

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES



**“RESIDUOS DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus* L.) VARIEDAD
‘LORCA’ COMO FUENTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU
APLICACIÓN COMO ANTIOXIDANTES”**

Presentada por:

MIRTHA PATRICIA MARTÍNEZ TAPIA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Lima – Perú

2016

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 LA ALCACHOFA.....	4
2.1.1 Origen.....	4
2.1.2 Cultivo.....	4
2.1.3 Variedades de alcachofa cultivadas.....	5
2.1.4 Producción e industrialización.....	6
2.1.5 Composición química.....	7
2.1.6 Propiedades benéficas.....	7
2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	8
2.2.1 Definición.....	8
2.2.2 Química de los compuestos fenólicos.....	8
2.2.3 Relación estructura-actividad.....	11
2.2.4 Alimentos como fuente de compuestos fenólicos.....	13
2.2.5 Valorización de residuos agroindustriales.....	13
2.2.6 Recuperación de compuestos funcionales a partir de residuos agroindustriales.....	15
2.3 APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN ACEITES.....	17
2.4 GESTIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS GENERADOS POR LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS.....	19
2.5 MÉTODO DE TAGUCHI.....	19
2.5.1 Función de pérdida.....	19
2.5.2 La calidad a través del diseño.....	19
2.6 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	23
2.6.1 Definición.....	23
2.6.2 Procedimiento secuencial.....	24
2.6.3 Diseño de Box-Behnken.....	26

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	30
3.2 MATERIALES EXPERIMENTAL.....	30
3.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	30
3.3.1 Equipos.....	30
3.3.2 Materiales.....	31
3.3.3 Reactivos.....	31
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	32
3.4.1 Determinación de humedad y materia seca.....	32
3.4.2 Capacidad antioxidante.....	32
3.4.3 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	33
3.4.4 Determinación del índice de peróxido.....	33
3.4.5 Determinación del valor de <i>p</i> -Anisidina.....	33
3.4.6. Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-PAD.....	34
3.4.7 Extracción de antioxidantes fenólicos a partir de muestras de aceite.....	35
3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	35
3.5.1 Evaluación de los residuos sólidos generados por el procesamiento de la alcachofa.....	35
3.5.2 Obtención de la harina de residuos de alcachofa.....	35
3.5.3 Maximización de la extracción de los compuestos fenólicos a partir de harina de residuos de alcachofa.....	36
3.5.4 Purificación del extracto fenólico maximizado.....	37
3.5.5 Estabilidad oxidativa en aceite de soya con adición de antioxidantes mediante pruebas aceleradas.....	38
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
3.6.1 Evaluación de residuos generados en la industrialización de alcachofa.....	39
3.6.2 Maximización de la extracción de los compuestos fenólicos a partir de la harina de residuos de alcachofa.....	39
a. <i>Screening</i> por el método de Taguchi.....	39
b. Maximización por el método de superficie de respuesta.....	41
3.6.3 Estabilidad oxidativa en aceite de soya con adición de antioxidantes mediante pruebas aceleradas.....	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44

4.1 EVALUACIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LA ALCACHOFA.....	44
4.1.1 Distribución de los residuos de alcachofa.....	44
4.1.2 Aporte de compuestos fenólicos en cada tipo de residuos de alcachofa....	45
4.2 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	46
4.2.1 <i>Screening</i> empleando el método de Taguchi.....	46
4.2.2 Maximización del proceso de extracción de compuestos fenólicos en la harina de residuos de alcachofa.....	49
4.3 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FT EN EL EXTRACTO MAXIMIZADO, OBTENIDO A PARTIR DE LA HARINA DE RESIDUOS DE ALCACHOFA.....	55
4.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA EN ACEITE DE SOYA MEDIANTE PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO	57
4.4.1 Índice de peróxidos (IP).....	57
4.4.2 Valor de <i>p</i> -Anisidina (<i>p</i> -A).....	60
4.4.3 Perfil de compuestos fenólicos identificados por HPLC-PAD en el extracto de alcachofa durante las pruebas de almacenamiento acelerado.....	61
4.5 ESTIMACIÓN DEL BENEFICIO AMBIENTAL Y ECONÓMICO PARA LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESIDUOS SÓLIDOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE ALCACHOFA	64
V. CONCLUSIONES.....	70
VI. RECOMENDACIONES	71
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
VIII. ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de la alcachofa (por 100 g de porción comestible).....	7
Tabla 2: Clases de compuestos fenólicos en las plantas	11
Tabla 3: Arreglo ortogonal $L_8 (2^7)$	22
Tabla 4: Diferencias entre el enfoque tradicional y el método de Taguchi.....	23
Tabla 5: Diseño Box-Behnken para tres variables.....	27
Tabla 6: Diseño Box-Behnken para cuatro y cinco variables.....	28
Tabla 7: Comparación de la eficiencia del diseño central compuesto (DCC), diseño Box-Behnken y diseño Doehlert (MD).....	29
Tabla 8: Niveles mínimos y máximos para el <i>screening</i> de los factores en el diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal $L_8 (2^7)$	40
Tabla 9: Diseño experimental por el método de Taguchi con arreglo ortogonal $L_8 (2^7)$ para el <i>screening</i>	40
Tabla 10: Variables independientes, códigos de niveles y sus valores según MSR.....	41
Tabla 11: Diseño Box-Behnken con tres variables y tres niveles por variable según MSR.....	42
Tabla 12: Cantidad de residuos que se generan en un <i>batch</i> promedio de procesamiento de alcachofa.....	44
Tabla 13: Aporte de contenido de fenólicos totales y capacidad antioxidante por tipo de residuo sólido de alcachofa.....	45
Tabla 14: Compuestos fenólicos totales bajo diferentes condiciones de extracción, según el arreglo ortogonal $L_8(2^7)$	46
Tabla 15: Capacidad antioxidante bajo diferentes condiciones de extracción, según el arreglo ortogonal $L_8 (2^7)$	47
Tabla 16: Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante bajo las condiciones de extracción ensayadas.....	50
Tabla 17: Coeficientes de regresión del modelo predictivo de segundo orden para las respuestas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.....	51
Tabla 18: Valores maximizados por MSR para capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$ harina (b.s.)).....	55
Tabla 19: Valores maximizados por MSR para compuestos fenólicos totales (mg ACE/g harina (b.s.)).....	55

Tabla 20: Compuestos fenólicos totales identificados en el extracto fenólico de harina de alcachofa mediante HPLC-PAD.....	56
Tabla 21: Variación de los contenidos fenólicos de los extractos de residuos de alcachofa en el aceite de soya almacenado a 55 °C.....	64
Tabla 22. Características de las alternativas de aprovechamiento de residuos sólidos generados por la industrialización de alcachofa.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras de los principales compuestos fenólicos presentes en la alcachofa.....	9
Figura 2: Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinámicos (b).....	10
Figura 3: Estructura genérica de una molécula de flavonoides.....	11
Figura 4: Tecnologías de valorización de los residuos y subproductos orgánicos en general.....	15
Figura 5: Diagrama de flujo para la utilización de residuos de frutas y vegetales.....	16
Figura 6: Reducción de la variabilidad utilizando relaciones no-lineales	20
Figura 7: Análisis de gráficas factoriales.....	22
Figura 8: Superficie de respuesta tridimensional donde se indica la respuesta esperada η como función de las variables x_1 y x_2	25
Figura 9: Gráfica de contorno de una superficie de respuesta.....	25
Figura 10: El carácter secuencial de la metodología de superficie de respuesta (MSR).....	26
Figura 11: Cubo para Diseño de Box-Behnken (a) y tres entrelazamientos para el diseño factorial 2^2 (b).....	27
Figura 12: Flujo de operaciones para la obtención de harina de residuos de alcachofa.....	36
Figura 13: Flujo de operaciones para la obtención del extracto fenólico a partir de harina de residuos de alcachofa.....	37
Figura 14: Esquema del proceso de purificación de los compuestos fenólicos de alcachofa	38
Figura 15: Valores señal/ruido (S/R, ETA) para cada factor y sus interacciones considerados, en la extracción de compuestos fenólicos totales a partir de harina de residuos de alcachofa.....	48
Figura 16: Superficie de respuesta y ploteo de contorno para los efectos del factor solvente de extracción (%) y el factor relación materia prima/solvente (m/v), a tiempo constante de 60 min, sobre los compuestos fenólicos totales del extracto fenólico obtenido a partir de harina de residuos de alcachofa.....	53
Figura 17: Superficie de respuesta y ploteo de contorno para los efectos del factor solvente de extracción (%) y el factor relación materia prima/solvente (m/v), a tiempo constante de 60 min, sobre la capacidad antioxidante del extracto obtenido a partir de harina de residuos de alcachofa.....	54

Figura 18: Perfil cromatográfico de elución del extracto de fenólico obtenido de la harina de residuos de alcachofa mediante HPLC-PAD a 320 nm.....	56
Figura 19: Índice de peróxido (meq O ₂ /kg aceite) en las muestras de aceite de soya evaluadas durante el almacenamiento a 55 °C.....	58
Figura 20: Valores de <i>p</i> -Anisidina para las muestras de aceite de soya evaluadas durante el almacenamiento a 55 °C.....	60
Figura 21: Cromatogramas a 320 nm para los extractos fenólicos de los residuos de alcachofa aplicados en aceite de soya sometidos a 55 °C a 0 (a), 10 (b) y 15 (c) días de almacenamiento acelerado.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Análisis de varianza para compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en el <i>screening</i> de Taguchi con arreglo ortogonal $L_8 (2)^7$	81
Anexo 2: Análisis de superficie de respuesta para los compuestos fenólicos totales.....	82
Anexo 3: Análisis de superficie de respuesta para capacidad antioxidante.....	84

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo optimizar la extracción de compuestos fenólicos, con solvente hidroalcohólico, a partir de harina de residuos sólidos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) variedad 'Lorca'. Se empleó el método de Taguchi para el *screening* de las variables independientes, en el que se determinó que la relación materia prima/solvente, el solvente de extracción y el tiempo influyeron en la extracción de los compuestos fenólicos. Con la metodología de superficie de respuestas optimizaron estas variables, sobre el contenido de compuestos fenólicos totales (FT) y la capacidad antioxidante (CA). Las condiciones óptimas encontradas, considerando a la CA fueron: 1/60 para la relación materia prima/solvente, 60.5% para el solvente de extracción y 30 min para el tiempo de extracción. El extracto de alcachofa fue evaluado como antioxidante natural en aceite crudo de soya desgomado (AAL) con 200 ppm en pruebas aceleradas de almacenamiento (55 °C por 15 días), también se evaluó como antioxidantes sintéticos al BHT (ABHT) y TBHQ (ATBHQ); y sin antioxidante (AB). El tratamiento (AAL) mostró valores mayores de IP (39.5 meq O₂/kg aceite) y *p*-A (5.05) en comparación con el blanco (AB) (IP 32.3 meq O₂/kg aceite; *p*-A 4.73); mientras que menores valores de IP y *p*-A fueron presentados por los aceites ABHT y ATBHQ (18.3 y 5.3 meq O₂/kg aceite; y 3.2 y 2.4, respectivamente). Al evaluar los cambios ocurridos a nivel de los compuestos fenólicos en el aceite (AAL), tendieron en conjunto a disminuir conforme los días de almacenamiento progresaron. Los resultados muestran que el extracto (AL) aplicado a 200 ppm, no protegió al aceite de soya frente a la oxidación bajo las condiciones evaluadas. No obstante, es una alternativa adecuada para la valorización de residuos sólidos de alcachofa.

Palabras clave: alcachofa, residuos sólidos, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, HPLC.

ABSTRACT

This investigation had the aim to optimize the extraction of phenolic compounds, with hydroalcoholic solvents, from flour of the solid waste of artichoke (*Cynara scolymus* L.) variety 'Lorca'. Taguchi's method was used for the screening of independent variables, it was determined that the variables influence phenolic compounds extraction were raw material/solvent ratio, solvent extraction and time. Surface response methodology was used to maximize these independent variables: on the phenolic content and antioxidant capacity (AC). The maximized conditions founded for AC were: 1/60 for raw material/solvent ratio, 60.5% for solvent extraction and 30 min for the extraction time. Artichoke extract was evaluated as a natural antioxidant on degumming crude soybean oil (AAL) with 200 ppm in accelerated storage tests (55 °C and 15 days). It was also evaluated soybean oils with synthetic antioxidant BHT (ABHT) and TBHQ (ATBHQ); and oil without antioxidant (AB). Soybean oil with artichoke extract (AAL) showed higher values PI(39.5 meq O₂/kg oil) and *p*-A (5.05) compared with control sample (AB) (PI 32.3 meq O₂/kg oil; 4.73 *p*-A); while lower values of PI and *p*-A were showed by ATBHQ ABHT oils (18.3 and 5.3 meq O₂/kg oil, and 3.2 and 2.4, respectively). Changes at phenolic compounds level in artichoke extract (AL) during accelerated storage tests were evaluated by HPLC-PAD, and showed that phenolic compounds in soybean oil (AAL) together tended to decrease as time of storage increased. This was related to the low stability of these compounds, storage conditions, but not because of a protective effect against oxidation. The results showed that artichoke extract (AL) at 200 ppm, presented no antioxidant activity against oxidation of soybean oil under the conditions evaluated. However, recovery of phenolic compounds is a suitable alternative for the valorization of artichoke solid waste.

Key words: artichoke, solid waste, phenolic compounds, antioxidant capacity, HPLC.

I. INTRODUCCIÓN

La agroindustria es un sector de gran importancia en nuestro país. Las industrias dedicadas al procesamiento de frutas y hortalizas generan grandes cantidades de residuos orgánicos sólidos y líquidos (hojas, tallos, semillas, efluentes contaminantes, etc.) y la gestión final de estos residuos representa un problema adicional (Llorach *et al.*, 2002; López-Molina *et al.*, 2003; Sánchez-Rabaneda, 2003; Velarde, 2006, Kosseva, 2013; Zuorro, 2014).

La industria procesadora de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) ofrece una amplia gama de productos, generando alrededor del 80-85% de residuos sólidos altamente perecibles (Federici *et al.*, 2009; Negro *et al.*, 2012; Zuorro *et al.*, 2016), lo que produciría problemas ambientales de no realizar una adecuada gestión de los mismos. Las pocas acciones de manejo para aliviar este problema ambiental son destinar estos residuos para alimentación animal y para la producción de fibra alimentaria (Llorach *et al.*, 2002; Sánchez-Rabaneda, 2003; Viniegra *et al.*, 2002; Velarde, 2006). Actualmente, existe interés y preocupación por lograr un mejor aprovechamiento de los productos y subproductos a fin de obtener un mayor rendimiento económico o cuando menos minimizar los gastos que supone su gestión (Viniegra *et al.*, 2002; Ayuso *et al.*, 2013). La obtención de compuestos como: azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteínas, polifenoles, lignina, entre otros; revalorizaría estos residuos, y originaría compuestos útiles en el campo alimentario, médico o químico (Bustos *et al.*, 2005; Ros *et al.*, 2012; Gaafar y Salama, 2013; Kosseva, 2013; Zuorro, 2014).

En los meses de Enero y Febrero del presente año, se ha exportado un peso neto promedio 2 023.7 toneladas de alcachofas en conserva (SUNAT, 2016), y considerando un 80 por ciento de residuos sólidos generados en el procesamiento de alcachofa, se habrían generado en promedio 8 094.8 toneladas de residuos, los que adecuadamente gestionados podrían ser fuente de compuestos fenólicos y/o elaboración de compost. Con esto se evitaría su disposición final en un relleno sanitario, espacio que debería ser empleado para la disposición de residuos peligrosos y no para residuos a los que se les puede dar una

valorización determinada y disminuir así la generación de lixiviados y gases que podrían contaminar el medio ambiente.

Los residuos procedentes de la industrialización de alcachofa pueden generar compuestos bioactivos, de valor agregado bastante atractivo, en términos económicos y tecnológicos. Diversas investigaciones conducidas sobre alcachofa han demostrado su potencial efecto benéfico en la salud, destacando sus propiedades hepatoprotectoras, anticarcinogénicas e hipocolesterolémicas (Llorach *et al.*, 2002; Shukla y Gupta, 2010). Muchas de estas propiedades estarían relacionadas con el poder antioxidante de sus compuestos fenólicos (Coinu *et al.*, 2006; Mulinacci *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). Por el contrario, se ha prestado relativamente poca atención a la reutilización de residuos de la alcachofa como fuente de polifenoles (Llorach *et al.*, 2002; Zuorro *et al.*, 2014). Y menos aún a la posibilidad de desarrollar un proceso integrado que combina la extracción de estos compuestos con algunas otras formas de valorización de residuos (Zuorro *et al.*, 2016).

El efecto protector de ciertos antioxidantes naturales frente a la rancidez oxidativa, ha sido reportado en diversas investigaciones; se puede mencionar al tocoferol, al ácido ascórbico (Frankel, 1996) y a los compuestos fenólicos (Naz *et al.*, 2004). El efecto anti-rancidez oxidativa de los compuestos fenólicos se debería en gran medida al número de grupos OH presentes en su estructura química (Naz *et al.*, 2004). En un estudio, Naz *et al.* (2004) encontraron que el ácido cafeico procedente del té, fue uno de los fenólicos más eficaces en la protección de la oxidación de aceite de maíz sometido a fritura. El ácido cafeico es uno de los compuestos fenólicos más abundantes en la alcachofa (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003).

Por tanto, los extractos fenólicos obtenidos de los residuos sólidos del procesamiento de la alcachofa, podrían ejercer un efecto protector frente a la oxidación de aceites; constituyendo una alternativa interesante para reemplazar a los antioxidantes sintéticos tales como: butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroquinona terciaria (TBHQ) que están muy cuestionados, desde el punto de vista de seguridad alimentaria. Asimismo, la obtención de compuestos fenólicos representaría otra forma de darle un valorización potencial a estos residuos con lo cual se lograría un beneficio económico y ambiental.

Dentro de este contexto, en la presente investigación el objetivo general fue:

- Reutilizar los residuos sólidos procedentes del procesamiento de alcachofa como posibles fuentes potenciales de antioxidantes naturales.

Y los objetivos secundarios fueron:

- Obtener a partir de los residuos sólidos de alcachofa, extractos ricos en compuestos fenólicos, optimizando su proceso de extracción.
- Evaluar la eficacia antioxidante de los extractos fenólicos en aceite de soya.
- Estimar el beneficio ambiental y económico para la producción de extractos fenólicos a partir de éstos residuos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA ALCACHOFA

2.1.1 Origen

Se tienen noticias de esta planta desde la antigüedad, siendo citada por Teofrasto, Galeno y Ateneo, aunque se cree que las informaciones sobre la misma están referidas a la alcachofa silvestre, de la que se derivan los actuales cultivares de alcachofa. Se trata de una planta oriunda de la región mediterránea (Maroto, 1992; Zuorro, 2014; Zuorro *et al.*, 2016). Parece ser que el cultivo fue durante la Edad Media objeto de selecciones, en Italia y en la España árabe, lo que justifica el gran número de variedades existentes en ambos países (Maroto, 1992).

Los árabes llevaron la alcachofa a España desde Marruecos, donde tomó el nombre de alcachofa como una derivación fonética del árabe *Al Kharshuf*. Fue introducida en Nápoles, en 1466, allí comenzó a cultivarse en mayor escala, expendiéndose a Italia; y a fines del siglo XIX se conoció en Estados Unidos (Mortensen y Bullard, 1971).

Calderón *et al.* (2001) indican que hay evidencias que la alcachofa fue introducida al Perú, por los misioneros franciscanos en la época de la conquista y posteriormente por familias italianas. Por su rusticidad se desarrolla bien en climas templados y subtropicales, por lo que hoy se cultiva en la costa peruana y en la sierra central.

2.1.2 Cultivo

La alcachofa es una planta vivaz, que suele aprovecharse generalmente durante dos o tres años seguidos del cultivo. Paralelamente con el crecimiento foliar de la planta, se desarrolla un importante sistema rizomático en el que se produce la acumulación de reservas nutrientes, y del que nacen los hijuelos que servirán para multiplicar la planta. Se adapta muy bien a climas templados, tolera en cierto grado la salinidad y es aprovechable por las inflorescencias carnosas, denominadas capítulos o cabezuelas (Mortensen y Bullard, 1971; Maroto, 1992; Calderón *et al.*, 2001). Crece hasta una altura de 1.0 a 2.0 m,

cubre un área aproximada de 1.5 a 2.0 m de diámetro, es de color verde plateado y se reproduce de tres formas (por semilla botánica, por hijuelos o por yemas en diferentes estados de desarrollo) (Calderón *et al.*, 2001; Maroto, 1992).

La alcachofa pertenece a la familia *Compositae* y su nombre científico es *Cynara scolymus* L., y es una planta que está compuesta por raíz, tallo, hojas e inflorescencia que constituye la parte comestible de esta hortaliza (Maroto, 1992).

2.1.3 Variedades de alcachofa cultivadas

Las alcachofas pueden ser clasificadas en base a la presencia o ausencia de espinas en los capítulos (Calderón *et al.*, 2001). Entre las variedades con espinas destaca la alcachofa criolla, muy difundida en el Perú, y probablemente es oriunda de la isla Cerdeña (Italia) (Calderón *et al.*, 2001). Se caracterizan por su sabor fuerte, textura fibrosa y color ligeramente morado. Son consumidas principalmente en el mercado nacional, como hortalizas frescas. En el mercado internacional se aprecian mucho sus fondos en conserva, por ser más grandes, de consistencia más dura y excelente sabor. Con ellas no se pueden obtener corazones debido a que las florecillas que nacen sobre los fondos son espinosas y deben eliminarse (Robles, 2001).

En cuanto a las alcachofas sin espinas, estas se caracterizan por poseer brácteas externas ligeramente redondeadas y con puntas achatadas; sus corazones poseen un sabor suave, textura sin fibra y color blanco. Según Robles (2001) este tipo de alcachofas se cultivan en los departamentos de Junín, La Libertad, Ica y Lima, entre otros; y son muy apreciadas en el mercado internacional en los Estados Unidos y Europa. Estas variedades se destinan a la producción de corazones de alcachofa congelados y en conserva, o también alcachofas enteras refrigeradas (MAXIMIXE, 2007; MINAG, 2008).

Las variedades más cultivadas en el Perú son *Green Globe*, Blanca de Tudela e *Imperial Star*. La primera es de tamaño grande, forma globosa, color verde y sin espinas, y muy estimada por su rusticidad, alto grado de reproducción y excelente sabor. Además de las mencionadas, existen otras variedades como Verde de Provenza, Violeta de Toscana, Lorca, A-106, A-107, Francesa, Americana, entre otras (MINAG, 2008). INIA (2016) menciona que desde el año 2015, la alcachofa de la variedad Lorca, es cultivada en el valle de Chancay (Huaral) como parte del plan de capacitación dirigido a los pequeños

productores de la zona. Esta variedad se caracteriza por no tener espinas y poseer innumerables propiedades alimenticias, por ello el INIA, a través de su Estación Experimental Agraria Donoso, sembró aproximadamente 50 hectáreas.

2.1.4 Producción e industrialización

Unos veinte países producen alcachofa siendo Italia, el más grande productor. El cultivo de la alcachofa está muy localizado en los países de la cuenca mediterránea (Italia, España, Francia, entre otros) que producen aproximadamente el 80 por ciento de la cosecha mundial (Maroto, 1992). El área mundial bordea las 120 000 hectáreas.

El Perú se ubica entre los primeros cinco países productores de alcachofa (FAOSTAT, 2015). Así, la producción de alcachofa fue de 141.7, 112.9 y 99.6 miles de toneladas métricas para los años 2012, 2013 y 2014, respectivamente. Asimismo, los departamentos con mayor producción de alcachofa, a nivel nacional, en el año 2014 fueron Arequipa, La Libertad e Ica con 30 085, 24 512 y 23 781 miles de toneladas métricas, respectivamente (INEI, 2015).

La alcachofa puede ser consumida en fresco o industrializada. Normalmente en fresco, se consume cocida, asada o frita. Las exportaciones nacionales en fresco todavía no han despegado siendo del orden de 30 mil dólares, falta aún mucho por hacer con esta presentación. En lo referente a la exportación en fresco, para la producción peruana, es posible aprovechar la contra estación en Estados Unidos y España, y la estacionalidad de Argentina y Brasil, gracias a que en el Perú es posible producir alcachofa durante casi todo el año (MINAG, 2008).

Según MAXIMIXE (2016) el Perú es el tercer exportador de alcachofas en conservas del mundo, después de China y Francia. Las exportaciones en el 2014 alcanzaron los US\$ 92 millones, lo que representa un crecimiento del 11% con respecto al año 2013. Así, en el período de Enero a Diciembre del año 2015, dentro de los productos no tradicionales en el sector agropecuario, el peso neto de exportación definitiva de alcachofa en conserva (Subpartida 2005991000) fue de 33 818.6 toneladas (SUNAT, 2015). Mientras que, en los meses de Enero y Febrero del presente año, se ha exportado un peso neto promedio de 2023.7 toneladas de alcachofas en conserva (SUNAT, 2016).

2.1.5 Composición química

En la Tabla 1 se presenta la composición química de la porción comestible de alcachofa. Los valores corresponden a los indicados según Fersini (1976) citado por Maroto (1992) y por la Tabla de Composición de Alimentos de América Latina (FAO/LATIN FOODS, 2002).

Tabla 1: Composición de la alcachofa (por 100 g de porción comestible)

Componente	Contenido ¹	Contenido ²
Proteínas	2.59 g	2.80 g
Lípidos	--	0.2 g
Glúcidos	6.72 g	2.9 g
Calorías	38	--
Vitamina A	270 UI	--
Vitamina B1	180 mcg	--
Vitamina B2	10 mcg	--
Vitamina C	5 mcg	--
Calcio	50 mg	42 mg
Fósforo	90 mg	51 mg
Hierro	0.5 mg	1.1 mg

¹ Según Fersini (1976) citado por Maroto (1992)

² Según FAO/LATIN FOODS (2002)

2.1.6 Propiedades benéficas

Las partes comestibles de la alcachofa y sus derivados contienen muchos compuestos químicos conocidos por sus efectos beneficiosos en el cuerpo humano, tales como ácidos fenólicos, flavonoides y sesquiterpenos, estos compuestos ayudan a proteger el hígado, reducir los niveles de colesterol en la sangre, tienen actividad anticancerígena, y aumento el volumen de la secreción de la bilis del hígado, así como la velocidad de descarga desde el sistema digestivo (Lattanzio *et al.*, 2009; Pandino *et al.*, 2011). Además de estos beneficios, los compuestos mencionados anteriormente, también son responsables de la actividad antioxidante de partes de alcachofa; estabilizan los radicales libres en el cuerpo humano (Claus *et al.*, 2015).

Según Wang *et al.* (2003) y Balasundram *et al.* (2006) diferentes estudios han demostrado que la alcachofa tiene ciertas propiedades fisiológicas y beneficiosas para la salud, tales como actividad antibacteriana, antioxidante, anti-HIV, hepatoprotectora, anticarcinogénicas hipocolesterolémicas (Llorach *et al.*, 2002; Shukla y Gupta, 2010), así como la habilidad

para inhibir la biosíntesis de colesterol y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad o LDL. Muchas de estas propiedades estarían relacionadas con las propiedades antioxidantes de sus compuestos fenólicos (Llorach *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Mulinacci *et al.*, 2004; Coinu *et al.*, 2007). Resultados de algunas investigaciones clínicas muestran la eficacia de extractos de alcachofa en el tratamiento de disfunciones hepatobiliares y problemas digestivos, tales como pérdida de apetito, náusea y dolor abdominal (Wegener *et al.*, 1999 citados por Mulinacci *et al.*, 2004).

El compuesto fenólico más abundante en la alcachofa es el ácido cafeico, encontrándose también derivados del ácido cafeoilquínico, ácido clorogénico, apigenina, luteolina, quercitina, entre otros (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003, Negro *et al.*, 2012; Pandino *et al.*, 2011). La actividad antioxidante de la alcachofa es atribuida principalmente a los ácidos cafeoilquínicos (derivados del ácido cafeico), presentes como mono y dicafeoil ésteres; siendo el ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico), ácido pseudoclorogénico (ácido 1-O-cafeoilquínico), 1,5-O-dicafeoilquínico y 3,5-O-di-cafeoilquínico; como las moléculas más abundantes en los capítulos de alcachofa en estado fresco. También son responsables de dicho poder antioxidante algunos flavonoides como luteolina y apigenina (Wang *et al.*, 2003). Llorach *et al.* (2002) determinaron la presencia del compuesto denominado cinarina (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico), cuya presencia se debe básicamente a la isomerización sufrida por el ácido 1,5-O-dicafeoilquínico durante la extracción con agua a temperaturas elevadas.

2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

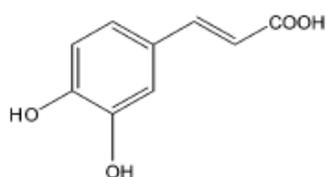
2.2.1 Definición

Los compuestos fenólicos, denominados también polifenoles, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, y son considerados metabolitos secundarios de las plantas (Martínez-Valverde *et al.*, 2000, Zuorro, 2014). Se caracterizan por presentar un anillo bencénico que lleva uno o más grupos hidroxilos, siendo ésta una de las características que los hace aptos para actuar como antioxidantes, mostrando en muchos casos una mayor eficiencia *in vitro* en comparación a la vitamina E y C (Naczki y Shahidi, 2004).

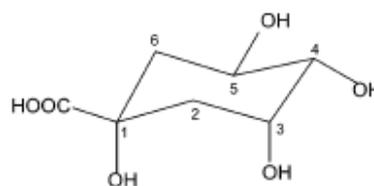
2.2.2 Química de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar (glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucorónico y

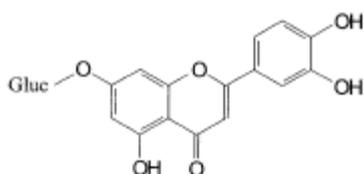
galacturónico) unidos por grupos hidróxilos. No obstante, en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Incluso pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos (Naczki y Shahidi, 2004). Las estructuras de estos compuestos se representan esquemáticamente en la Figura 1.



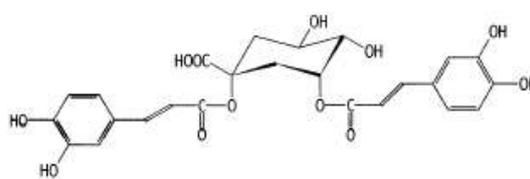
Ácido cafeico



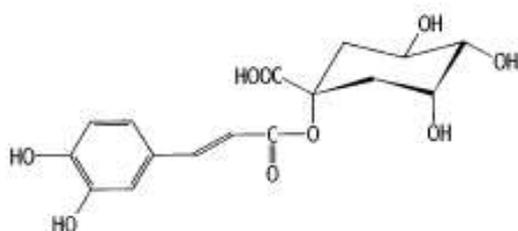
Ácido quínico



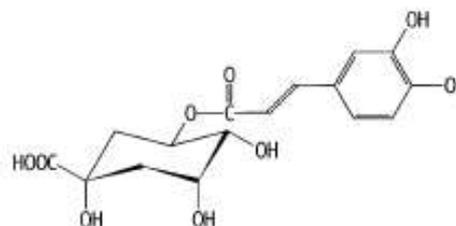
Luteolina-7-O-glucosido



Ácido 1,3-di-cafeolquínico (cinarina)



Ácido 1-O-cafeolquínico



Ácido clorogénico

Figura 1: Estructuras de los principales compuestos fenólicos presentes en la alcachofa

Fuente: Fristche *et al.* (2002); Wang *et al.* (2003) y Schutz *et al.* (2004).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos constan de un anillo aromático, teniendo uno o más radicales hidroxilos, y se encuentran en un rango desde fenólicos simples a compuestos altamente polimerizados. La mayoría de los compuestos fenólicos de origen natural están presentes en forma conjugados con mono y polisacáridos, vinculados a uno o más grupos fenólicos, y podría también aparecer como derivado funcionales, tales como ésteres y ésteres metílicos (Balasundram *et al.*, 2006).

Los ácidos fenólicos consisten de dos subgrupos, es decir, los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (Figura 2). Los ácidos hidroxibenzoicos incluyen ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatechuico, vanílico, siríngico, los cuales tienen en común una estructura C₆-C₁. Los ácidos hidroxicinámicos, por otro lado, son compuestos aromáticos con tres carbonos en la cadena (C₆-C₃), siendo los ácidos cafeíco, ferúlico, *p*-cumárico y sináptico, los más comunes (Manach *et al.*, 2004; Bravo, 1998 citado por Balasundram *et al.*, 2006).

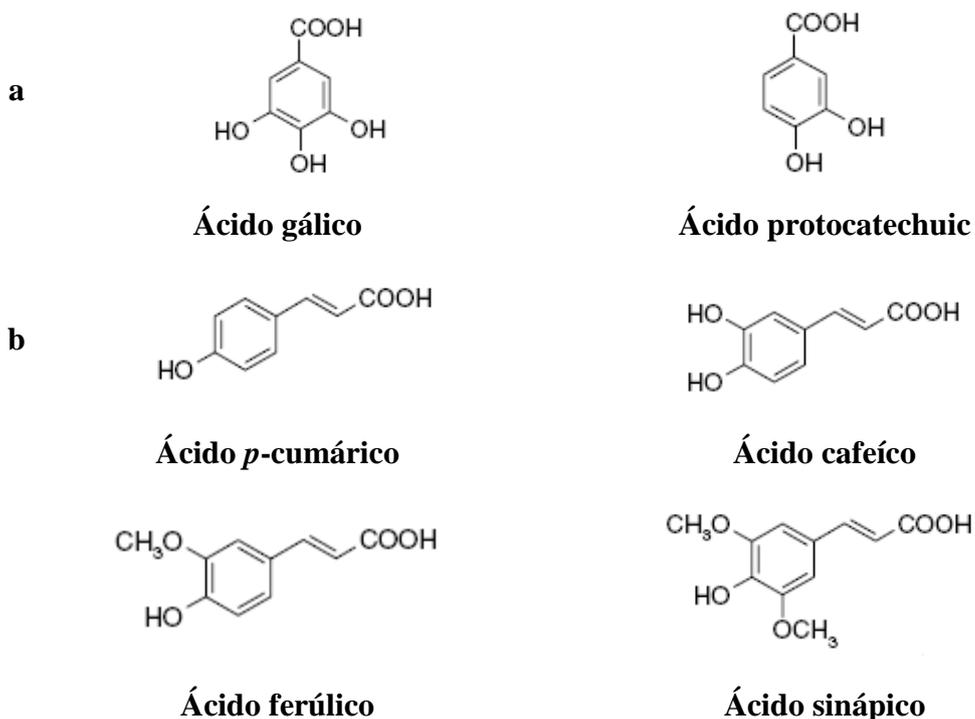


Figura 2: Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinámicos (b)

Fuente: Balasundram *et al.* (2006).

Los flavonoides constituyen el grupo más grande de plantas fenólicas, representan más de la mitad de los 8 000 compuestos fenólicos naturales (Harborne *et al.*, 1999 citados por Balasundram *et al.*, 2006). Los flavonoides son de peso molecular bajo, consisten de 15 átomos de carbono, arreglados en una configuración de C₆-C₃-C₆. Esencialmente la estructura consiste de dos anillos aromáticos A y B, unidos por un puente 3-Carbono puente, usualmente en la forma de un anillo heterocíclico, C (Figura 3).

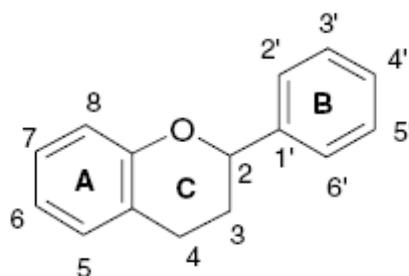


Figura 3: Estructura genérica de una molécula de flavonoide

Fuente: Balasundram *et al.* (2006)

A pesar de estos resultados, la diversidad estructural en el amplio rango de compuestos fenólicos presentes en la naturaleza, los compuestos fenólicos, básicamente pueden clasificarse en varias categorías, como se muestra en la Tabla 2 (Balasundram *et al.*, 2006).

Tabla 2: Clases de compuestos fenólicos en las plantas

Clase	Estructura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzoícos	C ₆ -C ₁
Acetofenones, ácido fenilacético	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides (cumarin, isocumarins, cromotes)	C ₆ -C ₃
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides, isoflavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Ligninas, neoligninas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados (proantocianidinas o flavolonas)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fuente: Balasundram *et al.* (2006)

2.2.3 Relación estructura - actividad

La estructura de los compuestos fenólicos son es una clave determinante es su captación de radicales y la actividad de quelar metales, y esto está referido a la relación estructura-actividad (Bodini *et al.*, 2001; Balasundram *et al.*, 2006; Sikwese y Duodu, 2007). En el caso de los ácidos fenólicos por ejemplo, la actividad antioxidante depende del número y

las posiciones de los grupos hidroxilos en relación al grupo carboxilo funcional (Wang *et al.*, 2003; Balasundram *et al.*, 2006).

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aumenta con el incremento del grado de hidroxilación, como es el caso del ácido gálico trihidroxilado, que muestra una alta actividad antioxidante. Sin embargo, la sustitución de los grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5 con los grupos metóxilos, como es el ácido sirínico que reduce la actividad (Balasundram *et al.*, 2006).

La oxidación ocurre como resultado de la reacción entre el oxígeno atmosférico y los ácidos grasos insaturados (en particular los poliinsaturados). Esta oxidación puede tener gran influencia en la estabilidad de productos que tengan este tipo de ácidos grasos. La presencia de los enlaces insaturados, si bien les confieren especiales cualidades biológicas, lo hacen también sensibles al oxígeno dando lugar al fenómeno de autooxidación (enranciamiento). Un aceite que presenta ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico está más propenso a ser oxidado respecto a un ácido mono-insaturado (Braverman, 1990).

Durante la autooxidación, el oxígeno reacciona con los ácidos grasos insaturados, inicialmente se forman peróxidos que se descomponen en hidrocarburos, aldehídos, cetonas y cantidades menores de epóxidos y alcoholes. El resultado de la autooxidación de las grasas y aceites es el desarrollo de sabores y aromas desagradables característicos de estas alteraciones conocidas como enranciamiento oxidativo. Entre los factores que originan a la oxidación lipídica se encuentran además del oxígeno, el calor, los metales y la humedad, y dan lugar a la aparición de colores y aromas desagradables en el alimento, las cuales reducen seriamente la calidad del mismo (Braverman, 1990).

Para la industria alimentaria los antioxidantes juegan un rol fundamental como agentes que retardan o suprimen una serie de reacciones de deterioro oxidativo en diversos alimentos, especialmente en los sistemas lipídicos los cuales resultan ser un blanco fácil frente a la rancidez oxidativa. Dicha rancidez oxidativa no sólo ocasiona cambios a nivel nutricional (deterioro de ácidos grasos insaturados) o sensorial (cambios indeseables del sabor y aroma) sino que, también dan origen a productos que pueden provocar daños a nivel de las membranas celulares de nuestro organismo (Braverman, 1990).

Los antioxidantes se clasifican en naturales y sintéticos. Los antioxidantes sintéticos (BHT, BHA, TBHQ) muy utilizados en alimentos, están siendo cuestionados desde un punto de vista de la seguridad alimentaria, esto ha motivado el interés del empleo de antioxidantes naturales (Wanasundara y Shahidi, 1998; Peschel *et al.*, 2006). Los antioxidantes naturales, fenólicos, han demostrado ser eficaces en la prevención de la rancidez de muchos sistemas de lípidos (Fukumoto y Mazza, 2000; Naz *et al.*, 2004; Fki *et al.*, 2005). Sin embargo, la actividad de estos compuestos es a menudo difícil de predecir, debido a los diversos mecanismos implicados en la eficacia antioxidante (Frankel, 1996).

2.2.4 Alimentos como fuente de compuestos fenólicos

Las frutas y vegetales son la mayor fuente de compuestos fenólicos en la dieta humana (Balasundram *et al.*, 2006). Existe una amplia variación entre el contenido total de fenólicos de las diferentes frutas o vegetales, o incluso para las mismas frutas o vegetales, lo que ha sido reportado en diferentes investigaciones. Estas diferencias podrían deberse a la complejidad de estos grupos de compuestos y de los métodos de extracción y análisis (Cacace y Mazza, 2003; Liyana-Pathirana y Shahidi; 2005; Bravo, 1998 citado por Balasundram *et al.*, 2006). Además, el contenido de fenólicos en alimentos vegetales depende de factores intrínsecos (género, especies, cultivares) y extrínsecos (agronómicos, ambientales, manejo y almacenamiento) (Tomás-Barberán y Espín, 2001 citados por Balasundram *et al.*, 2006). En general, el contenido de fenólicos de jugos es ligeramente estable durante el almacenamiento, particularmente a bajas temperaturas (Balasundram *et al.*, 2006).

La mayor parte de los fenólicos que se encuentran en el vino incluyen los de los derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidrobenczoicos, así como las flavonoles (quercetina y miricitina), catequina y epicatequina (Minussi *et al.*, 2003 citados por Balasundram *et al.*, 2006); y su contenido y composición es determinada por diferentes factores, tales como la variedad de uvas usadas, condiciones bajo las cuales crecen las uvas, técnicas de elaboración del vino, madurez y parámetros de procesamiento (Balasundram *et al.*, 2006).

2.2.5 Valorización de residuos agroindustriales

Según Federici *et al.* (2009), la valorización de los subproductos de alimentos procesados, los efluentes y los residuos sólidos es una oportunidad desafiante para el desarrollo sostenible y competitivo de varios sectores industriales. Sin embargo, hay varios puntos

clave como la técnica y dificultad científica (la clasificación, la inestabilidad microbiana y la alta heterogeneidad de los subproductos, residuos y efluentes) que tienen que ser abordados y tratados de una manera más eficaz. Además, el costo de la tecnología necesaria sigue siendo demasiado alto, debido a que la industria debe hacer frente a la valorización integral de procesamiento de subproductos, residuos y efluentes, que esto es todavía considerado un costo de procesamiento.

Existen numerosos trabajos de investigación en los que se busca valorizar los residuos agroindustriales con la finalidad de evitar disponerlos en el relleno sanitario, pero sobretodo porque estos residuos contienen aún compuestos de gran valor. Así, Henrique *et al.* (2013) demostraron un valor añadido de las semillas de mango que fueron empleadas para la generación de nanocristales de celulosa para aplicaciones diversas. Por su parte, Elain *et al.* (2016) han logrado valorizar las aguas de procesamiento de leguminosas y frutas para la obtención polihidroxialcalonatos (PHA). Los PHA son poliésteres microbianos producidos por numerosas bacterias en la naturaleza como reserva intracelular de carbono o de energía (Sudesh *et al.*, 2002 citados por Elain *et al.*, 2016).

En cuanto respecta al procesamiento de alcachofa, Conidi *et al.* (2014) encontraron que el fraccionamiento de efluentes del proceso de blanqueado de esta hortaliza, mediante filtración por membranas, conduce a ventajas significativas en términos de reducción del impacto ambiental, la recuperación de compuestos de alto valor añadido, logrando el ahorro de requerimientos de agua y de energía.

Según la Figura 4, Ros *et al.* (2012) señalan que dentro de las tecnologías más destacables de acuerdo al tipo de residuos, se puede dirigir hacia diversos tipos de industria como es la industria alimentaria (humana y animal), farmacéutica, química, entre otras, mediante la obtención de compuestos de interés a partir de los residuos y subproductos (por ejemplo: polifenoles, vitaminas, compuestos aromáticos entre otros). Algunos de estos son de naturaleza conocida, aunque existen otros muchos que esperan su identificación y posterior explotación por la industria para elaborar productos novedosos y competitivos en el mercado. También se pueden destinar a la industria energética para la obtención de fuentes de energía alternativas como biogás, bioetanol, entre otros. Finalmente, a la industria agraria para la obtención de materiales orgánicos estabilizados que puedan utilizarse como

enmienda orgánica de suelos o como sustrato de cultivo alternativos a las turbas, con actividades específicas con valor añadido.

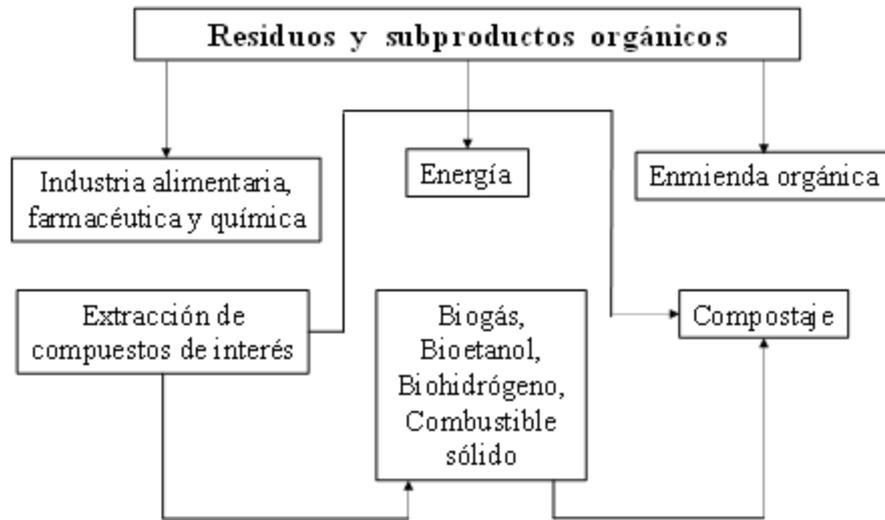


Figura 4: Tecnologías de valorización de los residuos y subproductos orgánicos en general

Fuente: Ros *et al.* (2012)

En la actualidad los antioxidantes naturales, de carácter fenólico, son bien cotizados en el mercado internacional. Estos productos significaron en el año 2002 el valor de 65 billones de dólares, correspondiendo sólo a EE.UU. unos 24 billones de dólares, y se esperaba que para el año 2006, el valor se incremente a aproximadamente 35.4 billones de dólares para el mercado americano (Lachance, 2002).

2.2.6 Recuperación de compuestos funcionales a partir de residuos agroindustriales

En los últimos años, se han seguido tendencias de reuso de residuos agroindustriales y de alimentos (Mirabella *et al.*, 2014), se han realizado intentos para encontrar la forma de añadir valor a los residuos de la alcachofa. En la Figura 5, se presenta un diagrama de flujo general para la recuperación de varios compuestos funcionales de cáscaras de fruta (Oreopoulou y Tiza, 2007).

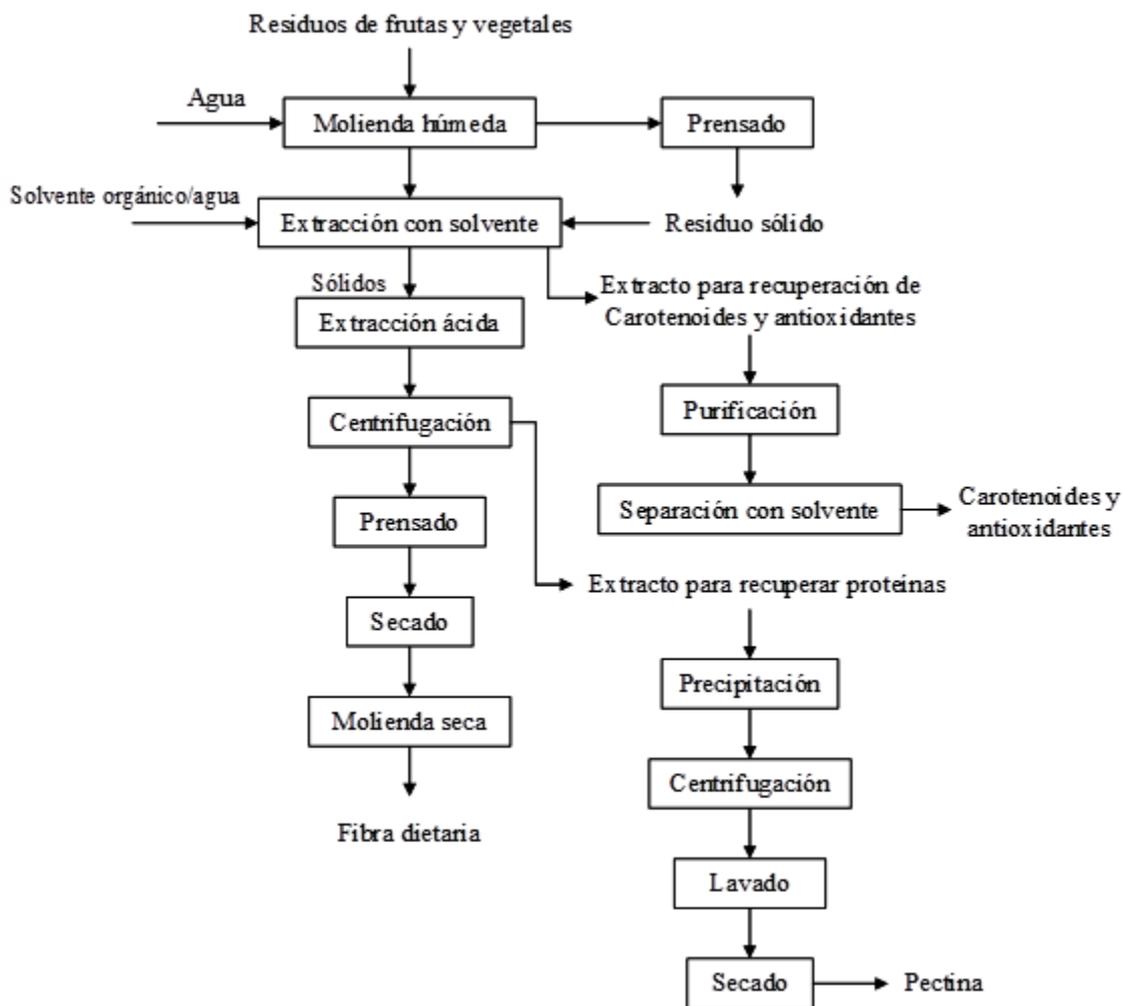


Figura 5: Diagrama de flujo para la utilización de residuos de frutas y vegetales

Fuente: Oreopoulou y Tiza (2007)

El procesamiento de alimentos vegetales genera residuos que son una fuente rica de compuestos bioactivos, incluyendo los compuestos fenólicos (Zuorro, 2014). La disponibilidad de los compuestos fenólicos de residuos agrícolas e industriales, su extracción (Zuorro *et al.*, 2016) y su actividad antioxidante han sido objeto de diferentes investigaciones (Balasundram *et al.*, 2006).

Reciclar los residuos ha sido apoyado por el hecho de que los polifenoles se han encontrado especialmente en las cáscaras (Wolfe *et al.*, 2003 citados por Peschel *et al.*, 2006) y que las condiciones de procesamiento influyen el contenido de fenólicos (Llorach *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Tomás-Barberán *et al.*, 2002 citados por Peschel *et al.*, 2006). Peschel *et al.* (2006) demostraron la posibilidad de recuperar grandes

cantidades de fenólicos con propiedades antioxidantes de residuos de frutas y vegetales no solo para la industria de alimentos sino también para aplicación cosmética. La industria de cítricos produce una gran cantidad de residuos de cáscaras y semillas, los cuales podrían llegar por encima del 50% de total del peso de la fruta fresca (Bocco *et al.*, 1998 citados por Balasundram *et al.*, 2006). Si éstos fueran utilizados en forma óptima, podrían ser la mejor fuente de compuestos fenólicos (Balasundram *et al.*, 2006).

Como es conocido, los residuos sólidos de alcachofa (brácteas externas, tallos producidos, defectuosos) generados por el procesamiento de alcachofa representan una gran cantidad de material de descarte (cerca del 80-85% del total de biomasa), la cual tiene un enorme potencial para ser usado como fuente de compuestos promotores de la salud como inulina y compuestos fenólicos (Llorach *et al.*, 2002; Lattanzio *et al.*, 2009; Zuorro, 2014; Zuorro *et al.*, 2016).

La actividad biológica de los residuos de alcachofa, y en particular de aquellos con marcado efecto antioxidante, están relacionados con su composición química, las cuales incluyen altos niveles de compuestos fenólicos con un amplio rango de derivados del ácido cafeoilquinico (el más importante) y flavonoides tales como apigenina-7-glucósido y luteolina (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003; Mulinacci *et al.*, 2004; Christaki *et al.*, 2012; Abu-Reidah *et al.*, 2013; Conidi *et al.*, 2014).

2.3 APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN ACEITES

El efecto protector de ciertos antioxidantes naturales frente a la rancidez oxidativa, ha sido reportado en diversas investigaciones. Así, el tocoferol, el ácido ascórbico (Frankel, 1996) y los compuestos fenólicos (Naz *et al.*, 2004) fueron utilizados como antioxidantes. El efecto anti-rancidez oxidativa de los compuestos fenólicos se debería en gran medida al número de grupos OH presentes en su estructura química (Wang *et al.*, 2003; Naz *et al.*, 2004).

En un estudio conducido por Naz *et al.* (2004) en fenólicos procedentes de té encontraron que los compuestos fenólicos: cafeílico, vanílico y ferúlico mostraron eficacia en la protección frente la oxidación del aceite de maíz sometido a un proceso de fritura. También, Suja *et al.* (2004) evaluaron el efecto antioxidante de un extracto fenólico metanólico procedente de la torta del sésamo en diversos aceites vegetales (soya, girasol,

safflower), los resultados mostraron que las concentraciones de este extracto entre 5 y 100 ppm disminuyeron significativamente los valores de índice de peróxido y dienos conjugados en pruebas de almacenamiento a 60 °C. De otro lado, Fki *et al.* (2005) demostraron que extractos polifenólicos procedentes de los desechos de la industrialización del aceite de oliva, presentaron adecuadas propiedades antioxidantes en aceites refinados.

2.4 GESTIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS GENERADOS POR LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS

La industria de procesamiento de frutas y vegetales genera una gran cantidad de residuos líquidos y sólidos. La disposición inadecuada de estos residuos sólidos puede dar origen a la contaminación del aire (generación de malos olores), del agua (subterránea y superficial) y del suelo. La contaminación del aire y del agua tiene relación principalmente con la putrefacción de material orgánico, generando malos olores y lixiviación de contaminantes hacia el suelo y las aguas superficiales y subterráneas, respectivamente. Por otra parte, la disposición de estos residuos en rellenos sanitarios, puede provocar serios problemas de operación en el relleno, por el alto contenido de humedad que presentan los residuos (CONAMA, 1998).

Los residuos sólidos provienen generalmente de las etapas de limpieza, lavado, corte, deshuesado, pelado y descorazonado de los productos vegetales. Entre los residuos sólidos más comunes generados por este tipo de industria encontramos restos de frutas, frutas en mal estado, cuescos, envases y embalajes. Sin embargo, la gran mayoría de ellos son reutilizados como suplemento alimenticio para animales o como mejoradores de suelo (CONAMA, 1998; Llorach *et al.*, 2002; Maroto, 1992).

El destino idóneo de los residuos agrícolas producidos en origen sería el reciclaje o, en su defecto, el vertedero. Los residuos producidos por la industria agroalimentaria deberán ser regulados mediante ordenanzas municipales, cambiando el concepto de residuo por el de subproducto siempre que sea posible (CONAMA, 1998). Los subproductos obtenidos en el procesamiento de la alcachofa son empleados en la alimentación del ganado (Maroto, 1992; Llorach *et al.*, 2002; Viniegra *et al.*, 2002; Velarde, 2006; Zuorro, 2014).

En los meses de Enero y Febrero del presente año, se ha exportado un peso neto promedio 2023.7 toneladas de alcachofas en conserva (SUNAT, 2016), y considerando un 80 por

ciento de residuos sólidos generados en el procesamiento de alcachofa, se habrían generado en promedio 8 094.8 toneladas de residuos, los que adecuadamente gestionados podrían ser fuente de compuestos fenólicos y/o elaboración de compost. Con esto se evitaría su disposición final en un relleno sanitario, espacio que debería ser empleado para la disposición de residuos peligrosos y no para residuos a los que se les puede dar una valorización determinada y disminuir así la generación de lixiviados y gases que podrían contaminar el medio ambiente.

2.5 METODOLOGÍA DE TAGUCHI

Marfil (1991) menciona que la calidad debe verse como la mínima pérdida ocasionada a la sociedad desde que el producto se embarca y puede expresarse en forma matemática a partir de la cual se calculan los costos de calidad y el diseño de tolerancias. La calidad se origina en el diseño de los productos a través del diseño de parámetros y el análisis de señal/ruido, con el fin de hacer al producto robusto e insensible al ruido.

2.5.1 La función de pérdida

Taguchi sostiene que las pérdidas por mala calidad se deben a desviaciones de la característica de calidad; sin embargo, en las prácticas de control de calidad se olvidan estos principios y a veces se actúa en contra de ellos. La forma matemática de la función de pérdida desarrollada por Taguchi, demuestra que tiene una relación cuadrática con respecto a la característica de calidad (Marfil, 1991). Esta función de pérdida tiene tres tipos de características, a saber:

- Nominal es mejor, la calidad es mayor cuando se acerca al valor nominal (Ejemplo: color, °brix, acidez, textura).
- Mayor es mejor, la calidad es mayor cuando la característica es mayor (Ejemplo: eficiencia, algunos atributos sensoriales, vida útil, etc.).
- Menor es mejor, la calidad es mayor cuando la característica es menor (Ejemplo: porcentaje de defectuosos, índices microbiológicos de calidad, etc.).

2.5.2 La calidad a través del diseño

Según Marfil (1991) el modelo de Taguchi sostiene que la variación de un proceso o de las características de un producto se debe a los llamados factores de ruido. Estos se incluyen en el diseño experimental y pueden ser de tres tipos:

- Factores de ruido exterior (Ejemplo: temperatura, ambiente, factores ambientales, etc.).

- Factores de ruido interior (Ejemplo: deterioro).
- Factores de ruido entre producto (Ejemplo: imperfecciones de manufactura).

Taguchi cataloga dos áreas principales de la Ingeniería de Calidad, fuera de línea y en línea. La primera se refiere al trabajo de diseño o etapa de investigación y desarrollo en donde se diseñan tanto el producto como el proceso; y la segunda se refiere a mejorar un proceso de manufactura o producto ya establecidos. En ambas partes, el objetivo es conseguir procesos/productos “robustos” o insensibles al ruido. Taguchi recomienda hacer uso de las relaciones no lineales entre un factor y la respuesta, para lograr la robustez de un producto. En la Figura 6, se muestra una relación hipotética entre un parámetro o factor X y una característica de calidad Y. Supongamos que el nivel deseado de la característica de calidad es y_1 , y que el factor X_1 , tiene un rango de variación determinado que produce en una variabilidad correspondiente a la característica y_1 . Si movemos el factor X_2 , debido a la relación que existe entre la gráfica, la variabilidad de la característica de manera importante. En este punto, se puede decir que el proceso es robusto (Marfil, 1991).

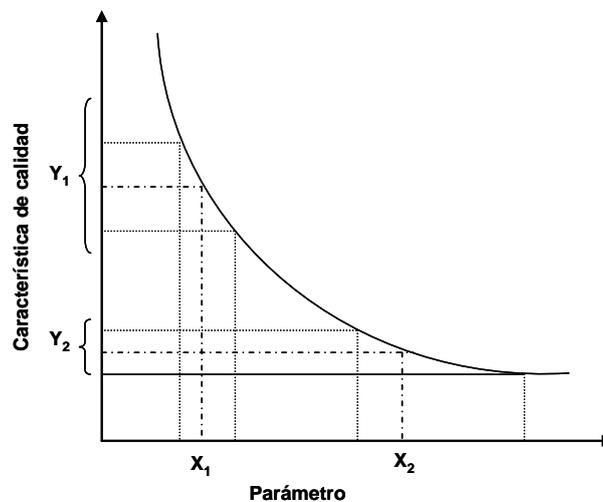


Figura 6: Reducción de la variabilidad utilizando relaciones no-lineales

Fuente: Marfil (1991)

Sin embargo, la característica de calidad se encuentra en el nivel 2, siendo que el objetivo es el nivel 1. Es necesario entonces seleccionar un segundo factor de control, por ejemplo Z, que afecte a toda la distribución de la característica de manera independiente que permita mover el resultado hacia el nivel 1. Para Taguchi lo importante para el diseño de experimentos, es encontrar aquellas relaciones entre los diferentes factores o parámetros que afecten el resultado y que nos permitan seleccionar los niveles adecuados para lograr la

robustez. Taguchi hace la distinción de los parámetros o factores en dos tipos: factores de control y factores de ruido (Marfil, 1999).

En el Diseño de Parámetros mediante el análisis de los resultados de la experimentación se utiliza el factor señal/ruido, y se seleccionan los niveles adecuados de los factores. Taguchi recomienda el uso de arreglos ortogonales, en lugar de experimentos factoriales completos u otros arreglos. Este recurso hace eficiente la experimentación al reducir el número de experimentos (Marfil, 1991).

Taguchi recomienda el uso de arreglos ortogonales para hacer matrices que contengan los controles y los factores de ruido en el diseño de experimentos. Ha simplificado el uso de este tipo de diseño al incorporar los arreglos ortogonales y las gráficas lineales, finalmente, en contraste con los enfoques tradicionales como equivalentes de ruido: mientras las interacciones sean relativamente suaves, el análisis de los efectos principales proporcionará las condiciones óptimas y una buena reproductibilidad en un experimento. El análisis del arreglo ortogonal de Taguchi es usado para producir los mejores parámetros para el diseño óptimo del proceso con el mínimo número de experimentos (Marfil, 1991).

Marfil (1991) menciona que la ventaja del arreglo ortogonal es que pueden ser aplicados al diseño experimental involucrando un gran número de factores. La desventaja es que puede ser únicamente aplicado en la etapa inicial del diseño del sistema del producto o proceso. Por ejemplo, en la Tabla 3 se muestra un arreglo ortogonal que representa $L_a(b)^c$, donde:

- L Indica que es un arreglo ortogonal
- a Número de corridas experimentales
- b Número de niveles para cada factor
- c Número de columnas o factores de un arreglo ortogonal

Según Marfil (1991) la relación S/R implica dos términos, la variación y la desviación contra el promedio o valor nominal. En su forma experimental la S/R es simplemente la razón de la media a la desviación estándar (o el inverso del coeficiente de variación). La S/R debe maximizarse para lograr un diseño robusto. Después del cálculo de la relación S/R y de las medias para cada grupo de experimentos, se realiza la construcción de gráficas lineales mediante el cálculo del efecto promedio de los factores. Suponiendo que el resultado de éste cálculo son las gráficas factoriales mostradas en la Figura 7.

Tabla 3: Arreglo ortogonal L₈ (2)⁷

N°	1	2	3	4	5	6	7	Resultados
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	Y ₁ Nivel 1
2	1	1	1	2	2	2	2	Y ₂ Nivel 1
3	1	2	2	1	1	2	2	Y ₃ Nivel 1
4	1	2	2	2	2	1	1	Y ₄ Nivel 1
5	2	1	2	1	2	1	2	Y ₅ Nivel 2
6	2	1	2	2	1	2	1	Y ₆ Nivel 2
7	2	2	1	1	2	2	1	Y ₇ Nivel 2
8	2	2	1	2	1	1	2	Y ₈ Nivel 2

Fuente: Marfil (1991)

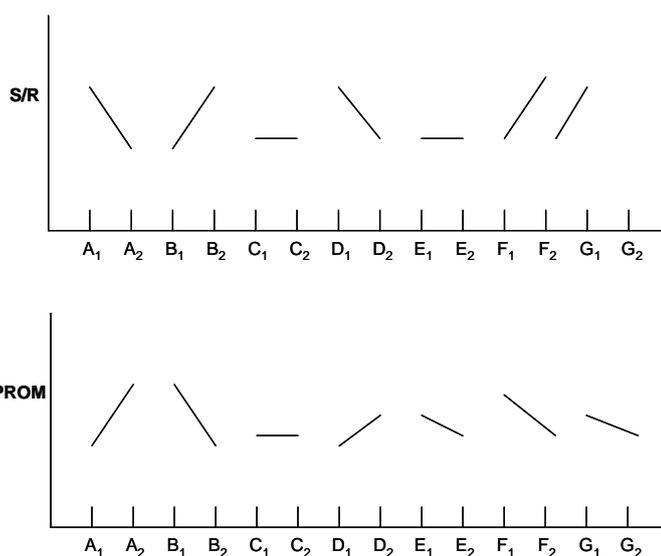


Figura 7: Análisis de gráficas factoriales

Fuente: Marfil (1991)

El diseño de parámetros tiene enfoques diferentes con el diseño de experimentos como se muestra en la Tabla 4. En la tercera etapa del diseño se establecen las tolerancias de manufactura considerando aquellos factores activos, tal como se explicó anteriormente (Marfil, 1991).

Tabla4: Diferencias entre el enfoque tradicional y el método Taguchi

Tradicional	Taguchi
- Todo está bien si las partes están dentro de especificaciones.	- La mejora de calidad debe ser continua, reduciendo la variabilidad.
- Se usa la evaluación pasa/no pasa.	- Análisis para lograr acercarse a la media de especificación.
- Se requiere Control Estadístico de Procesos para controlar procesos.	- El esfuerzo en Control Estadístico de Procesos es cambiado a esfuerzo en diseño para reducir costos.
- Las áreas responsables solucionarán los problemas y tomarán acciones correctivas.	- Los proyectos para reducir variabilidad se manejan por un grupo interdisciplinario, fomentando la integración y motivación.
- Cumpliendo las especificaciones, Ford producía una transmisión ruidosa.	- Las especificaciones se fijan de acuerdo a aspectos de costos en dispersión, habilidad del proceso y valores S/R.
- El Control Estadístico de Procesos reduce los costos debido a causas asignables.	- Proveedor japonés centrando todo hacia la media producía transmisión muy silenciosa. - Con Ingeniería de Calidad (Diseño de Experimentos) se hacen productos robustos e insensibles a variables del proceso.

Fuente: Marfil (1991)

2.6 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

2.6.1 Definición

La metodología de superficie de respuesta (MSR), es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en al modelación y análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversos factores y donde el objetivo es optimizar esta respuesta (Senanayake y Shahidi, 2002; Montgomery, 2003, Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005, Bas y Boyaci, 2007; Fan *et al.*, 2008).La MSR define el efecto de las variables independientes, solas o en combinación, en el proceso. Además de analizar los efectos de las variables independientes, esta metodología experimental genera un modelo matemático (Bas y Boyaci, 2007).En un lenguaje matemático, se puede decir que el investigador está interesado en la supuesta “relación funcional”:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon$$

donde η es la respuesta, f es la función desconocida de respuesta, x_1, x_2, \dots, x_n denotan las variables independientes, n es el número de las variables independientes y finalmente ε representa el ruido o error estadístico que representan otras fuentes de variabilidad no cuantificadas por f . Estas fuentes incluyen efectos tales como la medición del error. En

general se asume que el error tiene una distribución normal (con media cero y varianza uno) (Bas y Boyaci, 2007).

Según Montgomery (2003) en la mayoría de los problemas de la MSR, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso de la MSR es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre Y y el conjunto de variables independientes, Por lo general, se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon$$

Si hay curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, tal como el modelo de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Las ecuaciones polinómicas de bajo grado son más fáciles de manejar respecto a las de grados mayores, debido a que contienen pocos términos, lo cual se traduce en el requerimiento de menos valores observados de la respuesta para estimar los parámetros (los β 's) de la ecuación (Box y Draper, 1987). Por lo general, en la superficie de respuesta, η se representa gráficamente como en la Figura 8, en donde se tiene η contra los niveles x_1 y x_2 . Para ayudar a visualizar la forma de una superficie de respuesta, con frecuencia se recurre a los ploteos de contorno (Figura 9) (Montgomery, 2003).

2.6.2 Procedimiento secuencial

Muchas veces cuando se está en un punto de la superficie de respuesta que está apartado del óptimo, como en el caso de las condiciones de operación que se observa en la Figura 10, el sistema presenta una curvatura moderada y el modelo de primer orden será apropiado. El objetivo en este caso es llevar al experimentador de manera rápida y eficiente por la trayectoria del mejoramiento hasta la vecindad general del óptimo.

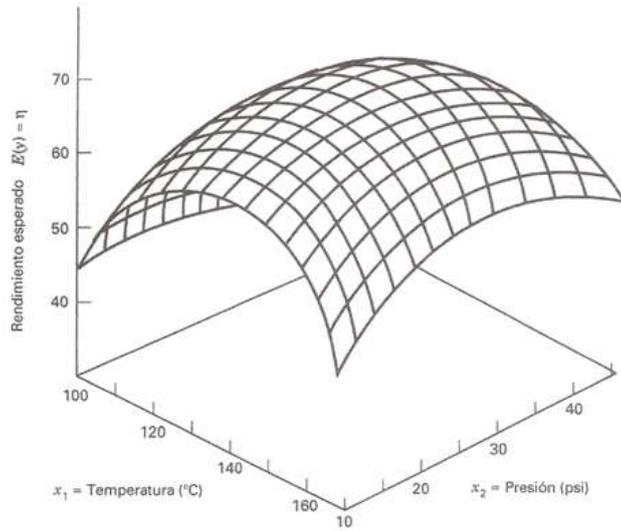


Figura 8: Superficie de respuesta tridimensional donde se indica la respuesta esperada η como función de las variables x_1 y x_2

Fuente: Montgomery (2003)

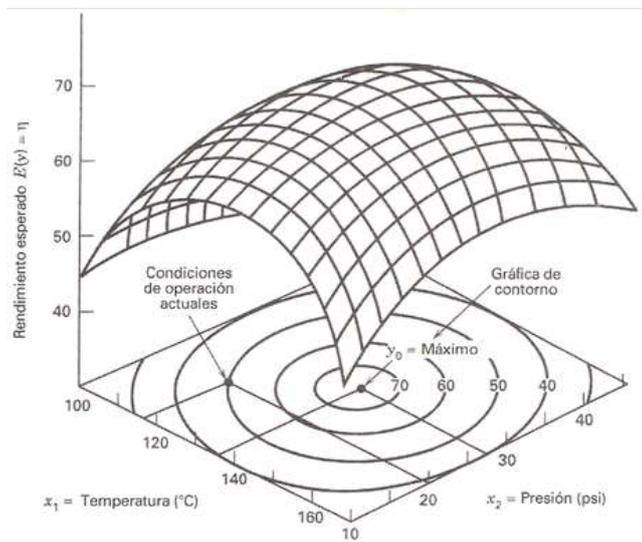


Figura 9: Gráfica de contorno de una superficie de respuesta

Fuente: Montgomery (2003)

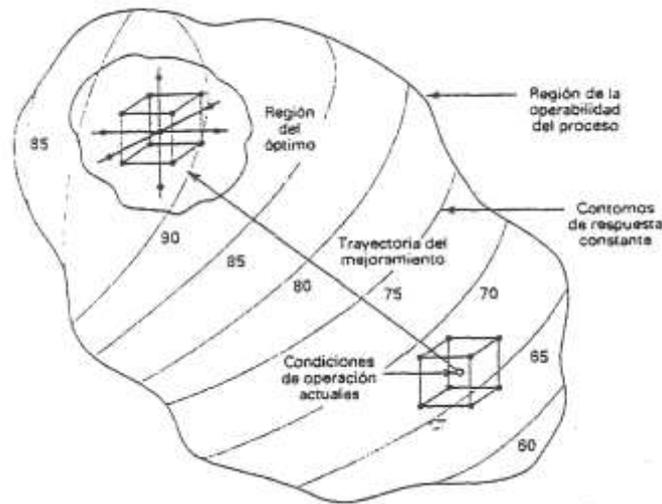


Figura 10: El carácter secuencial de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Fuente: Montgomery (2003)

Una vez encontrado el óptimo, puede emplearse un modelo más elaborado, como el de segundo orden, y llevarse a cabo un análisis para localizarse como “el ascenso a una colina”, donde la cima de ésta representa el punto de la respuesta máxima. Si el verdadero óptimo es un punto de respuesta mínima, entonces la situación puede considerarse como “el descenso a un valle”(Montgomery, 2003). El objetivo último de la MSR es determinar las condiciones de operación óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que se satisfagan los requerimientos de operación (Montgomery, 2003; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005).

2.6.3 Diseño de Box-Behnken

Box y Behnken han propuesto algunos diseños de tres niveles para ajustar superficies de respuesta. Estos diseños se forman combinando factoriales 2^k con diseños de bloque incompletos. Los diseños resultantes suelen ser muy eficientes en términos del número requerido de corridas, y son rotables o casi rotables (Montgomery, 2003; Ferreira *et al.*, 2007a; Ferreira *et al.*, 2007b). Para tres factores su representación gráfica puede ser vista de dos formas:

- Un cubo que consiste de punto central y puntos medios en los bordes (Figura 11a).
- Una figura de tres entrelazamientos de un diseño factorial 2^2 y un punto central (Figura 11b).

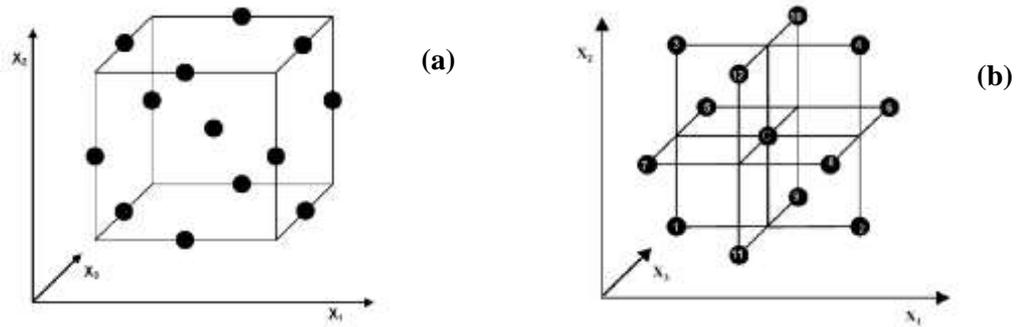


Figura 11: Cubo para Diseño de Box-Behnken (a) y tres entrelazamientos para el diseño factorial 2^3 (b)

Fuente: Ferreira *et al.* (2007a)

El número de experimentos (N) requerido para el desarrollo del Diseño Box-Behnken está definido como $N = 2k(k - 1) + C_o$, (donde k es el número de factores y C_o es el número de puntos centrales). Para comparar el número de experimentos para un diseño central compuesto es $N = 2^k + 2k(k - 1) + C_o$. Las Tablas 5 y 6 contienen los códigos para los niveles de los factores para el Diseño Box-Behnken para tres, cuatro y cinco factores, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2007a).

Tabla 5. Diseño Box-Behnken para tres variables

Experimento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0

Fuente: Ferreira *et al.* (2007a)

Tabla 6: Diseño Box-Behnken para cuatro y cinco variables

Cuatro factores				Cinco factores				
x_1	x_2	x_3	x_4	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5
± 1	± 1	0	0	± 1	± 1	0	0	0
0	0	± 1	± 1	0	0	± 1	± 1	0
0	0	0	0	0	± 1	0	0	± 1
				± 1	0	± 1	0	0
± 1	0	0	± 1	0	0	0	± 1	± 1
0	± 1	± 1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0					
				0	± 1	± 1	0	0
± 1	0	± 1	0	± 1	0	0	± 1	0
0	± 1	0	± 1	0	0	± 1	0	± 1
0	0	0	0	± 1	0	0	0	± 1
				0	± 1	0	± 1	0
				0	± 1	0	± 1	0

Fuente: Ferreira *et al.* (2007b)

Una comparación entre los diseños Box-Behnken y otros diseños de superficies de respuesta (central compuesto, matriz Doehlert y el diseño factorial completo de tres niveles) han demostrado que el diseño Box-Behnken y la matriz Doehlert son ligeramente más eficientes que el diseño central compuesto, pero mucho más eficiente que el diseño factorial completo de tres niveles donde la eficiencia de un diseño experimental está definido como el número de coeficientes en el modelo estimado dividido por el número de experimentos. La Tabla 7 establece una comparación entre las eficiencias del diseño Box-Behnken y otros diseños de superficie de respuesta para el modelo cuadrático, la misma tabla demuestra también que el diseño factorial completo de tres niveles son más costosos cuando el número de factores es mayor de 2 (Ferreira *et al.*, 2007a, Ferreira *et al.*, 2007b).

Otra ventaja del diseño Box-Behnken es que no contiene combinaciones para los cuales todos los factores de forma simultánea en sus niveles más altos o más bajos, así estos diseños son útiles para evitar los experimentos realizados en condiciones extremas, por los cuales resultados no satisfactorios podrían ocurrir. Por el contrario, no están indicados para las situaciones en las que nos gustaría conocer las respuestas en los extremos, es decir, en los vértices del cubo (Ferreira *et al.*, 2007a).

Tabla7: Comparación de la eficiencia del diseño central compuesto (DCC), diseño Box-Behnken (DBB) y diseño Doehlert (MD)

Factores	Número de coeficientes	Número de experimentos (<i>f</i>)			Eficiencia (<i>p/f</i>)		
		DCC	MD	DBB	DCC	MD	DBB
2	6	9	7	--	0.67	0.86	--
3	10	15	13	13	0.67	0.77	0.77
4	15	25	21	25	0.60	0.71	0.60
5	21	43	31	41	0.49	0.68	0.61
6	28	77	43	61	0.36	0.65	0.46
7	36	143	57	85	0.25	0.63	0.42
8	45	273	73	113	0.16	0.62	0.40

Fuente: Ferreira *et al.* (2007a)

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú.

3.2 MATERIALEXPERIMENTAL

Se emplearon como materia prima los residuos sólidos (tallos y puntas, brácteas externas y productos defectuosos) de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) blanqueada variedad 'Lorca', proporcionados por la empresa agroindustrial Intiagro S.A.C., que procesa alcachofa para la producción de corazones de alcachofa en conserva para exportación.

3.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

3.3.1 Equipos

- Agitador magnético Modelo Ceramag Midi Jkika® Works (USA)
- Balanza analítica Modelo Adventurer™ Ohaus® Corporation (USA)
- Balanza analítica Modelo Scout II Ohaus® CORPORATION (China)
- Balanza analítica Modelo BL6 Sartorius AG Göttingen (Alemania)
- Baño maría orbital Modelo 1083 GLF® (Alemania), Centrífuga Modelo Rotofix 32 Hettich Zentrifugen (Alemania)
- Bomba de vacío ABM Greiffenberger Antriebstechnik GMBH Marktredwitz (Alemania)
- Columna de cromatografía Waters Modelo Xterra RP₁₈ (5 µm, 250 x 4.6 mm)
- Congelador Electrolux Modelo Dupla Acao (Brasil)
- Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) con detector de arreglo de fotodiodos (PAD) Waters Modelo 996
- Espectrofotómetro de rango visible Modelo 4001/4 Genesys 20 Thermoelectron Corporation (USA)

- Estufa al vacío Modelo 1400E-2 VWR™ International Sheldon Manufacturing Inc. (USA).
- Estufa con recirculación de aire Memert (Western Germany)
- Homogenizador neumático Modelo Polymax 2040 Heidolph (Alemania)
- Molino de cuchillos
- Refrigerador LG Modelo GR-482-BEF (Corea)
- Rotavapor Modelo Laborota 4000 Heidolph (Alemania)
- Secador de aire caliente
- Selladora Modelo KF-300H Machintek (EE.UU.)
- Tanque de Nitrógeno de 6 m³ AGA (Perú)
- Vortex mixer Modelo Wizzard VELP® Científica Microtiter (Europa)

3.3.2 Materiales

- Material de vidrio (matraces, vasos de precipitados, probetas graduadas, pipetas graduadas, baguetas, tubos de ensayo, fiolas, placas petri, peras de decantación, etc.)
- Micropipetas de 1-10 µl, 20-100 µl y 200-1000 µl (Brand Transferpette®, Alemania)
- Otros (puntas para cada micropipeta, cartuchos Sep-pak C-18 (35 g, Waters), campanas desecantes, soporte universal, tubos Falcon, tubos Eppendorf, gradillas metálicas, papel aluminio, papel tissue, parafilm, tenazas y pinzas de metal)

3.3.3 Reactivos

- Ácido acético glacial (Fermont)
- Ácido clorhídrico fumante (Merck, Alemania)
- Ácido fórmico (Scharlau)
- Carbonato de potasio (Mallinckrodt Baker Inc., EE.UU.)
- Estándares de fenólicos: Ácido cafeico (Acros). Ácido clorogénico (Sigma Aldrich®, EE.UU.). Luteolina y Apigenina (Fluka).
- Etanol 96% grado alimentario (Montana, Perú)
- Etanol 99.5% grado reactivo (Sigma Aldrich®, EE.UU.)
- Folin Ciocalteu 2N, ABTS+ (2, 2' Azino-bis 3 ethylbenzthiazolone-6-sulfonic acid diammonium salt 98%) (Sigma Aldrich®, EE.UU.)

- Ioduro de potasio, tiosulfato de sodio (Merck, Alemania)
- Isooctano (Fermont)
- Metanol 99.99% grado reactivo (Sigma Aldrich ®, EE.UU.)
- Metanol grado HPLC (Sigma Aldrich ®, EE.UU.)
- *p*-Anisidina (Sigma Aldrich ®, EE.UU.)
- Persulfato de potasio (Mallinckrodt Baker Inc., EE.UU.)
- Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid)(Sigma Aldrich ®, EE.UU.)

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 Determinación de humedad y materia seca

Se utilizó el método recomendado por A.O.A.C. (1990). Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.4.2 Capacidad antioxidante

Se utilizó el método reportado por Miller *et al.* (1993) y modificado por Arnao (2001). Los resultados se expresaron como μmol de Trolox equivalente (TE)/ml de extracto. Se mezclaron partes iguales en volumen del 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) o ABTS y de persulfato de potasio; que formaron la solución madre, preparada 12 horas antes del análisis. La solución madre permaneció en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su dilución con etanol (1:60; solución madre: etanol), la solución diluida se leyó en un espectrofotómetro a 734 nm, la absorbancia osciló entre 1.08 y 1.12. Se dejó transcurrir 4 horas para realizar el análisis correspondiente.

Se tomaron 150 μl de extracto de alcachofa y se colocaron en un tubo de ensayo, seguidamente se adicionaron 2850 μl del reactivo ABTS, luego se agitó en el vortex; las muestras reaccionaron por 2,5 horas en oscuridad y con agitación constante. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm. El análisis requirió de un blanco, que se preparó con 150 μl de etanol. Los cálculos se realizaron con la curva estándar, que presentó la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol Trolox eq/ml muestra} = [0.6014 * (Abs_{blanco} - Abs_{muestra})] - 0.0599$$

donde:

Abs Absorbancia

3.4.3 Determinación de compuestos fenólicos totales

Se utilizó el método reportado por Swain y Hills (1959). Los resultados se expresaron como mg de ácido clorogénico equivalente (ACE)/ml de extracto. Se colocaron 500 µl de extracto de alcachofa en un tubo de ensayo, seguidamente se adicionaron 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1250 µl de carbonato de sodio 1.0 N. Los tubos fueron agitados en un vortex y luego se dejaron reposar por 30 minutos en oscuridad; posteriormente realizó a la lectura a 725 nm en el espectrofotómetro. El blanco se preparó con agua destilada y fue utilizado para calibrar el espectrofotómetro antes realizar la lectura de las muestras. Los cálculos se realizaron con la curva estándar, que presentó la siguiente ecuación:

$$mg \text{ ácido clorogénico eq/ml muestra} = (0.4312 * Abs_{muestra}) - 0.013$$

donde:

Abs Absorbancia

3.4.4 Determinación del índice de peróxido

Se utilizó el método recomendado por la AOAC (1990). Los resultados se expresaron como meq O₂/kg aceite. Se pesaron 5.0 g de aceite y se colocaron en un matraz, se adicionó 30 ml de una solución de ácido acético:cloroformo (3:2; v/v) para disolver la muestra. Seguidamente se añadió 500 µl de yoduro de potasio saturado y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Luego, se adicionaron 30 ml de agua destilada y 1 ml de almidón al 1%. Finalmente se procedió a titular con tiosulfato de sodio 0.01 N hasta la desaparición del color azul. El índice de peróxidos (IP) en las muestras se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{(S - B) * N}{Peso \text{ de muestra (g)}} * 100$$

donde:

S ml de tiosulfato de sodio utilizados para titular la muestra

B ml de tiosulfato de sodio utilizados para titular el blanco

N ml de tiosulfato de sodio utilizados para titular el blanco

3.4.5 Determinación del valor *p*-Anisidina

Este método permite determinar la presencia de aldehídos (principalmente 2-alkenal y 2,4-dienals), productos secundarios de la oxidación lipídica. Se utilizó el método recomendado

por IUPAC (1987). Los resultados se expresaron en valores de *p*-Anisidina (unidades arbitrarias).

Se pesaron 2.5 g de aceite, se adicionó isooctano y se agitó la solución en el vortex hasta conseguir la disolución de la muestra; luego se midió la absorbancia a 350 nm (A_b). Luego se tomó 5 ml y se colocó en un tubo de ensayo, se adicionó 1 ml del reactivo *p*-anisidina, se agitó hasta homogenizar correctamente y se dejó en reposo por 10 minutos; paralelamente se preparó el blanco con 5 ml de isooctano para calibrar el espectrofotómetro. Finalizado, el tiempo de reposo, se midió la absorbancia a 350 nm (A_s). Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación:

$$p-A.V. = \frac{0.25 (1.2 A_s - A_b)}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

donde:

A_b Absorbancia de la muestra sin reaccionar

A_s Absorbancia de la muestra después de 10 minutos de reacción

p-A.V. Valor de *p*-Anisidina (adimensional)

3.4.6 Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-PAD

El perfil de compuestos fenólicos fue determinado según el método de Llorach *et al.* (2002) con ligeras modificaciones. El extracto fenólico, obtenido a partir de la harina de residuos de alcachofa, fue separado usando el HPLC en fase reversa. Los espectros cromatográficos fueron registrados desde 280 a 320 nm durante la corrida completa. La separación de los compuestos fenólicos se realizó a 30 °C usando una columna X-terra RP₁₈ (5 μm, 250 mm x 4.6 mm) (Waters, Milford, MA). La fase móvil estuvo conformado por (A) una solución de ácido fórmico 5 por ciento (v/v) y (B) metanol grado HPLC a una velocidad de flujo de 1 ml/min y 20 μl de muestra fue inyectada. La gradiente lineal se realizó como sigue: de 0 a 15 por ciento B en 40 min, de 15 a 45 por ciento B en 40 min y de 45 a 100 por ciento B en 10 min. La muestra y las fases móviles fueron filtradas a través de un filtro 0.22 μm tipo GV (Waters, Bedford, MA) previo a la inyección en el HPLC. Los compuestos fenólicos fueron identificados y cuantificados por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción en el rango UV-Visible, de estándares, previamente inyectados.

Adicionalmente, con la finalidad de obtener mayor información sobre la naturaleza de los compuestos de alcachofa, se procedió a realizar una hidrólisis ácida y así obtener a las agliconas o estructuras base de los compuestos fenólicos. Para la hidrólisis ácida se empleó el método reportado por Hertog *et al.* (1993), Donde aproximadamente 20 mg de fenólicos se hicieron reaccionar con 5 ml de una solución de metanol:agua (50:50), que contenía 1.2 M de HCl, por espacio de 2 horas a 90 °C. Posteriormente, la solución se ajustó a un volumen final de 15 ml seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente. El producto resultante se analizó directamente por HPLC-PAD, de acuerdo a las condiciones y procedimientos descritos arriba.

3.4.7 Extracción de antioxidantes fenólicos a partir de muestras de aceite

El método permite extraer los fenólicos antioxidantes presente en aceites. Se utilizó el método recomendado por Araújo (1999). Consiste en extracciones sucesivas en muestras de aceite con etanol acuoso (80:20, v/v). El etanol (que contiene los fenólicos) fue recuperado evaporando hasta sequedad (temperatura <40 °C) y posterior redisolución en metanol grado HPLC para su evaluación mediante HPLC-PAD de acuerdo a lo descrito en el ítem 3.4.6.

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1 Evaluación de los residuos sólidos generados por el procesamiento de la alcachofa

Durante el procesamiento de la alcachofa para producir corazones de alcachofa en conserva, la empresa agroindustrial Intiagro S.A.C. se generan tres tipos de residuos sólidos los cuales son: tallos y puntas, brácteas externas y productos defectuosos. Estos residuos se obtienen a lo largo del flujo de procesamiento, donde no es factible obtenerlos por separado porque las fajas transportadoras juntan los mismos al final del proceso. La evaluación consistió en analizar la cantidad (kg) por tipo de residuos que se genera en un batch de producción y el contenido de compuestos fenólicos totales (mg de ACE/g residuo) y capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$ de residuo). que aportó cada tipo de residuo.

3.5.2 Obtención de la harina de residuos de alcachofa

Para la obtención de la harina de alcachofa a partir de los residuos sólidos (tallos y puntas, brácteas externas y productos defectuosos) de alcachofa se siguió el flujo de operaciones que se describe a continuación y se presenta en la Figura 12.

- **Acondicionamiento:** Inmediatamente después de recolectar los residuos de alcachofa de la planta procesadora, estos fueron transportados en bolsas de polietileno al secador y distribuidos en forma homogénea en las bandejas del mismo para secarlos.
- **Secado:** Los residuos se secaron en un secador de bandejas con aire caliente a 60 °C hasta llegar a un contenido de humedad final de 6.72 %.
- **Molido:** El producto seco, obtenido en el proceso anterior, fue molido en el molino de cuchillos hasta obtener una harina homogénea con un tamaño promedio de partícula de 1 mm de diámetro.

Finalmente, el producto fue envasado al vacío, almacenado en oscuridad y en congelación (-20 °C) hasta el proceso extracción.

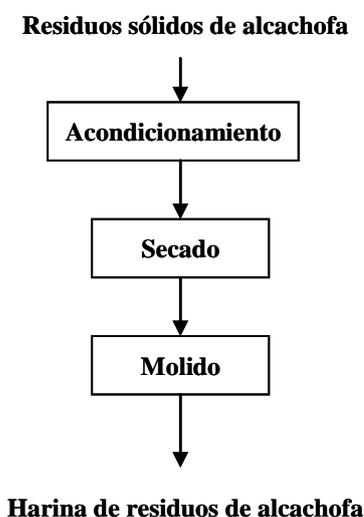


Figura 12: Flujo de operaciones para la obtención de harina de residuos de alcachofa

3.5.3 Maximización de la extracción de los compuestos fenólicos a partir de harina de residuos de alcachofa

Tanto para la etapa de *screening*, realizada mediante el método de Taguchi, como para la maximización mediante la MSR, la obtención de los compuestos fenólicos se realizó mediante el flujo de operaciones que a continuación se describe y se presenta en la Figura 13.

- **Mezclado:** La harina de residuos de alcachofa fue mezclada con el solvente de extracción hasta obtener una mezcla homogénea. El alcohol es un solvente ambientalmente amigable (Zuorro, 2014) y de uso permitido en la industria

alimentaria, por esta razón se emplearon las mezclas hidroalcohólicas (% v/v, etanol/agua) como solvente de extracción de los compuestos fenólicos (Nepote *et al.*, 2005; Zuorro, 2014; Zuorro *et al.*, 2016).

- **Extracción:** La extracción se realizó por lixiviación en un sistema *batch* bajo agitación constante. En esta operación se evaluaron las siguientes variables: relación materia prima/solvente (m/v), solvente de extracción (% v/v, etanol/agua), temperatura de extracción (°C) y tiempo de extracción (min).
- **Filtración/centrifugación:** Terminada la extracción se filtraron y centrifugaron los extractos obtenidos y se almacenaron en condiciones óptimas (atmósfera con nitrógeno y en congelación a -20 °C) hasta el momento del proceso de purificación. Al extracto obtenido se le denominó extracto bruto (EB) al cual se lo caracterizó en contenido de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y perfil de compuestos fenólicos por HPLC-PAD.

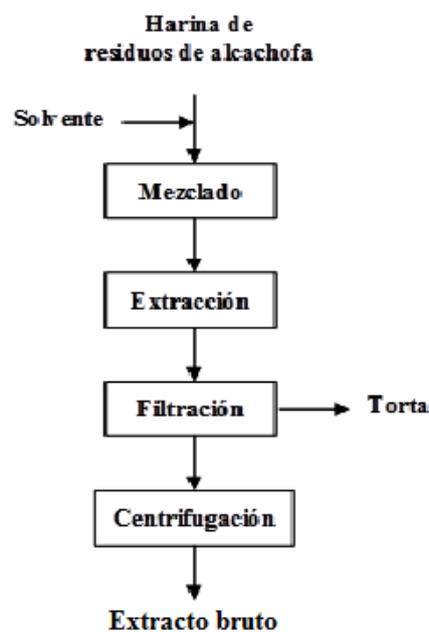


Figura 13: Flujo de operaciones para la obtención del extracto fenólico a partir de harina de residuos de alcachofa

3.5.4 Purificación del extracto fenólico

La purificación del extracto fenólico se realizó con el objetivo de eliminar sustancias de interferencias de naturaleza no-fenólica (Fno-fenólica) que pudieron haberse arrastrado durante el proceso de extracción, tales como: azúcares, proteínas, ácidos orgánicos, etc., obteniéndose al final del proceso un extracto rico en compuestos fenólicos.

Para la purificación (Figura 14) se emplearon columnas cromatográficas Sep pak C₁₈ (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001), las cuales fueron previamente acondicionadas con metanol y con agua acidulada (HCl 0.01% v/v); y luego se aplicó el extracto fenólico concentrado. La elución se realizó primero con agua acidulada (HCl 0.01%, v/v) con la finalidad de eliminar compuestos de carácter hidrofílico (F_{no}-fenólica) y luego con etanol acidulado (HCl 0.01%, v/v) para recuperar los compuestos de naturaleza fenólica (F-fenólica).

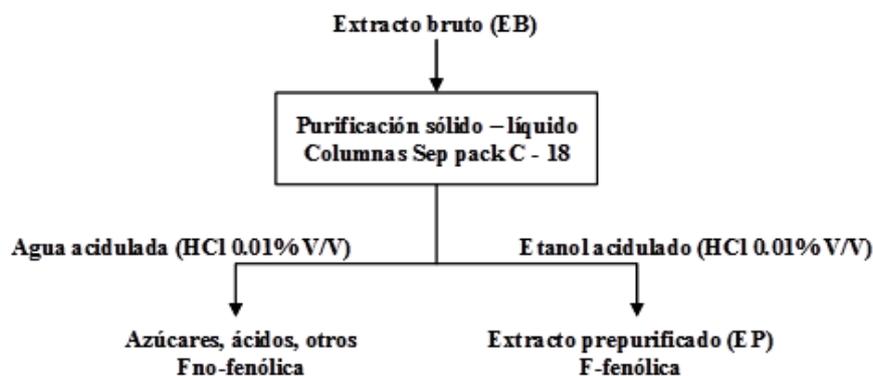


Figura 14: Esquema del proceso de purificación de los compuestos fenólicos de alcachofa

La fracción fenólica (F-fenólica) obtenida del proceso de purificación fue concentrada al vacío hasta sequedad (40 °C) y resuspendida en etanol absoluto (99.5 %). El producto resultante fue denominado extracto purificado (EP), al cual se le determinó el contenido de compuestos fenólicos (FT) y el perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC-PAD.

3.5.5 Estabilidad oxidativa en aceite de soya con adición de antioxidantes mediante pruebas aceleradas

Para evaluar la eficacia antioxidante del extracto purificado se utilizó aceite desgomado de soya crudo mediante pruebas aceleradas, según el procedimiento que a continuación se detalla.

En cuatro vasos de precipitado, se adicionaron por separado 100 ml de aceite de soya crudo. Un vaso no tuvo antioxidante (AB) en el aceite, y a los otros tres vasos se les adicionó por separado el extracto purificado de alcachofa (AAL), BHT (ABHT) y el TBHQ (ATBHQ) a la concentración de 200 ppm (concentración máxima permitida para el

empleo de antioxidantes sintéticos). La dosificación de 200 ppm para el extracto etanólico de residuos de alcachofa se hizo considerando la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el extracto (determinado por el método de Folin-Ciocalteu), de esta forma se calculó el volumen del extracto requerido para alcanzar la concentración requerida. El volumen del extracto etanólico no fue mayor al 0.4 % del volumen del aceite. El BHT y TBHQ fueron disueltos en un volumen de etanol absoluto igual al del extracto etanólico de alcachofa, mientras que el aceite sin antioxidante sólo presentó etanol en el mismo volumen de los anteriores (Fki *et al.*, 2005). El almacenamiento acelerado se realizó con una réplica, en botellas de 25 ml sin tapas, con la finalidad de acelerar el proceso de oxidación. El conjunto fue almacenado en estufa con circulación de aire a 55 °C por 15 días. A los 0, 5, 10 y 15 días se tomaron muestras de aceite AAL, ABHT, ATBHQ y AB para realizar los análisis de índice de peróxidos (IP) y valor de *p*-Anisidina (*p*-A). Durante el transcurso del almacenamiento las botellas fueron agitadas periódicamente.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1 Evaluación de residuos generados en la industrialización de alcachofa

En la evaluación del tipo de residuo sólido a utilizar para la extracción de los compuestos fenólicos, se determinó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en los tres tipos de residuo; se aplicó un análisis de varianza ($p < 0.05$) para un diseño completo al azar (DCA) con dos repeticiones. Para determinar las diferencias significativas entre los tipos de residuos, se aplicó la prueba de comparación de muestras LSD (Mínima Diferencia Significativa de Fisher).

3.6.2 Maximización de la extracción de los compuestos fenólicos a partir de la harina de residuos de alcachofa

a. *Screening* por el método de Taguchi

Muchas son los factores que afectan la extracción de compuestos fenólicos a partir de materiales vegetales, como composición del solvente, tiempo de extracción, temperatura de extracción, la relación materia prima/solvente, el tamaño de partícula, entre otros. Por esta razón, para determinar y definir los factores que significativamente afectan el proceso de extracción de los compuestos fenólicos a partir de la harina de residuos de alcachofa se realizó un *screening*. En el *screening* se consideraron como respuestas el contenido de fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos. Se evaluó la influencia de los siguientes factores: relación de materia prima/solvente (m/v), solvente de extracción (%,

v/v, etanol/agua), temperatura de extracción (°C) y tiempo de extracción (min), ello soportado en datos de la literatura. Se aplicó el diseño experimental correspondiente al criterio de “mayor es mejor” del método de Taguchi con arreglo ortogonal L₈ (2⁷) (Marfil, 1999). Con este estudio preliminar se evaluó en forma simultánea, los cuatro factores que condicionarían la extracción de los compuestos fenólicos a partir del sustrato en estudio. Los niveles mínimos y máximos de cada factor evaluado se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Niveles mínimos y máximos para el *screening* de las variables independientes en el diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal L₈ (2⁷)

Variables independientes	Niveles	
	1 (Mínimo)	2 (Máximo)
Solvente / materia prima (m/v)	1/10	1/30
Solvente (% , etanol/agua)	20	100
Temperatura (°C)	25	50
Tiempo (min)	30	90

En el *screening* para evaluar los factores de extracción y sus interacciones por método de Taguchi con arreglo ortogonal L₈, (2⁷), se realizó según el diseño experimental presentado en la Tabla 9. El análisis de varianza se realizó utilizando el programa STATISTICA®.

Tabla 9: Diseño experimental por el método de Taguchi con arreglo ortogonal L₈ (2⁷) para el *screening*

Corrida	Factores						
	A	B	AxB	C	AxC	D	AxD
1	1	1	--	1	--	1	--
2	1	1	--	2	--	2	--
3	1	2	--	1	--	2	--
4	1	2	--	2	--	1	--
5	2	1	--	1	--	1	--
6	2	1	--	2	--	2	--
7	2	2	--	1	--	2	--
8	2	2	--	2	--	1	--

donde, **A** es relación líquido - sólido, **B** es solvente de extracción, **C** es temperatura de extracción, **D** es el tiempo de extracción, **AxB** es interacción A y B, **AxC** es interacción A y C; y **AxD** es interacción A y D.

b. Maximización por el método de superficie de respuesta (MSR)

Con la información obtenida del *screening* se realizó el proceso de optimización para la extracción de compuestos fenólicos por el MSR aplicando el diseño de Box-Behnken, con tres variables y tres niveles por variable (Tabla10), consistente de 15 corridas experimentales con una réplica y tres réplicas alrededor del punto central (Montgomery, 2003).

Tabla 10: Variables independientes, códigos de niveles y sus valores segúnMSR

Variable independiente	Unidades	Símbolo	Códigos de niveles		
			- 1	0	+ 1
Materia prima/solvente	m/v	X ₁	20	40	60
Solvente de extracción	% (v/v)	X ₂	30	60	90
Tiempo	min	X ₃	30	60	90

En la optimización del proceso de extracción de los compuestos fenólicos se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus®. Para la obtención de los coeficientes de regresión, los datos experimentales se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión para las intersecciones lineal, cuadrática y términos de interacción, respectivamente; y X_i y X_j son las variables independientes.

Los efectos de la variabilidad en la respuesta observada, debido a variables extrañas, fueron minimizados aleatorizando el orden de los experimentos. Las variables del diseño fueron: relación materia prima/solvente (X_1 , m/v), solvente de extracción (X_2 , %, v/v, etanol/agua) y tiempo de extracción (X_3 , min). El diseño experimental empleado se presenta en el Tabla 11.

Tabla 11. Diseño de Box-Behnken con tres variables y tres niveles por variable según MSR

Orden standard ^a	Orden de corrida ^b	Variable 1 (X ₁)	Variable 2 (X ₂)	Variable 3 (X ₃)
		Relación materia prima/solvente (m/v)	Solvente de extracción (% v/v, etanol/agua)	Tiempo de extracción (min)
1	8	20 (-1)	60 (0)	30 (-1)
2	13	60 (+1)	60 (0)	30 (-1)
3	1	40 (0)	30 (-1)	30 (-1)
4	11	20 (-1)	60 (0)	90 (+1)
5	10	40 (0)	90 (+1)	30 (-1)
6	14	60 (+1)	30 (-1)	60 (0)
7	9	40 (0)	90 (+1)	90 (+1)
8	7	40 (0)	60 (0)	60 (0)
9	3	40 (0)	60 (0)	60 (0)
10	4	40 (0)	30 (-1)	90 (+1)
11	6	60 (+1)	60 (0)	90 (+1)
12	15	20 (-1)	30 (-1)	60 (0)
13	2	60 (+1)	90 (+1)	60 (0)
14	12	20 (-1)	90 (+1)	60 (0)
15	5	40 (0)	60 (0)	60 (0)

^aNo aleatorizado, ^b Aleatorizado

3.6.3 Estabilidad oxidativa en aceite de soya con adición de antioxidantes mediante pruebas aceleradas

Para determinar el efecto de la acción de los antioxidantes ensayados se aplicó un arreglo factorial 4² en un diseño completamente al azar ($p < 0.01$) con una réplica. Los factores fueron el tipo de antioxidante (B, AL, BHT, TBHQ) y el tiempo (0, 5, 10 y 15 días); se consideró como un nivel del factor tipo de antioxidante al aceite sin adición de antioxidante por considerar la presencia de antioxidantes naturales en el mismo. Se aplicó el método LSD (Mínima Diferencia Significativa de Fischer) para determinar diferencias significativas entre los niveles del factor tipo de antioxidante y tiempo.

El efecto antioxidante fue evaluado aplicando el diseño experimental antes descrito a los resultados de índice de peróxidos (IP) y valor de *p*-Anisidina (*p*-A). El día 0 y cada 5 días se tomó una muestra para determinar el IP y el valor de *p*-A. El programa STATGRAPHICS Plus® se utilizó para el análisis estadístico.

Para la evaluación de los fenólicos en las muestras de aceite almacenadas (que contenían el extracto fenólico de residuos de alcachofa - AAL), estas fueron sometidas a extracción de fenólicos según Araújo (1999). El extracto obtenido fue analizado mediante HPLC–PAD.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LA ALCACHOFA

4.1.1 Distribución de los residuos de alcachofa

En la industrialización de la alcachofa, para la obtención de corazones de alcachofa en conserva, esta es clasificada por calibre. Entre las operaciones que se desarrollan para la producción de alcachofa en conserva están: lavado, desinfección, blanqueado, cortado, llenado, esterilización y enfriamiento. Es a partir de la operación de cortado que se generan los residuos sólidos, y son los siguientes:

- Tallos y puntas: se cortan las puntas y los tallos de las alcachofas.
- Brácteas externas: brácteas fibrosas que cubren el corazón de alcachofa, y que son retiradas para obtener el mismo.
- Defectuosos: son los corazones que no tienen las características adecuadas para que sean envasadas.

En la Tabla 12 se presenta la distribución promedio de los residuos sólidos generados en dos *batch* de procesamiento en un día de producción, estos fueron pesados en línea. La cantidad de alcachofa procesada por *batch* de producción fue en promedio 2 845.8 kg. Se puede observar que el mayor porcentaje de residuos sólidos corresponde a las brácteas externas (87.4 por ciento) y el menor corresponde a los defectuosos (2.3 por ciento).

Tabla 12: Cantidad de residuos que se generan en un *batch* promedio de procesamiento de alcachofa

Tipo de residuo	Cantidad(kg)	Porcentaje(%)
Tallos y puntas	210.3	10.2
Brácteas externas	1796.8	87.4
Defectuosos	47.8	2.3
Total	2054.9	100.0

Asimismo, con la información recolectada en la planta de procesamiento, se logró determinar que la cantidad de residuos sólidos generados al final del procesamiento de alcachofa representa un 77.64 por ciento de la cantidad de alcachofa que ingresa al procesamiento.

4.1.2 Aporte de compuestos fenólicos en cada tipo de residuo de alcachofa

Estudios han demostrado que la cantidad de fenólicos en la alcachofa pueden variar significativamente con el estado de desarrollo de la planta, el genotipo, y que éstos tienen tendencia a acumularse preferentemente en diferentes partes de la planta (Pandino *et al.*, 2011; Pandino *et al.*, 2013, Zuorro, 2014). Así, en la Tabla 13 se observa que los tallos y puntas son los residuos que tienen mayor aporte en compuestos fenólicos totales (FT) y capacidad antioxidante (CA); no obstante, durante el procesamiento de la alcachofa es el tipo de residuo que tiene menor porcentaje de presencia (10.2 por ciento) en el volumen total de residuos generados. De forma similar, los defectuosos son el tipo de residuo que contribuye en segunda instancia con los FT y CA, después de los tallos y puntas, pero tiene el menor porcentaje de presencia (2.3 por ciento) en el volumen total de residuos.

Tabla 13: Aporte de contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante por tipo de residuo sólido de alcachofa

Tipo de residuo	Compuestos Fenólicos totales (FT) ¹	Capacidad antioxidante (CA) ²
Tallos y puntas	77.9	168.1
Brácteas externas	30.2	68.1
Defectuosos	56.2	111.2

¹ mg de ácido clorogénico equivalente (ACE) por gramo de residuo (base seca).

² μmol de trolox equivalente (TE) por gramo de residuo (base seca).

Las brácteas externas, representan el 87.4 por ciento del total de residuos generados y contribuye en menor grado con el contenido de FT y CA; esto podría estar relacionado con el alto porcentaje de fibra que ellas tienen. Los tallos y puntas presentaron aproximadamente el doble del contenido de FT comparado con las brácteas; resultados similares reportó Zuorro (2014) y encontró que el contenido de FT en los tallos de alcachofa fue 1.5 veces mayor que en las brácteas. Asimismo, las investigaciones de Pandino *et al.*(2011), Negro *et al.* (2012) y Gaafar y Salama (2013) corroboran los resultados encontrados en este trabajo.

Finalmente, se consideró trabajar con el total de residuos sólidos de alcachofa debido a que no era factible realizar una segregación de los mismos en la línea de producción y, además porque no se podría disponer de una cantidad suficiente del residuo (tallos y puntas) que fueron los que aportaban más contenido de FT y CA.

4.2 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

4.2.1 *Screening* empleando el método de Taguchi

El arreglo ortogonal L₈ (2⁷), con dos niveles, fue usado en el *screening* de los factores que afectarían el contenido de FT y CA, con dos réplicas, según el diseño experimental y los niveles mínimos y máximos establecidos (Acápite a). Los valores señal/ruido (S/R) fueron obtenidos bajo ocho condiciones de extracción, y se presentan en las Tablas 14 y 15, respectivamente.

Tabla 14: Compuestos fenólicos totales bajo diferentes condiciones de extracción, según el arreglo ortogonal L₈ (2⁷)

Corrida	Respuesta			FT ¹	S/R (db)
	1	2	3		
1	12,82	15,74	15,81	14.79	23,36
2	11,40	9,62	12,13	11.05	20,82
3	1,22	1,28	1,39	1.30	2,25
4	3,56	3,39	3,71	3.55	11,01
5	23,84	25,19	21,20	23.41	27,37
6	22,77	25,42	22,88	23.69	27,48
7	2,29	2,61	2,03	2.31	7,22
8	2,28	2,03	0,96	1.75	4,32

Donde, **FT** es el contenido de compuestos fenólicos totales

¹ mg de ácido clorogénico equivalente (ACE) por gramo de residuo (base seca, b.s.)

El objetivo principal del análisis de varianza (ANVA) fue extraer de los resultados cuanta variación produce cada factor con respecto a la variación total observada en el resultado (Mousavi *et al.*, 2007). En el Anexo 2 se observa que ambas respuestas, contenido de FT y CA, fueron afectadas por los siguientes factores: relación materia prima/solvente, solvente de extracción y tiempo de extracción ($p < 0.05$).

Tabla 15. Capacidad antioxidante bajo diferentes condiciones de extracción, según el arreglo ortogonal L₈ (2⁷) de Taguchi

Corrida	Respuesta			CA ¹	S/R (db)
	1	2	3		
1	39,92	37,31	47,76	39,33	32,35
2	34,58	28,28	32,71	31,86	30,03
3	18,78	12,89	17,24	16,30	24,14
4	14,27	16,44	14,81	15,17	23,61
5	82,52	87,84	83,65	84,67	38,55
6	76,92	87,16	72,87	78,98	37,93
7	7,68	7,53	8,13	7,78	17,82
8	9,72	9,99	9,52	9,74	19,77

Donde, CA es la capacidad antioxidante
¹ (μmol Trolox eq / g m.s.)

En la Figura 15, se observan los valores señal/ruido (S/R, ETA) y cómo los factores evaluados y sus interacciones, influyen en el contenido de FT y CA de los extractos obtenidos a partir de la harina de residuos de alcachofa, según el arreglo ortogonal aplicado.

El factor relación materia prima/solvente (m/v) (A) tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) en el proceso de extracción de los FT y fue seleccionando para la optimización mediante MSR, el nivel máximo fue escogido como nivel medio en la MSR debido al mayor valor de señal/ruido (Figura 15). Silva *et al.* (2007) investigaron sobre el contenido de polifenoles en hojas de *I. edulis*, para lo cual emplearon soluciones hidroalcohólicas; y no encontraron diferencias en el contenido de estos compuestos, bajo condiciones de altas relaciones materia prima/solvente en el proceso de extracción. Esto se debe la alta solubilidad de los polifenoles en este tipo de solvente de extracción (Rice-Evans *et al.*, 1998, citados por Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Escribano-Bailon y Santos-Buelga, 2003, citados por Silva *et al.*, 2007).

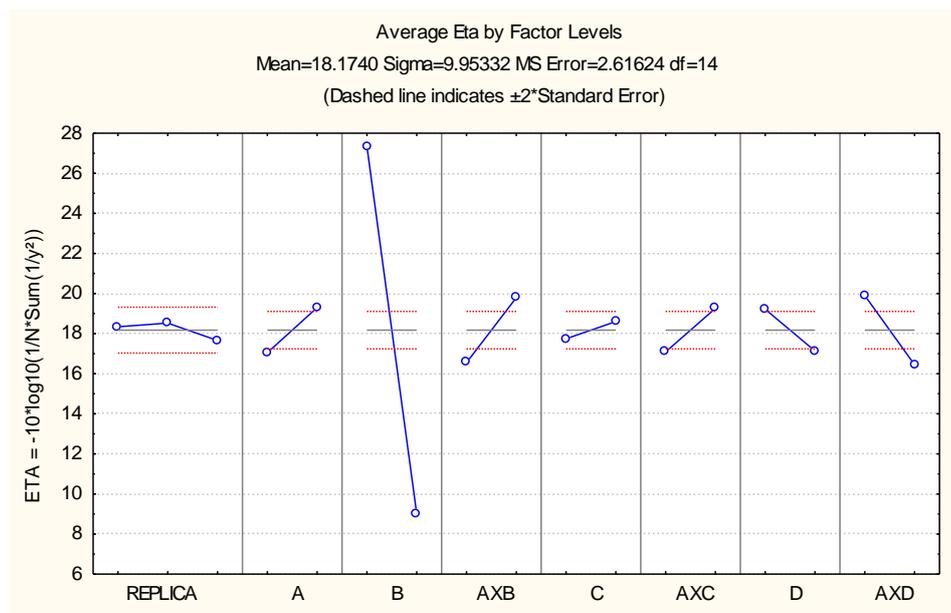


Figura 15: Valores señal/ruido (S/R, ETA), para cada factor y sus interacciones considerados, en la extracción de compuestos fenólicos totales a partir de harina de residuos de alcachofa

Donde:

- (A) Relación solvente/materia prima (m/v)
- (B) Solvente de extracción (% , v/v, etanol/agua)
- (AxB) Interacción relación materia prima/solvente - Solvente de extracción
- (C) Temperatura de extracción (°C)
- (AxC) Interacción relación materia prima/solvente - Temperatura de extracción
- (D) Tiempo de extracción (min)
- (AxD) Interacción relación materia prima/solvente - Tiempo de extracción

La selección de las condiciones apropiadas en la extracción de compuestos fenólicos a partir de materiales vegetales es crucial, y esto no puede generalizarse debido a la naturaleza de los antioxidantes naturales que existen en estos materiales (Wettasinghe y Shahidi, 1999; citados por Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005). Por otro lado, Park *et al.* (1998) encontraron que la concentración del solvente juega un rol crítico en la extracción de los sólidos solubles de los productos naturales. En forma similar, Kwon *et al.* (2003), citados por Liyana-Pathirana y Shahidi (2005), reportaron que la concentración del solvente fue el factor más importante que contribuyó en la extracción de los compuestos de ginseng usando el método de superficie de respuesta, esto puede corroborar los resultados obtenidos en este estudio preliminar. Por su parte, Zuurro (2015) encontró también, que la concentración del solvente de extracción afectó significativamente el proceso de extracción de fenólicos a partir de residuos de café expreso.

El factor solvente de extracción (% v/v) (B) tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) (Anexo 1) y fue seleccionado para la maximización posterior mediante MSR, el menor nivel (Figura 14) mostró el valor más alto de señal/ruido (S/R, ETA). Por consiguiente, se consideró ensayar para la optimización soluciones hidroalcohólicas, ambientalmente amigables, cuyo contenido de etanol fueron de 30, 60 y 90%. La interacción AxB mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) con el mayor nivel de la interacción por el mayor valor de señal/ruido (ETA).

El factor temperatura de extracción ($^{\circ}\text{C}$) (C) no tuvo efecto significativo en la extracción a un nivel de confianza de 95%, por esta razón se seleccionó el nivel más alto de temperatura (50°C) ensayado al haber obtenido el mayor valor de señal/ruido (ETA). Extraer los compuestos fenólicos, a una temperatura mayor, podría ocasionar una degradación de los mismos (Silva *et al.*, 2007). Por su parte, Zuorro *et al.* (2016) evaluaron el factor temperatura en el rango de $40\text{-}60^{\circ}\text{C}$, y encontraron que éste fue significativo en el proceso de extracción de compuestos fenólicos; sin embargo, la extracción a altas temperaturas, si bien mejora el rendimiento de extracción, podría inducir a una degradación de compuestos fenólicos (Volf *et al.*, 2014 citados por Zuorro *et al.*, 2016). La interacción AxC mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) en la extracción, el mayor valor de señal/ruido (ETA) indica el mayor nivel.

El factor tiempo de extracción (min) (D) mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) en la extracción, correspondiendo un mayor valor de señal/ruido (ETA) al mínimo nivel ensayado (30 minutos), debido a esto se seleccionó este nivel para el proceso de optimización con MSR. Por su parte, Zuorro *et al.* (2016) evaluaron el factor tiempo de extracción en el rango de 30 a 90 min (el mismo que se aplicó en el presente trabajo), y encontraron que éste factor tuvo una influencia más pronunciada en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a bajas relaciones materia prima:solvente. El efecto de la interacción AxD fue significativa ($p < 0.05$) (Anexo 2) y el mayor valor de señal/ruido (S/R, ETA) fue obtenido al nivel mínimo.

4.2.2 Maximización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la harina de residuos de alcachofa

Del estudio preliminar, usando el método de Taguchi, se determinó que los factores que condicionan el proceso de extracción de los FT de la harina de residuos de alcachofa

fueron los siguientes: relación materia prima/solvente, solvente de extracción y tiempo de extracción. Estos fueron seleccionados para maximizar el proceso de extracción mediante la MSR con el diseño de Box-Behnken ($p < 0.05$) (Acápito 3.6.2 b). La temperatura de extracción (50 °C) y el tamaño de partícula de la harina de residuos de alcachofa (en promedio 1 mm) se mantuvieron constantes en la ejecución de los ensayos. Los resultados experimentales obtenidos en los diferentes ensayos de extracción de compuestos fenólicos, bajo el diseño experimental establecido (Tabla 11), se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16: Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante bajo las condiciones de extracción ensayadas

Orden estándar ^a	Contenido de fenólicos totales ^{bc}	Capacidad antioxidante ^{bd}
1	31.45 ± 0.41	59.57 ± 0.18
2	59.06 ± 0.39	92.58 ± 0.44
3	37.38 ± 0.79	46.82 ± 0.82
4	32.72 ± 0.62	59.70 ± 0.04
5	17.41 ± 0.00	47.70 ± 0.34
6	58.95 ± 0.23	60.18 ± 0.80
7	12.25 ± 1.66	47.88 ± 0.31
8	32.13 ± 0.25	69.43 ± 0.05
9	32.45 ± 0.05	68.97 ± 0.39
10	34.98 ± 2.01	47.58 ± 0.19
11	58.67 ± 0.06	92.84 ± 0.10
12	35.78 ± 0.65	39.86 ± 0.23
13	49.02 ± 0.32	62.46 ± 2.21
14	28.75 ± 0.13	40.11 ± 0.33
15	32.19 ± 0.20	68.70 ± 0.57

^a No aleatorizado

^b Promedio ± DE

^c mg ácido clorogénico equivalente (ACE) por gramo de harina (b.s.)

^d μmol Trolox equivalente (TE) por gramo de harina (b.s.)

Las variables y su forma codificada (Tabla 10) permiten una interpretación directa de los efectos (lineal, cuadrático e interacciones) de las variables independientes, mientras que la superficie y el ploteo de contornos facilitan la visualización de los factores estadísticamente derivados del análisis estadístico (Montgomery, 2003). El modelo fue

adecuado para explicar la mayor variabilidad para los FT y CA. Para el modelo ajustado, el *software* genera coeficientes del modelo, valores de R^2 , valores de F y probabilidades significativas; y permite justificar la significancia de cada variable experimental (Montgomery, 2003). La respuesta máxima predecida, para los FT y CA, fue obtenida basada en un total de 15 experimentos realizados para determinar los 10 coeficientes de regresión del modelo. Una alta proporción de variabilidad fue explicada por el modelo de FT y CA, como indica el valor de R^2 . Los modelos de regresión fueron altamente significativos ($p < 0.05$) para ambas respuestas y fue satisfactoria con coeficientes de determinación (R^2) 0.96 y 0.98 para los FT y CA, respectivamente (Tabla 17).

Tabla 17. Coeficientes de regresión del modelo predictivo de segundo orden para las respuestas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

Coeficientes de regresión	FT	CA
β_0	51.95	-23.4183
Lineal		
Relación materia prima/solvente (β_1)	-2.3635 ^a	-0.4034 ^a
Solvente de extracción (β_2)	0.4524 ^a	3.1288 ^{NS}
Tiempo de extracción (β_3)	0.3392 ^{NS}	-0.2526 ^{NS}
Cuadrático		
Relación materia prima/solvente (β_{11})	0.0385 ^a	0.0129 ^a
Solvente de extracción (β_{22})	-0.0051 ^b	-0.0261 ^a
Tiempo de extracción (β_{33})	-0.0024 ^{NS}	0.0022 ^d
Interacción		
Relación materia prima/solvente x Solvente de extracción (β_{12})	-0.0012 ^{NS}	0.0008 ^{NS}
Relación materia prima/solvente x Tiempo de extracción (β_{13})	-0.0007 ^{NS}	0.0001 ^{NS}
Solvente de extracción x Tiempo de extracción (β_{23})	0.0008 ^b	-0.0002 ^{NS}
R^2	0.96	0.98

Estadísticamente significativo: ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.05$ y ^d $p < 0.10$; NS: no significativa

Con respecto al factor relación materia prima/solvente (X_1), se verificó un efecto lineal negativo por ser estadísticamente significativo para los FT y CA, tal como lo indican los valores de p en la Tabla 17. Un efecto cuadrático positivo de X_1 fue obtenida para ambas

respuestas, lo que indica que éstas se incrementan con el aumento de la relación materia prima/solvente por encima de 1/60.

Para el factor solvente de extracción (X_2) se encontró un efecto lineal para FT lo cual confirma que el incremento de la proporción de etanol en la solución hidroalcohólica mejora el rendimiento de extracción de los FT. Mientras que para CA se observa un efecto lineal no significativo. Se obtuvo un efecto cuadrático negativo de X_2 , para FT y CA, esto confirma la afirmación con respecto al rendimiento de extracción. Además, una excesiva proporción de etanol no hubiera sido de utilidad para lograr la extracción de mayor cantidad de FT.

Con respecto al tiempo de extracción (X_3) se observó un efecto lineal no significativo para ambas respuestas, FT y CA. Se observó un efecto cuadrático negativo para la CA ($p < 0.10$), esto está de acuerdo con la afirmación de que el rendimiento de extracción después de un cierto tiempo no cambia.

De forma importante, se encontró una interacción positiva (efecto cruzado) entre los factores solvente de extracción (X_2) y el tiempo de extracción (X_3) para FT, lo cual significa que el impacto de los factores X_2 o X_3 del nivel de la relación sólido/líquido que se ha usado, y esto tiende generalmente a incrementar el alto nivel de la relación sólido/líquido (X_2).

La superficie de respuesta y el ploteo de contornos que representa el efecto del factor relación materia prima/solvente y el factor solvente de extracción sobre el contenido de compuestos FT, obtenido de la harina de residuos de alcachofa, se muestra en la Figura 16.

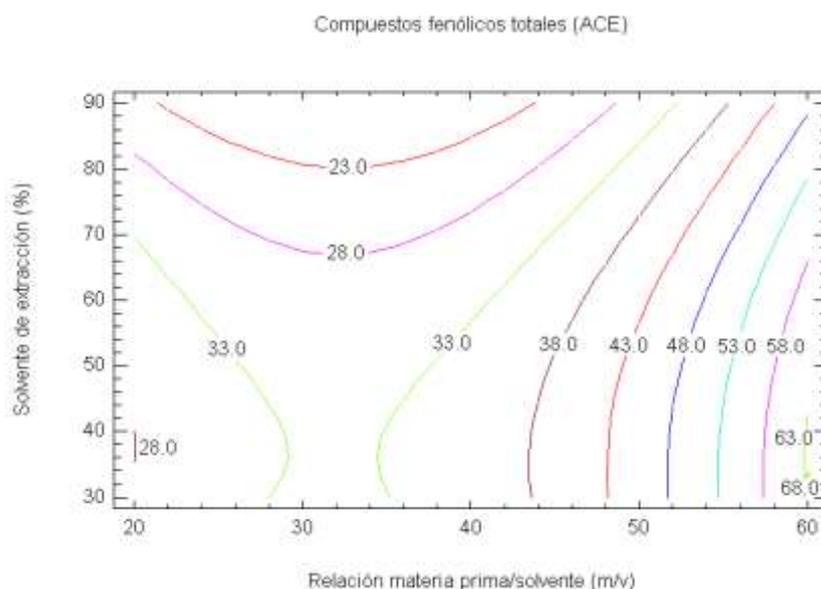
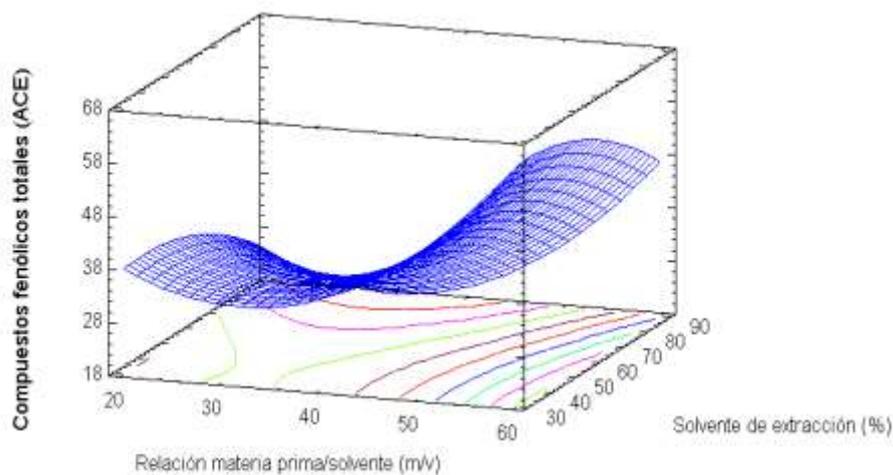


Figura 16: Superficie de respuesta y ploteo de contorno para los efectos del factor solvente de extracción (%) y el factor relación materia prima/solvente (m/v), a tiempo de extracción constante de 60 min, sobre los compuestos fenólicos totales del extracto fenólico obtenido a partir de harina de residuos de alcachofa

El factor solvente de extracción mostró un efecto cuadrático en la respuesta del rendimiento de fenólicos entre 30 y 40 por ciento de etanol en la solución hidroalcohólica. Cuando el factor tiempo de extracción se mantiene constante a 60 minutos, la relación materia prima/solvente ocasionó un incremento lineal en la respuesta, al menos con bajas proporciones de solventes orgánicos en el medio. La Figura 17 muestra la superficie de

respuesta y el ploteo de contornos de los efectos de los dos factores, relación materia prima/solvente y solvente de extracción sobre CA; mientras que en las Tablas 18 y 19 se presentan los valores maximizados para estas respuestas.

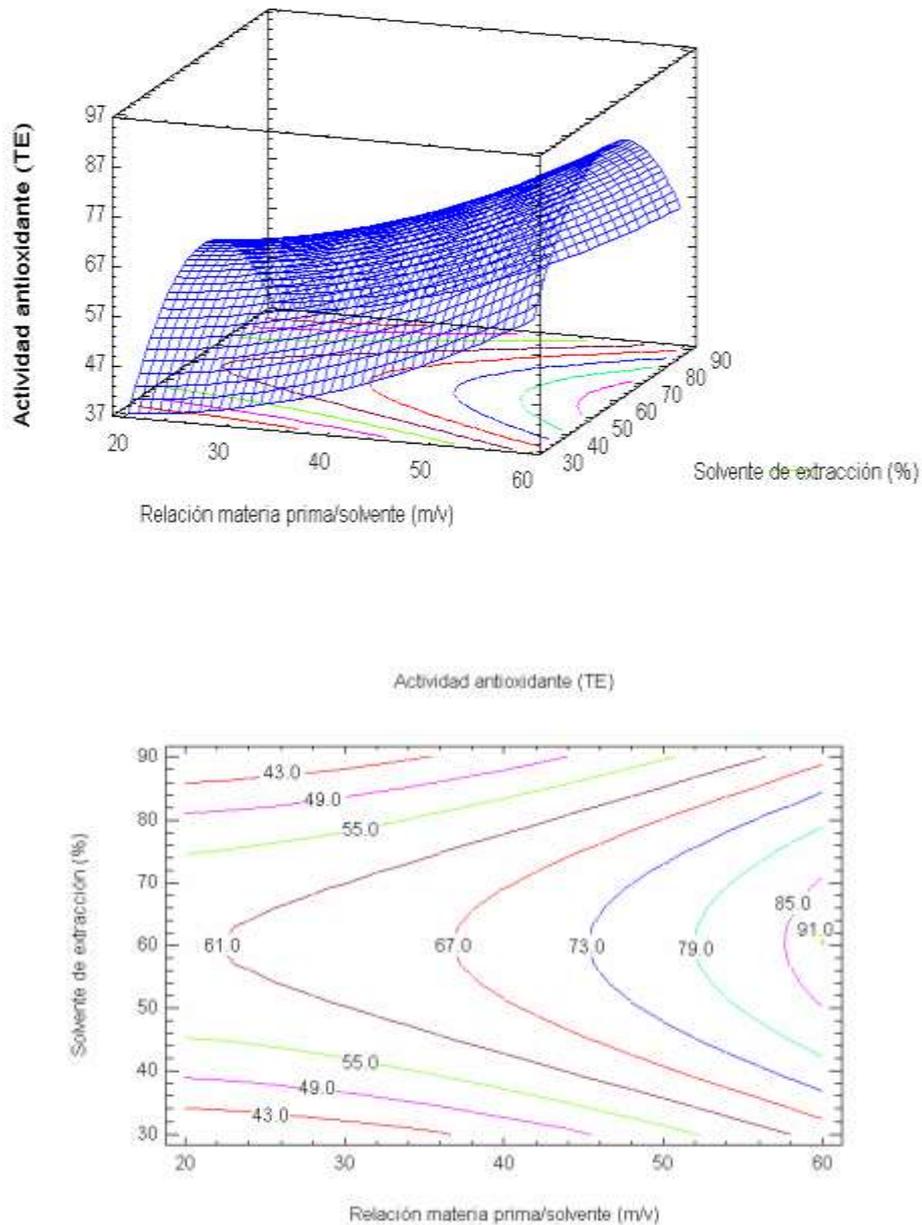


Figura 17: Superficie de respuesta y ploteo de contorno para los efectos del factor solvente de extracción (%) y el factor relación materia prima/solvente (m/v), a un tiempo de extracción constante de 60 min, sobre la capacidad antioxidante del extracto fenólico obtenido a partir de harina de residuos de alcachofa

Tabla 18: Valores maximizados por MSR para capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$ harina (b.s.))

Factor	Óptimo
Relación solvente / materia prima (m/v)	1/60
Solvente (% , v/v, etanol/agua)	60.5

Tabla 19: Valores maximizados por MSR para compuestos fenólicos totales (mg ACE/g harina (b.s.))

Variable	Óptimo
Relación solvente / materia prima (m/v)	1/60
Solvente (% , v/v, etanol/agua)	33.3

De lo obtenido para la maximización de la extracción de compuestos FT, se decidió escoger los valores correspondientes a la variable respuesta CA, debido a que la mayoría de las características benéficas de estos compuestos se le atribuyen a la actividad antioxidante de los mismos, la cual es una propiedad fundamental (Rice-Evans *et al.*, 1997; citados por Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005). Además, si se consideró que los extractos crudos, luego de ser purificados, podrían aplicarse en sistemas oleosos, es conveniente que éste tenga el menor contenido de agua posible.

4.3 Caracterización e identificación de compuestos fenólicos totales en el extracto maximizado, obtenido a partir de harina de residuos de alcachofa

Se obtuvo el extracto fenólico maximizado empleando los parámetros de extracción definidos para CA (Tabla 20). El extracto hidroalcohólico fue caracterizado con respecto a FT, obteniéndose 5.18 mg ACE/ml de extracto; mientras que en el extracto concentrado y purificado, se obtuvo 51.37 mg ACE/ml extracto.

El perfil de compuestos fenólicos del extracto de harina de residuos de alcachofa se presenta en el cromatograma registrado a 320 nm (Figura 18). Las principales familias de compuestos fenólicos identificados en el extracto fueron los ácido hidroxicinámicos. Los picos identificados correspondieron al ácido clorogénico (pico 4) y ácido cafeico (pico 5).

La identificación se basó en los tiempos de retención y los espectros UV-Vis de los estándares previamente inyectados.

Tabla 20: Compuestos fenólicos totales identificados en el extracto fenólico de harina de alcachofa mediante HPLC-PAD

Pico N°	Tiempo de retención (min)	Compuesto fenólico asignado	Área relativa 320 nm (%)
1	8.51	Derivado del ácido cafeoilquínico	8.91
2	8.65	Derivado del ácido cafeoilquínico	54.80
3	11.78	Derivado del ácido cafeoilquínico	2.07
4	13.37	Ácido clorogénico	0.45
5	15.23	Ácido cafeico	9.01
6	23.06	Derivado del ácido cafeico	10.33
7	52.50	Derivado del ácido cafeoilquínico	14.42

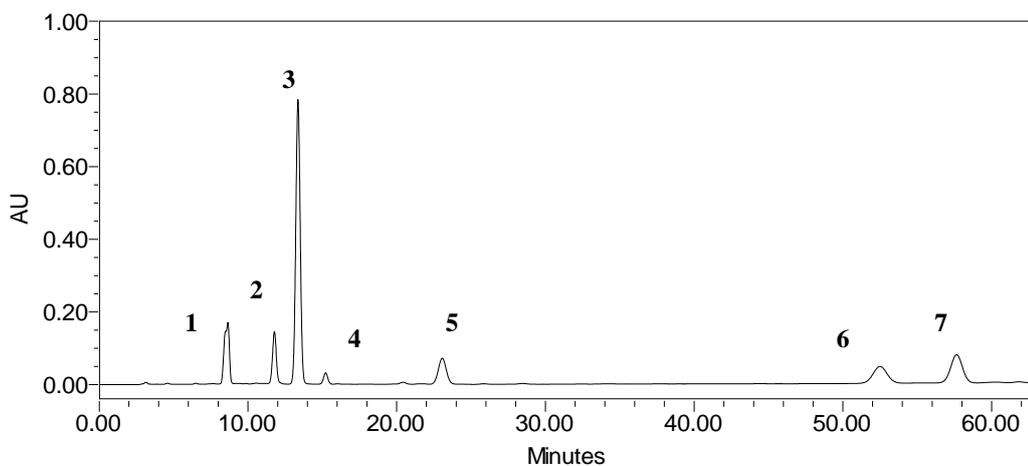


Figura 18: Perfil cromatográfico de elución del extracto de fenólico obtenido de la harina de residuos de alcachofa mediante HPLC-PAD a 320 nm

Sánchez-Rabaneda *et al.*(2003); Pandino *et al.* (2011) y Negro *et al.* (2012) sostienen que el compuesto fenólico más abundante en la alcachofa es el ácido cafeico, encontrándose también derivados del ácido cafeoilquínico, ácido clorogénico, apigenina, luteolina, quercitina, entre otros; esto concuerda con lo encontrado en esta investigación.

Llorach *et al.* (2002) determinaron la presencia de cinarina (ácido 1,3-*O*-dicafeolquínico) que se debe básicamente a la isomerización sufrida por el ácido 1,5-*O*-di-cafeolquínico durante la extracción con agua a temperaturas elevadas. En la Tabla 20 se presentan los compuestos fenólicos identificados en el extracto de harina de residuos de alcachofa, también se muestran sus tiempos de retención y las áreas relativas de cada uno de ellos, a 320 nm.

Con respecto a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en la alcachofa, Wang *et al.*(2003) mencionan que su actividad antioxidante es atribuida principalmente a los ácidos cafeolquínicos (derivados del ácido cafeico), presentes como mono y dicafeoil ésteres. El ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico), ácido pseudoclorogénico (ácido 1-*O*-cafeolquínico), ácido 1,5-*O*-dicafeolquínico y ácido 3,5-*O*-di-cafeolquínico son las moléculas más abundantes en los capítulos de alcachofa en estado fresco. También son responsables de su poder antioxidante algunos flavonoides como luteolina y apeginina.

4.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA EN ACEITE DE SOYA MEDIANTE PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO

En esta etapa se determinó la estabilidad oxidativa del aceite de soya, al que se le aplicó el extracto fenólico, obtenido de harina de residuos de alcachofa, durante el almacenamiento acelerado a 55 °C por 15 días. La evaluación del proceso de oxidación del aceite se realizó cada 5 días mediante la determinación del índice de peróxido y del índice de *p*-Anisidina.

4.4.1 Índice de peróxido (IP)

Los valores de IP para los aceites evaluados: AAL (aceite con 200 ppm de AL), ABHT (aceite con 200 ppm de BHT), ATBHQ (aceite con 200 ppm de TBHQ) y AB (aceite sin antioxidante) durante las pruebas aceleradas de oxidación a la que fueron sometidas se muestran en la Figura 19. En todos los casos, los valores de IP mostraron una tendencia creciente conforme el tiempo de almacenamiento progresaba. Esto indicó que se produjo oxidación y hubo formación de compuestos primarios de oxidación (peróxidos) en el aceite de soya con los diferentes tipos de antioxidantes evaluados.

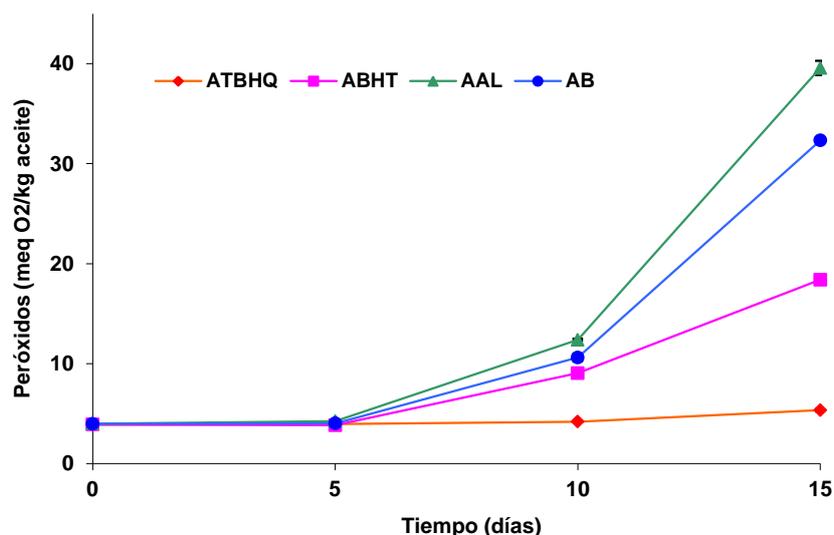


Figura 19: Índice de peróxido (meq O₂/kg aceite) en las muestras de aceite de soya evaluadas durante el almacenamiento a 55 °C

Al día 0 los aceites para los diversos tratamientos presentaron valores de IP cercanos a 3.9 meq O₂/kg aceite. Entre el día 0 y el día 5 no se apreciaron diferencias significativas ($p < 0.01$) en los valores de IP para los tipos de antioxidantes evaluados. Sin embargo, diferencias significativas por el efecto del tipo de antioxidante ($p < 0.01$) comenzaron a elucidarse a partir del día 10, siendo mucho más evidentes hacia el día 15 de almacenamiento. Los valores de IP alcanzados por los aceites ATBHQ, ABHT, AB y AAL fueron 5.3, 18.3, 32.3 y 39.5 meq O₂/kg aceite, respectivamente; ello indica que los antioxidantes sintéticos TBHQ y BHT protegieron mejor al aceite de soya de la oxidación (menor formación de peróxidos lipídicos) respecto al aceite sin antioxidantes. Estos resultados son consistentes con los reportados por Kiyomi y Yasuko (1995) y Yanping *et al.* (1999); citados por Rehman *et al.* (2004), quienes encontraron que los peróxidos se redujeron por la adición de antioxidantes en alimentos procesados y aceites.

Los valores finales de índice de peróxido alcanzados para el aceite de soya sin antioxidante (AB) (32.3 meq O₂/kg aceite) y aceite con BHT (ABHT) al final del almacenamiento, difieren de los reportados por Rehman *et al.* (2004) quienes evaluaron los cambios del IP para el aceite de soya durante almacenamiento acelerado a la temperatura de 45 °C, encontrando valores hacia el término del almacenamiento de 6.3 y 9.0 meq O₂/kg aceite, para los aceites sin antioxidante y con BHT (a 200 ppm), respectivamente. Diferencias que

podrían relacionarse con el origen de la soya y método de extracción del aceite, el cual asegura en parte la cantidad de fenólicos entre otros compuestos como carotenoides, propios del grano que actuarían como antioxidantes. Así, el empleo de bajas temperaturas para evaluar el almacenamiento acelerado (45 °C) podría dar origen a este resultado. El empleo de mayores temperaturas durante un almacenamiento intensivo aceleran las reacciones de oxidación en aceites.

De otro lado, respecto al aceite con el extracto de residuos de alcachofa aplicado a la concentración de 200 ppm (AAL), se observó que no ejerció efecto protector alguno frente a la oxidación del aceite de soya, presentando al final del almacenamiento el mayor valor de IP (39.5 meq O₂/kg aceite) entre los tipos de antioxidantes evaluados. Este resultado es contrario a los reportados en la literatura, dado a que empleo de extractos fenólicos como antioxidantes en aceites ha sido evaluado con éxito en muchos trabajos de investigación. Así, Pazos *et al.* (2005) comprobaron la eficacia antioxidante de extractos polifenólicos (aplicados a la concentración de 0.01%, p/p) obtenidos a partir de la uva en aceites de pescado almacenados por 7 días a 30 °C. Asimismo, extractos de papa obtenidos por medio de una extracción con éter de petróleo aplicados a las concentraciones de 800, 1600 y 2400 ppm inhibieron eficazmente la oxidación del aceite de soya (bajos IP en comparación al aceite sin antioxidante) almacenado a 45 °C por 15 días (Rehman *et al.*, 2004). Fki *et al.* (2005) evaluaron el empleo de extractos fenólicos obtenidos de los residuos del procesamiento de la aceituna a 200 y 500 ppm en un aceite refinado de aceituna a la temperatura de 50 °C por 120 días, encontrando menores IP para ambas concentraciones respecto a un tratamiento blanco sin antioxidante. Goli *et al.* (2005) encontraron que los fenólicos obtenidos del pistacho fueron efectivos en retardar el deterioro del aceite de soya a 60 °C por 12 días a la concentración de 0.06% (600 ppm) mostrando la misma eficacia (IP cercanos) que la presentada por el BHT y BHA a las concentraciones de 200 ppm. Finalmente, Campos *et al.* (2007) encontraron que los compuestos fenólicos extraídos con acetato de etilo a partir de mashua, a las concentraciones de 300 y 600 ppm, evitaron la oxidación del aceite de soya sometido a almacenamiento acelerado de 55 °C, mostrando al día 15 de almacenamiento bajos valores de IP (26.9 y 11.5 meq O₂/kg aceite, respectivamente) en comparación al aceite sin antioxidante (98.2 meq O₂/kg aceite) y con BHT (33.6 meq O₂/kg aceite) a la concentración de 200 ppm.

Se puede considerar que los resultados encontrados en el presente trabajo, así como en los trabajos citados arriba, dependen del tipo de compuestos fenólicos presentes en los extractos aplicados como antioxidantes en aceites, por lo que la elucidación y caracterización de los mismos es un punto clave para explicar y comprender los resultados presentados, así como por la dosis empleada en la evaluación.

4.4.2 Valor de *p*-Anisidina (*p*-A)

Los valores de *p*-A para los aceites evaluados: AAL (aceite con 200 ppm de AL), ABHT (aceite con 200 ppm de BHT), ATBHQ (aceite con 200 ppm de TBHQ) y AB (aceite sin antioxidante) durante las pruebas aceleradas oxidativas para el aceite de soya se muestran en la Figura 20. Para todos los casos, un constante incremento en los valores de *p*-A en función al tiempo de almacenamiento fueron encontrados, lo que indicó que hubo formación de productos secundarios de oxidación (aldehídos) en el aceite de soya, los mismos que son los responsables del mal olor y sabor del mismo.

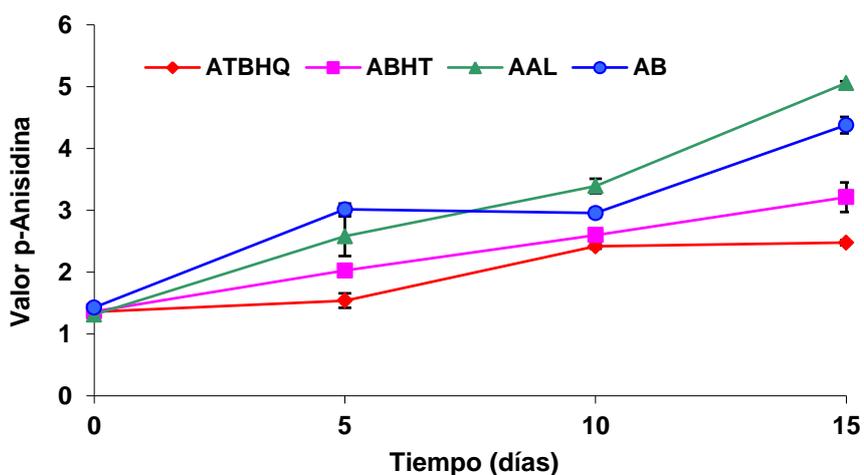


Figura 20: Valores de *p*-Anisidina para las muestras de aceite de soya evaluadas durante el almacenamiento a 55 °C

Al día 0 los aceites para los diversos tratamientos presentaron valores de *p*-A cercanos a 1.4 meq O₂/kg aceite. Para los tiempos 5, 10 y 15 días, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en los valores de *p*-A entre los tipos de antioxidantes evaluados. Los valores de *p*-A hacia el final de las pruebas aceleradas para los tratamientos ATBHQ, ABHT, AB y AAL fueron 2.47, 3.21, 4.73 y 5.05; respectivamente. Nuevamente se

encontró que los antioxidantes sintéticos TBHQ y BHT protegieron al aceite crudo desgomado de soya de la oxidación más eficazmente respecto al aceite sin antioxidantes, al evitar la formación de un mayor número de compuestos secundarios producto de la oxidación del aceite de soya.

El valor de *p*-A alcanzado por el aceite de soya sin antioxidante (4.73) al final del almacenamiento, fue mucho más alto del reportado por Naz *et al.* (2004) para aceite de soya almacenado a 30 °C por el mismo tiempo (0.33), la mayor temperatura empleada en esta investigación pudo ser la causa de la diferencia en estos valores, al favorecer la aparición de las reacciones secundarias de la oxidación en el aceite de soya.

El extracto fenólico de residuos de alcachofa aplicado a la concentración de 200 ppm (AAL), no mostró efecto protector frente a la oxidación del aceite de soya, presentando al final del almacenamiento un valor de *p*-A (5.05) superior a los encontrados para los aceites AB, ABHT y ATBHQ. Estos resultados confirman que el extracto de alcachofa no presentó propiedades antioxidantes para prevenir la oxidación del aceite de soya bajo las condiciones evaluadas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para el IP y el valor de *p*-A, la eficacia antioxidante en orden decreciente de los tipos de antioxidantes evaluados presentó el siguiente orden: ATBHQ > ABHT > AB ≥ AAL.

Con la finalidad de tener mayor información sobre lo acontecido en la prueba de almacenamiento acelerado se decidió evaluar lo que sucedió a nivel de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, obtenido a partir de residuos sólidos de alcachofa, durante el curso del proceso oxidativo en almacenamiento generado en el aceite de soya.

4.4.3 Perfil de compuestos fenólicos identificados por HPLC-PAD en el extracto de alcachofa durante las pruebas de almacenamiento acelerado

En la Figura 21 se muestran los cromatogramas de los compuestos fenólicos del extracto obtenidos de la harina de residuos de alcachofa para los días 0, 10 y 15 de almacenamiento acelerado obtenidos por HPLC-PAD a 320 nm de longitud de onda. No se evaluó el día 5 porque no ocurrieron mayores cambios respecto al día cero cuando se evaluó el IP ($p < 0.01$).

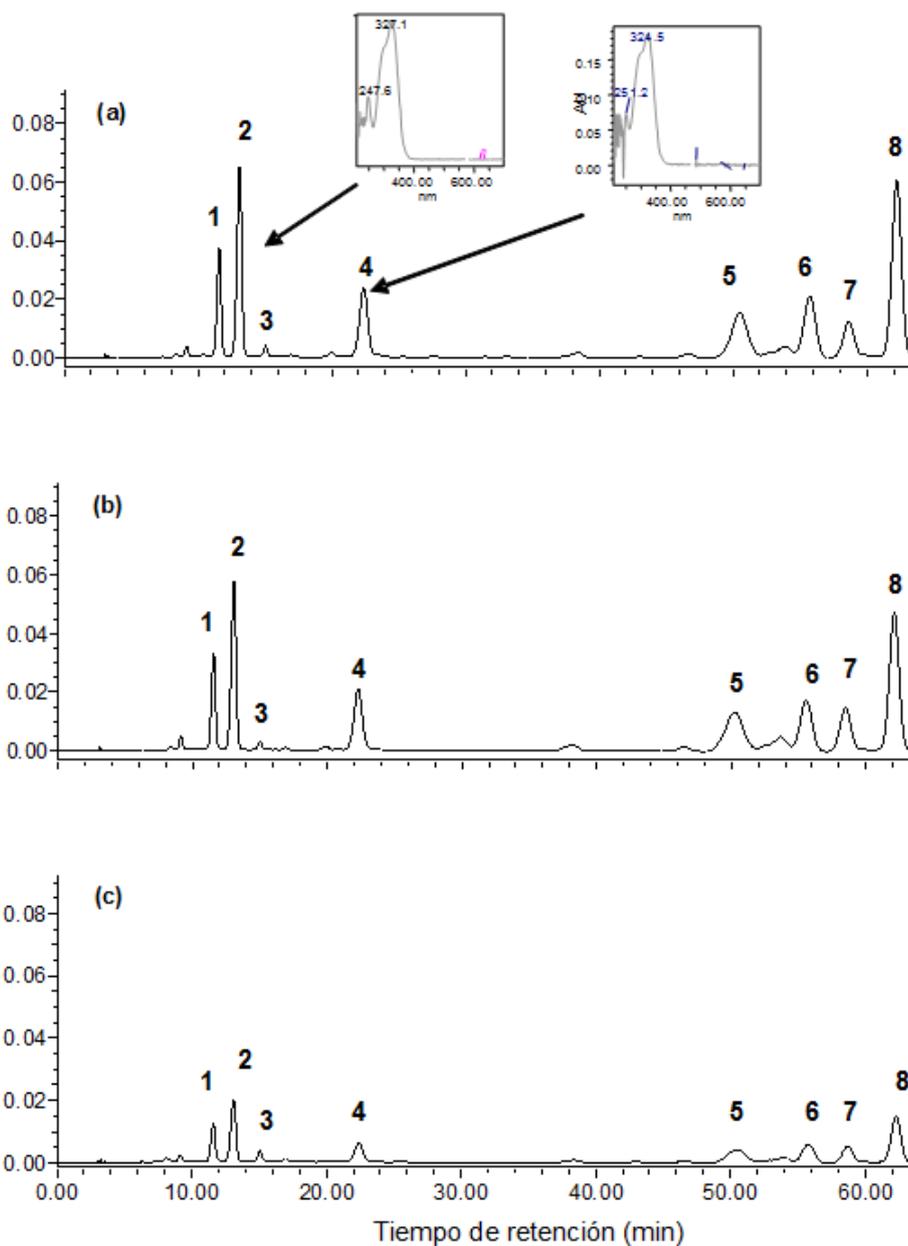


Figura 21: Cromatogramas a 320 nm para los extractos fenólicos de los residuos de alcachofa aplicados en aceite de soya sometidos a 55 °C a 0 (a), 10 (b) y 15 (c) días de almacenamiento acelerado

Es importante recalcar que cuando los compuestos fenólicos de alcachofa fueron evaluados a otras longitudes de onda, como 280 y 360 nm, bajo las cuales absorben principalmente los ácidos hidroxibenzoicos, flavanoles y flavanonas, y los flavonoles, respectivamente, no se encontraron más picos que los reportados a 320 nm; esto quiere decir que los extractos de los residuos de alcachofa obtenidos estuvieron compuestos principalmente por ácidos hidroxicinámicos y/o flavonas.

Al día cero de almacenamiento (Figura 21a) un total de 8 picos representativos fueron encontrados y cuando sus espectros de absorción fueron comparados con los encontrados para los estándares previamente inyectados, se observó que todos pertenecieron a la familia de los ácidos cinámicos del tipo clorogénico y cafeico. Estos resultados están en concordancia con los reportados por Llorach *et al.* (2002) y Sánchez-Rabaneda *et al.* (2003), quienes encontraron que los componentes fenólicos mayoritarios en la alcachofa son los ácidos hidroxicinámicos: cafeico y clorogénico, sin embargo la presencia de flavonas como la apigenina y luteolina y los flavonoles como la quercitina, también fueron encontrados por los mismos investigadores. En esta investigación no se encontraron estos últimos tres fenólicos en los extractos, probablemente esto se deba a la variedad de alcachofa y las condiciones de las actividades culturales (Sukhwant *et al.*, 1992) pero también otras causas podrían ser que en este trabajo solo se incluyen los residuos y las condiciones de extracción.

Así, los picos 1, 2, 4, 5, 7 y 8 correspondieron a fenólicos derivados del ácido clorogénico; mientras que los picos 3, 4 y 6 correspondieron a los derivados del ácido cafeico. En la Figura 21a, se aprecian a manera de ejemplo los espectros obtenidos para los pico 2 y 4 que corresponden a los compuestos derivados de ácido clorogénico (λ máx. 327 nm) y cafeico (λ máx. 324 nm); respectivamente. Las cantidades y porcentajes de participación de cada uno de ellos (medidos a 320 nm) para los diferentes días de almacenamiento se aprecian en la Tabla 21.

Los días 0 y 10 de almacenamiento presentaron un perfil de fenólicos semejantes (Figura 21a y b), tendiendo a disminuir el conjunto de los fenólicos detectados hacia el día 10 (de 131.1 a 111.0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). La disminución de los fenólicos fue más marcada hacia el día 15 de almacenamiento (Figura 21c). Obteniéndose 34.5 $\mu\text{g/ml}$ lo que representa sólo el 26.3 % del contenido inicial de fenólicos. También, al día 15 se observó la desaparición del pico 3 y la aparición de un nuevo pico (pico 9) con las mismas características espectrales del pico 3, probablemente el pico 9 fue un producto derivado de este último. De otro lado, se observó que durante el curso del almacenamiento la proporción de derivados de ácido clorogénico y ácido cafeico en porcentaje fue casi la misma, siendo siempre los derivados del ácido clorogénico mayoritarios (Tabla 21).

Tabla 21: Variación de los contenidos fenólicos de los extractos de residuos de alcachofa en el aceite de soya almacenado a 55 °C

Pico N°	Tiempo de retención (min)	Compuesto fenólico asignado	Día cero Concentración (µg/ml)	Día diez Concentración (µg/ml)	Día quince Concentración (µg/ml)
1	11.6	Derivado del ácido clorogénico	12.3	8.9	4.5
2	13.1	Derivado del ácido clorogénico	25.6	18.6	8.5
9	15.0	Derivado del ácido cafeico	--	--	0.7
3	15.4	Derivado del ácido cafeico	0.4	2.3	--
4	22.4	Derivado del ácido cafeico	7.8	7.1	1.6
5	50.1	Derivado del ácido clorogénico	19.1	16.8	3.2
6	55.8	Derivado del ácido cafeico	9.4	7.3	2.4
7	58.7	Derivado del ácido clorogénico	12.4	10.0	4.0
8	62.3	Derivado del ácido clorogénico	44.0	39.9	9.7
Total derivado A. clorogénico (µg/ml, %)			113.3 (86.5%)	94.3 (84.7%)	29.9 (86.6%)
Total derivado A. cafeico(µg/ml, %)			17.6 (13.5%)	16.7 (15.1%)	4.6 (13.4%)
Total fenólicos (µg/ml)			131.1	111.0	34.5

La desaparición en conjunto de los fenólicos de la alcachofa durante almacenamiento acelerado nos indica que los fenólicos iban consumiéndose bajo las condiciones de almacenamiento acelerado (presencia de oxígeno y temperatura de 55 °C).

El efecto del ácido cafeico (hidroxicinámico) como antioxidante en aceites ha sido previamente reportada y evidenciada por Naz *et al.* (2004). De otro lado, Hynes y O'coinceanainn (2004) indican que el ácido cafeico es conocido por inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) así como también, proteger al aceite de oliva frente a la oxidación catalizada por metales. De esto, se podría afirmar que la presencia en

su mayoría del ácido clorogénico (85-86%) respecto al ácido cafeico (14-15%) en los extractos de alcachofa pudo haber sido el origen de la poca efectividad del extracto frente a la oxidación del aceite de soya. No se descarta la posibilidad de un efecto pro-oxidante de los fenólicos de la alcachofa a la concentración evaluada.

4.5 Estimación del beneficio ambiental y económico para la producción de extractos fenólicos a partir de residuos sólidos provenientes de industrialización de alcachofa

La actividad en la industria que transforma vegetales genera cantidades importantes de residuos y subproductos orgánicos que pueden generar, si se gestionan adecuadamente, un beneficio económico y ambiental. Por lo general, los restos orgánicos generados, en la transformación de vegetales, oscilan entre un 13% y un 65% de materia prima procesada (Ros *et al.*, 2012). En el caso de los residuos sólidos de alcachofa, provenientes del proceso de industrialización, éstos consisten principalmente en las partes externas de las flores, las que comúnmente son conocidas como brácteas, y los tallos, lo que se comprobó en esta investigación al realizar la evaluación de los residuos en la planta de procesamiento (Acápita 4.1.1) Estas partes no son aptas para el consumo humano y generalmente se descarta como residuo sólido (Zuorro *et al.*, 2016). Con estos antecedentes, en esta sección se presenta una estimación del beneficio ambiental y económico de las alternativas de aprovechamiento de residuos como una estrategia de gestión de residuos (Pereira y Lee, 2016) para manejar los desechos generados por la industrialización de la alcachofa.

Según Federici *et al.* (2009), Negro *et al.* (2012) y Zuorro *et al.* (2016) sostienen que la industria procesadora de alcachofa genera alrededor del 80-85% de residuos sólidos altamente perecibles, lo que produciría problemas ambientales de no realizar una adecuada gestión de los mismos. Este porcentaje se pudo corroborar en la planta de procesamiento

Las pocas acciones de manejo para aliviar este problema ambiental (alta generación de residuos sólidos perecibles) son destinar estos residuos para alimentación animal, como forraje verde o seco; y fibras y concentrados para animales menores, con lo que se evita la contaminación del medio ambiente por la acumulación de residuos que de por sí podría degradarse naturalmente (Llorach *et al.*, 2002; Sánchez-Rabaneda, 2003; Viniegra *et al.*, 2002; Velarde, 2006; Schieber *et al.*, 2001, citados por Balasundram *et al.*, 2006). La obtención de una adecuada tecnología que permita transformar estos residuos y

subproductos orgánicos en productos que generen un beneficio económico y ambiental, es clave para obtener el máximo potencial de algunos de estos residuos y no simplemente la alimentación animal de forma directa o su disposición final al relleno sanitario (Ros *et al.*, 2012). Además, se reduce la cantidad de residuos y subproductos orgánicos que serían destinados al relleno sanitario, con lo que se reduce la cantidad de lixiviados al medio ambiente (Jacob *et al.*, 2003). En lo que respecta, a la agroindustria nacional que procesa alcachofa, Velarde (2006) señaló que esta agroindustria peruana, por lo general, destina los residuos sólidos generados para alimentación animal.

Si bien es cierto, que el destinar los residuos para alimentación animal evita su acumulación, se conoce que los subproductos generados de las actividades agroindustriales tienen una cantidad importante de compuestos de interés, como por ejemplo compuestos bioactivos (polifenoles) (Schieber *et al.*, 2001 citados por Balasundram *et al.*, 2006; Zuorro y Lavecchia, 2012; Ros *et al.*, 2012; Ayuso *et al.*, 2013; Zuorro, 2015; Zuorro *et al.*, 2016). Con estos antecedentes, se realizó la presente investigación sobre la utilidad potencial que se le daría a estos residuos y subproductos, que serían fuentes de antioxidantes naturales que podrían ser eficaces en la protección contra la oxidación de alimentos oleosos y de aceites vegetales. Así, para cada uno de los componentes de los residuos sólidos de alcachofa evaluados, se determinó el contenido de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (Acápite 4.1.2). Estos resultados confirman que la obtención de compuestos fenólicos a partir de estos residuos es una forma de valorizar estos residuos, y que al obtener estos compuestos fenólicos que podrían ser empleados en la industria, se generaría un beneficio ambiental y también económico.

Ros *et al.* (2012) señalan que el sector de industrialización de vegetales genera una diversidad de residuos y subproductos orgánicos con un potencial energético muy interesante y con unas características de composición adecuadas para la codigestión anaerobia, y generados en cantidades que hacen viable la aplicación de esta tecnología para su valorización; la que es aplicada en países como Dinamarca, Alemania, Suecia, Italia, Austria y Francia; y en el Perú aún esta tecnología no está desarrollada. Por eso, con el empleo de la tecnología de recuperación de compuestos fenólicos obtenidos de los subproductos de industrialización de la alcachofa, se evitaría su destino a la producción de biogás (mezcla de CH₄ y CO₂), cuyo componente principal es el metano (Ros *et al.*, 2012).

En la Tabla 22 se presentan las características de las alternativas de aprovechamiento y/o disposición de los residuos sólidos generados por la industrialización de alcachofa en el Perú.

Tabla 22. Características de las alternativas de aprovechamiento y/o disposición de residuos sólidos generados por la industrialización de alcachofa

Alternativa	Características
Alimentación animal	Recojo de residuos sólidos acopiados, por parte de entidad interesada
Disposición en relleno sanitario	Contratación del servicio de EPS para disposición de los residuos sólidos generados en el relleno sanitario
Producción de compost	Envío a la zona de tratamiento de residuos para la elaboración de compost
Extracción de compuestos fenólicos	Obtención de compuestos fenólicos con solución hidroalcohólica, a partir de residuos sólidos previamente deshidratados

Con respecto a la primera alternativa, en el caso de destinar los residuos sólidos de alcachofa para la alimentación animal, esta actividad no representa ningún costo para la empresa agroindustrial. Este costo es asumido por la entidad interesada, es decir, aquella que tiene interés en adquirir los residuos, lo que no perjudica a la empresa agroindustrial. El acopio es diario, los residuos son recogidos por la entidad interesada cuando termina el proceso productivo. Al respecto, Velarde (2006) manifestó que el ingreso que recibe la empresa agroindustrial (S/. 4.00 nuevos soles por tonelada), por la venta de éstos residuos, solamente es suficiente para mantener las áreas verdes de la empresa mensualmente.

En caso de disponer los residuos orgánicos en el relleno sanitario (segunda alternativa), esto implicaría un costo para la empresa agroindustrial procesadora de alcachofa, siendo éste de S/. 5.00 nuevos soles por tonelada. Y la disposición final en el relleno sanitario de Huaycoloro (como este), que sería realizado por la EPS Petramas, es de S/. 23.60 nuevos soles por tonelada; siendo el costo total S/. 28.60 nuevos soles por tonelada de residuo generado (Ramírez, 2015). No obstante, según lo que se detalló en los acápite 2.2.5 y 2.2.6, estos residuos son una fuente importante para la recuperación de compuestos fenólicos, con lo que se le daría una gran valorización a estos residuos.

En lo que respecta a la tercera alternativa, el proceso de compostaje es un procedimiento controlado de degradación biológica aeróbica de residuos y subproductos orgánicos, el cual pasa por una fase termófila que asegura que el producto final se encuentre libre de patógenos y semillas de malas hierbas, y un proceso de maduración en el que dan lugar a un producto final bioestabilizado (compost). Su utilización como enmienda orgánica de suelos incrementa el contenido de materia orgánica en el suelo, mejora la capacidad de retención hídrica del suelo, actúa como una fuente de nutrientes a largo plazo y algunos de ellos tienen cierta capacidad para controlar enfermedades de plantas. La obtención de compost a partir de lodos de depuración de la industria de transformados vegetales y restos vegetales se ha realizado con éxito (Ros *et al.*, 2012). En el caso de los residuos sólidos de alcachofa, para destinar estos residuos a la elaboración de compost, la empresa agroindustrial podría vender los residuos a otra empresa interesada que se dedica a la elaboración de compost. La empresa que elabora el compost paga en promedio S/. 4.00 nuevos soles por cada tonelada de residuos sólidos recogidos (Ramírez, 2015).

El destinar los residuos para la recuperación de compuestos fenólicos (cuarta alternativa), implicaría la venta de estos residuos a una empresa interesada que se dedique a la recuperación de estos compuestos. Los costos por materia prima, reactivos químicos, uso de equipos, agua, energía y otros recursos sería aproximadamente de S/. 400.00 nuevos soles, los que serían asumidos por la empresa interesada. Lo más importante es que los residuos y subproductos orgánicos serían utilizados en la recuperación de compuestos fenólicos, que tienen demanda mundial; y con aplicación en diferentes industrias, principalmente en la industria alimentaria. Los compuestos fenólicos son obtenidos con soluciones hidroalcohólicas, amigables con el medio ambiente (Zuorro, 2014), y que son de uso permitido en la industria alimentaria; no causarían efectos perjudiciales ni a la salud de las personas ni al medio ambiente (Zuorro 2014, Zuorro *et al.*, 2016).

Con esta última alternativa, se podría gestionar adecuadamente estos residuos, pues se ha demostrado que son una fuente importante para la recuperación de compuestos fenólicos; con lo que se evitaría la disposición final de estos residuos en un relleno sanitario, espacio que debería ser empleado para la disposición de residuos peligrosos y no para residuos a los que se les puede dar una valorización determinada y disminuir así la generación de lixiviados y gases que podrían contaminar el medio ambiente. Además, considerando que mensualmente se exporta un peso neto promedio 2 023.7 toneladas de alcachofas en

conserva (SUNAT, 2016), se habrían generado en promedio 7 762.9 toneladas de residuos mensuales a nivel nacional; esta considerable cantidad de residuos podrían ser aprovechados logrando la valorización de los mismos, lo que beneficia al medio ambiente y se lograría un beneficio económico para la empresa dedicada a este procesamiento, pues los compuestos fenólicos están muy bien valorizados en el mercado internacional.

VI. CONCLUSIONES

1. Los residuos sólidos generados al final del procesamiento de alcachofa representan un 77.64 por ciento de la cantidad de alcachofa que ingresa al procesamiento.
2. Las variables que influyen en la obtención de compuestos fenólicos a partir de la harina de residuos de alcachofa son: la relación de materia prima/solvente (m/v), el solvente de extracción (% , etanol/agua) y el tiempo de extracción (min).
3. Las condiciones óptimas de extracción de los compuestos fenólicos, determinada mediante el MSR, a partir de la harina de residuos de alcachofa fueron de 1/60 para la relación de materia prima/solvente (m/v), solvente de extracción 60.5% (etanol/agua) y 30 min para el tiempo de extracción.
4. El extracto pre-purificado obtenido a partir de residuos de alcachofa, utilizado a una concentración de 200 ppm, no protegió al aceite de soya crudo al final de los 15 días de almacenamiento acelerado, en comparación con los antioxidantes sintéticos.
5. Mediante el HPLC-PAD se determinó que dos fueron los compuestos mayoritarios en los extractos de alcachofa, agrupándose estos como derivados del ácido clorogénico y del ácido cafeico, estando presente los primeros en una mayor cantidad (~ 85%) respecto a los segundos.
6. El análisis de los compuestos fenólicos totales usando la técnica de HPLC-PAD, mostró que el conjunto disminuyó en un 73.7 por ciento al final del almacenamiento acelerado a 55 °C.
7. La recuperación de compuestos fenólicos a partir de residuos sólidos del procesamiento de alcachofa, es una alternativa importante para lograr la valorización de los residuos.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la aplicación del extracto de residuos de alcachofa en otra matriz, como antioxidante natural, como por ejemplo carne o productos cárnicos.
- Evaluar el extracto de alcachofa en concentraciones mayores y en sinergismo con otros antioxidantes tales como el ácido ascórbico, tocoferoles u otros antioxidantes naturales de origen fenólico.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Reidah, I; Arraez-Roman, D; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Extensive characterization of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry* 141(3): 2269-2277.
2. AOAC (Association of Analytical Chemistry, Estados Unidos de América).1990. Official Methods of Analysis. N-984.25. Vol 2. Editorial Board.
3. Araújo, JMA. 1999. Food chemistry - Theory and Practical. 2ª revised ed. UFV.
4. Arnao, M; Cano, A; Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73(2): 239-244.
5. Ayuso, M; Morales, A; Gómez, A; Martínez, S; Ros, M; Pascual, J. 2013. Estrategias sostenibles para la gestión y valorización integrada de residuos orgánicos de la industria de frutas y hortalizas. Compuestos de interés en subproductos vegetales generados en el procesado de frutas y hortalizas. *CTC Alimentación* 55: 22-30.
6. Bailey, EA. 1979. Aceites y grasas industriales. Segunda edición. Barcelona. Editorial Reverté S.A. 741 p.
7. Balasundram, N; Sundram, K; Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*99(1): 191-203.
8. Bas, D; Boyaci, I. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78(3):836-845.
9. Bodoni, ME; Del Valle, MA; Leighon, F; Gonzales, L. 2001. Study of iron catechin complexes in dimethyl sulphoxide. Redox chemistry and interaction with superoxide radical anion in this medium. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46(3): 309-317.
10. Box, G; Draper, N. 1987. Empirical Model-Building and Response Surfaces. John Wiley & Sons. Inc. New York – U.S.A. 669 p.
11. Braverman, J. 1990. La bioquímica de los alimentos. Editorial El Manual Moderno S.A. México D.F.

12. Cacace, JE; Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59(4): 379-389.
13. Calderón, C; Gutarra, R; Huamanchaqui, J; Inga, A; Marmanilla, A; Vizcarra, H. 2001. *Manual de la Alcachofa*. Instituto de Desarrollo Andina del Perú - IDEA. Lima - Perú. 26 p.
14. Campos, D; Chirinos, R; Betalleluz, I; Rogez, H; Pedreschi, R; Larondelle, Y. 2007. Antioxidant phenolics from mashua tuber protect against oxidation during storage and frying of soybean oil. *Libro de resúmenes. IFT Annual Meeting (2007, Chicago, Estados Unidos de América)*. Chicago, Estados Unidos. 120 p.
15. Claus, T; Maruyama, S; Palombini, S; Montanher, P; Bonafé, E; Santos, O; Matsushita, M; Visentainer, J. 2015. Chemical characterization and use of artichoke parts for protection from oxidative stress in canola oil. *LWT-Food Science and Technology* 61(2): 346-351.
16. Coinu, R; Carta, S; Urgeghe, P; Mulinacci, N; Pinelli, P; Franconi, F; Romaní, A. 2007. Dose-effect study on the antioxidants properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from *Viолleto di Toscana* artichoke. *Food Chemistry* 101(2): 524-531.
17. CONAMA (Comisión Nacional del Medio Ambiente, Chile). 1998. *Industria Procesadora de Frutas y Hortalizas. Guía para el Control y Prevención de la Contaminación Industrial*. Santiago de Chile, Chile. 54 p.
18. Conidi, C; Cassano, A; Garcia-Castello, E. 2014. Valorization of artichoke wastewaters by integrated membrane process. *Water research* 48: 363-374.
19. Christaki, E; Bonos, E; Florou-Paneri, P. 2012. Nutritional and functional properties of *Cynara* crops (globe artichoke and cardoon) and their potential applications: a review. *International Journal Applying Science Technology* 2(2): 64-70.
20. Elain, A; Le Grand, A; Corre, YM; Le Fellic, M; Hachet, N; Le Tilly, V; Bruzaud, S. 2016. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops and Products* 80: 1-5.
21. Fan, G; Han, Y; Gu, Z; Chen, D. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT-Food Science and Technology* 41(1): 155-160.
22. FAO/LATINFOODS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2002. *Tabla de Composición de Alimentos de América Latina*(en

- línea). Roma, Italia. Consultado 29 ene. 2008. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/bases/alimento>.
23. FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2015. Food and Agricultural Commodities Production. Data. Roma, Italia. Consultado 29 dic. 2015. Disponible en <http://faostat3.fao.org>.
 24. Federici, F; Fava, F; Kalogerakis, N; Mantzavinos, D. 2009. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill waste waters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(6): 895-900.
 25. Ferreira, SLC; Bruns, RE; Ferreira, HS; Matos, GD; David, JM; Brandao, GC; da Silva, EGP; Portugal, LA; dos Reis, PS; Souza, AS; dos Santos, WNL. 2007a. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597(2): 179-186.
 26. Ferreira, SLC; Bruns, RE; da Silva, EGP; dos Santos, WNL; Quintella, CM; David, JM; de Andrade, JB; Breitzkreitz, MC; Sales, IC; Barros, N. 2007b. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 1158(1):2-14.
 27. Fki, I; Allouche, N; Sayadi, S. 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry* 93(2): 197-204.
 28. Frankel, E. 1996. Antioxidant in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry* 57(1): 51-55.
 29. Fristche, J; Beindorff, C; Dachtler, M; Zhang, H; Lammers, J. 2002. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *European Food Research and Technology* 215(2):149-157.
 30. Fukumoto, LR; Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolics compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8):3597-3640.
 31. Gaafar, AA; Salama, ZA. 2013. Phenolic compounds from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products and their antimicrobial activities. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 3(12): 1-6.
 32. García, R. 1988. Horticultura. Segunda edición. Salvat Editores S.A. Barcelona - España. 411 p.
 33. Goli, AH; Barzegar, M; Sahari, MA. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistacho (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry* 92(3): 521-525.

34. Henrique, MA.; Silvério, HA.; Neto, WPF; Pasquini, D. 2013. Valorization of an agro-industrial waste, mango seed, by the extraction and characterization of its cellulose nanocrystals. *Journal of environmental management* 121: 202-209.
35. Hertog, MG; Feskens, EJ; Hollman, PC; Katan, MB; Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 342(8878):1007-1011.
36. Hynes, MJ; O'Coinceanainn, M. 2004. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98(8): 1457-1464.
37. INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria, Perú). 2016. Nueva variedad de alcachofa "Lorca" llega al valle de Chancay-Huaral gracias a tecnología del INIA (en línea). Lima, Perú. Consultado 12 mar. 2016. Disponible en <http://www.inia.gob.pe/sala-de-prensa/notas-de-prensa/935-2015-nota-035>
38. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática, Perú). 2015. Compendio Estadístico Perú 2015 (en línea). Lima, Perú. Consultado 13 mar. 2015. Disponible en https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1253/cap12/ind12.html
39. IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, Reino Unido). 1987. Method Number 2.504-Determination of the *p*-Anisidine value (p-AV). *In: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 7th ed. C. Paquot & A. Hautfenne (Eds.), Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
40. Jacob, S; Menna, M; Plaza, G; Pacheco, O; Branda, J; Murcia, G. 2003. Reformulación del sistema de manejo de residuos. Identificación de Impactos Ambientales. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 7(1): 1-41.
41. Kosseva, MR. 2013. Functional food and nutraceuticals derived from food industry wastes. *En: Food industry wastes: assessment and recuperation of commodities*. Academic, Waltham, 103-120.
42. Lattanzio, V; Kroon, P; Linsalata, V; Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of functional foods* 1(2): 131-144.
43. Liyana-Pathirana, CH; Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93(1): 47-56.

44. Llorach, R; Espín, JC; Tomás-Barberán, FA; Ferreres, F. 2002. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(12): 3458-3464.
45. López-Molina, D; Hiner, AN; Tudela, J; García-Cánovas, F; Rodríguez-López, JN. 2003. Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme and microbial technology* 33(5): 738-742.
46. Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; Remesy, C; Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.
47. Marfil, R. 1991. Una herramienta para el mejoramiento de la calidad. *Tecnología de alimentos*. Vol. 25, N° 5. México.
48. Maroto, J. 1992. *Horticultura herbácea especial*. Ediciones Mundi-Prensa. Tercera edición, Madrid, España. 568 p.
49. Martínez-Valverde, I; Periago, M; Ros, G. 2000. Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50(1): 5-18.
50. MAXIMIXE (Maximixe Consult S.A., Perú). 2007. Gran demanda de alcachofa. En *Alimentos y Bebidas*, revista de la Industria Alimentaria. Año V, Edición N° 32, p. 12-15.
51. MAXIMIXE (Maximixe Consult S.A., Perú). 2016. Nueva planta procesadora en Cusco industrializará 200 toneladas de alcachofa por día (en línea). Lima, Perú. Consultado 11 feb. 2016. Disponible en <http://alertaeconomica.com/nueva-planta-procesadora-en-cusco-industrializara-200-toneladas-de-alcachofa-por-dia/>
52. MINAG (Ministerio de Agricultura, Perú). 2008. On line http://www.minag.gob.pe/dgpa1/?mod=cad_alcachofa_est. http://www.minag.gob.pe/agricola/pro_hortalizas.shtml
53. Mirabella, N.; Castellani, V.; Sala, S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal Cleaner Production* 65: 28-41.
54. Montgomery, D. 2003. *Diseño y análisis de experimentos*. Editorial Limusa S.A., México D.F., México. 686 pp.
55. Mortensen, E; Bullard, E. 1971. *Horticultura Tropical y Subtropical*. Centro Regional de ayuda Tecnológica. Segunda Edición. Agencia para el Desarrollo Industrial - AID. México D.F. 182 p.

56. Mousavi, S.M; Yaghmaei, S; Jafari, A; Vossoughi, M; Ghobadi, Z. 2007. Optimization of ferrous biooxidation rate in a packed bed bioreactor using Taguchi approach. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 46(10): 935-940.
57. Mulinacci, N; Prucher, D; Peruzzi, M; Romani, A; Pinelli, P; Giaccherini, C; Vincieri, F.F. 2004. Comercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34(2): 349-357.
58. Naczk, M; Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics on food. *Journal of Chromatography A*,1054(1):95-111.
59. Naz, S; Sheikh, H; Siddiqi, R; Asad Sayeed, S. 2004. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. *Food Chemistry* 88(2): 253-259.
60. Negro, D; Montesano, V; Grieco, S; Crupi, P; Sarli, G; De Lisi, A; Sonnante, G. 2012. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *Journal of Food Science* 77(2): 244-252.
61. Nepote, V; Grosso, N.R; Guzmán, C.A. 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanuts skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(1): 33-338.
62. Oreopoulou, V; Russ, W. 2007. Utilization of Plants By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants and Colorants. *In: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Editado por Vasso Oreopoulouy Winfried Russ, Editorial Springer, New York. p. 209-232.
63. Pandino, G; Lombardo, S; Mauromicale, G; Williamson, G. 2011. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(2): 148-153.
64. Pandino, G; Lombardo, S; Mauromicale, G. 2013. Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products* 44: 44-49.
65. Pazos, M; Gallardo, JM; Torres, JL; Medina, I. 2005. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry* 92(3): 547-557.
66. Pereira, JP.; Lee, L. 2016. Economic and environmental benefits of waste-to-energy technologies for debris recovery in disaster-hit Northeast Japan. *Journal of Cleaner Production* 112: 4419-4429.

67. Peschel, W; Sánchez Rabaneda, F; Diekmann, W; Plescher, A; Gartzia, I; Jimenez, D; Lamuela-Raventós, R; Buxaderas, S; Codina, C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97(1): 137-150.
68. Ramírez, A. 2015. Comunicación personal.
69. Rehman, Z; Habib, F; Shah, W.H. 2004. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. *Food Chemistry* 85(2): 215-220.
70. Robles, F. 2001. La alcachofa: Nueva alternativa para la Agricultura Peruana. Comisión para la Promoción de Exportación - PROMPEX. Lima. 43 p.
71. Rodríguez-Saona, L; Wrolstad, R.E. 2001. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F.1.1.1-F.1.1.13. John Wiley & Sons Inc., New York.
72. Ros, M; Pascual, J; Ayuso, M; Morales, A; Miralles, J; Solera, C. 2012. Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortalizas: proyecto Life+ Agrowaste. *Residuos* 130: 2-9.
73. Sánchez-Rabaneda, F; Jáuregui, O; Lamuela-Raventós, RM; Bastidas, J; Viladomat, F; Codina, C. 2003. Identification of phenolics compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1008(1): 57-72.
74. Schütz, K; Kammerer, D; Carle, R; Schieber, A. 2004. Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, Juice and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(13): 4090-4096.
75. Senanayake, SPJN; Shahidi, F. 2002. Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DMA) into borage oil: optimization using response surface methodology. *Food Chemistry* 77(1): 115-123.
76. Shukla, S, Gupta, S. 2010. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research* 27(6): 962-978.
77. Sikwese, FE; Duodu, KG. 2007. Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. *Food Chemistry* 104(1):324-331.
78. Silva, EM; Rogez, H; Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 55(3): 381-387.

79. Suja, KP; Abraham, JT; Tamiz, SN; Jayalekshmy, A; Arumughan, C. 2004. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry* 84(3): 393-400.
80. Sukhwant, MK; Harvinder, K; Tejinder, G. 1992. Effect of cooking on fibre content of vegetables. *Journal of Food Science and Technology* 29(3):185-186.
81. SUNAT (Superintendencia Nacional de Aduanas y de Administración Tributaria, Perú). 2015. Boletín 2015: Estadísticas de Comercio Exterior(Cuadro N° 18: (Principales Subpartidas Nacionales por Sector Económico)).Lima, Perú. Consultado 24 abr. 2016.Disponible en: http://www.sunat.gob.pe/estad-comExt/modelo_web/Bol2015.htm.
82. SUNAT(Superintendencia Nacional de Aduanas y de Administración Tributaria, Perú). 2016. Boletín 2016: Estadísticas de Comercio Exterior (Cuadro N° 18: (Principales Subpartidas Nacionales por Sector Económico)). Lima, Perú. Consultado 24 abr. 2016.Disponible en: http://www.sunat.gob.pe/estad-comExt/modelo_web/Bol2016.htm.
83. Swain, T; Hills, WE.1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*10(1): 63-68.
84. Velarde, O. 2006. Comunicación personal.
85. Viniegra, V; Sierra, O; Jáuregui, J. 2002. Gestión y tratamiento de residuos sólidos orgánicos de la industria de transformados vegetales (en línea). Centro Técnico Nacional de Conservas Vegetales, Laboratorio del Ebro. Navarra, España. Consultado 23 jun. 2004. Disponible en: http://www.infoagro.com/conservas/residuos_conservas_vegetales.htm.
86. Wang, M; Simon, JE; Aviles, F; He, K; Zheng, QY; Tadmor, Y. 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3): 601-608.
87. Wanasundara, UN; Shahidi, F. 1998. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry* 63(3): 335-342.
88. Zuorro, A; Lavecchia, R. 2012. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production* 34: 49-56.
89. Zuorro, A. 2014. Response surface methodology analysis of polyphenol recovery from artichoke waste. *American Journal of Applied Science* 11(9): 1463-1471.

90. Zuorro, A, Maffei, G, Lavecchia, R. 2014. Effect of solvent type and extraction conditions on the recovery of phenolic compounds from artichoke waste. *Chemical Engineering Transactions* 39 (Special Issue): 463-468.
91. Zuorro, A. 2015. Optimization of polyphenol recovery from espresso coffee residues using factorial design and response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 152: 64-69.
92. Zuorro, A, Maffei, G, Lavecchia, R. 2016. Reuse potential of artichoke (*Cynara scolymus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production* 111: 279-284.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de varianza para compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en el *screening* de Taguchi con arreglo ortogonal L₈ (2)⁷

Factor	FT				CA		
	GL	Suma de cuadrados	F	P	Suma de cuadrados	F	p
(A)	1	30,021	11,27	0,0040	5,825	7,43	0,0149
(B)	1	2066,610	776,15	0,0000	1074,490	1371,04	0,0000
(A x B)	1	57,472	21,58	0,0003	220,589	281,47	0,0000
(C)	1	4,408	1,66	0,2165	0,858	1,10	0,3109
(A x C)	1	30,461	11,44	0,0038	6,532	8,33	0,0107
(D)	1	25,645	9,63	0,0068	7,145	9,12	0,0081
(A x D)	1	76,855	28,86	0,0001	0,238	0,30	0,5889
Residual	16	42,602			12,539		

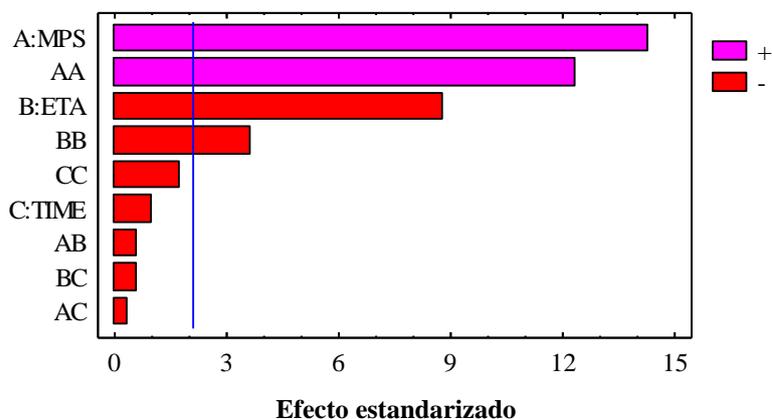
donde,

FT es contenido de compuestos fenólicos totales (mg ACE / g m.s.), **CA** es capacidad antioxidante (μmol Trolox eq/g m.s.).

A es relación solvente/materia prima, **B** es solvente de extracción, **C** es temperatura de extracción, **D** es tiempo de extracción time, **AxB** es interacción A y B, **AxC** es interacción A y C; y **AxD** es interacción A y D.

ANEXO 2. Análisis de superficie de respuesta para los compuestos fenólicos totales

Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño aplicado



Análisis de varianza de la regresión para compuestos FT a partir de harina de residuos de alcachofa en la optimización

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p
A:MPS	2351.28	1			0.0000
B:ETA	890.426	1	890.426	77.58	0.0000
C:TIME	11.189	1	11.189	0.97	0.3359
AA	1755.74	1	1755.74	152.98	0.0000
AB	4.24861	1	4.24861	0.37	0.5501
AC	1.36951	1	1.36951	0.12	0.7336
BB	152.754	1	152.754	13.31	0.0017
BC	3.82261	1	3.82261	0.33	0.5706
CC	35.7618	1	35.7618	3.12	0.0936
Bloques	0.0128133	1	0.0128133	0.00	0.9737
Error total	218.061	19	11.4769		
Total (Corr.)	5546.6	29			

R-cuadrado = 96.0686 por ciento

R-cuadrado (ajustado por GL) = 94.2994 por ciento

Coefficientes de la regresión para compuestos FT

Constante	51.95
A: MPS	-2.3635
B: ETA	0.452417
C: TIME	0.339208
AA	0.0385484
AB	-0.00121458
AC	-0.000689583
BB	-0.00505347
BC	-0.000768056
CC	-0.00244514

Esta información muestra la ecuación de regresión que se ajusta a la data. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned}
 FT = & 51.95 - 2.3635 * MPS + 0.452417 * ETA + 0.339208 * TIME + 0.0385484 * MPS^2 - \\
 & 0.00121458 * MPS * ETA - 0.000689583 * MPS * TIME - 0.00505347 * ETA^2 - \\
 & 0.000768056 * ETA * TIME - 0.00244514 * TIME^2
 \end{aligned}$$

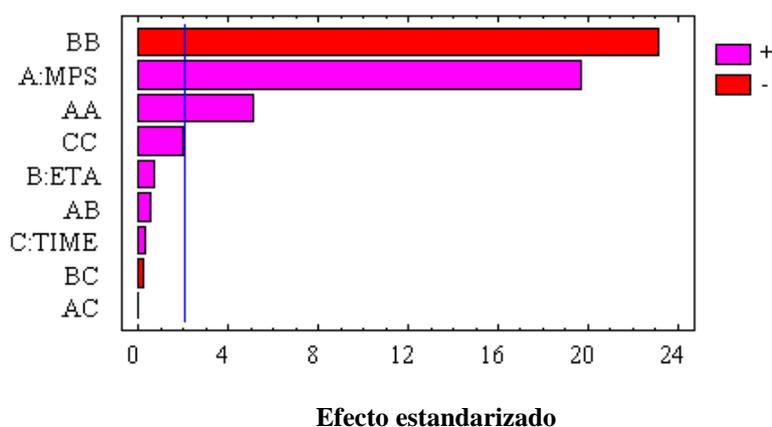
Respuesta optimizada (Objetivo: Maximizar FT)

Optimum value = 63.528

Factor	Menor	Mayor	Óptimo
A: MPS	20.0	60.0	60.0
B: ETA	30.0	90.0	33.2794
C: TIME	30.0	90.0	55.5927

ANEXO 3. Análisis de superficie de respuesta para capacidad antioxidante

Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño aplicado



Análisis de varianza de la regresión para CA a partir de harina de residuos de alcachofa en la optimización

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor <i>p</i>
A:MPS	2959.63	1	2959.63	384.48	0.0000
B:ETA	3.45031	1	3.45031	0.45	0.5112
C:TIME	0.4489	1	0.4489	0.06	0.8118
AA	195.795	1	195.795	25.44	0.0001
AB	2.0402	1	2.0402	0.27	0.6126
AC	0.0078125	1	0.0078125	0.00	0.9749
BB	4088.86	1	4088.86	531.18	0.0000
BC	0.165312	1	0.165312	0.02	0.8850
CC	29.3296	1	29.3296	3.81	0.0658
Bloques	0.0572033	1	0.0572033	0.01	0.9322
Error total	146.257	19	7.69774		
Total (Corr.)	7642.3	29			

R-cuadrado = 98.0862 por ciento

R-cuadrado (ajustado por GL) = 97.225 por ciento

Coefficientes de la regresión para CA

Constante	-23.4183
A: MPS	-0.403427
B: ETA	3.12884
C: TIME	-0.252639
AA	0.0128729
AB	0.000841667
AC	0.0000520833
BB	0.0261454
BC	-0.000159722
CC	0.00221435

Esta información muestra la ecuación de regresión que se ajusta a la data. La ecuación del modelo ajustado es:

$$CA = -23.4183 - 0.403427*MPS + 3.12884*ETA - 0.252639*TIME + 0.0128729*MPS^2 + 0.000841667*MPS*ETA + 0.0000520833*MPS*TIME - 0.0261454*ETA^2 - 0.000159722*ETA*TIME + 0.00221435*TIME^2$$

Respuesta optimizada (Objetivo: Maximizar FT)

Optimum value = 89.9804

Factor	Menor	Mayor	Óptimo
A: MPS	20.0	60.0	60.0
B: ETA	30.0	90.0	60.5272
C: TIME	30.0	90.0	90.0