisis de 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano)dihidrocloruro (AAPH) en una solución saturada de oxígeno, manteniendo constante el flujo de éstos durante la reacción. El atrapamiento de radicales por parte de los antioxidantes se realiza por mecanismo HAT. Los resultados se expresan en función de un estándar antioxidante, Trolox, un análogo

de la vitamina E soluble en agua, quedando los resultados expresados en Trolox equivalentes (ET) (Alam et al., 2013; Dudonné et al., 2009; López-Alarcón et al., 2006; Poblete et al., 2009).

1.8. Métodos cromatográficos

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria alimentaria.

Se entiende por cromatografía como la técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla son selectivamente retenidos por la fase estacionaria.

La técnica de HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) utiliza una fase móvil, la cual se hace pasar en forma uniforme a una alta presión (≈ 400 atmósferas), la ventaja más obvia de esta técnica es permitir la separación y detección de los analitos en muestras complejas que no son volátiles o que se descomponen con la temperatura (Bansal et al., 2010).

Se inyecta una pequeña cantidad (5 -100 μL) de muestra líquida o disuelta en solución, en la fase móvil, la cual pasa a través de una columna cromatográfica que está empacada con partículas de fase estacionaria. De acuerdo a la afinidad del soluto con las dos fases se producirá la separación de acuerdo al fenómeno de adsorción (si la fase estacionaria es un sólido), o de reparto (si la fase estacionaria es un líquido).

En cromatografía de adsorción se utiliza una fase estacionaria de naturaleza polar, tales como partículas de sílice o alúmina hidratada. La fase móvil es apolar, y por lo tanto, el soluto de acuerdo a su polaridad competirá por los sitios activos de la fase estacionaria, por medio del fenómeno de adsorción.

Por otro lado en la cromatografía de partición, el soluto se distribuye entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria formada por un líquido inmisible con la fase móvil y que está en un soporte sólido inerte. El fenómeno de reparto es controlado variando la polaridad de la fase móvil, en donde se puede realizar la combinación de dos o más solventes durante la corrida cromatográfica (gradiente de fase móvil), para mejorar la resolución de los picos cromatográficos. Si la fase estacionaria es más polar que la fase móvil se denomina cromatografía de fase normal, en cambio si la fase móvil es más polar que la fase estacionaria se llamará cromatografía en fase reversa, siendo ésta última la más utilizada actualmente.

Usualmente para la cuantificación de los analitos se utiliza una curva de calibración, realizada a diferentes concentraciones con una estándar del compuesto de interés.

La cromatografía debe estar acoplada a un detector. Una de las clasificaciones de los detectores, puede estar basada en una “propiedad de la disolución”, los cuales responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una “propiedad del soluto” responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV-Vis, fluorescencia o fosforescencia, que no son propias de la fase móvil. El espectrofotómetro UV-Vis con arreglo de diodos, es el más utilizado en la actualidad, ya que permiten registrar el espectro completo por cada analito previamente separado.

1.9. Análisis sensorial

El desarrollo de un producto involucra una serie de análisis químicos, los cuales pueden ser complementados con una evaluación sensorial. Ésta última ha sido definida como un método científico utilizado para evocar, medir, analizar e interpretar las respuestas de un grupo de personas, que a través del uso de los cinco sentidos; vista, olfato, tacto, gusto y oído, han percibido ciertas características de un determinado producto (Lawless, 2003).

Existen varios test para la evaluación sensorial de los productos existentes en el mercado. Dentro de éstos se pueden encontrar dos tipos de test; con consumidores

y con panel entrenado. En la realización de evaluación con consumidores se emplean comúnmente los siguientes test; de aceptabilidad, de preferencia y los focus group, además de otros test que han sido desarrollados en el último tiempo. En cambio en la realización de evaluación sensorial con panel entrenado se utilizan test de diferencia; de valoración de calidad y análisis descriptivo.

Dentro de los test realizados en este estudio, se encuentra el test Check All That Apply (CATA), el cual consiste en la medición de la percepción de ciertos atributos o frases que cuestionan características propias de los productos, los cuales son características o parámetros que condicionarían la preferencia o aceptabilidad por parte del consumidor. Es un método que se caracteriza por su rápida ejecución y análisis, lo que permite tener resultados en tiempos acotados (Valentín et al., 2012). Dentro de los tres test mencionados anteriormente, el test de aceptabilidad, es un método que proporciona información sobre si el producto fue del gusto de los consumidores o no, en un sentido absoluto (Lawless, 2003).

2. Planteamiento del problema

La empresa procesadora de hortalizas llamada Biofresco, presentó la problemática de acumulación de desechos provenientes principalmente del apio (*Apium graveolens L. var. dulce*), produciendo al mes una cantidad aproximada de 28 toneladas de descarte en hojas, tallos y raíz, de las cuales 12 toneladas corresponden a hojas. Sabiendo que ésta última posee propiedades beneficiosas para la salud, estos descartes podrían ser aprovechados para la obtención de productos para la industria alimentaria con un valor agregado.

3. Hipótesis

Es factible la utilización de descartes provenientes de desechos agroindustriales como las hojas de apio (*Apium graveolens L. var. dulce*), que poseen antioxidantes y clorofilas, para la obtención de alimentos e ingredientes con actividad funcional.

4. Objetivos

4.1. Objetivos Generales

Estudiar la cinética de secado por convección con aire caliente para el descarte de hoja de apio; desarrollar dos productos a partir de éste: infusión con aporte de antioxidantes y extracto de hoja de apio para posterior uso como colorante natural.

4.2. Objetivos Específicos

- Ajustar las curvas de secado por diferentes modelos matemáticos a diferentes temperaturas.
- Desarrollar una infusión a partir de la hoja de apio, a diferentes temperaturas de secado y tiempos de extracción.
- Evaluar la capacidad antioxidante (ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH) y contenido de polifenoles totales (Folin C.) para las diferentes infusiones.
- Determinar la cantidad de apigenina, en la infusión óptima, por el método HPLC-DAD.
- Evaluar sensorialmente la infusión óptima obtenida por medio de un test con consumidores.
- Desarrollar un extracto enriquecido en clorofila a partir de la hoja de apio a través del método de maceración.
- Cuantificar la clorofila en el extracto enriquecido por espectrofotometría.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Muestras de *Apium graveolens L. var. dulce*

Para el desarrollo de esta memoria se utilizó el descarte de hoja de apio (*Apium graveolens L. var. dulce*) proveniente de la empresa Biofresco. Esta hoja fue recepcionada y seleccionada, luego fue conservada a 4°C, hasta el uso para los diferentes análisis.

5.1.2. Reactivos

La siguiente Tabla 2, especifica los principales reactivos utilizados en la investigación:

Tabla 2: Reactivos utilizados para el desarrollo experimental de la investigación.

Etanol 95%	Agua Nano pura	Agua ácida 2%
Pirrogalol rojo	Metanol	Ácido Acético (glacial) 100%
Fluoresceína	2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH)	Agua grado HPLC
Trolox	Carbonato de sodio	Apigenina
Reactivo de Folin C	Buffer fosfato pH: 7,4	Clorofila
Ácido gálico	2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)dihidrocloruro (AAPH)	
Agua destilada	Acetonitrilo	

5.2. Métodos

5.2.1. Humedad

Para determinar el contenido de humedad inicial de la hoja de apio, se utilizó el método gravimétrico propuesto por la Association of Analytical Communities

(AOAC, 1990) el cual se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de agua de la muestra, la cual es secada en estufa, hasta obtener una masa constante.

El procedimiento consistió en lo siguiente:

- Se colocó una cápsula durante 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto.
- Empleando pinzas, se trasladó la capsula al desecador y se dejó enfriar durante 30 a 45 min. Se pesó la cápsula con una aproximación de 0.1 mg. Se registró masa (m_1).
- Se pesaron en balanza analítica, 5 g de muestra previamente homogeneizada. Se registró la masa (m_2).
- Se colocó la muestra con la cápsula en la estufa a la temperatura/tiempo reportado; 105°C por 5 horas.
- Se extrajo la cápsula con la muestra de la estufa y se dejó enfriar en desecador durante un tiempo de 30 a 45 minutos.
- El procedimiento desecado fue repetido, por una hora adicional, hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedan de 5 mg. Se registró la masa (m_3).

La humedad del producto expresada en porcentaje, corresponde a:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

- m_1 : masa de la cápsula vacía, en gramos.
- m_2 : masa de la cápsula con la muestra antes del secado, en gramos.
- m_3 : masa de la cápsula más la muestra desecada, en gramos.

5.2.2. Secado de hojas de apio

El secado de las hojas de apio se realizó en estufa por convección con aire caliente, a tres temperaturas: 35, 45 y 55°C, hasta una humedad del 10%. Para esto, las muestras de hojas frescas fueron reducidas de tamaño en una procesadora y luego,

25 g de éstas fueron dispuestas en canastillos, en forma de capa fina, para después llevarlos a una estufa a la temperatura correspondiente. Los canastillos tenían dimensiones de 13x10x2 cm (Figura 5). El secado de las hojas se realizó en triplicado.

Para controlar la variación del agua perdida por las muestras, hasta llegar al 10% de humedad, se registró el peso de cada una de ellas en balanza granataria, en intervalos de tiempo de 3, 5, 10, 20 y 60 minutos. Luego, se realizó una curva de secado, la cual daba a conocer la variación de la razón de humedad (MR) en función del tiempo. Para la obtención de dicha gráfica: i) se calculó la humedad en base seca ($X_{b.s}$) de la muestra a cada tiempo de secado, con las Ecuaciones 2 y 3, ii) con $X_{b.s}$, se calculó MR, utilizando la Ecuación 4. La MR es en una humedad fraccional, obtenida a través de la Ecuación 4. El uso de dicha ecuación, asume que la humedad relativa del aire de secado fluctúa continuamente, por lo tanto también la humedad de equilibrio.



Figura 5: Canastillos para el secado, con sus respectivas muestras dispuestas en capa fina.

$$X_{bh} = \frac{\text{masa de agua}}{\text{masa total}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$X_{bs} = \frac{\text{masa de agua}}{\text{masa s. s}} = \frac{X_{bh}}{1 - X_{bh}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$MR = \frac{X_{b.s.t}}{X_{b.s.i}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde $X_{b.h}$, corresponde a la humedad en base húmeda; $X_{b.s}$, a la humedad en base seca; $X_{b.s.t}$ a la humedad en base seca en el tiempo t y $X_{b.s.i}$ a la humedad en base seca inicial.

5.2.2.1. Modelado de las curvas de secado

Los datos de secado obtenidos experimentalmente a las temperaturas de 35, 45 y 55°C, fueron graficados y ajustados a los modelos matemáticos representados en las Ecuaciones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la Tabla 3:

Tabla 3: Modelos matemáticos utilizados para ajuste de curvas de secado.

Modelo	Ecuación	
Logarítmico	$MR = a * \exp(-kt) + C$	(Ecuación 5)
Henderson Pabis	$MR = a * \exp(-kt)$	(Ecuación 6)
Henderson Pabis Modificado	$MR = a \exp(-kt) + b \exp(-gt) + c \exp(-ht)$	(Ecuación 7)
Page	$MR = \exp(-kt^n)$	(Ecuación 8)
Page Modificado	$MR = \exp(-(kt)^n)$	(Ecuación 9)
Newton	$MR = \exp(-kt)$	(Ecuación 10)

Donde MR corresponde a la relación de humedad obtenida experimentalmente y los valores de a, k, g, h y n son constantes de los modelos obtenidos de cada ajuste.

5.2.2.2. Cálculo de la difusividad efectiva y energía de activación

a. Difusividad Efectiva:

El cálculo de la difusividad efectiva (D_{eff}) del proceso de secado de las hojas de apio, se realizó utilizando las soluciones analíticas propuestas por Crank (1975), el cual aplicó la ley de Fick con diferentes condiciones de secado, para obtener una ecuación matemática (Ecuación 11) válida para una muestra con una distribución de humedad inicial uniforme, un transporte de humedad de la muestra en una dimensión, difusividad de ésta constante y geometrías de la muestra regulares.

$$MR = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(- (2n+1)^2 \pi^2 \frac{D_{eff}(t-t_0)}{L^2}\right) \quad (\text{Ecuación 11})$$

A tiempos de secado suficientemente largos, se ha reportado que se puede utilizar solo una parte de la Ecuación 11, siendo la Ecuación 12 comúnmente utilizada para el cálculo de la D_{eff} .

$$MR = \frac{8}{\pi^2} \exp\left(\frac{-\pi^2 D_{eff} t}{4L^2}\right) \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde, MR es la relación de humedad experimental, D_{eff} corresponde al coeficiente de difusividad de humedad efectiva (m^2/s), L es el semi-espesor de la capa fina de hoja dispuesta en los canastillos (m) y t es el tiempo en segundos.

La Ecuación 12 es utilizada asumiendo que el secado se realizó a una lámina de espesor L, con pérdida de humedad por ambos lados, con un movimiento de humedad unidimensional y coeficiente de difusividad, a una temperatura constante y resistencia externa despreciable (Doymaz, 2006).

Para obtener el coeficiente de difusividad efectiva se graficó el logaritmo natural de la razón de humedad ($\ln(MR)$) versus el tiempo (minutos), dando como resultado una recta cuyo valor de la pendiente (k_0) correspondió a la siguiente Ecuación 13:

$$k_0 = \frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Reemplazando los valores de semi-espesor se pudo calcular el coeficiente de difusividad (m^2/s) para cada temperatura de secado.

b. Energía de Activación

Estudios han reportado que la dependencia de la difusividad efectiva con la temperatura y la humedad es generalmente descrita por una ecuación tipo Arrhenius como la Ecuación 14 (Carrín M. et al. 2009):

$$D_{eff} = D_0 * \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde:

D_0 : factor de Arrhenius.

R: constante universal de los gases ideales ($kJ/mol \cdot K$)

T: temperatura ($^{\circ}K$)

E_a : energía de activación (kJ/mol)

Con la Ecuación 14 se calculó la E_a , graficando $\ln(D_{\text{eff}})$ vs $1/T$, obteniéndose una recta, cuya pendiente corresponde a E_a/R . Despejando con el valor de la constante universal se tiene la energía de activación correspondiente al proceso de secado de las hojas de apio.

5.2.3. Análisis estadístico para ajustes de curvas a modelos matemáticos de secado

Para evaluar el ajuste de los modelos matemáticos, se utilizaron los siguientes coeficientes estadísticos: el coeficiente de determinación (R^2), CHI-cuadrado (χ^2), suma de los errores al cuadrado (SSE) y raíz cuadrada de los errores al cuadrado (RMSE). Los mejores ajustes fueron aquellos modelos que presentaron los valores más bajos de χ^2 , SSE y RMSE y el valor más cercano a 1 de R^2 (Puente, 2013). Las siguientes ecuaciones, expresan como se calcularon los valores estadísticos mencionados:

$$R^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(MR_{\text{calc},i} - \overline{MR_{\text{exp},i}})^2}{(MR_{\text{exp},i} - \overline{MR_{\text{exp},i}})^2} \quad (\text{Ecuación 15})$$

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (MR_{\text{exp},i} - MR_{\text{calc},i})^2}{N - z} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$SSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (MR_{\text{exp},i} - MR_{\text{calc},i})^2 \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N (MR_{\text{pre},i} - MR_{\text{exp},i})^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

R^2 Donde $MR_{\text{exp},i}$ representan la relación de humedad obtenida experimentalmente, $MR_{\text{pre},i}$ o $MR_{\text{calc},i}$ son las predicciones hechas por los modelos matemáticos, N es el número de datos y z el número de constantes. El ajuste y los cálculos de estos análisis estadísticos se realizaron en software SigmaPlot 11.0.

5.2.3. Preparación de las infusiones

Se pesaron 2 g de hoja, previamente secadas a 35, 45 y 55°C. A cada una éstas se agregaron 200 mL de agua caliente a $98 \pm 1^\circ\text{C}$. El tiempo de contacto de la hoja con el agua caliente fue de: 3, 5, 7 y 10 minutos. Por lo tanto se obtuvo un total de 12 infusiones, a las cuales se realizaron los análisis correspondientes.

5.2.4. Capacidad Antioxidante y Polifenoles Totales

5.2.4.1. Capacidad antioxidante

a. Capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (ORAC)

a.1. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-FL

Este método mide la degradación oxidativa de la molécula sonda fluoresceína, después de interaccionar con el radical peroxilo (ROO^\bullet) generado térmicamente a partir de AAPH (2,2'-Azo-bis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (Ou et al. 2001). La fluorescencia se midió cada 1 minuto durante un tiempo determinado con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm en un multilector de microplacas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc., utilizando microplacas de poliestireno blancas de 96 celdas. Se utilizó el programa Gen 5 para controlar el multilector.

El volumen final en cada celda de la microplaca fue de 200 μL y el medio de reacción fue buffer fosfato 75 mM a pH 7,4. Usando una micropipeta multicanal se agregaron en cada celda 150 μL de fluoresceína cuya concentración final fue 40 nM y alícuotas de 25 μL de infusión (diluida 20 veces con buffer, pH: 7,4), preparadas con hoja de apio secada a tres temperaturas (35, 45 y 55°C). El blanco se realizó con buffer pH: 7,4. La microplaca fue pre incubada por 7 minutos a 40°C en el multilector y posteriormente se agregaron 25 μL de AAPH, cuya concentración final en cada celda fue 18,21 mM.

Luego de medir las cinéticas de decaimiento de fluorescencia, se normalizan todas las curvas obtenidas, y se calcula el área bajo la curva de (F/F_0) en el tiempo, tanto

para Trolox que se utilizó como estándar, como para las diferentes infusiones obtenidas a los distintos tiempos de extracción y diferentes temperaturas de secado. Luego de obtener la curva de calibración con el estándar Trolox, se interpoló el ABC neta de la infusión. Finalmente los valores de capacidad antioxidante fueron expresados en $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$. Los ensayos se realizaron en triplicado.

Las curvas de decaimiento de la fluorescencia de los ensayos ORAC FL muestran un tiempo de inducción, el cual indica el tiempo en que la fluoresceína está siendo protegida al reaccionar los compuestos antioxidantes presentes en la infusión de hoja de apio con los radicales peroxilo generados térmicamente, tal como se observa en la Figura 6.a, Anexo 3.

a.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-PGR

Este método se basa en la competencia entre el antioxidante y la molécula sonda pirogalol rojo, por el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) al igual que en el ensayo ORAC-FL.

Se utilizó un multilector de microplacas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc., microplacas de poliestireno transparente de 96 celdas. Se usó el programa Gen 5 para controlar el multilector.

Como molécula sonda se utilizó rojo de pirogalol (PGR), el cual reacciona muy rápidamente con los radicales libres; por lo tanto, es un indicador de la calidad de los antioxidantes presentes en las infusiones de hoja de apio obtenidas. (López-Alarcón et al., 2006).

El volumen final en cada celda de la microplaca fue de $200 \mu\text{L}$ y el medio de reacción fue buffer fosfato de concentración 75 mM a $\text{pH } 7,4$. Usando una micropipeta multicanal se agregaron en cada celda $150 \mu\text{L}$ de rojo de pirogalol $70 \mu\text{M}$, cuya concentración en celda fue $52,4 \mu\text{M}$ y alícuotas de $25 \mu\text{L}$ de infusión de hoja de apio. Se incluyó una solución blanco que consta de buffer fosfato en lugar de extracto. La microplaca fue pre incubada por 7 minutos a 40°C en el multilector y posteriormente se agregaron $25 \mu\text{L}$ de AAPH, cuya concentración final en cada celda fue $0,1 \text{ M}$.

En el ensayo ORAC-PGR se realizó el mismo tratamiento de datos que en el ensayo ORAC-FL, pero proporcionando una medida de reactividad, relacionado con la

velocidad de reacción del antioxidante al medir la absorbancia a 540 nm (se muestra el decaimiento típico de las curvas por método ORAC-PGR en la Figura 6. b, Anexo 1).

b. Determinación de la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH

El estudio se basó en la medida fotométrica de la reducción del radical DPPH^{*} a 517 nm aproximadamente (Villaño et al., 2007), en espectrómetro UV-Vis UNICAM. Para la determinación, 100 µL de infusión fueron agregados a 3 mL de una solución DPPH^{*} de concentración cercana a 0,09 mM, equivalente a una unidad de absorbancia. Se registró la disminución de las absorbancias de cada solución de DPPH^{*}, después de la incubación en oscuridad durante 15 minutos desde la adición de los volúmenes de extracto de hoja de apio, lo cual permitió obtener el porcentaje de inhibición del radical libre.

El porcentaje de inhibición se calcula a partir de la ecuación 19:

$$\%Inhibición = \frac{A-\alpha}{A} \times 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

Donde:

A = Absorbancia del blanco.

α = Absorbancia de la muestra.

Los experimentos de este ensayo fueron realizados en triplicado.

5.2.5. Polifenoles Totales

5.2.5.1. Ensayo Folin Ciocalteu

El análisis consistió en medir espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 765 nm (Dudonné et al., 2009) la aparición del color azul al reaccionar el reactivo de Folin con los antioxidantes presentes en la infusión, al ser efectiva la reducción del reactivo.

La absorbancia fue medida en un multilector de microplacas marca PerkinElmer, utilizando microplacas de poliestireno transparentes de 96 celdas.

El volumen final en cada celda de la microplaca fue de 300 uL y el medio de reacción estaba compuesto de carbonato de sodio (1,9 M) y agua nanopura. Utilizando una

micropipeta multicanal se agregaron 200 uL de reactivo de Folin, 40 uL de carbonato de sodio, 45 uL de agua nanopura y 15 uL de extracto de hoja de apio. El blanco contenía agua nanopura. Antes de ser medida la absorbancia por el equipo, la microplaca tuvo un tiempo de reacción de 30 minutos a una temperatura de 37°C. El resultado final se presentó en mg EAG/100 g ps, para lo cual se realizó una curva de calibración con ácido gálico como estándar. Las absorbancias de los extractos fueron interpoladas en la curva de calibración. Los análisis se realizaron en triplicado.

5.2.6. Determinación de apigenina por HPLC-DAD

Para detectar y cuantificar la apigenina de los extractos, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con un detector de arreglo de diodos (DAD) Agilent Technologies 1200 system, utilizando una columna C18e Chromolith® HighResolution de 100-4,6 mm de diámetro y 10 cm de largo, sistema de bomba cuaternaria e inyección automática, el volumen de inyección (loop) fue de 20 µL. La adquisición de datos se realizó a 340 nm, siendo esta la longitud de onda máxima del compuesto.

Se utilizó una mezcla binaria de fase móvil, conteniendo acetonitrilo (fase móvil A) y ácido acético 2 % (Fase móvil B). La condición inicial fue, 70% Fase móvil A y 30% de Fase móvil B, hasta llegar a 92% Fase móvil A y 8% Fase móvil B después de 45 min. (La Tabla 4 del Anexo 4, indica en detalle el gradiente de fase móvil).

Como estándar se utilizó apigenina libre. Ésta fue disuelta en metanol ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y fue inyectado para determinar el tiempo de retención y su longitud de onda máxima. Para realizar la identificación en los extractos, éstos fueron dopados con el estándar, donde se preparó un estándar $362 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en metanol grado HPLC. Se agregó una alícuota de 275 uL de apigenina (AP) a 1 mL de los extractos; luego se inyectaron éstas mezclas y los cromatogramas obtenidos se compararon con los de los extractos de hoja de apio sin dopar. La identificación se basó en el aumento de las áreas de las señales de los extractos.

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones (0,06; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y $2,5 \text{ mg L}^{-1}$). Cada una de estas

disoluciones fueron inyectadas en el cromatógrafo, para obtener su área que fueron utilizadas para graficar la curva de calibración (Área vs Concentración de AP mg·L⁻¹). La concentración de los extractos se calculó interpolando en la curva de calibración realizada.

5.2.7. Análisis sensorial de la infusión

Para complementar el análisis químico del desarrollo de la infusión de hoja de apio, se realizó una evaluación sensorial. Este análisis fue llevado a cabo con consumidores.

Las variables evaluadas para el desarrollo del producto fueron: (i) el tiempo de preparación o extracción, y (ii) hojas con y sin escaldado. Esta última variable, considera un tratamiento térmico a la hoja fresca de apio con vapor a 100 °C por 30 segundos. El objetivo de este tratamiento es evitar que la hoja fermente por acción enzimática, disminuyendo así aromas y sabores desagradables en la infusión, además de mantener el color verde de la hoja ya que se evita la oxidación de la clorofila presente en ella (Sato et al, 2007).

A continuación se detalla las muestras y test utilizados en la evaluación sensorial:

Muestras: las infusiones utilizadas para la evaluación sensorial fueron las realizadas con hoja secada a 35°C (las infusiones a 35°C fueron las que mostraron mayores valores de capacidad antioxidante), con y sin tratamiento térmico previo, y con tiempos de extracción de 3 y 5 minutos.

Antes de comenzar el test, las personas fueron filtradas, preguntándole si consumían té o infusiones de hierbas. La pregunta realizada fue la siguiente:

¿Con qué frecuencia bebe té o infusiones de hierbas? Marque solo una alternativa. Las respuestas a estas preguntas fueron dirigidas, siendo las opciones: más de una vez al día, una vez al día, 4 veces por semana, 2 veces por semana, 1 vez al mes, menos que una vez al mes. Fueron seleccionados lo que cumplieron con beber té o infusiones 2 veces por semana y por sobre esa frecuencia de tiempo.

El test sensorial consistió en las siguientes preguntas:

- a. Adición de azúcar o edulcorante: se consultó, “Cuando consume té o infusiones, ¿qué utiliza para endulzar? Marque una sola alternativa. Para esta pregunta la respuesta también fue dirigida, siendo las opciones: azúcar, edulcorante líquido, edulcorante en tabletas, no agrega nada. Además, se consultó por cuánta cantidad de azúcar o edulcorante agrega a una taza de té o infusión (200 mL aproximadamente), si es que agregase.
- b. Test Check All That Apply (CATA): se aplicó el test CATA, el cual consistió en plantear una cantidad de 12 atributos, previamente seleccionados, de acuerdo a reportes de test realizado a otras infusiones y atributos propios de esta infusión, los cuales cuentan con, aroma, sabor, aspecto y frases. Esto con el fin de que los individuos identifiquen los atributos que mejor describen las muestras a probar. La pregunta realizada consistió en la siguiente: Marque todos los atributos que mejor describan la muestra que probó.
Los atributos expuestos en la hoja de respuesta fueron:
Aroma: Aroma a apio, aroma a heno y aroma agradable.
Sabor: amargo, picante, sabor a verdura cocida, sabor a apio, y sabor agradable.
Aspecto: aspecto turbio y aspecto transparente.
Frases: agradable en general y desagradable en general

Se utilizó la prueba estadística Q de Cochran para evaluar si había diferencias significativas entre los atributos consultados, y se realizó un análisis de correspondencias para analizar la relación entre los atributos y las muestras.

- c. Test de aceptabilidad: se aplicó el test de aceptabilidad preguntando al consumidor: en general, ¿qué le parece el producto probado? Marque solo una alternativa. Para la respuesta se utilizó una escala hedónica de 7 puntos, con las siguientes respuestas: Me disgusta mucho, me gusta mucho, me disgusta un poco, no me gusta ni me disgusta, me gusta poco, me gusta y

me gusta mucho. Para el análisis de resultados las respuestas fueron codificadas, utilizando la nota 1 para la opción me disgusta mucho y la nota 7 para la opción me gusta mucho. Se realizó un análisis ANOVA multifactorial de dos vías para el análisis de resultados.

- d. Intención de compra: en cuanto a la intención de compra, se preguntó:
- i. ¿Agregaría esta infusión a las que consume habitualmente? Marque solo una alternativa. Para esta pregunta hubo las siguientes alternativas de respuesta: definitivamente si la agregaría, probablemente si la agregaría, no sé si la agregaría o no la agregaría, probablemente no la agregaría, definitivamente no la agregaría. Para el análisis de resultados, las respuestas fueron codificadas desde la nota 5, opción definitivamente si la agregaría y nota 1, opción definitivamente no la agregaría.
 - ii. Si este producto se encuentra donde Ud. habitualmente hace las compras, ¿qué es lo que probablemente hará? Marque solo una alternativa. Las alternativas de respuesta fueron: definitivamente si lo compraría, probablemente si lo compraría, no sé si la compraría o no la compraría, probablemente no la compraría, definitivamente no la compraría. Para el análisis las respuestas fueron codificadas desde la nota 5, opción definitivamente si lo compraría y nota 1, opción definitivamente no la compraría. Para el análisis de resultados, se realizó un ANOVA multifactorial de dos vías.

5.2.8. Obtención del extracto enriquecido en clorofila

Para la obtención del extracto se utilizó el método de extracción descrito por Mancilla et. al., 2012, el cual fue modificado. Para este tipo de extracción se utilizó hoja fresca. Para esto se pesaron $0,403 \pm 0,001$ g de hoja de apio. Éstas fueron

cortadas a un menor tamaño. Esto fue realizado en forma manual para evitar degradación de la clorofila.

La extracción de los pigmentos, fue realizada en un tubo de ensayo (Figura 7.a), se agregaron sobre las hojas frescas, 10 mL de etanol 95%.

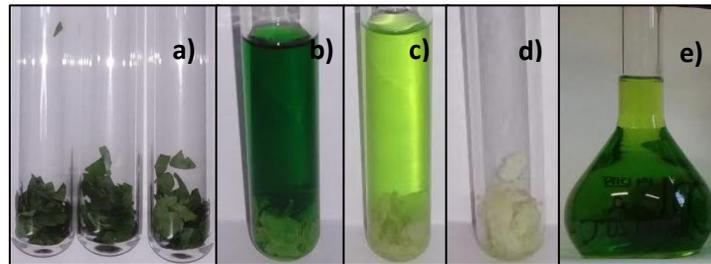


Figura 7: Obtención extracto enriquecido en clorofila: a) Hojas de apio antes de la extracción con etanol 95%. b) Extracto obtenido en los primeros 10 minutos de maceración. c) Extracto obtenido después de la segunda maceración. d) Hojas después del proceso completo de maceración. e) Extracto final.

La mezcla fue colocada en un baño termostático a 80°C por 20 min. Una vez finalizado el tiempo de extracción, se separó el sobrenadante de las hojas (H-1), obteniéndose un extracto verde oscuro (extracto-1) (Figura 7.b). Se realizó una segunda extracción a las hojas H-1, agregando sobre éstas 10 mL de etanol 95%, repitiendo las mismas condiciones de la primera extracción. Se separa el sobrenadante de las hojas, obteniéndose un extracto-2, de un color verde más claro que la primera extracción (Figura 7.c). Una tercera extracción no fue necesaria, ya que la hoja resultante del segundo extracto, estaba falta de pigmentación (Figura 7.d). Los extractos fueron realizados en triplicado.

Finalmente los extractos fueron mezclados (Figura 7.e), para determinar la concentración de clorofila.

5.2.9. Determinación fotométrica de clorofila en extracto de hoja de apio fresca

El espectro de la *clorofila a* disuelta en etanol 95% como solvente, tiene dos máximos que la caracterizan, a 431,6 nm y a 664,2 nm (Lichtenthaler, 1987).

Para determinar el contenido de *clorofila a* de los extractos obtenidos, se registró la absorbancia a 431,5 nm, siendo ésta la banda obtenida experimentalmente. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración a concentraciones de 0,167; 0,886; 1,721; 2,562; 3,333 g/L. Se midió la absorbancia de cada uno de los extractos de hoja de apio a 431,5 nm., donde posteriormente las absorbancias obtenidas se interpolaron en la curva de calibración y se realizaron los cálculos correspondientes, expresando los resultados en g clorofila a /Kg hoja de apio pf. Los extractos fueron realizados en triplicado.

6. Resultados y discusión

6.1. Humedad

Para las hojas de apio frescas, la humedad en base húmeda fue de $88,4 \pm 0,2$ %, esto equivalente a 88,4 g de H₂O en 100 g de hoja fresca. La humedad obtenida se encuentra dentro del promedio que se ha reportado para hortalizas en general, correspondiente a una humedad de 90% (Schmidth et al., 2007).

6.2. Secado de hojas de apio

En la Figura 8, se muestra el gráfico de las curvas de secado a 35°, 45° y 55 °C, hasta una humedad de $\approx 10\%$ (b.h), demarcada con una línea roja, correspondiente a una razón de humedad (MR), igual a 0,015 aproximadamente. En esta gráfica se da a conocer la variación de la MR en función del tiempo de secado. Se puede observar que a medida que aumenta la temperatura de secado, disminuye el tiempo para llegar a una humedad de un 10%. Por lo tanto, el tiempo de secado tiene la siguiente tendencia a las diferentes temperaturas; $55^{\circ}\text{C} < 45^{\circ}\text{C} < 35^{\circ}\text{C}$, es decir, es más rápido secar la hoja de apio a 55°C, ya que se invierte un tiempo de 160 minutos, disminuyendo en un 37% en tiempo, respecto al secado a 45°C. Esto se debe a que a una mayor temperatura del aire de secado, la remoción de humedad ocurre en un menor tiempo. El secado a 35°C demoró un tiempo de 665 minutos para llegar a una humedad del 10%, siendo un tiempo 4 veces mayor que secar a 55°C y alrededor de 3 veces mayor que secar a 45°C. Con esto, se establece que hay una dependencia directa del tiempo de secado con la temperatura a la que se lleva a cabo dicha operación (Jeria et al., 2011).

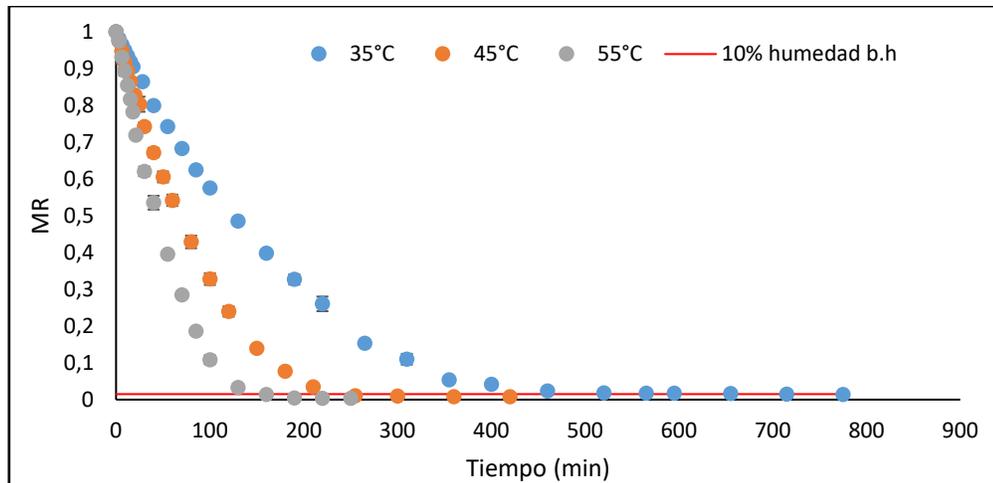


Figura 8: Gráfico de curvas de secado de la hoja de apio a las temperaturas de 35, 45 y 55° C.

Se destaca que las curvas de secado se realizaron hasta obtener un peso constante de las hojas de apio. Por lo que, un 10% de humedad (b.h) se encuentra dentro del rango cercano a la “humedad de equilibrio” (X_{eq}) de las hojas de apio secadas a 35°C, ya que los tres últimos puntos de medición de peso, representan un contenido de humedad de la hoja de un 10% (b.h). El comportamiento de la curva de secado a 45°C y 55°C fue distinto, ya que se obtuvo un 6% y 3,6% de humedad final (b.h) ($\approx X_{eq}$) respectivamente. Esto significa que dependiendo de la temperatura de secado, las hojas pueden perder menor o mayor cantidad de agua y que esta pérdida llega hasta un límite; la humedad de equilibrio. Los tiempos exactos en que se comenzó a llegar a dicha humedad, fueron: 715, 300 y 220 min, a 35, 45 y 55°C respectivamente.

Los tiempos y comportamientos de secado obtenidos en la gráfica de la Figura 8, son comparables con estudios de secado realizado a hojas de menta (Doymaz, 2006), el cual presentó similares resultados; 600, 285 y 180 minutos para el tiempo de secado a temperaturas de 35, 45 y 55 °C respectivamente, hasta un $10 \pm 0,5$ % de humedad (b.h). La misma tendencia se observa en estudios de secado de otros vegetales como la zanahoria (Doymaz, 2004), brócoli (Mrkic et al., 2007) y hojas de té negro (Panchariya et al., 2002).

Por otro lado, se destaca que las curvas de secado no presentaron tiempo de inducción y se presentó un desarrollo y forma característico del secado de productos alimenticios.

La Figura 9 muestra la variación de la velocidad de secado en función de la razón de humedad (MR) de las hojas secadas.

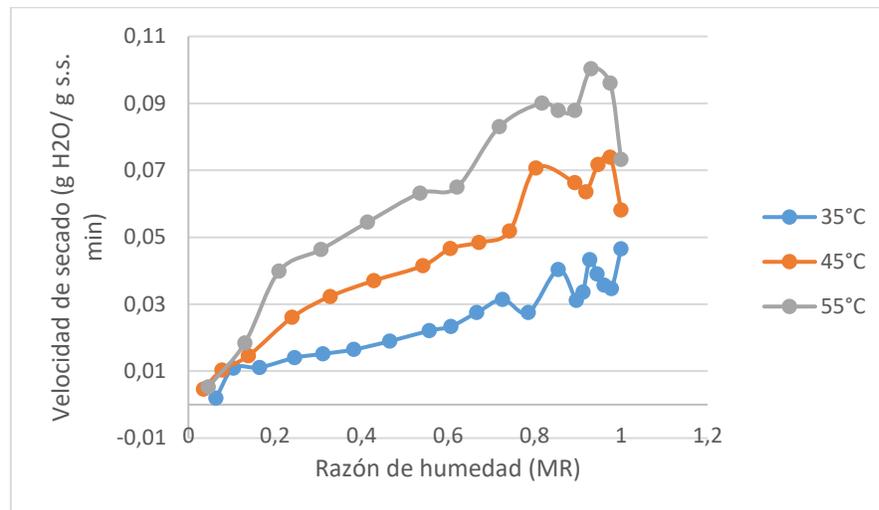


Figura 9: Gráfico que representa la variación de la velocidad de secado en función de la razón de humedad.

En esta figura, no se detectó un período de velocidad de secado constante en las curvas de secado realizadas a las 3 temperaturas. Dicho comportamiento es teórico, y se demuestra en las curvas de secado controladas por la difusión. Dentro de los factores que afectan la obtención de este período en la curva de velocidad de secado se encuentran: la rugosidad y la contracción del sólido al ser secado (Carrín et al., 2009, Doymaz, 2006), variables que ocurrieron durante el desarrollo del secado de la hoja de apio, razones por las que no se pudo obtener dicho período de velocidad constante en la gráfica.

La Figura 9 también da a conocer la incidencia de la temperatura en la velocidad de secado. Esto se demuestra en que a mayores temperaturas del aire de secado, se obtuvieron las mayores velocidades de secado de la hoja. Además se muestra claramente el periodo de velocidad decreciente hasta llegar, en este caso, al 10% de humedad (b.h), siendo la fase donde se eliminó la mayor cantidad de humedad,

concordante con estudios realizados a hojas de menta (Kadam et al., 2011) y hojas de stevia (Jeria et al., 2011).

Para la obtención de la difusividad efectiva de la humedad de las hojas de apio secas, se utilizó la ecuación de difusión de Fick (Ecuación 12) para partículas de geometría plana, (Kadam et al., 2011). Al graficar el Ln (MR) en función del tiempo es posible determinar la difusividad efectiva del agua contenida en las hojas a las tres temperaturas de secado ya establecidas. Esta relación da como resultado una línea recta y su pendiente es utilizada para el cálculo de la difusividad a través de la Ecuación 13. La linealización se presenta en el Gráfico de la Figura 10, Anexo 5.

El mejor coeficiente de relación, de los datos linealizados, fue obtenido a 35°C; R² de 0,9912, mientras que a 45°C y 55°C fueron de 0,9763 y 0,9813 respectivamente.

Los valores de difusividad efectiva obtenidos, se encontraron entre $6,5 \times 10^{-10}$ - $2,8 \times 10^{-9}$ (m²/s) (Tabla 4), los que están dentro del rango de difusividad efectiva del secado de hojas de menta; $3,067 \times 10^{-9}$; $5,837 \times 10^{-9}$ y $1,237 \times 10^{-8}$ m²/s a temperaturas de secado de 35°C 45°C y 55°C respectivamente (Doymaz, 2006).

Tabla 5: Valores de difusividad efectiva a las diferentes temperaturas de secado de la hoja de apio.

Temperatura (°C)	Deff (m ² /s)	SD
35	$6,5 \times 10^{-10}$	0
45	$1,7 \times 10^{-9}$	$3,7 \times 10^{-10}$
55	$2,8 \times 10^{-9}$	$3,7 \times 10^{-10}$

Como se observa en la Tabla 5, a mayores temperaturas de secado la difusividad efectiva es mayor, siendo más fácil la salida del agua del alimento a temperaturas más altas. Con esto se evidencia que hay una dependencia directa entre la temperatura de aire de secado y el grado de difusividad de la humedad de las hojas de apio. Este comportamiento es comparable con estudios de difusividad efectiva

de la humedad de hojas de stevia (Jeria et al., 2011) y hojas de menta (Kadam et al., 2011; Doymaz, 2006).

Con los valores de difusividad efectiva de la Tabla 5, se construyó un gráfico con el $\ln(D_{eff})$ en función de $1/T$ (Figura 11, Anexo 6). En este gráfico, se obtiene una recta cuya ecuación es utilizada para la obtención de la energía de activación (E_a) y el factor de Arrhenius (D_0) del proceso de secado. Esto se realizó relacionando la Ecuación 14, con los valores de la pendiente e intercepto de la ecuación de la recta obtenida. El valor de E_a y D_0 fue de 61,83 kJ/mol y $21,16 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Destacar, que el valor de la energía de activación es de alta importancia, ya que significa que para las condiciones de secado de este producto en particular, se necesita como mínimo, una energía de 61,83 kJ/mol para iniciar el proceso de secado.

Los valores de energía de activación y factor de Arrhenius, se encuentran dentro de los rangos obtenidos en estudios de secado de hoja de menta, en el cual se obtuvo un valor de energía de activación de 62,96 kJ/mol en un rango de temperatura de 35-60°C (Doymaz, 2006). La energía de activación varía con la temperatura de secado y el tipo de vegetal a secar, esta diferencia se puede ver en la Tabla 6, que muestra valores de E_a para distintos vegetales.

Tabla 6: Comparación de energía de activación con valores de la literatura.

Material	Energía de activación (E_a) (kJ/mol)	Referencias
Hoja de Apio	61,83	Resultado de esta investigación
Hojas de menta	62,96	Doymaz (2006)
Hojas de menta	82,93	Park et al. (2002)
Zanahoria	28,36	Doymaz (2004)
Hoja de olivo	53,74	Bahloul et al. (2009)

6.2.1. Modelado de curvas de secado

La Tabla 7 (Anexo 7) contiene los parámetros estadísticos obtenidos al realizar los ajustes a los modelos matemáticos de los datos experimentales del secado a 35, 45 y 55 °C. En general los datos experimentales se ajustaron de buena manera a los modelos matemáticos, obteniéndose bajos valores de los estadísticos X^2 , SSE y RMSE, además de valores cercanos a 1 de R^2 . Pero hay dos modelos en los que hubo un mejor ajuste.

Para el secado a 35°C, el mejor ajuste se obtuvo en el modelo Page Modificado, arrojando los valores más pequeños de X^2 , SSE RMSE, y el valor más alto de R^2 , siendo los valores de $1,848 \times 10^{-4}$; $1,716 \times 10^{-4}$; $1,310 \times 10^{-2}$ y 0,999 respectivamente. Por otro lado, los datos experimentales de secado a 45°C se ajustaron a 2 modelos; Page y Page modificado, obteniéndose los mismos valores de los parámetros estadísticos, siendo: $5,760 \times 10^{-4}$ (X^2); $5,259 \times 10^{-4}$ (SSE); $2,293 \times 10^{-2}$ (RMSE) y 0,996 (R^2). Finalmente, los datos experimentales del secado de las hojas a 55°C, arrojaron un mejor ajuste al modelo Page Modificado, los valores obtenidos para X^2 ; SSE; RMSE y R^2 fueron $2,032 \times 10^{-4}$; $1,818 \times 10^{-4}$; $1,348 \times 10^{-2}$ y 0,999 respectivamente. El mismo valor de R^2 se obtuvo en el ajuste a los modelos matemáticos a las tres temperaturas de secado, pero la mejor combinación de parámetros estadísticos para los datos experimentales de secado fue la descrita anteriormente.

Las constantes de los ajustes matemáticos se detallan en la Tabla 8.

Las constantes de los modelos matemáticos Page y Page Modificado (Ecuación 8 y 9) son dos y corresponden a k y n . El ajuste de los datos, a las tres temperaturas, a los modelos: Page y Page modificado, dieron como resultado valores de k y n entre 0,039 – 0,09 y 1,0946 – 1,1948; 0,0063 – 0,0173 y 1,0946 – 1,0972; respectivamente.

Con los modelos matemáticos que presentaron los mejores ajustes a los datos experimentales, es posible predecir el tiempo de secado de la hoja de apio a una determinada temperatura para alcanzar una determinada humedad, lo que facilita la posterior utilización de esta hortaliza en la industria alimentaria que requiera el

secado de la hoja para la obtención de un producto procesado (Chayjan et al., 2013).

Tabla 8: Constantes de los ajustes de los datos experimentales a los modelos matemáticos presentados.

Modelo	Temperatura (°C)	Parámetros	Valores	Modelo	Temperatura (°C)	Parámetros	Valores
Henderson Pabis	35	a	1,0105	Page	35	k	0,0039
		k	0,0064			n	1,0972
	45	a	1,0149		45	k	0,009
		k	0,0137			n	1,0946
	55	a	1,0457		55	k	0,0079
		k	0,0181			n	1,1948
Henderson Pabis Modificado	35	a	0,3357	Page Modificado	35	k	0,0063
		b	0,0064			n	1,0972
		c	0,3396		45	k	0,0135
		k	0,0064			n	1,0946
		g	0,3353		55	k	0,0173
		h	0,0064			n	1,1948
	45	a	0,337	Newton	35	k	0,0063
		b	0,0137		45	k	0,0133
		c	0,3414		55	k	0,0169
		k	0,0137	Logarítmico	35	a	1,0283
		g	0,3365			k	0,006
		h	0,0137			C	-0,0222
	55	a	0,3518	45	a	1,0333	
		b	0,0181		k	0,0129	
		c	0,3507		C	-0,0237	
		k	0,0181	55	a	1,0817	
		g	0,3433		k	0,0163	
		h	0,0181		C	-0,0466	

6.3. Capacidad Antioxidante de la infusión de hoja de apio a los distintos tiempos de extracción

6.3.1. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-FL y ORAC-PGR

El ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno) es un método validado por la USDA (United States Department of Agriculture) para la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos y suplementos nutricionales. Por lo tanto, será la medida referencial para el desarrollo de la infusión a partir de hoja de apio seca.

Con las hojas de apio secadas a tres temperaturas (35, 45 y 55°C), se realizaron cuatro infusiones por cada temperatura de secado, a diferentes tiempos de extracción: 3, 5, 7 y 10 minutos. A las 12 infusiones obtenidas se les midió la capacidad antioxidante (CA) mediante el ensayo ORAC-FL. La Figura 12, muestra la variación de la capacidad antioxidante de las diferentes infusiones.

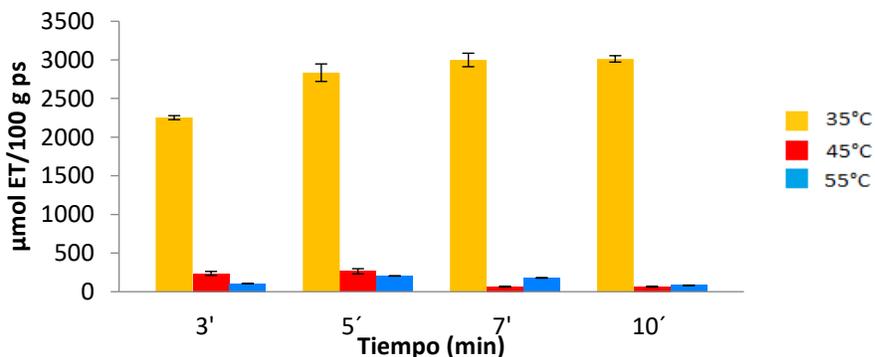


Figura 12: Variación de la CA por ORAC-FL a los distintos tiempos de extracción y a las distintas temperaturas de secado de la hoja de apio.

Según la temperatura de secado de las hojas de apio, se puede observar que todas las infusiones obtenidas con las hojas secadas a 35°C, son las que tienen mayores valores de ORAC-FL (los valores son presentados en la Tabla 9, Anexo 8). Los resultados obtenidos se calcularon interpolando el área neta, en la curva de calibración de trolox (Figura 13, Anexo 9).

Estos resultados se deben a que a mayor temperatura de exposición de las hojas, aumenta la degradación de los componentes en una muestra vegetal, incluyendo los antioxidantes. Las reacciones de degradación que incluyen oxígeno como reactante, se ven favorecidas al aumentar la temperatura.

Por otro lado, se observa que la mayor degradación de los antioxidantes es desde 35 a 45 °C con una disminución de la CA promedio de 94 %. En cambio la variación entre 45 y 55°C, es sólo de un 41 % y no es significativa.

Cabe destacar, que el parámetro de temperatura de secado, es un punto crítico para el desarrollo de una infusión con un valor agregado como es la capacidad antioxidante.

Otro punto a evaluar, es el tiempo de contacto entre la hoja de apio seca con el extractante (H₂O caliente, 98°C). De acuerdo a los resultados obtenidos según los diferentes tiempos de extracción (3, 5, 7 y 10 min), con la temperatura de secado a 35°C, se puede observar que se obtuvo un máximo de CA a los 7 y 10 min no habiendo diferencias significativas entre ambos tiempos. Esto refleja que a tiempos mayores de 7 min no hay un aumento de la CA, por lo que se asume que a este tiempo la mayoría de los antioxidantes ya han sido extraídos. Por lo tanto, para el desarrollo de este producto, se recomienda realizar la infusión por al menos 7 min antes de consumir, ya que se asegura que ésta tenga un valor agregado de CA.

En cuanto a los resultados obtenidos con las infusiones realizadas con las hojas secas a 45 y 55°C, se observa un comportamiento distinto a los diferentes tiempos de extracción, en relación a los obtenidos a 35°C, en donde se observa una disminución de la CA a medida que aumenta el tiempo de extracción. Esto se debe a que la calidad de los antioxidantes de las hojas secadas a mayor temperatura son diferentes, por lo tanto tendrán un comportamiento distinto.

Para observar las diferencias significativas de los valores de CA obtenidos de las infusiones con las hojas secadas a 35, 45 y 55°C y a todos los tiempos de extracción, se realizó un análisis estadístico: ANOVA (los valores se muestran en la Tabla 9, Anexo 8).

Debido a la gran cantidad de reportes en donde se estudia la CA de los tés, demostrando que éstos tienen capacidades antioxidantes elevadas; a modo de comparación, se realizaron ensayos de ORAC-FL en las mismas condiciones que las infusiones con hoja de apio secadas a 35°C, a muestras de té verde y té negro (Té verde marca Supremo y té negro marca Lipton Golden). Los valores de CA obtenidos para estas muestras fueron 5 veces mejores que las infusiones de hoja de apio, a los 3 minutos de extracción. Té verde: $11.477 \pm 604 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$; Té negro: $10.494 \pm 334 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$.

Para comparar la CA vs la temperatura de secado, Mondaca et al. 2015, realizó extractos de hoja de stevia, secadas a temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C, obteniéndose un máximo de CA en los extractos con hoja secada a 40°C, luego la CA comienza a decaer, hasta llegar a una CA constante con extractos de hoja secada a 70°C y 80°C.

Según estudios (Poblete et al., 2009; López-Alarcón et al., 2011), ORAC-FL frente a otras metodologías para medir CA, ésta da a conocer una relación estequiométrica de los antioxidantes presentes en la muestra, por lo que se puede decir que hay un nivel máximo de extracción de éstos, siendo en este caso con hoja de apio secada a 35°C con un tiempo de extracción de 7 minutos.

Por otro lado, no hay ningún método para medir la capacidad antioxidante absoluta de un alimento, por lo que se hace necesario hacer otras mediciones, que entregan otro tipo de información referente a los antioxidantes presentes en las muestras de alimentos.

Por lo tanto, otro método descrito es ORAC modificado, donde la molécula sonda es cambiada y se utiliza pirogalol rojo. Se midió la CA de las infusiones obtenidas con hojas secadas a diferentes temperaturas (35, 45 y 55°C) y a diferentes tiempos de extracción (3, 5, 7 y 10 min.) al igual que para ORAC-FL. Se realizó una curva de calibración de Trolox para obtener los valores de CA, al interpolar el área neta del extracto en ella (Figura 14, Anexo 10).

En la figura 15 se muestra la variación de los valores de CA para las infusiones (se detallan los valores en la Tabla 10, Anexo 11). En la gráfica se muestra un comportamiento similar al observado por el método ORAC-FL, donde al aumentar la temperatura de secado también disminuyó la CA, a pesar que no se observan diferencias significativas entre las muestras de hoja de apio secadas a 35 y 45°C (el detalle del análisis estadístico de estas diferencias se presenta en Anexo 12).

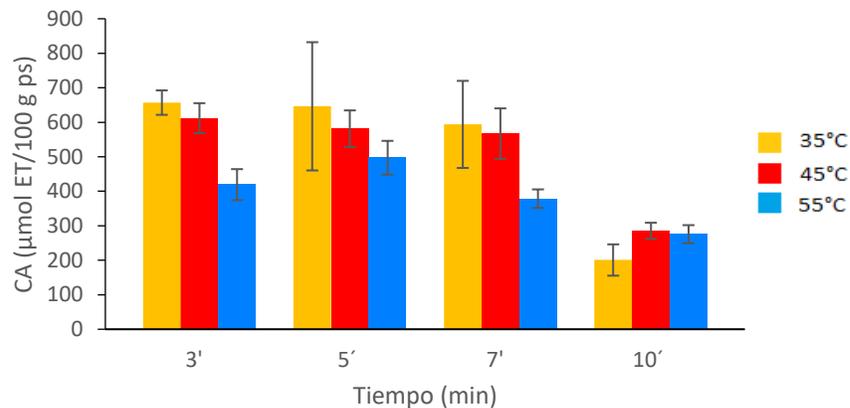


Figura 15: Variación de la CA por ORAC-PGR a los distintos tiempos de extracción y a las distintas temperaturas de secado de la hoja de apio.

En cuanto a los tiempos de extracción, se realizó el mismo análisis estadístico que para ORAC-FL (Véase Tabla 10, Anexo 11). Este análisis fue realizado para las muestras secadas a 35°C, observándose que no hay diferencias significativas entre los tiempos de extracción 3, 5 y 7 minutos, por lo que los máximos de CA están dados a esos tiempos de infusión. Para 45°C, se repitió la misma tendencia que para 35°C, siendo el máximo de CA entre 3, 5 y 7 minutos. Sin embargo, para 55°C, las diferencias mostraron que el máximo de CA se obtuvo a los 5 minutos, disminuyendo en aproximadamente la mitad la CA a los 10 minutos de extracción. Esto es debido a que a esos tiempos de extracción (7 y 10 minutos), solo se registran los antioxidantes que quedan en la infusión, ya que los demás pueden haber presentado degradación.

Tomando como promedio los tiempos de extracción 3, 5 y 7, se observa una disminución de CA por temperatura de secado: comparando 35 con 45°C se

muestra una tendencia de decaimiento de $7 \pm 3\%$ y entre 35 y 55°C se observa una disminución de $32 \pm 8\%$ (Véase Figura 15).

Al relacionar ambos métodos (ORAC-FL y ORAC-PGR), estos no se correlacionan, obteniéndose valores de; a 35°C R^2 : 0,28; 45°C R^2 : 0,40; 55°C R^2 : 0,56, esto porque cada método entrega información diferente acerca de la CA. ORAC-FL, entrega información sobre la estequiometría de los antioxidantes presentes en los extractos, en cambio ORAC-PGR da a conocer la reactividad éstos. Por un lado, esta diferencia entre las metodologías se puede apreciar en las gráficas de decaimiento de fluorescencia vs absorbancia normalizadas en función del tiempo (Figura 6, Anexo 3). Donde en ORAC FL, se aprecia un tiempo de inducción antes de que la curva comience a decaer, esto se debe a que en un inicio se genera una competencia directa entre la sonda y los antioxidantes presentes en la infusión, por reaccionar con los radicales peroxilo. Al no haber decaimiento de la curva, quiere decir que el antioxidante está protegiendo la sonda (Fluoresceína), evitando que ocurra el “*scavenging*”. En cambio con la sonda pirogalol rojo no se generan tiempos de inducción, ya que el pirogalol es altamente reactivo con los radicales peroxilo y por lo tanto, los antioxidantes deben poseer una alta reactividad para competir con la molécula sonda, reflejándose una disminución inmediata de ésta (López-Alarcón et al., 2011; Poblete et al., 2009). Hasta ahora, con estas dos metodologías, se puede mencionar que la temperatura de secado seleccionada será 35°C, ya que se puede decir que hay mayor presencia de antioxidantes en las infusiones, siendo el máximo de extracción entre 7 y 10 minutos, para ORAC-FL. Pero los antioxidantes más reactivos están presentes en las infusiones realizadas a los 3, 5 y 7 minutos de extracción.

6.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH

Puesto que es necesario tener más evidencia del comportamiento de la CA de las infusiones, se utilizó también la metodología DPPH. Los resultados se muestran en la Figura 16, y los valores se detallan en la Tabla 11, Anexo 13. Para este análisis, los resultados de CA están medidos en % de inhibición del radical DPPH por parte de los antioxidantes presentes en las infusiones. Los resultados presentados en la

Figura 16, muestran que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo en las infusiones realizadas con hoja secada a 45°C y un tiempo de extracción de 7 minutos ($21 \pm 1\%$ inhibición). Por otro lado, los resultados entre las infusiones realizadas a 35° y 55°C, a todos los tiempos de extracción, no se observan grandes diferencias. Por ejemplo: a 35°C y 5 minutos la inhibición fue de $12 \pm 1\%$ y a 55°C y 10 minutos; $15,2 \pm 0,6\%$ de inhibición.

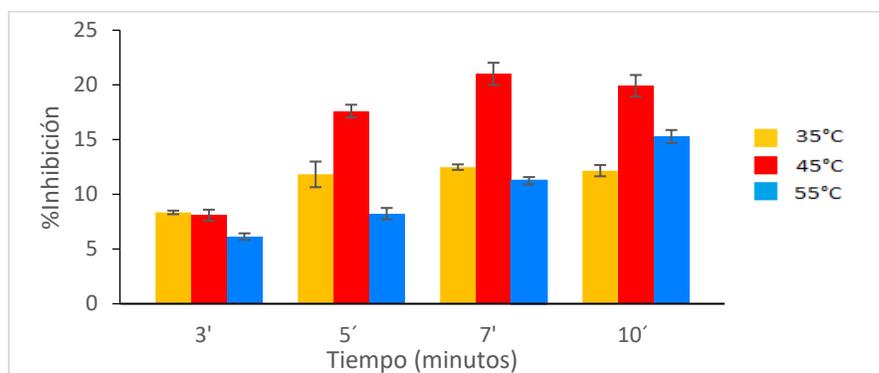


Figura 16: Variación del % de inhibición del radical DPPH, en función del tiempo de extracción a cada temperatura de secado de las hojas.

Se correlacionaron tanto los tiempos de extracción como las temperaturas de secado entre las tres metodologías, encontrando correlación de los tiempos de extracción a 35°C, entre ORAC-FL y DPPH, con un valor de $R^2: 0,98$. La diferencia observada entre las metodologías se puede deber a que los mecanismos de reacción son distintos, el método DPPH es principalmente por transferencia de electrones, y ORAC por transferencia de átomo de hidrógeno. Además, considerando el medio de reacción, DPPH se realiza con metanol y ORAC con buffer, por lo que en DPPH pueden estar reaccionando antioxidantes con carácter más apolares de la infusión. Desde otro punto de vista, ORAC trabaja en un medio fisiológico, ya que se controla el pH de la reacción con buffer a pH 7,4. Además, los radicales que reaccionan con el antioxidante son peroxilo, con tiempos de vida muy corto (0,5 – 7 s) (Termini, 2003), siendo los que se generan en el organismo humano, en cambio el radical DPPH, es semiestable en el medio ambiente, y no se encuentra en un medio fisiológico. Por lo tanto, el método ORAC-FL, desde este punto de vista sería más representativo en la medición de la CA.

6.4. Determinación polifenoles totales de la infusión por método Folin C

Se utilizó el método de Folin C, para la determinación de polifenoles totales de las infusiones obtenidas en las mismas condiciones que las metodologías anteriores. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos de manera gráfica, los valores se exponen en la Tabla 12, Anexo 14.

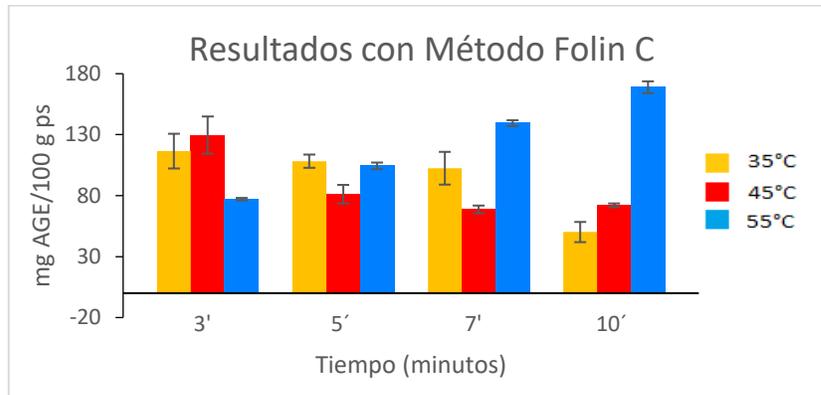


Figura 17: Polifenoles totales de las infusiones obtenidas a los tiempos de extracción 3, 5, 7 y 10 minutos con hoja de apio secada a 35, 45 y 55°C.

Los resultados se obtuvieron al interpolar la absorbancia de cada infusión en la curva de calibración de ácido gálico, utilizado como referencia (Figura 18, Anexo 15).

En la Figura 17, se puede observar que no hay una tendencia semejante a los tres métodos presentados anteriormente. Por lo que este tipo de metodología estaría entregando otro tipo de información. Se observa que la mayor cantidad de polifenoles totales se encuentra en la infusión realizada con hoja secada a 55°C y a un tiempo de extracción de 10 minutos.

A 35°C, la mayor cantidad de polifenoles se obtuvo entre los 3, 5 y 7 minutos de extracción, mientras que a 45°C, los máximos observados fueron a 5, 7 y 10 minutos de extracción.

Lo esperado para Folin C es que la mayor cantidad de PT se hubiera encontrado en las infusiones obtenidas a 35°C al igual que ORAC-FL, esto debido a que estudios

en extractos naturales reportan una relación entre ambas metodologías, al ser ORAC-FL vinculado con la estequiometría de los antioxidantes presentes en la infusión y Folin C, da a conocer los polifenoles totales, que son en gran medida, los antioxidantes totales presentes en los extractos. En este estudio, no hubo correlación entre ambas metodologías, a las diferentes temperaturas; 35°C R²: 0,36; 45°C R²: 0,40; 55°C R²: 0,053. Cabe destacar, que otro motivo que explique estas bajas correlaciones puede deberse a las interferencias que se presentan en la medición por método Folin C, ya que el reactivo no solo reacciona con los antioxidantes presentes en la infusión, sino que también con toda sustancia reductora presente en ella, esto involucra azúcares y proteínas. Además, otro interferente sería el color, ya que la infusión posee un color verdoso, y la longitud de onda a la que se mide el cambio de coloración de la reacción es a 765 nm, en el rango de los tonos azules.

6.5. Determinación del flavonoide apigenina en infusiones por HPLC-DAD

Dentro de los flavonoides presentes en el apio, se destacan varios compuestos, siendo uno de los más abundantes; la apigenina. Esta flavona ha sido ampliamente estudiada y se han reportado los beneficios para el organismo, dentro de los cuales se encuentra la propiedad antioxidante. Por lo tanto se estudió el contenido de este flavonoide, a las infusiones que tenían mayor capacidad antioxidante por ensayo ORAC-FL. Estas infusiones correspondieron a las obtenidas con hoja secada a 35°C, a los tiempos de extracción de 3, 5, 7 y 10 min.

Los resultados se obtuvieron al interpolar el área del pico encontrado en la infusión, en la curva de calibración de AP (Figura 19, Anexo 16). Los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) se muestran en Anexo 16, Tabla 13.

La Tabla 14, muestra los resultados de la cantidad de apigenina libre en 4 infusiones realizadas, expresando el valor en mg de apigenina (AP) en 100 g de hoja de apio peso seco (ps).

Tabla 14: Cantidad de apigenina libre en las infusiones realizadas con hoja secada a 35°C, a los 4 tiempos de extracción.

Tiempo de extracción (min)	mg AP/100 g hoja ps
3	1,5 ^a ± 0,2
5	1,5 ^a ± 0,3
7	1,6 ^a ± 0,4
10	2 ^a ± 0

Como se muestra en la Tabla 14, la cantidad de AP en las 4 infusiones varió entre $1,5 \pm 0,2$ y 2 ± 0 mg AP/100 g hoja de apio ps, encontrando que no hay diferencias significativas entre las infusiones obtenidas. Por lo que se evidencia que las infusiones contienen apigenina, la cual está contribuyendo con la capacidad antioxidante de éstas, considerando que estas son infusiones que se realizan con agua caliente como solvente y con tiempos cortos de extracción (hasta 10 minutos). Por lo tanto independiente del tiempo de extracción, queda demostrado que las infusiones desarrolladas contienen AP cuantificable.

Se ha reportado que las hojas de apio poseen grandes cantidades de apigenina. Row et al., 2011, optimizaron la extracción de apigenina de la hoja de apio seca, obteniendo un valor de 94 mg de AP en 100 g de hoja seca. Este alto contenido de AP en extractos de hoja de apio realizados con solventes, explica que se haya presentado este flavonoide en las infusiones.

6.6. Resumen de análisis químico para el desarrollo de una infusión de hoja de apio

Mediante los análisis químicos realizados se comprobó que las infusiones poseen capacidad antioxidante como valor agregado. Esto fue demostrado por 3 metodologías realizadas. Los resultados de ORAC-FL, muestran que la infusión con mayor CA es la realizada con hoja secada a 35°C, con un tiempo de extracción de al menos 7 min. Para el método ORAC-PGR, se obtuvo que las infusiones con

mejores resultados, fueron también las realizadas con hoja secada a 35°C, mientras que en los tiempos de extracción de 3, 5 y 7 minutos no hubieron diferencias significativas. Por otra parte, la metodología DPPH, mostró resultados comparables con el ORAC-FL, en las infusiones con hoja secada a 35°C, a todos los tiempos de extracción.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el desarrollo de la infusión con las mejores propiedades antioxidantes se obtiene a partir de hoja de apio secada a 35°C, manteniendo en contacto la hoja seca con agua caliente por un tiempo máximo de 7 minutos.

Para la creación de un nuevo producto, se llevan a cabo varios procesos y análisis. Éstos involucran la generación de ideas, estudios de mercado, balances de masa, evaluación sensorial, entre otros. En particular, la evaluación sensorial da a conocer si el producto es aceptado por los consumidores, punto crítico en la decisión de introducir éste al mercado. En consecuencia, para el desarrollo integral de este producto, se realizó una evaluación sensorial, para lo cual se seleccionaron las mejores infusiones en relación a la capacidad antioxidante obtenida por las metodologías antes descritas. De éstas se escogieron las con hoja secada a 35°C, con y sin tratamiento térmico previo (escaldado), a tiempos de extracción de 3 y 5 minutos, excluyendo la extracción a 7 minutos al considerarse un tiempo muy extenso de preparación de la infusión.

6.7. Evaluación sensorial de las infusiones

La evaluación sensorial de las infusiones fue realizada por un total de 39 consumidores, en un rango etario entre los 19 y 39 años, de los cuales 24 eran de sexo femenino y 15 de sexo masculino.

La Figura 20, muestra un gráfico de torta el cual señala la frecuencia de consumo de té o infusiones de hierbas por parte de los evaluadores, dando a conocer en porcentaje aquella frecuencia.

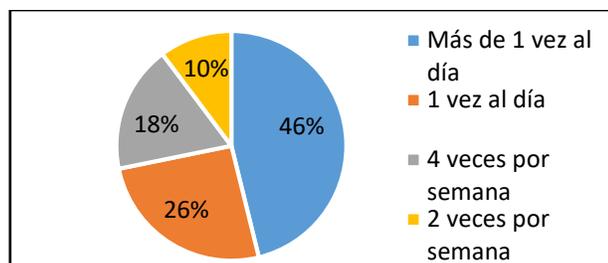


Figura 20: Gráfico de torta que representa la frecuencia de consumo de té o infusiones de hierbas por parte de los evaluadores.

Como muestra la Figura 20, del universo de evaluadores, un 72% consumía té o infusiones de hierbas al menos una vez al día. De acuerdo al género, se encontró que un 72% de las personas que consumían té más de una vez al día, correspondió a mujeres y un 28% a hombres. De los que consumían té o infusiones de hierbas 1 vez al día, los resultados mostraron que un 50% de consumidores era de género masculino y un 50% de consumidores de género femenino (véase Figura 21, Anexo 17). Por lo tanto la muestra encuestada es representativa en función del género de los encuestados y la frecuencia de consumo de productos similares a las infusiones de hoja de apio evaluadas.

En cuanto al edulcorante utilizado para endulzar el té o infusiones de hierbas, se evidenció que el más consumido por los evaluadores es el edulcorante líquido con una 44%, luego el azúcar granulado (23%) y la opción “no agrega ningún tipo de edulcorante” (20%), tuvieron porcentajes similares, y por último el edulcorante en tabletas, tuvo una preferencia de sólo un 13% (Figura 22).

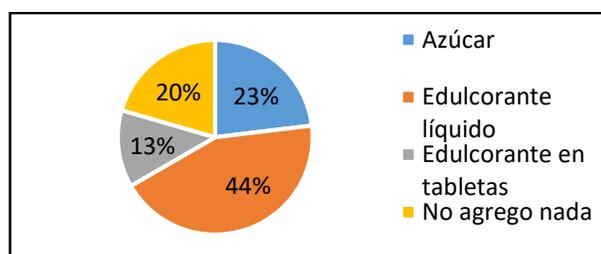


Figura 22: Representación gráfica del consumo de edulcorantes por parte de los evaluadores.

Para evitar que el dulzor del edulcorante fuera una variante al momento de contestar las preguntas realizadas, los evaluadores dieron a conocer cuánto agregan a una

taza de 200 mL y se realizó la proporción para los 50 mL de infusión, que fue el volumen utilizado para esta evaluación. Dicha cantidad debió ser igual para todas las muestras evaluadas.

6.7.1. Test Check All That Apply (CATA)

Los resultados obtenidos del test CATA se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15: Diferencias significativas por atributo y por muestra evaluada, obtenidas por la prueba Q de Cochran.

Atributos	p - valores	5 minutos		3 minutos	
		Escaldada	No escaldada	Escaldada	No escaldada
Aroma a apio	0,4378	0,692 (a)	0,641 (a)	0,641 (a)	0,538 (a)
Agradable en gral.	0,6659	0,590 (a)	0,487 (a)	0,538 (a)	0,487 (a)
Amargo	0,0193	0,051 (a)	0,282 (b)	0,128 (ab)	0,231 (ab)
Sabor agradable	0,9625	0,487 (a)	0,538 (a)	0,513 (a)	0,538 (a)
Sabor a verdura cocida	0,0129	0,615 (a)	0,385 (a)	0,615 (a)	0,385 (a)
Aroma a heno	0,5945	0,128 (a)	0,154 (a)	0,154 (a)	0,077 (a)
Picante	0,4936	0,077 (a)	0,026 (a)	0,026 (a)	0,077 (a)
Sabor a apio	0,0603	0,615 (a)	0,564 (a)	0,744 (a)	0,795 (a)
Aspecto turbio	0,147	0,026 (a)	0,103 (a)	0,051 (a)	0,154 (a)
Desagradable en gral.	0,3916	0,103 (a)	0,026 (a)	0,103 (a)	0,051 (a)
Aspecto transparente	0,0021	0,821 (b)	0,590 (a)	0,692 (ab)	0,513 (a)
Aroma agradable	0,6325	0,615 (a)	0,615 (a)	0,513 (a)	0,590 (a)

La Tabla 15, muestra en la columna 1 los atributos analizados, en la columna 2 los p – valor con un 5% de significancia, por lo que si el p arrojado es menor a 0,05; significa que hay diferencias significativas para ese atributo. Las siguientes columnas (3 – 7) contienen proporciones (PROP) presentadas por el programa, las que señalan diferencias significativas entre las muestras en función de cada atributo, indicadas con letras. Para la interpretación de los resultados de la Tabla 15, si se comparan las PROP entre dos muestras y éstas poseen letras iguales, quiere decir que no hay diferencias significativas entre ellas y si las letras son

distintas hay diferencias significativas. Por otro lado, las PROP dan a conocer la frecuencia en que fue marcado el atributo por los consumidores; si el valor es alto para una muestra en comparación con las demás, significa que varios de los consumidores notaron la presencia de tal atributo en la muestra analizada, esto se puede traducir como una medida de la intensidad de cada atributo en las muestras evaluadas.

Como se muestra en la Tabla 15, hubo diferencias significativas en los siguientes atributos: amargo, sabor a verdura cocida y aspecto transparente ($p < 0,05$), por lo que los evaluadores pudieron percibir diferencias entre las diferentes muestras evaluadas en cuanto a los atributos antes mencionados, y no así para los demás atributos (aroma a apio, agradable en gral., sabor agradable, aroma a heno, picante, sabor a apio, aspecto turbio, desagradable en gral.). En cuanto a la intensidad del atributo para cada muestra, se obtuvo que el atributo amargo, solo presentó diferencias entre las muestras 5 min escaldada y 5 min no escaldada, considerado más intensa la presencia de este descriptor en la muestra 5 min no escaldada (PROP = 0,282).

El atributo sabor a verdura cocida, fue percibido más intenso en las muestras 5 min escaldada y 3 min escaldada (ambas PROP = 0,615), siendo esperado ya que estas infusiones fueron realizadas con hoja escaldada (inmersas en vapor a 100°C por 30 seg.), proceso realizado previamente al secado, lo que pudo provocar dicho sabor en la hoja. Las muestras 3 y 5 min no escaldada también presentaron aquel sabor, pero con menor intensidad. Destacar que para el atributo sabor a verdura cocida no se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras (letra a), a pesar de presentar PROP diferentes. Esto puede deberse a que el programa no alcanza a registrar esas diferencias, las cuales no son indicadas a través de las letras respectivas, pero si las muestra en el valor de las proporciones.

En cuanto al atributo aspecto transparente, se obtuvo que en la muestra 5 min escaldada se percibió con mayor intensidad la transparencia (PROP = 0,821), siendo la muestra más transparente de las 4 analizadas, aunque no es significativamente más transparente que la muestra 3 min escaldada.

La Figura 22 muestra el mapa del análisis de correspondencias (CA).

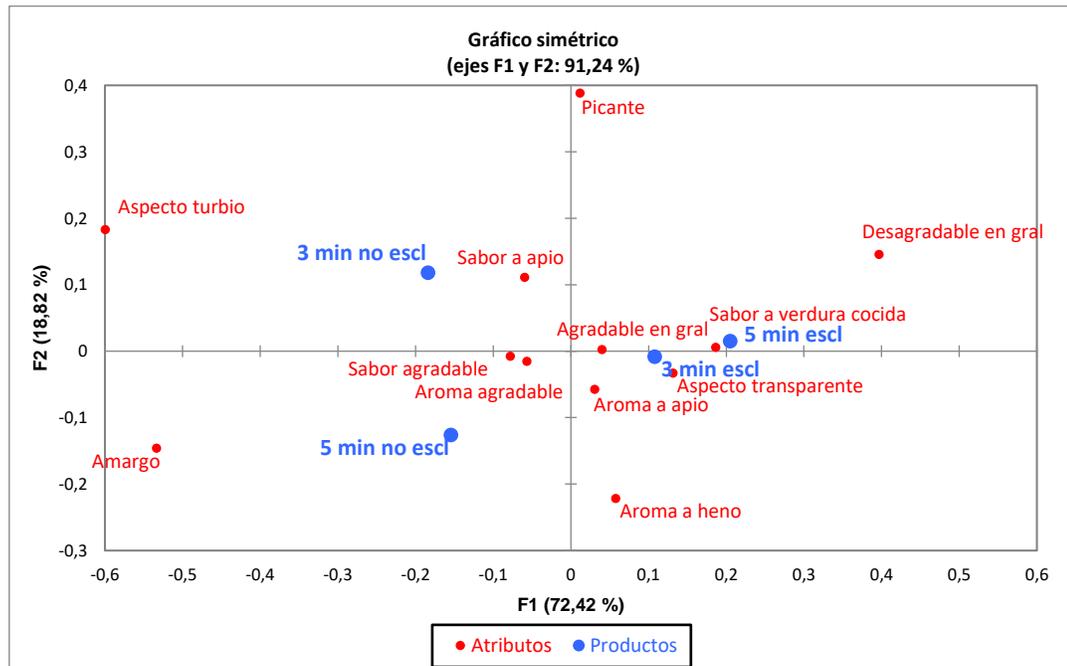


Figura 22: Mapa del análisis de correspondencias (CA).

De acuerdo al mapa, se puede decir que los atributos que se encuentran posicionados en forma horizontal (eje F1) contribuyen en mayor proporción a explicar la variabilidad entre las muestras, en comparación con los atributos presentados en forma vertical (eje F2) ya que el porcentaje de inercia es mayor para el eje F1 (72,42%). Por lo tanto, las muestras 3 y 5 min no escaldada poseen en mayor proporción los siguientes atributos: sabor a apio, sabor agradable y aroma agradable, y las muestras 3 y 5 min escaldadas los atributos agradable en general, sabor a verdura cocida, aspecto transparente y aroma a apio. En el eje F2 (vertical), los atributos solo contribuyeron en un 18,82% a explicar la variabilidad entre las muestras, y se destaca que la muestras 3 min no escaldada está en el eje que posee el atributo aspecto turbio, la muestra 5 min no escaldada está en el eje que posee el atributo amargo y las muestras 3 y 5 min escaldadas poseen el atributo sabor a verdura cocida, concordando con los resultados de la Tabla 15.

6.7.2. Aceptabilidad, adición al consumo habitual e intención de compra

La Tabla 16, da a conocer en resumen, los valores promedio obtenidos de las respuestas dadas por los consumidores en el test de aceptabilidad, y en las respuestas a las preguntas; ¿agrega el producto evaluado a los que consume habitualmente? e intención de compra.

Tabla 16: Resumen del análisis estadístico de la evaluación sensorial.

Atributo	Valor promedio por infusión				Diferencias significativas entre productos	
	5 min escaldado	5 min no escaldado	3 min no escaldado	3 min escaldado	p - Valor	Diferencias
Aceptabilidad*	5,0 ^a	5,3 ^a	5,2 ^a	5,3 ^a	0,7507	No
¿Agrega el producto a los que ya consume?*	3,3 ^a	3,4 ^a	3,4 ^a	3,5 ^a	0,6875	No
Intención de compra***	3,2 ^a	3,3 ^a	3,3 ^a	3,4 ^a	0,8914	No

*Escala de 1 – 7, nota 7: “me gusta mucho” a nota 1: “me disgusta mucho”.

**Escala de 1 – 5, nota 5: “definitivamente si la agregaría” y nota 1: “definitivamente no la agregaría”.

***Escala de 1 – 5, nota 5: “definitivamente si lo compraría” y nota 1: “definitivamente no lo compraría”.

Las letras distintas en una misma fila, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los productos.

En la Tabla 16, se observa que para el test de aceptabilidad, no hubo diferencias significativas entre los productos evaluados por los consumidores, con un 5% de significancia (véase gráfico de medias en Anexo 18). Esto se ve reflejado en los promedios de aceptabilidad para cada muestra, fluctuando entre un 5,0 y 5,3, donde las muestras 5 min no escaldado y 3 min escaldado presentaron el mayor promedio. De la escala hedónica presentada a los consumidores, los productos se ubicaron dentro de la categoría “me gusta algo” (nota 5).

Para el caso de las respuestas a las preguntas de adición del producto al consumo habitual e intención de compra, también se obtuvo que no hay diferencias significativas entre productos, obteniéndose un promedio de entre 3,3 y 3,5 para la

primera pregunta, situándose en la escala codificada dentro de la opción “No sé si la agregaría o no la agregaría” (nota 3). Se presentó la misma condición para la pregunta de intención de compra, situándose en la escala dentro de la opción no se la compraría o no la compraría (nota 3).

Adicionalmente, se calculó la intención de compra positiva como el porcentaje de personas que eligieron las alternativas codificadas con nota 5 y 4 para las respuestas a las preguntas “¿Agregaría esta infusión a las que consume habitualmente?” y “Si este producto se encuentra donde Ud. Habitualmente hace las compras, ¿qué es lo que probablemente haría?”. Obteniéndose que la muestra 3 min escaldada es la que probablemente agregarían a las infusiones que ya consumen (64%) y también la que probablemente comprarían (56%) (detalle en Tabla 17).

Tabla 17: Intención positiva de compra y de agregar a la canasta habitual los productos evaluados.

Preguntas	Productos			
	5 min escaldado (%)	5 min NO escaldado (%)	3 min NO escaldado (%)	3 min escaldado (%)
Personas que agregarían esta infusión a las que consume habitualmente (puntaje 4 y 5)	46	56	49	64
Personas que comprarían el producto (puntaje 4 y 5)	46	46	46	56

Los resultados obtenidos del análisis sensorial, evidencian que, a pesar que los consumidores encuestados consumían té o infusiones de hierbas al menos 2 veces a la semana, esta infusión de hoja de apio, no es de su agrado general y no accederían a ella en primera instancia, ya que es un producto que en general: les gusta algo, no saben si lo agregarían a los tés que consumen habitualmente y tampoco saben si lo comprarían. Pero, por análisis de intención de compra positiva, la infusión 3 min escaldada es la que probablemente sería adquirida por los consumidores.

Para futuras investigaciones sería interesante analizar un grupo objetivo distinto, ya que los consumidores que evaluaron las infusiones pertenecían a una población joven (19 – 39 años), lo que corresponde, probablemente, a un segmento que no consumiría este tipo de té. Por lo que para mejorar este análisis se sugiere dirigir la evaluación sensorial a una población de mayor edad o por otro lado, a un segmento de personas que consuma específicamente infusiones de hierbas.

6.8. Extracto enriquecido con clorofila

Se realizó el método maceración para la obtención de los extractos de hoja de apio enriquecidos con clorofila, descrito en el punto 5.3.7. A éstos se les cuantificó la “*clorofila a*” por método fotométrico descrito en el punto 5.3.8. El análisis realizado muestra como resultado que el extracto de hoja de apio, contiene en promedio: 25,1 ± 0,3 g de clorofila a/Kg de hoja pf.

Para la obtención de los resultados se realizó una curva de calibración de estándar de *clorofila a*, la cual se detalla en la Figura 23, del Anexo 18.

Por lo tanto queda demostrado que el descarte de hoja de apio posee el pigmento *clorofila a*, el cual puede ser utilizado como colorante natural alimentario. Además se destaca que el método realizado para la obtención del extracto enriquecido en clorofila es de bajo costo y al ser efectuada la extracción con las hojas frescas, no hubo mayor degradación de los compuestos bioactivos contenidos en ellas.

Para investigaciones posteriores, sería útil procesar el extracto para la obtención de clorofila pura y realizar una evaluación sensorial de ésta, comparándolo con colorantes naturales que sean empleados en la industria alimentaria para estimar su potencial competencia en el mercado.

7. Conclusiones

De lo anteriormente analizado se concluye que:

- En general los objetivos propuestos en este trabajo de investigación se cumplieron satisfactoriamente, logrando desarrollar dos productos a partir de descartes de hoja de apio provenientes de la empresa Biofresco; una infusión con un valor agregado de capacidad antioxidante y un extracto enriquecido en clorofila para un posterior uso como colorante natural en la industria alimentaria.
- Se consiguió estudiar la cinética de secado por convección con aire caliente de los descartes de hoja de apio, ajustando las curvas de secado obtenidas experimentalmente a modelos matemáticos establecidos. El modelo Page modificado es el que logró un mejor ajuste de los datos obtenidos a las 3 temperaturas de secado. Además, se demostró que es más rápido secar a 55°C con una difusividad efectiva de $2,8 \times 10^{-9}$ (m²/s), aplicando una energía mínima de 61,83 KJ/mol.
- Se logró desarrollar una infusión con hoja secada a 3 temperaturas (35, 45 y 55°C) y a 4 tiempos de extracción (3, 5, 7 y 10 minutos), evaluando la capacidad antioxidante por los métodos ORAC-FL, ORAC-PGR Y DPPH y el contenido de polifenoles totales a través del ensayo de Folin C. La infusión con las mejores propiedades antioxidantes fue la realizada con hoja secada a 35°C y con un tiempo de extracción máximo de 7 minutos.
- La cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (DAD), resultó ser una técnica adecuada para el análisis de apigenina presente en las infusiones obtenidas con hoja secada a 35°C, y a todos los tiempos de extracción. Obteniéndose valores entre $1,5 \pm 0,2$ y 2 ± 0 mg de apigenina en 100 g hoja de apio seca. Evidenciando que las infusiones desarrolladas poseen este flavonoide, el cual está contribuyendo con la capacidad antioxidante de éstas.

- De acuerdo a la evaluación sensorial de la infusión:
 - Por Test CATA, se evidenció la presencia de atributos negativos, encontrados en la muestra 5 min escaldada (atributo amargo) y en las muestras 3 y 5 min escaldadas (atributo sabor a verdura cocida). A pesar de esto, las 4 muestras, en general, poseían atributos considerados positivos, siendo éstos percibidos en mayor proporción por los consumidores.
 - En el Test de aceptabilidad e intención de compra, no hubo diferencias significativas entre muestras en cuanto a las respuestas entregadas por los consumidores, situándose las infusiones en las categorías: “me gusta algo”, no sé si la agregaría o no la agregaría a los té y/o infusiones que ya consumo” y “no sé si la compraría o no la compraría”. Esto significa que los consumidores no accederían en primera instancia a la compra y consumo de las infusiones de apio evaluadas. Esto se puede deber a que la edad de los evaluadores varió entre 19 – 39 años, segmento joven de la población. Por lo que, para futuras investigaciones, se sugiere cambiar el rango etario de los consumidores, sobre 50 años.

- La cuantificación de *clorofila a* por espectrofotometría fue adecuada para el extracto de la hoja fresca realizada a través del método de maceración con solvente etanol 95%, obteniendo como resultado una cantidad de $25,1 \pm 0,3$ g de *clorofila a* por Kg de hoja fresca.

8. Referencias

- Aghbashlo, M., Kianmehr, MH., Samimi-Akhijahani, H. Influence of drying conditions on the effective moisture diffusivity, energy of activation and energy consumption during the thin-layer drying of berberis fruit (Berberidaceae). *Energy Convers Manag*, 2008. 49: 2865–2871.
- Alam, N., Bristi, N., Rafiqzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013. 21, 143 – 152.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 15th Edition. Virginia, EE.UU. Kenneth Helrich. 1990. p. 40.
- Araya, M., Ratti, C. *Avances in food dehydration: Dehydration of foods: General concepts*. USA, CRC Press, 2009. 2– 3.
- Bahloul, N., Boudhrioua, N. Kouhila, M., Kechaou, N. Convective solar drying of olive leaves. *Journal of Food Process Engineering*, 2011. 34: 1338 – 1362.
- Bansal, V., Malviya, R., Pal, O., Sharma S. High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2010. p. 22 – 26.
- Carmona, I. “Utilización de los residuos de la industria del tomate para la obtención de compuestos bioactivos”. [en línea] *Agrimundo*, Agosto 2013.<<http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/REPORTE-7-CONDISE%C3%91O-INCLUIDO-APROBADO.pdf>> [consultado: 13/04/2015].
- Carrín, M., Crapiste, G. *Convective drying of food*. USA, CRC Press, 2009. 123 – 151.
- Castaño, S. *Vertederos e impacto sobre las aguas subterráneas*. [en línea]. Instituto Geológico y Minero de España, Madrid. <<http://riubu.ubu.es/bitstream/10259.4/2495/1/Casta%C3%B1o-Vertederos.pdf>> [consultado: 10 de Octubre de 2016].
- Chayjan, R., Salari. K., Abedi, Q., Sabziparvar, A. Modeling moisture diffusivity, activation energy and specific energy consumption of squash seeds in a semi fluidized and fluidized bed drying. *Journal of Food Science Technology*, 2013. 50 (4): 667 – 677.
- Crank, J. *The mathematics of diffusion*. 2th Edition, Londres. Clarendos Press, 1975. p. 44 – 68.
- Doymaz, I. Thin-layer drying behaviour of mint leaves. *Journal of Food Engineering*. 74: 370 – 375, 2006.
- Doymaz, I. Convective air drying characteristics of thin layer carrots. *Journal of Food Engineering*, 2004. 61: 359 – 364.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (57): 1768-1774. Julio 2009.
- ETC y EHIA, 2014. *Tea & herbal infusions Europe*. [en línea: <http://www.thie-online.eu/fileadmin/inhalte/Publications/HFI/1_2014-06-

27_Compendium_of_Guidelines_for_Herbal_Infusions.pdf>]
15/10/2016].

[consultado:

- Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., Fraga, C.G. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys*, 2010. (1): 23 – 30.
- Gauri, M., S, Ali., Khan, M. A review of *Apium graveolens* (Karafs) with special reference to Unani Medicine. *IAIM*, 2015. 2(1): 131 – 136.
- Huang, D., OU, B., Prior, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. (53): 1841 – 1856.
- Ibañez, E., Herrero M., Cifuentes, A. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*, 2006. 98:136 – 148.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 2011. 126 (4): 1821 – 1835.
- Jensen, K. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003. 387 – 392.
- Jeria, D., Pozo, A. Estudio del secado convectivo de hojas de *Stevia rebaudiana* y factibilidad técnico-económica de una planta elaboradora de edulcorante a base de stevia. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero en limentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2011. 22 – 28 p.
- Kadam, M., Goyal, R.K., Singh, K.K., Gupta, M.K. Thin layer convective drying of mint leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011. 5(2): 164 – 170.
- Kaleta, A., Górnicki, K. Some remarks on evaluation of drying models on red beet particles. *Energy Conversion and Management*, 2010. 51: 2967 – 2978.
- Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H., Ashtary-Larky, D. A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Advanced Herbal Medicine*, 2014. 1 (1): 48 – 59.
- Krokida, M.K., Karathanos, V.T., Maroulis, Z.B. Drying kinetics of some vegetables. *Journal of Food Engineering*, 2003. 59: 391–403.
- Lawless, H., Heymann, H. *Sensory evaluation of food*. 2th Edition. EE.UU. Springer, 2003. 1: 1 – 3; 14: 325 – 328.
- Lichtenthaler, H. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987. Vol. 148.
- López-Alarcón, A., Ortíz, R., Benavides, J., Mura, E., Lissi, E. Use of the ORAC-pyrogallol red/ORAC fluorescein ratio to assess the quality of antioxidant in Chilean wines. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2011. 56, N ° 3: 764 – 767.
- López-Alarcón, E. Lissi. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with Peroxyl Radicals. *Free Radical Research*. 40 (9) (2006). 979–985.
- Malhotra, S. Celery. En: *Handbook of herbs and spices*. 2012, 12: 249-267.

- Mancilla, E., Castrejón R., Rosas M., Blanco Z. y Pérez J. “Extracción y Separación de Pigmentos Vegetales”. México. Universidad del Valle de México. 2012.
- Mencherini, T., Cau, A., Bianco, G., Della Loggia, R., Aquino, P., Autore, G. An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59: 891–897, 2007.
- Mondaca, R., Ah-Hen, K., Gálvez, A., Honores, C., Moraga, N. *Stevia rebaudiana* leaves: Effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant Foods Hum Nutr*, 2015.
- Mrkic, V., Ukrainczyk, M., Tripalo, B. Applicability of moisture transfer Bi-Di correlation for convective drying of broccoli. *Journal of Food Engineering*, 2007. 79: 640 – 646.
- Okos, M., Campanella, O., Narsimhan, G., Singh R., Weitnauer, A.C. *Food Dehydration*. 2^{da} ed. EE.UU, CRS Press, 2007. 10: 603 – 605.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001). 4619-4626.
- Panchariya, P.C., Popovic, D., Sharma, A.L. Thin-layer modeling of black tea drying process. *Journal of Food Engineering*, 2002. 52: 349 – 357.
- Park. K., Vohnikova. Z., Brod. F. Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispa L.*). *Journal of Food Engineering*, 2002. 51: 193 – 199.
- Pefaur, J. 2014. IV Gama, una industria alimentaria en crecimiento. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA).
- Poblete, A., López-Alarcón, C., Lissi, E. Campos, A.M. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) values of herbal teas obtained employing different methodologies can provide complementary data. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2009. 54: 154 – 157.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53: 4290 – 4302.
- Puente, L. Echeagaray, E. Castro, E. Di Scala, K. “Aplicación de Modelos Matemáticos al Proceso de Secado Asistido por Infrarrojos de Descartes de Limón (*Citrus limon (L.)* Burm. F. Cv. Genova)”. *Dyna*. 181: 91-97, octubre 2013.
- Qian, Z., Ming-Ming, Z., Pei-Lin, C., Yun-Ying, C., Xiang-Ling, T. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from celery. *Journal of Food Science*, 2011. C680 – C685.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radicals Biology & Medicine*, 1996. (7): 993 – 956.

- Rico, D., Martín-Diana, A., Barat, J.M., Barry-Ryan, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Food Science Technology*, 2007. p. 373 – 386.
- Row, K., Han, D. Determination of luteolin and apigenin in celery using ultrasonic-assisted extraction based on aqueous solution of ionic liquid coupled with HPLC quantification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011. 91: 2888 – 2892.
- Sambamurty, A.V.S.S. (2005). *Taxonomy of Angiosperms*. I. K. International Pvt Ltd.
- Sánchez-Rangel, J., Benavides, J., Heredia J., Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. The Folin – Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 2013. 5: 5990 – 5999.
- Sato D., Ikeda N. y Kinoshita T. Home-Processing Black and Green Tea (*Camellia sinensis*). *Food Safety and Technology*, 2007. 26: 1 – 2.
- Scalbert, A., Andres-Lacueva, C., Arita, M., Kroon, O., Manach, C., Urpi-Sarda, M., Wishart, D. Databases on food phytochemicals and their health-promoting effects. *J. Agric Food Chem*, 2011. (9): 4331 – 4348.
- Schmidh, S., Fontana A. Water activity values of select food ingredients and products. En su: *Water activity in foods*. Primera edición. USA. IFT Press, Blackwell Publishing. 2007. p. 407 – 420.
- Segura, S., Torres, J. *Historia de las plantas en el mundo antiguo*. Bilbao – Madrid. 2009. p: 403 – 404.
- Senadeera, W., Bhandari, B.G., Wijesinghe, B. Physical properties and fluidization behavior of fresh green bean particulates during fluidized bed drying. *Trans I ChemE*, 2000. 78 Part C, 43–47.
- Senadeera, W., Bhandari, B.G., Wijesinghe, B. Influence of shapes of selected vegetables materials on drying kinetics during fluidized bed drying. *Journal of Food Engineering*, 2003. 58, 277–283.
- Sorour, M., Hassanen, N., Ahmed, M. Natural antioxidant changes in fresh and dried celery (*Apium graveolens*). *American Journal of Energy Engineering*, 2015. 3 (2 – 1): 12 – 16.
- Speisky, H. 2008. Base de datos de actividad antioxidante (ORAC) y contenido de polifenoles totales (PFT) en hortalizas producidas y/o consumidas en Chile. URL: (<http://www.portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-antioxidantes-de-hortalizas/>). Última actualización Enero - 2015.
- Termini, J. Peroxyl and alkoxyl radical mediated DNA damage. En: CUTLER, R., RODRÍGUEZ, H. *Critical reviews of oxidative stress and aging*. Singapur, World Scientific, 2003. pp. 39 – 53.
- Valentín, D., Chollet, S., Lelievre, M., Abdi H. Quick and dirty but still pretty good: a review of new descriptive methods in food science. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012. 47: 1563 – 1578.
- Villaño, D. Fernández-Pachón, M.L. Moyá, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, vol 71 (2007), 230–235.

- Wang, L., Weller, C. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Food Science & Technology*, 2006. 17: 300 – 312.
- Wolski, T., Dyduch, J., Najda, A. Evaluation of content and composition of phenolic acids and tannins in leaf dry matter of two celery cultivars (*Apium graveolens* L. var. dulce mil. pers.). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Horticulture*, 2002. 5 (1).

9. Anexos

Anexo 1:

Tabla 1: Ácidos fenólicos, flavonoides e isoflavonas encontradas en la hoja de apio fresca (Sorour et al., 2015).

Ácidos Fenólicos	Flavonoides	Isoflavonas	
Ácido Gálico	Ácido Ferúlico	Apigenina	Daidzeína
Ácido Protocatecuico	Ácido Salicílico	Hesperetina	Genisteína
Catecol	Ácido Cinámico	Luteolina	Isoramnetina
Ácido Clorogénico	Ácido Crisina	Quercetrina	
Ácido Siríngico	Ácido Pirogalico	Rosmarínico	
Ácido Caféico	Ácido Elágico		
Ácido p-cumárico	Catequina		

Anexo 2:

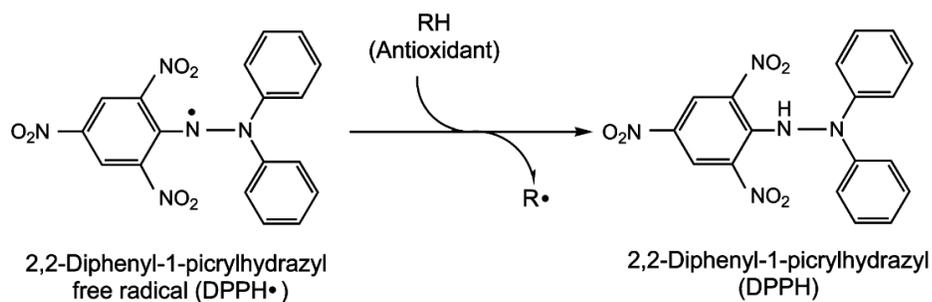


Figura 4: Reacción entre el radical DPPH y un compuesto antioxidante.

Anexo 3:

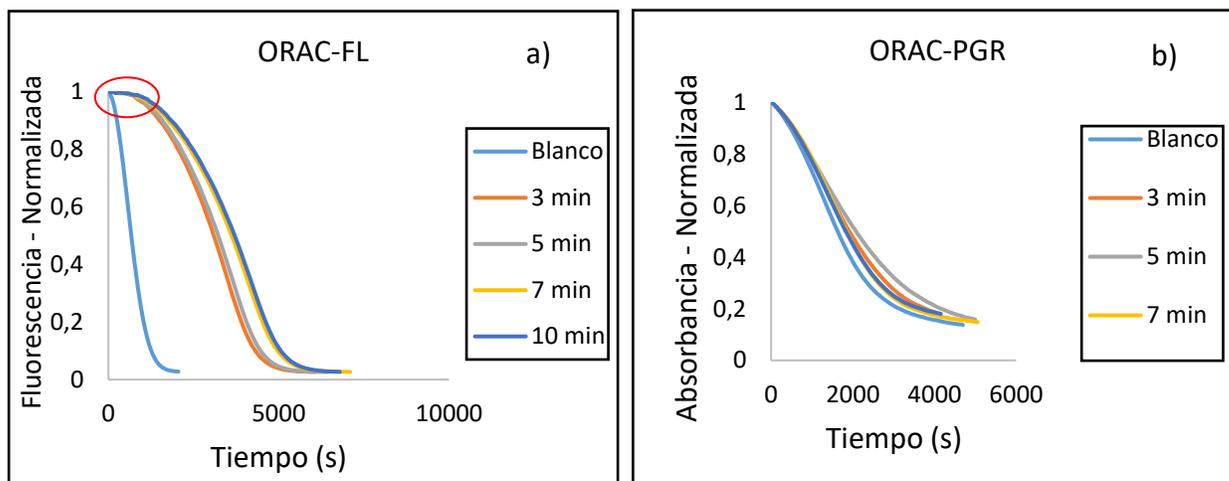


Figura 6: Diferencia gráfica entre ORAC-FL y ORAC-PGR: a) Gráfica de ORAC-FL, la cual presenta un tiempo de inducción, al inicio del decaimiento de la fluorescencia (encerrado en un círculo rojo) y b) Gráfica ORAC-PGR, la cual no inicia con un tiempo de inducción sino que el decaimiento se produce de forma inmediata.

Anexo 4:

Tabla 4: Gradiente de elusión cromatográfica.

Tiempo	A %	B %	C%	D %	Flow [mL/min]	Presión [bar]
0	8	92	0	0	1	40
2	9	91	0	0	1	40
4	10,2	89,8	0	0	1	40
6	11,2	88,8	0	0	1	40
8	12,5	87,5	0	0	1	40
10	13,5	86,5	0	0	1	40
12	14,8	85,2	0	0	1	40
14	15,9	84,1	0	0	1	40
16	17	83	0	0	1	40
18	18,2	81,8	0	0	1	40
20	19,1	80,9	0	0	1	40
24	38	62	0	0	1	40
28	44	56	0	0	1	40
32	52,5	47,5	0	0	1	40
36	62	38	0	0	1	40
40	70	30	0	0	1	40
45	8	92	0	0	1	40

Anexo 5:

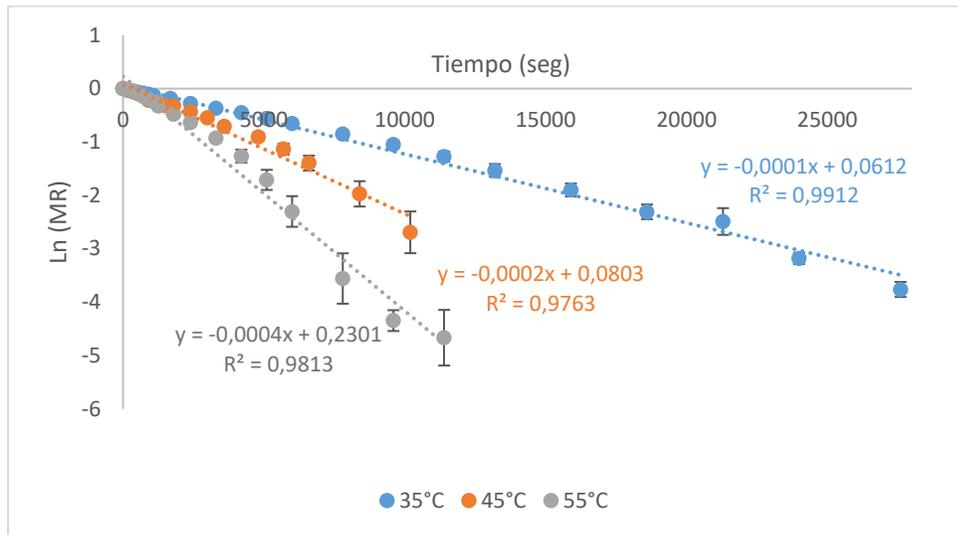


Figura 10: Logaritmo de la razón de humedades en función del tiempo de las hojas de apio a 35°C, 45°C y 55°C.

Anexo 6:

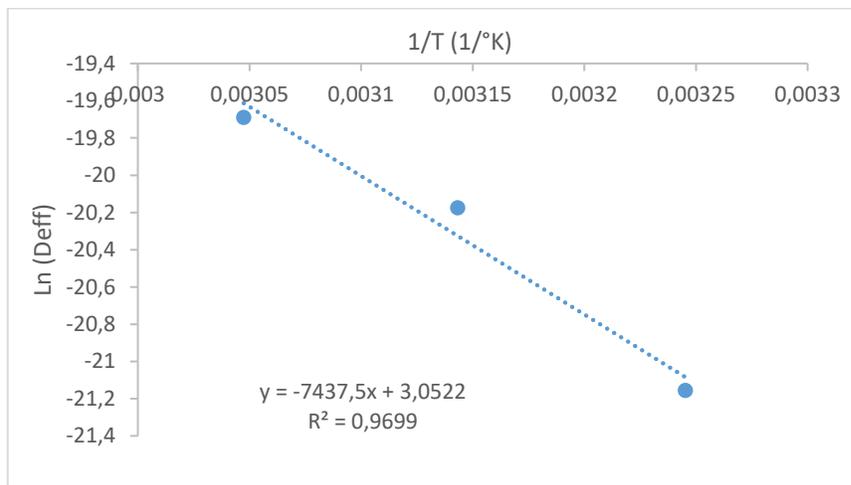


Figura 11: Gráfico del logaritmo natural de la difusividad efectiva a 35°C, 45°C y 55°C versus 1/T (1/°K).

Anexo 7:

Tabla 7: Comparación de los estadísticos de los ajustes a modelos matemáticos.

Modelo	Temperatura (°C)	Estadísticos			
		X ²	SSE	RMSE	R ²
Henderson Pabis	35	3,829E-04	3,556E-04	1,886E-02	0,998
	45	7,745E-04	7,072E-04	2,659E-02	0,995
	55	7,901E-04	7,070E-04	2,659E-02	0,995
Henderson Pabis Modificado	35	4,526E-04	3,556E-04	1,886E-02	0,998
	45	9,560E-04	7,066E-04	2,658E-02	0,995
	55	1,033E-03	7,070E-04	2,659E-02	0,995
Page	35	1,890E-04	1,755E-04	1,325E-02	0,999
	45	5,760E-04	5,259E-04	2,293E-02	0,996
	55	7,901E-04	7,070E-04	2,659E-02	0,999
Page Modificado	35	1,848E-04	1,716E-04	1,310E-02	0,999
	45	5,760E-04	5,259E-04	2,293E-02	0,996
	55	2,032E-04	1,818E-04	1,348E-02	0,999
Newton	35	3,962E-04	3,820E-04	1,955E-02	0,997
	45	7,858E-04	7,517E-04	2,742E-02	0,996
	55	1,219E-03	1,155E-03	3,399E-02	0,992
Logarítmico	35	3,006E-04	2,684E-04	1,638E-02	0,998
	45	6,916E-04	6,014E-04	2,452E-02	0,996
	55	8,395E-04	7,070E-04	2,659E-02	0,997

Anexo 8:

Tabla 9: Variación de la Capacidad Antioxidante (CA) por método ORAC-FL a los distintos tiempos de extracción y a las diferentes temperaturas de secado de la hoja de apio para realizar las infusiones.

Resultados ORAC-FL			
	35°C	45°C	55°C
Tiempo extracción (min)	CA µmol ET/100 g ps	CA µmol ET/100 g ps	CA µmol ET/100 g ps
3	2253 ± 25 ^a	236 ± 25 ^a	106 ± 1 ^a
5	2835 ± 114 ^b	264 ± 33 ^a	204 ± 2 ^b
7	2999 ± 88 ^c	65 ± 6 ^b	179 ± 3 ^c
10	3013 ± 41 ^c	65 ± 6 ^b	83 ± 3 ^d

*Columnas con letras iguales, significa que no hay diferencias significativas de CA entre los tiempos de extracción ($p \leq 0,05$).

Anexo 9:

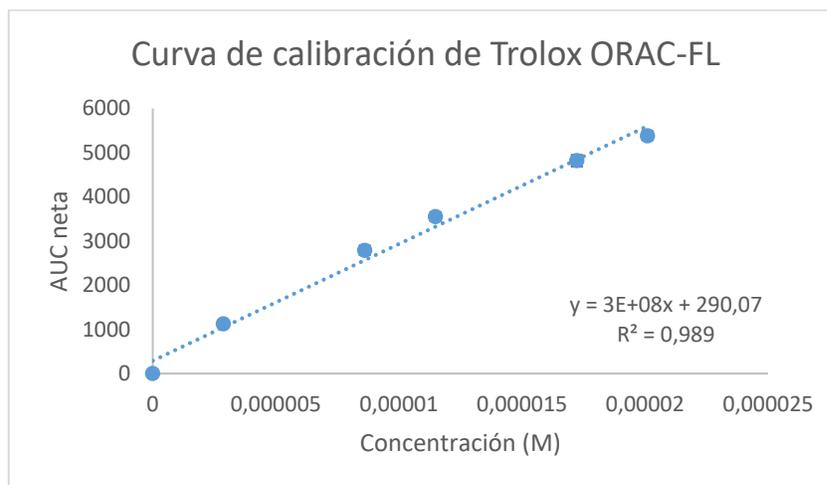


Figura 13: Curva de calibración de Trolox que representa utilizada para ensayo ORAC-FL.

Anexo 10:

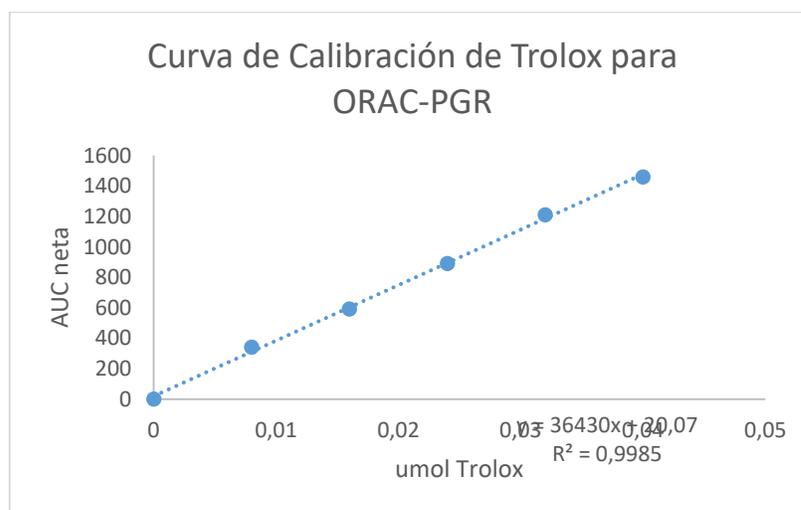


Figura 14: Curva de calibración de Trolox utilizada para ensayo ORAC-PGR.

Anexo 11:

Tabla 10: Variación de la Capacidad Antioxidante (CA) por método ORAC-PGR a los distintos tiempos de extracción y a las diferentes temperaturas de secado de la hoja de apio para realizar las infusiones.

Resultados ORAC-PGR			
	35°C	45°C	55°C
Tiempo extracción (min)	CA μ mol ET/100 g ps	CA μ mol ET/100 g ps	CA μ mol ET/100 g ps
3	657 \pm 35 ^a	612 \pm 44 ^a	419 \pm 45 ^a
5	646 \pm 186 ^a	581 \pm 53 ^a	497 \pm 49 ^b
7	594 \pm 126 ^a	567 \pm 73 ^a	378 \pm 27 ^a
10	201 \pm 45 ^b	285 \pm 23 ^b	276 \pm 26 ^c

*Columnas con letras iguales, significa que no hay diferencias significativas de CA entre los tiempos de extracción ($p \leq 0,05$).

Anexo 12: Análisis estadístico de las diferencias de capacidad antioxidante entre las infusiones obtenidas a 35 y 45°C.

Pruebas de Múltiple Rangos para CA por Temperatura °C

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura °C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
55	17	383,952	20,8185	X
45	12	511,342	24,5739	X
35	12	524,423	24,5739	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
35 - 45		13,0808	70,5519
35 - 55	*	140,471	65,3836
45 - 55	*	127,39	65,3836

* indica una diferencia significativa.

Anexo 13:

Tabla 11: Variación de la Capacidad Antioxidante (CA) por método DPPH a los distintos tiempos de extracción y a las diferentes temperaturas de secado de la hoja de apio para realizar las infusiones.

Resultados DPPH			
	35°C	45°C	55°C
Tiempo extracción (min)	%Inhibición	%Inhibición	%Inhibición
3	8,3 ± 0,2 ^a	8,1 ± 0,5 ^a	6,1 ± 0,3 ^a
5	12 ± 1 ^b	17,6 ± 0,6 ^b	8,2 ± 0,5 ^b
7	12,5 ± 0,2 ^b	21 ± 1 ^c	11,2 ± 0,3 ^c
10	12,2 ± 0,5 ^b	20 ± 1 ^c	15,2 ± 0,6 ^d

*Columnas con letras iguales, significa que no hay diferencias significativas de CA entre los tiempos de extracción ($p \leq 0,05$).

Anexo 14:

Tabla 12: Variación del contenido de PT por método Folin C a los distintos tiempos de extracción y a las diferentes temperaturas de secado de la hoja de apio para realizar las infusiones.

Resultados Folin C			
	35°C	45°C	55°C
Tiempo extracción (min)	PT (mg AGE/100 g ps)	PT (mg AGE/100 g ps)	PT (mg AGE/100 g ps)
3	116 ± 14 ^a	129 ± 15 ^a	77 ± 1 ^a
5	108 ± 5 ^a	81 ± 8 ^b	104 ± 3 ^b
7	102 ± 13 ^a	69 ± 3 ^b	139 ± 2 ^c
10	50 ± 8 ^b	72 ± 1 ^b	169 ± 5 ^d

*Columnas con letras iguales, significa que no hay diferencias significativas de CA entre los tiempos de extracción ($p \leq 0,05$).

Anexo 15:

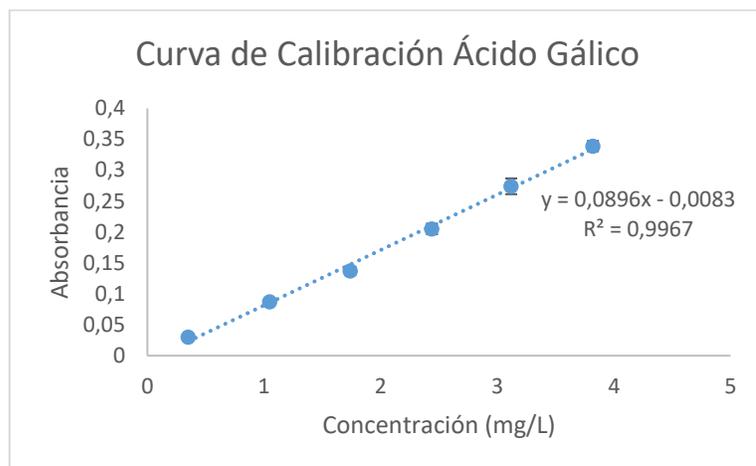


Figura 18: Curva de calibración de estándar ácido gálico para expresión de resultados finales del ensayo Folin C.

Anexo 16:

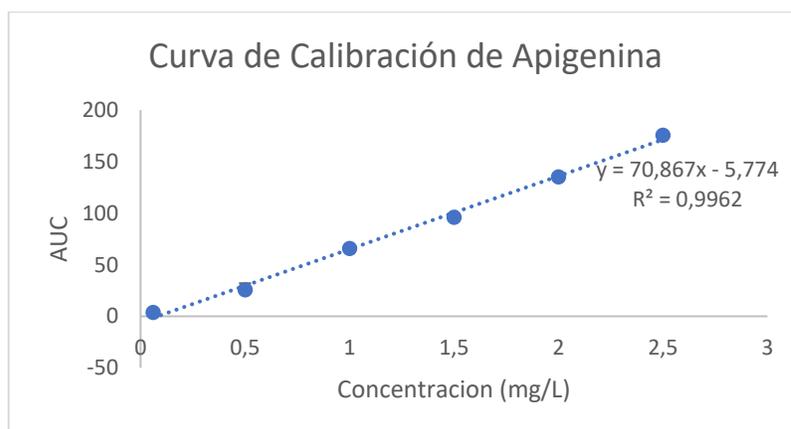


Figura 19: Curva de calibración de estándar de apigenina libre, para su cuantificación en las infusiones desarrolladas.

Tabla 13: Límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y longitud de onda máxima del flavonoide apigenina.

Polifenol	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	Longitud de onda máxima (nm)
Apigenina	0,063	0,209	340

Anexo 17:

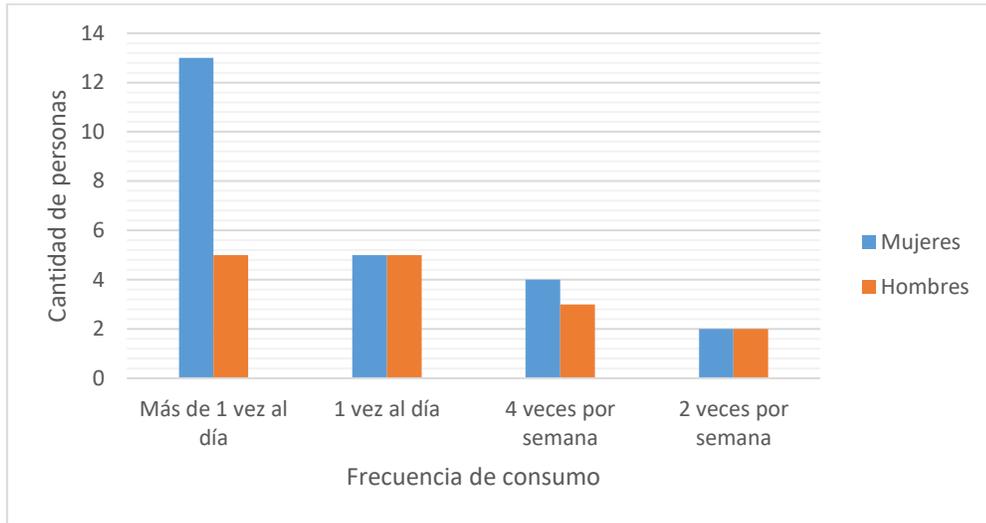
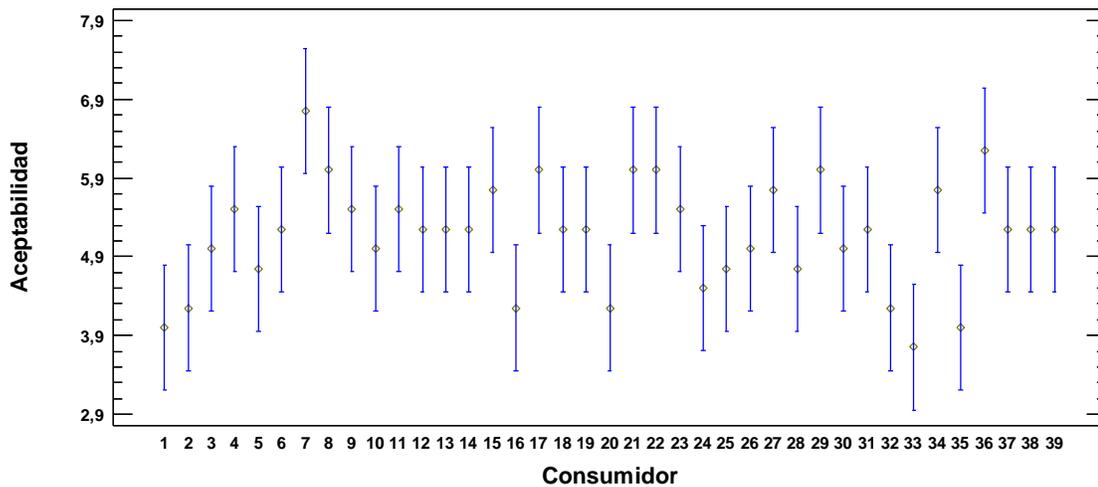


Figura 21.- Frecuencia de consumo de té o hierbas por parte de los consumidores encuestados.

Anexo 18: Gráfico de medias del análisis estadístico del test de aceptabilidad, dando a conocer la variación de la aceptabilidad por consumidor.



Anexo 18:

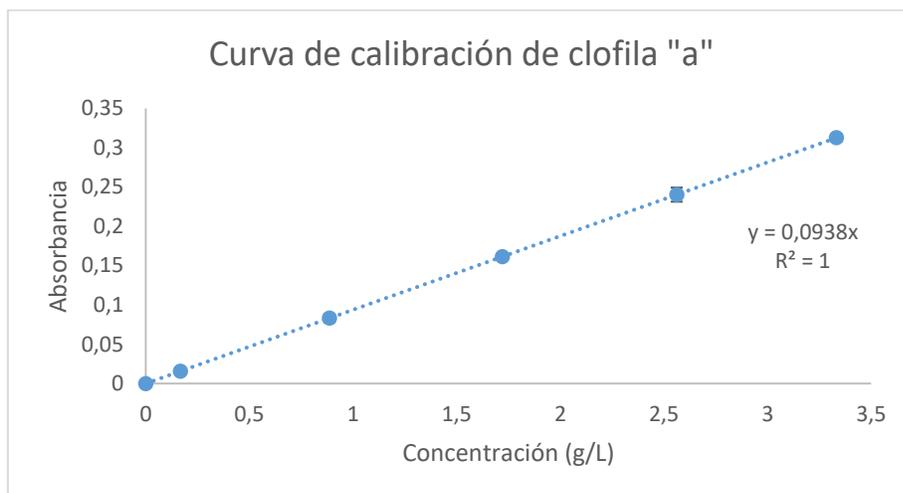


Figura 23: Curva de calibración de estándar clorofila.