

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS



**“DESARROLLO DE UN FILTRANTE ANTIOXIDANTE A
BASE DE CORONTA DE MAÍZ MORADO (*Zea mays* L.)”**

Presentada por:

ANGELA CINDY DÍAZ GARCÍA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2024

“DESARROLLO DE UN FILTRANTE ANTIOXIDANTE A BASE DE CORONTA DE MAÍZ MORADO (Zea mays L.)”

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 10%

Excluir bibliografía

Activo

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

**“DESARROLLO DE UN FILTRANTE ANTIOXIDANTE A BASE DE
CORONTA DE MAÍZ MORADO (*Zea mays* L.)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

ANGELA CINDY DÍAZ GARCÍA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Christian Encina Zelada
PRESIDENTE

Dr. Alberto Condezo Hoyos
ASESOR

Ph.D. María Mónica Giusti Hundskopf
CO-ASESORA

Ph.D. Fernando Vargas Delgado
MIEMBRO

Dr. Raúl Siche Jara
MIEMBRO

Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A Dios

A mi mamá, Catalina García

A mi papá, Inocente Díaz (+)

A mi esposo, Nelson

Y a mi hijo, Gabriel

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida y sus innumerables bendiciones.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) por brindarme un excelente ambiente de estudios, además por ser el lugar donde formé buenas amistades.

Al Dr. Luis Alberto Condezo Hoyos, mi asesor de tesis, por su amistad y confianza desde un inicio, por su paciencia en transmitirme sus conocimientos y experiencias en varios campos de la investigación, sobre todo en los métodos de análisis y redacción. Asimismo, por motivarme con sus grandes ideas y sabias orientaciones en todo el proceso de la tesis.

A la Ph.D. María Mónica Giusti Hundskopf, mi co-asesora de tesis, por su valiosa guía, sus correcciones y recomendaciones oportunas, por su ejemplo de mujer en la ciencia y por todas las experiencias transmitidas.

A la Dra. Bettit Salvá Ruiz, a la Mg. Diana María Nolzco Cama, al Dr. Marcial Silva Jaimes, al Dr. Milber Oswaldo Ureña Peralta, a la Dra. Nataly Dolores Bernuy, a la Dra. Paola Cortés Avendaño y a la Mg. Patricia Martínez Tapia, por su predisposición para responder mis consultas y por todo el apoyo que me brindaron en la UNALM.

A todos los colaboradores externos de mi trabajo de investigación por su gran soporte para culminar con éxito mi trabajo de investigación, en especial al Mg. Nelson Bautista Cruz y al Mg. Edwin Macavilca Ticlayauri, por la alta predisposición.

A los voluntarios que participaron en el estudio del efecto antioxidante del consumo del filtrante desarrollado, por su gran amor a la ciencia y su voluntad de apoyar con mucha responsabilidad.

A todos mis amigos que estuvieron a mi lado en este retador camino, en especial a Yaquelin Calizaya, Jackeline Valqui y Karol Sánchez.

A mi amada mamá y a mis hermanas Yeimy, Maribel y Lidia por su apoyo incondicional.

A INNOVATE-PERU por financiar el proyecto “Desarrollo de filtrantes de maíz morado con hojas de membrillo y estevia como propuesta de infusión de frutas con alta capacidad antioxidante, endulzadas naturalmente y con un alto nivel de agrado en L’ECOLE PRODUITS S.A.C.”: contrato 027-INNOVATEPERÚ-PIEC1-2019.

A la beca del proyecto Concytec-Banco Mundial (Convenio de Adjudicación de Fondos N° 02-2018-FONDECYT-BM), a través de su unidad ejecutora, Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT).

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	Maíz morado (<i>Zea mays</i> L.).....	4
2.1.1.	Origen	4
2.1.2.	Producción de maíz morado en Perú	4
2.1.3.	Exportación de maíz morado de Perú	4
2.1.4.	Coronta de maíz morado.....	6
2.1.5.	Propiedad antioxidante del maíz morado y productos derivados	9
2.2.	Estevia (<i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni)	10
2.3.	Membrillo (<i>Cydonia oblonga</i> L.)	10
2.4.	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	10
2.5.	Clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>)	11
2.6.	Estrés oxidativo, antioxidantes y métodos de capacidad/actividad antioxidante ...	11
2.6.1.	Estrés oxidativo	11
2.6.2.	Antioxidantes.....	12
2.6.3.	Métodos de capacidad/actividad antioxidante	13
2.7.	Desarrollo de filtrantes	18
2.7.1.	Filtrantes o bolsitas de “té” herbales	18
2.7.2.	Diseño de mezcla como herramienta para el desarrollo de productos.....	18
2.8.	Estabilidad de un producto alimentario	20
2.8.1.	Evaluación de estabilidad	20
2.8.2.	Antecedentes de estudio de estabilidad química de productos con maíz morado ...	20
2.9.	Estudio del efecto antioxidante en humanos	21
2.9.1.	Ensayos clínicos.....	21
2.9.2.	Antecedentes de actividad antioxidante en humanos de productos con maíz morado	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Lugar de ejecución.....	25
3.2.	Reactivos.....	25

3.2.1. Reactivos para análisis químicos	25
3.2.2. Medios para análisis microbiológicos	26
3.3. Materiales vegetales.....	26
3.4. Métodos de análisis.....	26
3.4.1. Análisis químicos.....	26
3.4.2. Análisis de humedad.....	30
3.4.3. Análisis de acidez	30
3.4.4. Medición de pH	30
3.4.5. Medición de actividad de agua	30
3.4.6. Análisis granulométrico.....	30
3.4.7. Medición de porosidad y tamaño promedio de poro	31
3.4.8. Detección de fugas de sólidos.....	31
3.4.9. Curva de espectro y medición de color.....	31
3.4.10. Medición de isoterma de sorción de humedad.....	31
3.4.11. Análisis de permeabilidad al vapor de agua	32
3.4.12. Análisis de antocianinas por UHPLC	32
3.4.13. Análisis de la actividad de enzimas antioxidantes.....	34
3.4.14. Análisis microbiológico.....	34
3.5. Metodología experimental	35
3.5.1. Caracterización de ingredientes	37
3.5.2. Optimización de la fórmula del filtrante y evaluación de la estabilidad de filtrante óptimo.....	38
3.5.3. Evaluación del efecto antioxidante <i>in vivo</i>	43
3.6. Análisis estadístico	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1. Caracterización de los ingredientes del filtrante.....	48
4.1.1. Caracterización fisicoquímica.....	48
4.1.2. Análisis granulométrico.....	48
4.1.3. Capacidad antioxidante, antocianinas monoméricas totales y polifenoles totales...	49
4.2. Selección de la bolsa filtrante	51
4.3. Optimización de la fórmula del filtrante.....	53
4.3.1. Análisis de los modelos	53
4.3.2. Efecto de la formulación de filtrante sobre el contenido de CA-ORAC _{FL} y AMT..	55

4.3.3. Optimización y validación	57
4.4. Estabilidad de las características del filtrante óptimo.....	58
4.4.1. Isoterma de sorción de humedad del filtrante	58
4.4.2. Permeabilidad al vapor de agua del sobre bilaminado	60
4.4.3. Evaluación de humedad, actividad de agua, compuestos bioactivos, capacidad antioxidante, pH y color del filtrante en almacenamiento	61
4.4.4. Características microbiológicas del filtrante.....	72
4.4.5. Antocianinas por UHPLC del filtrante	73
4.5. Efecto antioxidante <i>in vivo</i>	75
4.5.1. Seguimiento del consumo de nutrientes de los voluntarios.....	75
4.5.2. Seguimiento de los valores de presión arterial sistólica (PAD), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardiaca (FC) de los voluntarios	77
4.5.3. Seguimiento de los parámetros de estrés oxidativo del plasma en los voluntarios .	78
4.5.4. Valores de <i>protection score</i> , <i>damage score</i> y OXY-SCORE.....	80
V. CONCLUSIONES	82
VI. RECOMENDACIONES	83
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
VIII. ANEXOS.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación general de ensayos de capacidad/actividad antioxidante	14
Tabla 2: Diseño de mezcla <i>I-optimal</i> para la optimización de la fórmula del filtrante	40
Tabla 3: Características basales de los voluntarios (n=18)	44
Tabla 4: Capacidad antioxidante medido por ORAC _{FL} , antocianinas monoméricas totales y polifenoles totales de los ingredientes del filtrante	50
Tabla 5: Valores de las variables respuesta del diseño de mezcla <i>I-optimal</i>	53
Tabla 6: Análisis de varianza para modelos cuadráticos Scheffe ajustados a las variables respuestas.....	54
Tabla 7: Valores predichos y medidos experimentalmente de CA-ORAC _{FL} y contenido de AMT de la infusión del filtrante óptimo.....	57
Tabla 8: Parámetros del modelo de la isoterma de sorción para el filtrante.....	60
Tabla 9: Parámetros de la cinética de degradación de AMT del filtrante	66
Tabla 10: Características microbiológicas del filtrante	73
Tabla 11: Consumo de nutrientes de los voluntarios después del periodo de lavado (0 semanas) y después de 2 y 4 semanas de estudio	75
Tabla 12: Valores de PAS, PAD y FC de los voluntarios después del período de lavado (0 semanas), después de 2 y 4 semanas de estudio	77
Tabla 13: Valores de <i>protection score</i> , <i>damage score</i> y OXY-SCORE del grupo control y consumo después del período de lavado (0 semanas), después de 2 y 4 semanas de estudio.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Variación en la producción (miles de toneladas) del maíz morado frente a otros maíces en Perú.	5
Figura 2: Variación de la producción (miles de toneladas) y valores monetarios (millones de soles) del maíz morado del 2018 al 2022	5
Figura 3: Valor neto (toneladas) y el valor “libre a bordo” (miles de dólares estadounidenses) de la exportación de maíz morado entero del 2018 al 2022	6
Figura 4: Valor neto (toneladas) y el valor “libre a bordo” (miles de dólares estadounidenses) de la exportación de colorante de maíz morado del 2018 al 2022	7
Figura 5: Coronta de maíz morado variedad INIA-601 adquirida para el estudio	7
Figura 6: Tipos de ensayos clínicos controlados y aleatorizados (ECCA)	24
Figura 7: Diseño metodológico	36
Figura 8: Diagrama de flujo del filtrante a base de coronta de maíz morado.....	37
Figura 9: Sobre bilaminado metalizado usado para envasar las bolsitas filtrantes	42
Figura 10: Diseño del estudio del efecto antioxidante	44
Figura 11: Retención en tamiz (%) de los ingredientes del filtrante	49
Figura 12: Imágenes al microscopio (A) y porosidad (%) de las bolsas (B). Fuga de sólidos (%) en las infusiones vs. porosidad (%) de las bolsas (C). Curva de absorbancia de las infusiones (blanco = agua destilada) medida en un espectrofotómetro CM-5 de 400 a 700 nm (D).	52
Figura 13: Gráfica tridimensional de superficie-contorno y gráfica de Piepel del modelo cuadrático de Scheffe de capacidad antioxidante medida por ORAC _{FL} (A-B) y contenido de antocianina monomérica total (C-D). Gráfica de optimización con las variables respuesta (E)	56
Figura 14: Isoterma de sorción de la humedad del filtrante	59
Figura 15: Humedad del filtrante durante el tiempo de almacenamiento.....	61
Figura 16: Actividad de agua del filtrante durante el tiempo de almacenamiento	62

Figura 17: Contenido de PT del filtrante durante el tiempo de almacenamiento	63
Figura 18: Contenido de antocianinas monoméricas totales del filtrante durante el tiempo de almacenamiento	64
Figura 19: Capacidad antioxidante equivalente trolox del filtrante durante el tiempo de almacenamiento	67
Figura 20: Capacidad antioxidante ORAC _{PGR} del filtrante durante el tiempo de almacenamiento	68
Figura 21: Valores de pH de la infusión durante el tiempo de almacenamiento.....	69
Figura 22: Color en escala CIELAB de la infusión durante el tiempo de almacenamiento	70
Figura 23: Correlación entre humedad, actividad de agua, contenido de PT, contenido de AMT, capacidad antioxidante, pH y color del filtrante	71
Figura 24: Cromatograma de la infusión del filtrante óptimo	74
Figura 25: Cromatograma de la infusión hidrolizada del filtrante óptimo	74
Figura 26: Efecto del filtrante sobre los parámetros de estrés oxidativo del plasma sanguíneo después del período de lavado (0 semanas), después de 2 y 4 semanas de estudio	78

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de calidad de la coronta de maíz morado variedad INIA-601.....	102
ANEXO 2: Informe de ensayo de la determinación de micotoxinas en la coronta de maíz morado.....	103
ANEXO 3: Fotos de algunos materiales y equipos empleados en la tesis	105
ANEXO 4: Fotos del filtrante e infusión óptima.....	106
ANEXO 5: Vistas generadas por el UHPLC en la tesis para análisis de los cromatogramas de las antocianinas de la infusión del filtrante óptimo	107
ANEXO 6: Cromatograma del estándar cianidina-3-glucósido	108
ANEXO 7: Cromatogramas de antocianidinas.....	109
ANEXO 8: Ejemplo de registro diario de alimentos en Excel	110
ANEXO 9: Artículos científicos generados en la tesis	111

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un filtrante natural antioxidante a base de coronta de maíz morado (*Zea mays* L.) (CMM) y con inclusión de estevia (E), membrillo (M), canela (C) y clavo de olor (CO). Se evaluó el contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT), polifenoles totales (PT) y capacidad antioxidante ORAC_{FL} (CA-ORAC_{FL}) de los ingredientes, luego se optimizó una fórmula con un diseño de mezcla maximizando CA-ORAC_{FL} y AMT. En el filtrante óptimo, se evaluó la estabilidad en almacenamiento bajo condiciones aceleradas a 30, 40 y 50 °C combinadas con humedades relativas (HR) de 75 y 85 % por 19 días y se estudió el efecto del consumo en biomarcadores de estrés oxidativo en plasma de voluntarios sanos (divididos en grupo control y de consumo). La fórmula del filtrante óptimo fue (%): 83,62 de CMM, 8,33 de E, 4,47 de M, 3,33 de C y 0,25 de CO. La infusión óptima presentó CA-ORAC_{FL} de 9,09 $\mu\text{mol ET/mL}$ y AMT de 97,19 mg EC3G/L. Durante el almacenamiento, el filtrante óptimo permaneció sin variación significativa en PT y color en todas las condiciones de almacenamiento, mientras que AMT y capacidad antioxidante se redujeron significativamente en las condiciones más severas, hasta en un 21,89 y 42,66 % de sus valores iniciales, respectivamente. No se encontró variación significativa del consumo del filtrante en los biomarcadores CAT, SOD, GPx y TEAC, pero sí en CA-ORAC_{PGR} y carbonilos de proteínas. Sin embargo, los índices OXY-SCORE en ambos grupos fueron cercanos a cero y no variaron significativamente después de 2 y 4 semanas, indicando un equilibrio entre el sistema de defensa antioxidante y los oxidantes. En conclusión, se desarrolló un filtrante óptimo a base de CMM con propiedad antioxidante demostrada *in vitro* y que es estable en PT y color en las condiciones aceleradas estudiadas.

Palabras clave: Maíz morado; filtrante; antioxidante; antocianinas; estabilidad; estrés oxidativo.

ABSTRACT

The objective of this research was to develop a natural antioxidant tea from purple corn cob (*Zea mays* L.) (PCC) and addition of stevia (S), quince (Q), cinnamon (C) and cloves (Cv). The total monomeric anthocyanins content (TMA), total polyphenols (TP) and antioxidant capacity ORAC_{FL} (AC-ORAC_{FL}) of the ingredients were evaluated, then a formula was optimized with a mixture design, maximizing AC-ORAC_{FL} and TMA. The storage stability under accelerated conditions was evaluated for the optimal tea; at 30, 40 and 50 °C combined with relative humidities (RH) of 75 and 85% for 19 days. The effect of consumption on biomarkers of oxidative stress in plasma of healthy volunteers (divided into control and consumption groups) was studied. The optimal tea had (%): 83.62 PCC, 8.33 S, 4.47 Q, 3.33 C and 0.25 Cv. The optimal infusion presented AC-ORAC_{FL} of 9.09 μmol TE/mL and TMA of 97.19 mg C3GE/L. During storage, the optimal tea remained without significant variation in TP and color in all storage conditions, while the TMA and antioxidant capacity were significantly reduced in the most severe conditions, up to 21.89 and 42.66 % of their initial values, respectively. No significant variation in tea consumption was found in the biomarkers CAT, SOD, GPx and TEAC, but it was found in AC-ORAC_{PGR} and protein carbonyls. However, the OXY-SCORE indices in both groups were close to zero and did not vary significantly after 2 and 4 weeks, indicating a balance between the antioxidant defense system and oxidants. In conclusion, an optimal PCC-based tea was developed with antioxidant property demonstrated *in vitro* and that is stable in TP and color under the accelerated conditions studied.

Keywords: Purple corn; herbal tea; antioxidants; anthocyanins; stability; oxidative stress.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz morado (*Zea mays* L.) es un cereal originario de Perú (FAO 2013, MINAN 2018), y se consume tradicionalmente en postres y bebidas como la “mazamorra morada” y “chicha morada” (FAO 2013). Es considerado una fuente rica de compuestos fenólicos, destacando principalmente en antocianinas (Jing *et al.* 2007, Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2007, Gálvez *et al.* 2017). La coronta del maíz morado tiene un contenido abundante de antocianinas, lo cual es superior al resto de la mazorca y a la mayoría de las fuentes comunes como la mora, aronia, grosella negra, sauco, entre otros (Wu *et al.* 2006); lo que hace a la coronta del maíz morado un subproducto alimentario funcionalmente valioso. Asimismo, la coronta de maíz morado también tendría un gran potencial de exportación como producto transformado; hasta la actualidad la exportación del maíz morado peruano es mínima y sólo se da como materia prima y como colorante alimentario (MIDAGRI 2023). Por lo tanto, el aprovechamiento integral de maíz morado no sólo beneficiaría al consumidor, sino también al agricultor y a la industria.

Además de la coronta de maíz morado, existen otros vegetales como la estevia, membrillo, canela y clavo de olor con muchas propiedades que pueden ser incluidos en el desarrollo de productos. La estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni), originario de Sudamérica, es muy conocida por su dulzor, aporte de prácticamente “cero” calorías y por sus propiedades antioxidantes; las cuales la convierten en un componente ideal para el desarrollo de cualquier producto (Lemus-Mondaca *et al.* 2016, Singh *et al.* 2019). El membrillo es originario de Asia (Segura Munguía y Torres Ripa 2009), pero hay variedades cultivadas en Perú (Espinoza *et al.* 2015); los estudios evidencian que el membrillo tiene alto contenido de compuestos fenólicos (Silva *et al.* 2002) y efectos positivos para la salud (Wojdyło *et al.* 2013); además, se conoce que aporta un agradable aroma y sabor a los postres (Silva *et al.* 2002, 2004). La canela y el clavo de olor son dos especias con múltiples usos, principalmente como ingredientes de productos alimentarios por sus características aromatizantes y porque poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antivirales, entre otros (Nurdjannah y Bermawie 2012, Thomas y Kuruvilla 2012, Chimbetete *et al.* 2019).

Por otro lado, el estrés oxidativo se definió como el desequilibrio entre la aparición de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERO/ERN) y la capacidad del organismo para contrarrestar su acción por el sistema de protección antioxidante (Pisoschi y Pop 2015). Este desequilibrio conlleva a alteraciones y modulaciones de la función de biomoléculas claves del organismo, contribuyendo así en la patogénesis de muchas enfermedades crónicas no transmisibles (Pisoschi y Pop 2015). Las enfermedades no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes son graves problemas a nivel mundial, porque son causantes de casi el 75 % de muertes al año y tiene una tendencia de crecimiento, según las estimaciones podría llegar a representar alrededor del 86 % de muertes hasta al año 2050 (OMS 2023). Sin embargo, estas enfermedades cuyas causas constituyen el estrés oxidativo se pueden controlar mediante el consumo de alimentos con contenido de antioxidantes (Pisoschi *et al.* 2021). Los compuestos antioxidantes presentes en los alimentos neutralizan a las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno del organismo, evitando así su acumulación y por consiguiente la generación del estrés oxidativo. Existen evidencias del efecto positivo de las propiedades antioxidantes de extractos del maíz morado en estudios *in vitro* y en animales de experimentación; siendo uno de los efectos importantes, el incremento de enzimas antioxidantes endógenas (Lao *et al.* 2017, Kim *et al.* 2023), no obstante, aún falta estudios del efecto antioxidante realizados en humanos.

Es necesario desarrollar productos con alta aceptación y de fácil consumo a base de maíz morado, siendo uno de estos el filtrante herbal. Los filtrantes son bolsitas que contienen alguna (s) parte (s) de una planta generalmente en forma molida, muy apreciados por los consumidores; lo consideran un alimento funcional, sano y natural (Thiagarajah *et al.* 2019). El consumo de filtrantes es a nivel mundial, con casi dos tercios de la población del planeta bebiéndolas diariamente (Bassi *et al.* 2020). Además, son productos muy convenientes para la industria debido a su facilidad de fabricación, al requerir un equipamiento mínimo y al reducido espacio de almacenamiento que necesitan (Bassi *et al.* 2020).

Por consiguiente, el presente estudio tuvo como objetivo general desarrollar un filtrante antioxidante a base de coronta de maíz morado (*Zea mays* L.). Los objetivos específicos fueron: (1) cuantificar el contenido de polifenoles totales y antocianinas, y evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de la coronta de maíz morado y los ingredientes (membrillo, estevia, canela y clavo de olor); (2) optimizar la fórmula del filtrante a base de coronta de

maíz morado con los ingredientes mencionados en función de su contenido de antocianinas y capacidad antioxidante *in vitro* y evaluar la estabilidad en almacenamiento del filtrante óptimo; y (3) evaluar el efecto antioxidante *in vivo* del filtrante óptimo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MAÍZ MORADO (*Zea mays* L.)

2.1.1. ORIGEN

El maíz morado (*Zea mays* L.) es una especie de gramínea que agrupa muchas razas y variedades de maíz de color morado o negro con la raza común ancestral *kculli*, es originario de Perú y ampliamente cultivado y consumido en la Región Andina de Sudamérica, principalmente en Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina (MINAN 2018).

2.1.2. PRODUCCIÓN DE MAÍZ MORADO EN PERÚ

La producción de maíz morado en el Perú se da en varias regiones, principalmente han destacado Lima y Ayacucho (MIDAGRI 2023). En los últimos años, la producción de este cereal se ha incrementado, ascendiendo de 8 a 25 miles de toneladas del 2001 al 2020 (Figura 1); sin embargo, aún sigue siendo muy bajo en comparación con otros maíces comerciales. En la Figura 2 se observa la variación de la producción y de sus valores monetarios en los últimos cinco años (MIDAGRI 2023).

2.1.3. EXPORTACIÓN DE MAÍZ MORADO DE PERÚ

El maíz morado se ha estado exportando en dos presentaciones; mazorca entera y colorante alimentario (MIDAGRI 2023).

Según MIDAGRI, el volumen de exportación de la presentación entero ha crecido del año 2001 al 2020 con una tasa anual de 10 %; sin embargo, al 2022, este volumen representa aún un bajo porcentaje de la producción total (3 %). En la Figura 3 se observa el valor neto (t) y el valor “libre a bordo” (miles de dólares estadounidenses) de la exportación de maíz morado entero en los últimos cinco años (2018 - 2022), teniendo un pico en el 2020, que podría deberse a la aparición de la COVID-19, lo que generó mayor interés en los alimentos con compuestos antioxidantes. Se destaca tres mercados de destino; Ecuador, Estados Unidos y la Unión Europea (España y Bélgica) (MIDAGRI 2023).

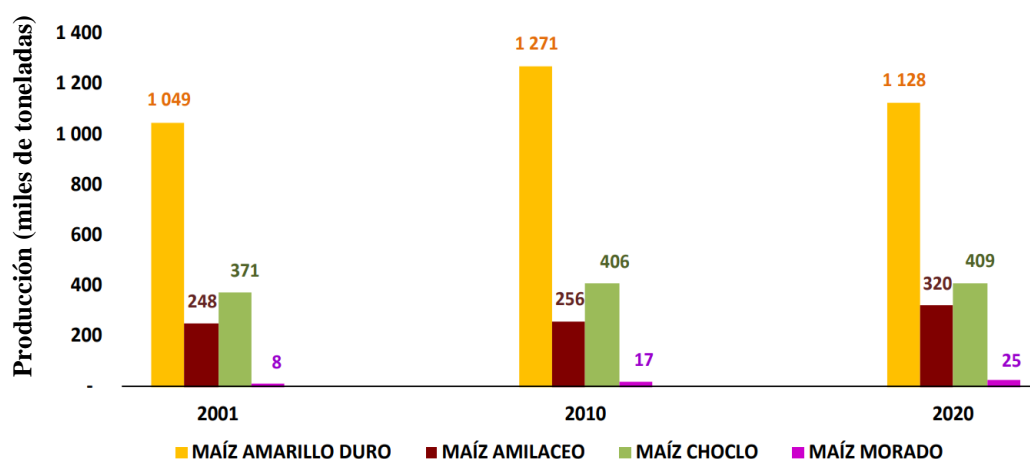


Figura 1: Variación en la producción (miles de toneladas) del maíz morado frente a otros maíces en Perú

FUENTE: Dirección General de Políticas Agraria (DGPA)-MIDAGRI (2021).

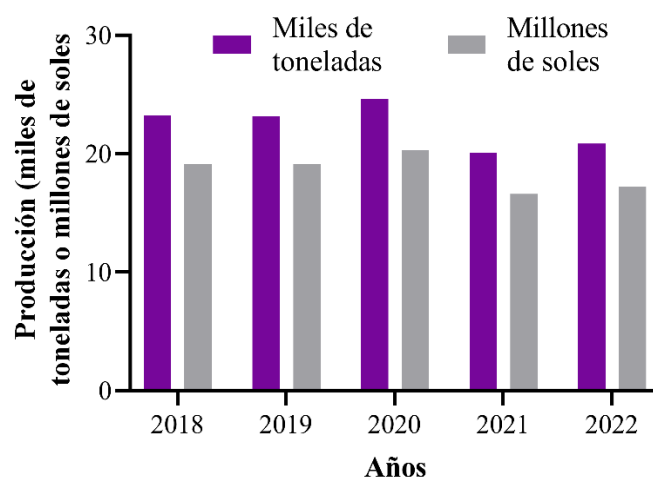


Figura 2: Variación de la producción (miles de toneladas) y valores monetarios (millones de soles) del maíz morado del 2018 al 2022

FUENTE: Elaborado en base a los datos del Sistema Integrado de Estadística Agraria de (SIEA)-MIDAGRI (2023).

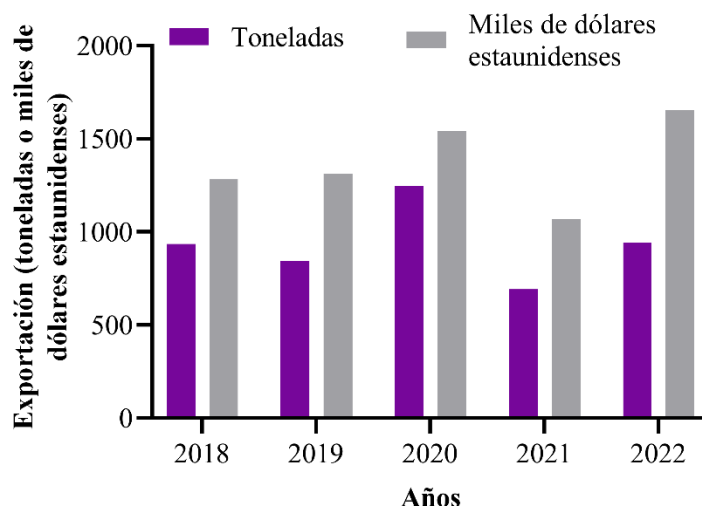


Figura 3: Valor neto (toneladas) y el valor “libre a bordo” (miles de dólares estadounidenses) de la exportación de maíz morado entero del 2018 al 2022

FUENTE: Elaborado en base a los datos del Sistema Integrado de Estadística Agraria de (SIEA)-MIDAGRI (2023).

La exportación del colorante del maíz morado (antocianinas) en los últimos años ha crecido limitadamente desde 1,2 toneladas en el 2002 a 71,1 toneladas al 2022. En la Figura 4 se muestra el valor neto (t) y el valor “libre a bordo” (miles de dólares estadounidenses) de la exportación de colorante de maíz morado de los últimos cinco años (2018 al 2022) y se evidencia que, si bien el peso neto exportado ha aumentado, su equivalente monetario pareciera haberse mantenido, esto podría deberse a una disminución del precio de este producto, y a esto podría sumarse el aumento del valor del dólar frente al valor de la moneda peruana, entre otros motivos, que afectarían a los exportadores peruanos. También se evidencia que en el 2020 hubo una caída del volumen vendido, pudiendo deberse a las bajas en la producción de cosméticos por la COVID-19, principal mercado del colorante de maíz morado. Las ventas se han venido concentrando en cuatro destinos; Estados Unidos, Corea del Sur, Chile y la Unión Europea (MIDAGRI 2023).

2.1.4. CORONTA DE MAÍZ MORADO

a. Descripción

La mazorca de maíz morado tiene tres partes bien definidas; granos o semillas, coronta y brácteas. El grano es sin duda la parte principal de cualquier maíz, sin embargo, en el caso

del maíz morado, todas las partes tienen un interés particular en la industria y por lo tanto en el consumo (MINAN 2018).

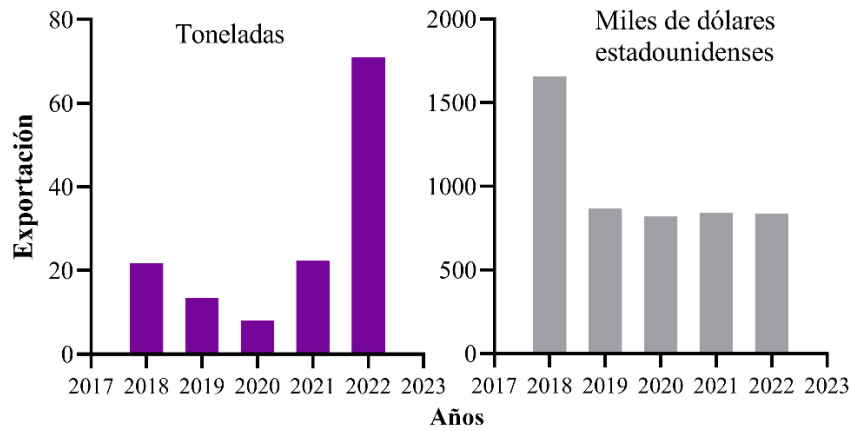


Figura 4: Valor neto (toneladas) y el valor “libre a bordo” (miles de dólares estadounidenses) de la exportación de colorante de maíz morado del 2018 al 2022

FUENTE: Elaborado en base a los datos del Sistema Integrado de Estadística Agraria de (SIEA)-MIDAGRI (2023).

La coronta u olote, eje céntrico donde están adheridos los granos (Figura 5), se caracteriza por tener más coloración morada, por ende, más antocianinas que el resto de las partes del vegetal (Lao *et al.* 2017, Carrera *et al.* 2023). Las antocianinas son un tipo de compuestos fenólicos que se caracterizan principalmente por su propiedad antioxidante (Yang y Zhai 2010).



Figura 5: Coronta de maíz morado variedad INIA-601 adquirida para el estudio

b. Compuestos fenólicos de la coronta de maíz morado

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos no poliméricos que presentan al menos un grupo hidroxilo fenólico en su estructura molecular. Los compuestos fenólicos más encontrados en el maíz morado son los flavonoides (antocianinas, quercetina, rutina, entre otros) y ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, derivados de ácido cafeico, entre otros) (Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2007, Ramos-Escudero *et al.* 2012, Gálvez *et al.* 2017). La composición total de fenólicos de la coronta de maíz morado asciende hasta 72,2 mg de equivalente ácido gálico por g de peso fresco (Jing *et al.* 2007, Quispe-Jacobo *et al.* 2011, Lao y Giusti 2018).

Las antocianinas conforman el grupo mayoritario de compuestos fenólicos presentes en la coronta de maíz morado. La estructura base de las antocianinas son los derivados polihidroxiolos y/o polimetoxilos del 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio y se diferencian entre sí en el número de grupos hidroxilos y/o metoxilos presentes en ella y las características de los azúcares unidos a la molécula. Cuando a una antocianina se le libera de la sustitución de azúcares por hidrólisis se conoce como antocianidina (Schwartz *et al.* 2017).

De acuerdo con la investigación de Lao y Giusti (2016), las antocianinas encontradas en la coronta de maíz morado incluyen a catequina-(4,8)-cianidina-3,5-diglucósido, cianidina-3,5-diglucósido, cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, cianidina-3-malonilglucósido, peonidina-3-glucósido, cianidina-3-(6''-malonilglucósido), cianidina-3-succinilglucósido, entre otros, mientras que las antocianidinas halladas son tres; cianidina, pelargonidina y peonidina, todas ellas identificadas por (HPLC)-PDA-MS.

Los reportes del contenido total de antocianinas de la coronta de maíz morado muestran valores desde 0,8 a 71,5 mg de equivalente cianidina-3-glucósido por gramo de peso fresco (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos 2003, Yang y Zhai 2010, Piña 2018, Rabanal-Atalaya y Medina-Hoyos 2021). Este contenido es mayor a otras fuentes comunes; el arándano (3,7 mg/g de peso fresco), la zarzamora (2,5 mg/g de peso fresco) y la baya del saúco (13,8 mg/g de peso fresco) (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos 2003, Wu *et al.* 2006).

2.1.5. PROPIEDAD ANTIOXIDANTE DEL MAÍZ MORADO Y PRODUCTOS DERIVADOS

La propiedad antioxidante del maíz morado se ha evaluado por ensayos de capacidad/actividad antioxidante *in vitro*, estudios *ex vivo* y estudios *in vivo* (en animales) (Lao *et al.* 2017, Kim *et al.* 2023).

En un estudio de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos del maíz morado, se evidenció que ésta fue mayor y que presentó una cinética de reacción más rápida que la misma cantidad de compuestos fenólicos de arándanos, lo que sugiere que los compuestos fenólicos del maíz morado tienen un mayor número de grupos hidroxilo activos y configuraciones más favorables que permiten mejores interacciones con los radicales libres (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos 2003).

Así mismo, se encontró que la capacidad/actividad antioxidante por DPPH, ABTS, FRAP y desoxirribosa mostraron alta correlación positiva con el contenido de flavonoides, flavanoles y antocianinas, mientras que una baja correlación con el contenido de flavonoles del maíz morado. En el mismo trabajo de investigación, se evaluó el extracto de maíz morado en aislados homogenizados de riñón, hígado y cerebro de ratón y se observó que el extracto aumentó los niveles de enzimas endógenas como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa total y disminuyó la formación de malondialdehído (Ramos-Escudero *et al.* 2012).

En un estudio con ratas sanas, se observó que la histología celular de ratas alimentadas con maíz morado no presentó una diferencia significativa a la de las ratas alimentadas con una dieta regular; sin embargo, el suero de ratas alimentadas con maíz morado presentó un fuerte poder antioxidante en pruebas de antioxidantes *in vivo*, y además que en los análisis de micro matrices mostraron que el maíz morado podría inducir la expresión de ARN de la oxidoreductasa P450 (citocromo), fosfatidilinositol 3-quinasa y fosfolipasa A, concluyendo que tiene un potencial quimiopreventivo contra el desarrollo de lesiones preneoplásicas hepáticas (Yokohira *et al.* 2008).

Otro estudio con ratas inducidas al estrés oxidativo demostró el efecto protector de las dietas de maíz morado contra el daño oxidativo en hígados y riñones. Se indujo al estrés oxidativo mediante la adición de fluoruro al agua potable de las ratas, de las cuales las células de ratas tratadas con fluoruro y dieta rica en maíz morado a la vez mostraron menos células

inflamadas y niveles de malondialdehído significativamente más bajos que las que no recibían la dieta rica en maíz morado. Los niveles de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) de las ratas tratadas con maíz morado también fueron significativamente más altos que el grupo tratado solamente con fluoruro (Zhang *et al.* 2014).

2.2. ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* (BERT.) BERTONI)

La estevia es una especie del género *Stevia* de la familia de las Asteráceas, nativa de la región tropical de Sudamérica (Martínez Cruz 2015). La hoja de estevia es famosa por su dulzor, que se debe a la presencia de glucósidos de esteviol que tienen entre 150 y 300 veces el dulzor de la sacarosa, por lo que es un buen sustituto del azúcar en la industria alimentaria (Singh *et al.* 2019). Además, la hoja de estevia cuenta con propiedades antioxidantes debido a la presencia de altas concentraciones de compuestos bioactivos como flavonoides y otros compuestos fenólicos (Lemus-Mondaca *et al.* 2016). Así mismo, se le atribuye efectos positivos frente a enfermedades y condiciones fisiológicas como la hiperglucemia, hipertensión, cáncer, entre otros (Singh *et al.* 2019).

2.3. MEMBRILLO (*Cydonia oblonga* L.)

El membrillo es originario de Asia (Segura Munguía y Torres Ripa 2009), sin embargo, hay variedades cultivadas en Perú (Espinoza *et al.* 2015). El consumo de membrillo como fruta no es común debido a su sabor ácido y la dureza de su pulpa; en cambio, tiende a usarse en conservas, mermeladas, gelatinas o jaleas (Silva *et al.* 2004, 2002). Las investigaciones en torno al membrillo muestran su alto contenido fenólico, principalmente ácidos cafeoilquínicos y flavonolglucósidos (Silva *et al.* 2002) y sus efectos positivos para la salud (Wojdyło *et al.* 2013).

2.4. CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*)

La canela es originaria de la India (Thomas y Kuruvilla 2012). Es un ingrediente aromatizante ampliamente usado en la elaboración de productos alimentarios y es conocida por ser fuente dietética de antioxidantes naturales y antimicrobianos (Su *et al.* 2007, Thomas y Kuruvilla 2012). En un estudio que comparó a la canela con otras conocidas especias; orégano, pimienta negra, nuez moscada y rosa mosqueta, reveló que la canela tiene los contenidos fenólicos más altos y las propiedades antioxidantes más fuertes que ellos (Su *et*

al. 2007). Según un reciente estudio, la canela podría servir para prevenir y/o tratar la obesidad, la hiperglucemia y el síndrome metabólico (Chimbetete *et al.* 2019).

2.5. CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*)

El clavo de olor es originario de Indonesia (Nurdjannah y Bermawie 2012). Es una especia alimentaria usada por siglos como aromatizante y conservante natural al igual que la canela (Nurdjannah y Bermawie 2012). Esta especia es una fuente de compuestos fenólicos como eugenol, acetato de eugenol y ácido gálico y tiene propiedades biológicas ampliamente estudiadas como antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, citotóxicas, entre otras (Cortés-Rojas *et al.* 2014). Además, así como la canela, el clavo de olor podría servir para prevenir y/o tratar la obesidad, la hiperglucemia y el síndrome metabólico (Chimbetete *et al.* 2019).

2.6. ESTRÉS OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES Y MÉTODOS DE CAPACIDAD/ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.6.1. ESTRÉS OXIDATIVO

a. Definición

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la aparición de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERO/ERN) y la capacidad del organismo vivo para enfrentarlos con el sistema de defensa antioxidante (Pisoschi y Pop 2015).

b. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Las ERO y ERN incluyen compuestos de naturaleza radical y no radical, tales como; radical anión superóxido, hidroxilo, alcoxilo, radicales peroxilolipídicos, óxido nítrico y peroxinitrito (Pisoschi y Pop 2015, Brainina *et al.* 2019).

Los radicales libres se generan en procesos aeróbicos como la respiración celular, la exposición a infecciones microbianas, durante la actividad física intensa o la acción de contaminantes/toxinas como el humo del cigarrillo, el alcohol, las radiaciones ionizantes y ultravioleta, los pesticidas y el ozono. Las ERO en pequeñas cantidades cumplen el rol de moléculas de señalización, que participan en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la expresión genética mediante la activación de factores de transcripción. Su generación por fagocitos es esencial en el mecanismo de defensa contra la diversidad de cepas microbianas (Pisoschi *et al.* 2021).

c. Patologías asociadas al estrés oxidativo

Se plantea que existe dos principales mecanismos por el cual el estrés oxidativo contribuye a una patología. El primero, involucra a las especies reactivas que están en exceso en un estrés oxidativo, éstas oxidan directamente a las macromoléculas; lípidos de membrana (peroxidación), proteínas estructurales (carbonilación), enzimas y ácidos nucleicos (roturas de cadena u oxidación de las bases nitrogenadas), provocando una función celular aberrante y su posterior muerte. El segundo mecanismo es la señalización redox aberrante. Los oxidantes, en particular el H₂O₂ generado por las células tras la estimulación fisiológica, pueden actuar como segundos mensajeros. En el estrés oxidativo, la producción no fisiológica de H₂O₂ puede hacer que la señalización redox desaparezca (Forman y Zhang 2021).

Estas modificaciones oxidativas están estrechamente relacionadas con el desarrollo de cáncer, diabetes, neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedades renales y enfermedades oculares (Pisoschi y Pop 2015, Pisoschi *et al.* 2021).

2.6.2. ANTIOXIDANTES

a. Definición

Los antioxidantes son moléculas que frenan a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), por diversos mecanismos, como la donación de hidrógeno, quelación de oxígeno singulete, descomposición de peróxido, inhibición de enzimas oxidativas o absorción de radiación UV. Existe un sistema de defensa antioxidante endógeno (en el organismo), la cual es complementada con los antioxidantes exógenos de la dieta o suplementos (Pisoschi y Pop 2015, Embuscado 2015).

b. Antioxidantes endógenos y exógenos

Los antioxidantes endógenos son aquellos que son producidos en el cuerpo humano e incluyen a las enzimas tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, a proteínas vinculadas a metales como la ferritina, lactoferrina, ceruloplasmina, así como a componentes de bajo peso molecular tales como glutatión reducido, ácido úrico, ácido alfa lipoico, ubiquinonas, bilirrubina y melatonina. Los antioxidantes exógenos son aquellos que el organismo humano no lo sintetiza, son tomados de la dieta o de los suplementos. Ejemplos: vitamina C, tocoferoles, compuestos fenólicos, carotenoides, etc. Los

antioxidantes exógenos pueden retrasar el consumo de los endógenos, de tal manera que mantienen inalterado el potencial antioxidante de la célula (Embuscado 2015, Pisoschi y Pop 2015, Pisoschi *et al.* 2021).

c. Propiedad antioxidante

A la capacidad que tiene un antioxidante (s) para inhibir todas las moléculas que tienen alto potencial óxido-reducción se le denomina propiedad antioxidante (Brainina *et al.* 2019). Esta propiedad también es llamada capacidad o actividad antioxidante indistintamente, pero que en realidad tienen conceptos distintos (Apak *et al.* 2016). La capacidad antioxidante es la “eficiencia de conversión termodinámica de especies reactivas por antioxidantes, tal como el número de moles de especies reactivas eliminadas por 1 mol de antioxidantes durante un período de tiempo fijo” (Apak *et al.* 2016). Por otro lado, la actividad antioxidante es la concentración de antioxidantes que se requiere para generar una velocidad específica de la eliminación de especies reactivas, y generalmente se expresa como tasas de reacción o porcentajes de barrido por unidad de tiempo (Apak *et al.* 2016, Olszowy-Tomczyk 2021). La actividad antioxidante se puede aplicar cuando se presentan las condiciones experimentales definidas que miden la acción del antioxidante potencial (es decir; presión, temperatura, medios de reacción, co-reactantes y puntos de referencia) (Olszowy-Tomczyk 2021).

2.6.3. MÉTODOS DE CAPACIDAD/ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Existen muchos métodos para medir la capacidad/actividad antioxidante, y detalladamente se pueden agrupar según la Tabla 1. Existen métodos *in vitro* o de base química, *in vitro* combinado con técnicas instrumentales y ensayos *in vivo* (Sun *et al.* 2018).

a. Ensayos de capacidad antioxidante de base química

Estos ensayos son los más extensos, incluyen a los ensayos con mecanismos *HAT* (transferencia de átomo de hidrógeno), *SET* (transferencia de un sólo electrón) y mixtos (Sun *et al.* 2018).

Tabla 1: Clasificación general de ensayos de capacidad/actividad antioxidante

Clasificación		Ensayos
Ensayos de capacidad/actividad antioxidante de base química	Ensayos basados en sistema en transferencia del átomo de hidrógeno (<i>HAT</i>)	Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) Ensayo de parámetros antioxidantes de captura de radicales totales (TRAP) Ensayo capacidad total de captación de oxirradicales (TOSC) Ensayo de blanqueo de crocina
	Ensayos basados en sistema de transferencia de un solo electrón (<i>SET</i>)	Ensayo de Folin-Ciocalteu Ensayo del poder antioxidante reductor férrico (FRAP) Ensayo de capacidad antioxidante reductor cúprico (CUPRAC) Ensayo de ferricianuro Ensayos con reactivos fuertemente oxidantes (Ce (IV), Cr (VI) y ensayos de Mn (VII)) Ensayo basado en voltametría cíclica (CV) Ensayo basado en pulso diferencial (DPV) Ensayo basado en voltametría de onda cuadrada (SWV) Ensayo basado en electrodo de gota de mercurio (DME) Ensayo basado en nanopartículas de plata nanotecnológicas (SNPAC) Ensayo basado en nanopartículas de oro (AuNP)
Ensayos de modo mixto (<i>SET/HAT</i>)		Ensayo de capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC)/ ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS) Ensayo de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) Ensayo de captación de radicales N, N-dimetil-p-fenilendiamina dihidrocloruro (DMPD) Ensayo de captación de radicales galvinoxilo Ensayo de captación de [2,6-di-terc-butil-4-(4'-metoxifenil) radical fenoxilo]

«continuación»

Ensayos de actividad antioxidante <i>in vivo</i>	Ensayo de actividad antioxidante celular (CAA)	Ensayo de actividad antioxidante celular con diferentes líneas celulares
	Biomarcadores de estrés oxidativo y métodos relacionados	Ensayo de captación de radicales de anión superóxido de ERO y ERN; quimioluminiscencia basada en luminol, quimioluminiscencia basada en nitroazul de tetrazolio; método de atrapamiento de espín por resonancia de espín de electrones; entre otros. Productos de la peroxidación lipídica Malondialdehído (MDA); sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); 4hidroxinonenal (4-HNE), entre otros. Productos de la oxidación del ácido nucleico 8-Hidroxi-2'desoxiguanosina (8-OHdG); Ensayo cometa-rotura de ADN, citometría de flujo; 8-hidroxiadenina (8-OHA); 2,6-diamino- 4-hidroxi-5-formamidopirimidina (Fapy-guanina); 4,6-diamino-5- formamidopirimidina (Fapy-adenina), entre otros. Productos de la oxidación de proteína: Carbonilos; 3-nitrotirosina; tiol de proteína; semialdehído glutámico, entre otros. Productos de la oxidación de carbohidratos: Productos finales de glicación avanzada Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GSH-RX), colorimétrico de xantina oxidasa, fluorométrico, ELISA, HPLC
	Mecanismo de señalización redox subyacente a las acciones antioxidantes	Ensayos de cambio de movilidad electroforética, PCR en tiempo real (RT-PCR) y Western blot para la evaluación de expresiones génicas y proteicas. Evaluación indirecta de la actividad antioxidante utilizando biomarcadores como factores de transcripción de señalización celular de las vías Nrf-2 y NF-κB

«continuación»

Métodos	Métodos híbridos entre	Método HPLC-DPPH en línea
misceláneos	cromatografía y ensayos <i>in vitro</i>	HPLC-FRAP HPLC-ABTS

FUENTE: Traducida de Sun *et al.* (2018).

Los ensayos *HAT* miden la capacidad de un antioxidante para inhibir los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno (H). Ejemplo: ORAC. El ensayo ORAC mide la capacidad de los antioxidantes para proteger una sonda (se usa comúnmente fluoresceína o pirogalol rojo) del daño de los radicales libres. Se suele usar el diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-amidino-propano) (AAPH) como fuente del radical peroxilo, que se genera como resultado de la descomposición espontánea de AAPH a 37 °C. La pérdida de la zona es un indicador del alcance del daño causado por su reacción con el radical peroxilo. El efecto protector de los antioxidantes se mide evaluando el área bajo la curva (AUC) de la reacción. El trolox se usa como estándar de calibración (AOAC 2019).

Los ensayos *SET* o *ET* se basan en la transferencia de un electrón para reducir los iones metálicos, carbonilos y radicales. Ejemplo: Ensayo Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu es un método que se basa en la oxidación de compuestos fenólicos en una solución alcalina (carbonato o hidróxido de sodio) con un reactivo de heteropolianión de molibdotungstosfosfato, lo que produce un producto coloreado que se absorbe a 750–765 nm, por lo que también se usa para cuantificar polifenoles totales (Magalhães *et al.* 2010).

Los ensayos con modos mixtos (*HAT/SET*) son aquellos en que pueden ocurrir la transferencia de un átomo de hidrógeno, de un solo electrón o incluso de electrones acoplados a protones, desempeñando diferentes funciones para variar grados, dependiendo de las condiciones de reacción. Ejemplo: TEAC. El método TEAC utiliza radicales catiónicos de ABTS^{•+} de colores intensos como sonda colorimétrica que acepta átomos de hidrógeno o electrones proporcionados por compuestos antioxidantes. El agente oxidante que se puede usar en este ensayo es el persulfato de potasio y el color de la reacción se puede medir a 734 nm (Re *et al.* 1999).

b. Ensayos de actividad antioxidante *in vivo*

Los ensayos de actividad antioxidante *in vivo* incluyen estudios en líneas celulares o biomarcadores de estrés oxidativo. Existen muchos subproductos de ERO/ERN o los daños

oxidativos causados por éstos, o los componentes que controlan las ERO/ERN o reducen el daño oxidativo, que pueden usarse como biomarcadores. Ejemplos: la medición de carbonilos de proteínas, como producto de oxidación de proteínas y la medición de la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, entre otros (Sun *et al.* 2018).

Los carbonilos de proteína pueden ser producidos de la oxidación directa de ciertos aminoácidos tales como Lys, Pro, Arg, Thr e His, o mediante escisión del esqueleto peptídico y reacciones de adición de Michael de residuos Lys, His y Cys con productos de peroxidación lipídica, o mediante reacciones de glucoxidación con el grupo amino Lys, formando productos finales de glicación avanzada. Los métodos más utilizados para detectar carbonilos de proteínas son la espectrometría, el HPLC y la detección inmunoquímica (Apak *et al.* 2017). La cuantificación de carbonilos de proteína por espectrometría se basa en la reacción de la 2,4 - dinitrofenilhidracina (DNPH) con el grupo carbonilo. Mesquita *et al.* (2014) modificó el método tradicional DNPH a un método denominado DNPH alcalino (la reacción en medio básico) con lectura de absorbancia a 450 nm, la cual es un método más rápido, barato y menos laborioso que el método tradicional. Posteriormente, Quintana-Villamandos *et al.* (2016) adaptaron el mismo método a un lector de microplacas, la cual permite el uso de menores cantidades de reactivos.

La medición de las enzimas antioxidantes, tales como SOD, CAT, GPx en muestras biológicas suele medirse con kits de ensayos comerciales. Ejemplo: kit de Cayman Chemical para medición con lector de microplacas. Para el caso de la actividad SOD, el kit se basa en la acción de esta enzima de catalizar la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrogeno. El kit de ensayo de actividad CAT de Cayman utiliza la función peroxidática de CAT, se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H₂O₂. El ensayo GPx de Cayman mide la actividad GPx indirectamente mediante una reacción acoplada con glutatión reductasa (GR). Ello es que, el glutatión oxidado cual es producido al reducir el hidroperóxido por GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH.

2.7. DESARROLLO DE FILTRANTES

2.7.1. FILTRANTES O BOLSITAS DE “TÉ” HERBALES

Los filtrantes o bolsitas de té herbales son bolsas de material poroso que contienen algún vegetal o mezcla de vegetales, generalmente molido y de presentación unitaria, que son usados para las preparaciones de infusiones (Bassi *et al.* 2020). Las normas técnicas peruanas (NTP) definen a las infusiones como “aquellos productos que resultan de la extracción por medio del agua caliente de los principios flavonoides y aromáticos de ciertos vegetales de los cuales se utilizarán las hojas, semillas, flores, ápices o tallos floridos jóvenes” (INACAL 2021). Existen NTP de ciertos vegetales como: anís, manzanilla, boldo, hierba luisa y coca.

Los filtrantes herbales son bien recibidos por los consumidores, lo consideran productos funcionales, como bebidas sanas y naturales que además de tener un agradable aroma contienen muchos fitoquímicos (Thiagarajah *et al.* 2019). Los filtrantes se consumen en todo el mundo, con más del 70 % de la población del planeta que ingiere todos los días (Bassi *et al.* 2020).

La producción de dosis individuales de “té” en bolsitas es conveniente no solo para los consumidores, sino también para la industria: es un producto muy ventajoso debido a su facilidad de fabricación, al requerir un equipamiento mínimo y al reducido espacio de almacenamiento que necesitan (Bassi *et al.* 2020). Sin embargo, queda el desafío de desarrollar productos de alta calidad, teniendo en cuenta principalmente dos aspectos; la parte funcional y el material de empaque, para ello es importante la participación de la comunidad científica (Bassi *et al.* 2020).

2.7.2. DISEÑO DE MEZCLA COMO HERRAMIENTA PARA EL DESARROLLO DE PRODUCTOS

El diseño de mezcla es un tipo de diseño de experimentos con gran aplicación en la industria alimentaria porque permite tener valiosa información a partir de un reducido número de experimentos y evaluar la interacción entre las variables (Buruk Sahin *et al.* 2016). La metodología de diseño de mezcla es un tipo especial de la metodología superficie respuesta en la cual los factores son los componentes de la mezcla, las cuales adquieren valores que deben sumar la unidad o 100 % (Cornell 2011).

Los diseños de mezcla más usados son (Buruk Sahin *et al.* 2016):

- Diseño *Simplex-Lattice*
- Diseño *Simplex-centroide*
- I-D-G *-optimal*

a. Diseño de mezcla *optimal*

Los diseños I-D-G-*optimal* son ampliamente empleados en la industria desde hace algunos años. Los diseños *optimal* tienen la ventaja que se pueden añadir restricciones en las proporciones de los ingredientes de la mezcla (Vining *et al.* 1993).

El diseño I-*optimal* está enfocado en minimizar la varianza de predicción promedio sobre la región de diseño. El diseño G-*optimal* está centrado en la varianza de la ecuación de la predicción general. El diseño D-*optimal* está enfocado en la estimación de los mejores coeficientes de modelo posibles, especialmente para regiones de mezcla restringidas (Buruk Sahin *et al.* 2016).

Según Kappele (1998), el diseño I-*optimal* es mejor que los otros diseños de mezcla tradicionales, debido a que dan límites de confianza más estrechos en las predicciones, en promedio, produciendo predicciones de mayor calidad sobre el rendimiento del producto. Además, Bradley y Goos (2012) señalan que debido a que el criterio de optimización “I” está orientado a la predicción este sería más adecuado para diseños de superficie de respuesta.

b. Aplicación de diseño de mezcla *optimal* en el desarrollo de productos

Se desarrolló una bebida de sobremesa con tres ingredientes; extracto acuoso de cáscara de boniato (*Ipomoea batatas* L.), extracto acuoso de hojas de boniato y solución de miel, teniendo como variables respuestas a la capacidad antioxidante DPPH y FRAP, contenido de polifenoles totales y sólidos solubles, mediante un diseño de mezcla I-*optimal*, donde se corrieron 24 formulaciones (Anastácio y De Carvalho 2016).

Se propuso también una pasta para atletas con la adición de varias fuentes proteicas; semolina, aislado de proteína de alverja, harina de avena, aislado de proteína de soya, aislado de proteína de trigo y gluten. Se usó el diseño de mezcla D-*optimal*, corriendo en total 31 fórmulas. Se consideró como parámetro principal a la dureza, pero se analizaron también

tiempo de cocción y pérdida de sólidos en la cocción. La fórmula óptima tuvo más alta aceptabilidad sensorial que su control (Kamali Rousta *et al.* 2020).

De similar manera, se desarrolló una bebida funcional con alta capacidad antioxidante a partir de jugo de frutas rojas, extractos de plantas y solución de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*). Se aplicó el diseño de mezcla *D-optimal*, teniendo 14 corridas. Se analizaron polifenoles totales, contenido de antocianinas, contenido de vitamina C, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante DPPH como variables respuesta (Sahraee *et al.* 2022).

2.8. ESTABILIDAD DE UN PRODUCTO ALIMENTARIO

2.8.1. EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD

La estabilidad se define como la capacidad que tiene una sustancia para resistir cambios durante un tiempo específico. Para un producto alimentario, el período de tiempo que permanece con cambios mínimos a diferentes tipos de deterioro se conoce como su estabilidad de almacenamiento. La estabilidad puede ser evaluada a condiciones ambientales, o para mejorar la velocidad de reacción y reducir así el tiempo necesario para predicciones, puede ser evaluada a condiciones aceleradas; humedades relativas y temperaturas extremas (Bell 2020).

2.8.2. ANTECEDENTES DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA DE PRODUCTOS CON MAÍZ MORADO

Mohammadalinejad *et al.* (2023) desarrollaron encapsulados de extractos de maíz morado con alginato. Se evaluó la estabilidad de antocianinas, polifenoles totales, capacidad antioxidante y color durante cuatro semanas almacenadas a 4, 8°C y temperatura ambiental. Las antocianinas se degradaron siguiendo una cinética de primer orden, y fueron más estables a 4°C y 8°C, que a temperatura ambiental. Mientras que los compuestos fenólicos, el color y la capacidad antioxidante no sufrieron cambios significativos a ninguna temperatura durante el tiempo de seguimiento.

Flores-Aguilar y Flores-Rivera (2018) formularon cuatro bebidas a base de coronta de maíz morado y *Uncaria tomentosa* sp., endulzada con sacarosa y estevia. Se evaluó la estabilidad de antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante durante 86 días a 4 y 18 °C, protegidas de la luz. Las antocianinas se degradaron en menor grado a 4 °C, que, a 18 °C,

siguiendo una cinética de primer orden, mientras que los polifenoles totales y la capacidad antioxidante mostraron estabilidad en el periodo evaluado independientemente de la temperatura de almacenamiento.

Nolazco y Araujo (2015) formularon un filtrante que contenía maíz morado (coronta y grano), canela y clavo de olor, y evaluaron la estabilidad de color y de antocianinas a 70, 80, 90 y 100 % de humedad relativa. Las antocianinas se degradaron con cinética de primer orden y el tiempo de vida media fue de 55, 46,5, 24,5 y 23,8 días a humedades relativas de 70, 80, 90 y 100 %, respectivamente. Además, se evidenció que el color y las antocianinas fueron más estables a 70 y 80 % de humedad relativa. Los filtrantes fueron almacenados en envases de polipropileno con permeabilidad de 0,705 g-milipulgadas/ m²-día-mmHg.

2.9. ESTUDIO DEL EFECTO ANTIOXIDANTE EN HUMANOS

2.9.1. ENSAYOS CLÍNICOS

Los ensayos clínicos son estudios experimentales para evaluar la eficacia y efectividad de una intervención terapéutica, preventiva o educativa. La intervención en el área clínica se refiere a la acción(es) dirigida(s) a variar una o más condiciones de una persona sana o con enfermedad, de manera individual o grupal (Zurita-Cruz *et al.* 2018).

a. Tipos de ensayos clínicos

Existen muchos tipos de ensayos clínicos, en la Figura 6 se observa un diagrama de los diferentes estudios clínicos completamente aleatorizados (ECCA).

b. Ensayos clínicos con alimentos

Los ensayos clínicos también pueden llevarse a cabo para evaluar el efecto de productos alimentarios, pero existen muchas cuestiones técnicas que son todo un desafío en cada una de las fases del ensayo: la organización inicial del ensayo, su ejecución y, finalmente, la difusión de los datos una vez finalizado el ensayo (Brown *et al.* 2018). Según Brown *et al.* (2018) los desafíos a tenerse en cuenta son:

- Más difícil conseguir financiación industrial para apoyar el ensayo
- El soporte técnico para iniciar una prueba puede ser inexistente
- El placebo es más difícil de crear
- Es difícil entregar alimentos a los pacientes

- Los alimentos deben mantenerse frescos
- La comida sabrosa es un problema; los medicamentos sabrosos no lo son
- Los pacientes pueden acceder a los alimentos más fácilmente que a los medicamentos
- Los pacientes pueden compartir su comida
- Los marcadores de cumplimiento convencionales pueden ser poco fiables
- Los biomarcadores plasmáticos de cumplimiento deben ser exclusivos de la intervención alimentaria o nutracéutica
- Análisis estadístico
- La respuesta del público a los resultados positivos
- Sano escepticismo (¿incredulidad?) ante los resultados del campo médico.

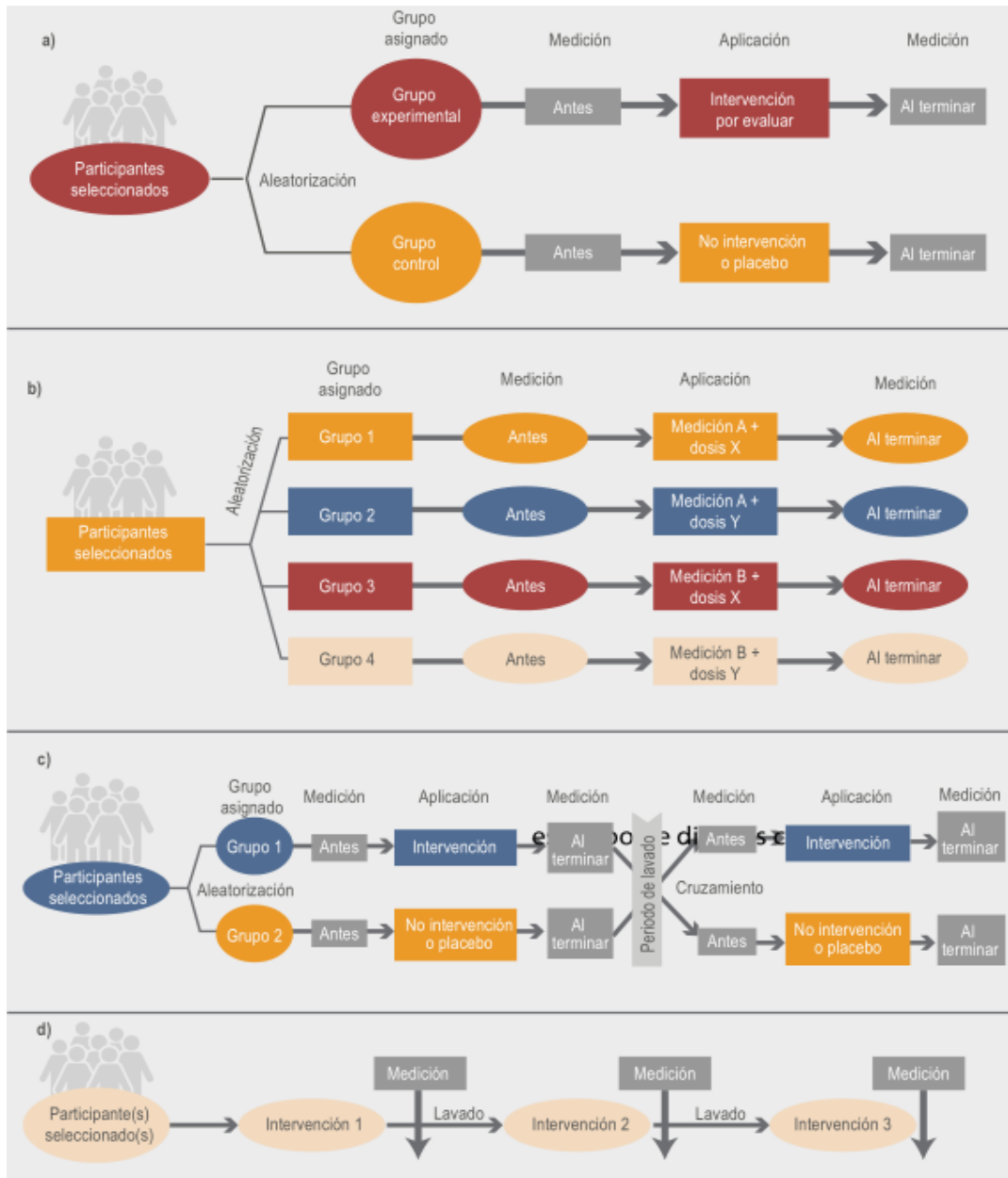
2.9.2. ANTECEDENTES DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HUMANOS DE PRODUCTOS CON MAÍZ MORADO

A la fecha, no se encontró estudios en humanos de la actividad antioxidante de productos con maíz morado; sin embargo, en esta sección se muestra un estudio con un producto que contenía maíz morado en ratas y otros estudios con productos ricos en antocianinas en humanos, debido a la escasez de estudios con maíz morado.

Wattanathorn *et al.* (2018) formularon una bebida funcional que contenía extractos de coronta de maíz morado y hojas de *Pandanus amaryllifolius*, y evaluaron su efecto en la memoria y cambios cerebrales en la menopausia inducida por ovariectomía bilateral en ratas. No se observó ninguna mejora en el estado de estrés oxidativo, pero se encontró una mejora de la memoria en parte a través de la supresión de la acetilcolinesterasa y el aumento de la señalización de la proteína quinasa 1 y 2 en el hipocampo.

Bakuradze *et al.* (2019) estudiaron los efectos biológicos de un jugo de frutas rico en antocianinas que contenía zumo de uva, zumo de arándano rojo, puré de manzana, arándanos y fresas, zumo de aronia y puré de acerola. Fue un estudio de intervención controlado con un grupo placebo, en el que participaron un total de cincuenta y siete voluntarios varones sanos y de nueve semanas de duración (una semana de acondicionamiento y ocho semanas de intervención). Se evaluaron los niveles de CAT y SOD, entre otros, como parámetros de estrés oxidativo. Los resultados indicaron que únicamente la actividad de la SOD se elevó significativamente en el grupo de consumo de jugo de frutas rico en antocianinas, mientras que el resto de los parámetros permanecieron sin cambios significativos.

Kuntz *et al.* (2014) investigaron los efectos en los parámetros relacionados con la oxidación y la inflamación en bebidas ricas en antocianinas (jugo y batido elaborados con una mezcla de uvas rojas y arándanos (*Vaccinium myrtillus*). Fue un estudio con tres grupos; uno de consumo de jugo, otro de batido y el otro placebo, donde todos los participantes (treinta voluntarias sanas) pasaron catorce días en cada grupo. Dentro de los parámetros relacionados al estrés oxidativo, se evaluaron las actividades de las enzimas antioxidantes; SOD, CAT y GPx y TEAC en plasma, SOD en eritrocitos, MDA y TBARS en plasma y orina. Las actividades de SOD y CAT y la capacidad antioxidante equivalente de trolox en plasma aumentaron significativamente después de la ingestión de las bebidas. Las actividades de GPx plasmática y SOD en eritrocitos no se vieron afectadas. Las concentraciones plasmáticas y urinarias de MDA disminuyeron después de la ingestión de bebidas.



*a; ECCA clásico, b; ECCA factorial, c; ECCA cruzado, d; Ensayo clínico de N=1.

Figura 6: Tipos de ensayos clínicos controlados y aleatorizados (ECCA)

FUENTE: Tomado de Zurita-Cruz *et al.* (2018)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El procesamiento de los ingredientes del filtrante, caracterización fisicoquímica, estudio del envase y análisis biológicos se llevaron a cabo en la Planta Piloto de Alimentos y en los laboratorios de investigación de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los análisis de capacidad antioxidante y componentes bioactivos de los ingredientes y filtrantes en la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Mientras que, los análisis microbiológicos, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. REACTIVOS

3.2.1. REACTIVOS PARA ANÁLISIS QUÍMICOS

Los reactivos dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH), ácido 6-hidroxi-2,3,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), acetona, ácido clorhídrico, reactivo de Folin-Ciocalteu, sal disódica de fluoresceína, cloruro de potasio, ácido gálico, tampón de fosfato 75 mM a pH 7,4, metanol de grado HPLC, acetato de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de cianidina 3-O-glucósido grado USP y nitrito de sodio se adquirieron de Merck (Merck & Co., Inc., EE. UU.). Los reactivos ABTSTM *Chromophore*, pirogalol rojo, azul brillante G puro, albúmina de suero bovino fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Merck & Co., Inc., EE. UU.). El persulfato de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, hidróxido de sodio, ácido fórmico, acetonitrilo grado HPLC, ácido sulfúrico y cloruro de sodio de J.T. Baker, Avantor (EE. UU.). El cloruro de litio, acetato de potasio, cloruro de magnesio y cromato de potasio de Fermont (Productos químicos Monterrey, México). Se utilizó agua Milli-Q (< 18,2 MΩ·cm) para preparar todas las soluciones de análisis.

3.2.2. MEDIOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Agar dextrosa papa, caldo Rappaport Vassiliadis, agua peptonada, caldo de Selenito Cistina se adquirieron de Merck. El caldo verde brillante, agar verde brillante, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), y el agar MacConkey se adquirieron de DIFCO®.

3.3. MATERIALES VEGETALES

Los materiales vegetales usados para la elaboración del filtrante fueron: maíz morado (*Zea mays* L.) (parte coronta), membrillo (*Cydonia oblonga* M.), estevia (*Stevia rebaudiana* B.), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*). Las corontas de maíz morado de la variedad INIA-601 se adquirieron de Agrícola Pro Campo SRL (Cajamarca, Perú). En el Anexo 1 se muestra el certificado de calidad y en el Anexo 2 el informe de ensayo de micotoxinas. Las hojas secas de estevia se compraron de la empresa Stevia Coronel S.A.C. (Lima, Perú). Los frutos frescos de membrillo de la variedad serrano, así como la canela y el clavo de olor se compraron de un mercado local (Lima, Perú). Todos los ingredientes se almacenaron a 4 °C.

La elección de estos vegetales se debió al uso frecuente de éstos en la elaboración de la “chicha morada” y de postres a base de maíz morado, así como por sus propiedades bioactivas revisadas. La variedad INIA-601 de la coronta de maíz morado se eligió por tener un alto contenido de antocianinas comparado con otras variedades conocidas, reportado en un anterior estudio (Piña 2018).

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. ANÁLISIS QUÍMICOS

a. Preparación de la muestra

Para análisis de capacidades antioxidantes, polifenoles totales y carbonilos de proteína:

Los ingredientes se molieron a tamaño de partícula menor a 600 µm y se extrajeron usando metanol: agua (50:50 v/v) a pH 2 en un agitador vortex-SA8 (Cole-Parmer, Reino Unido) a 620 rpm en condiciones de oscuridad durante una hora. A continuación, el extracto se centrifugó a 10 000 g durante 10 min (4 °C) en una centrífuga Z216MK (Labortechnik GmbH, Alemania) y se separó el sobrenadante. Se realizó una segunda extracción utilizando

acetona:agua (70:30 v/v). Los sobrenadantes de cada extracción se combinaron y almacenaron a 4 - 8 °C hasta su análisis el mismo día. Se usó una relación solvente/sólido de 200 para la extracción.

Los filtrantes se extrajeron en agua, simulando la realización de una infusión. Para ello, las bolsitas de filtrantes se colocaron en un vaso de precipitado y se vertieron sobre ellas 250 mL de agua destilada a 95 ± 1 °C, se dejaron en reposo 5 min y se sumergieron tres veces antes de retirar las bolsitas filtrantes (Castañeda-Saucedo *et al.* 2020). Las infusiones se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se centrifugaron en las mismas condiciones que los extractos de los ingredientes y se almacenaron a -18 °C hasta análisis.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1000 xg a 4 °C por 10 minutos para la separación del plasma. El plasma fue dosificado en crio viales para almacenar en congelación (-70 °C) hasta su análisis.

Para análisis de antocianinas monoméricas totales:

Los ingredientes se molieron a tamaño de partícula menor a 600 μm y se extrajo con acetona:agua (70:30 v/v) y HCl al 0,01 % (Giusti y Wrolstad 2005) a 620 rpm en un agitador vortex-SA8 (Cole-Parmer, Reino Unido) por una hora. Luego, la mezcla se centrifugó, en las mismas condiciones ya mencionadas en la sección a, para separar los sobrenadantes. Esta extracción se repitió tres veces. Todos los sobrenadantes se agruparon en un solo tubo y se almacenaron a 4 - 8 °C hasta su análisis el mismo día. Se usó una relación solvente/sólido de 100 para la extracción.

La extracción de los filtrantes se realizó como en la sección a.

b. Capacidad antioxidante ORAC_{FL} (CA-ORAC_{FL})

La CA-ORAC_{FL} de los extractos de los ingredientes del filtrante y de los filtrantes se midió de acuerdo con el método oficial 2012.23 (AOAC 2019). La reacción se llevó a cabo en una microplaca negra de 96 pocillos (Costar, España) y se usó un tampón de fosfato de potasio a pH 7,4 (75 mM). Brevemente, se colocaron 150 μL de una solución de fluoresceína (FL) (111,2 nM), y 25 μL del extracto de la muestra (o tampón (como blanco), control o estándar) a cada designado. Luego, la placa se incubó a 37 °C por 30 min. Finalmente, se agregaron 25 μL de AAPH (153 mM) a todos los pocillos para lograr un volumen final de 200 μL . La intensidad de la fluorescencia se midió utilizando un lector de microplacas Synergy HTX

Multi-Mode (Biotek Instruments Inc., VT, EE. UU.) con una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente. La curva de calibración se preparó con el blanco y cinco puntos usando Trolox como estándar (6,25 a 100 μM , concentración final), resultando en la siguiente ecuación: ($Y = 0,279x + 2,8206$; $R^2 = 0,998$). Los resultados se expresaron como micromoles de Trolox equivalente por gramo de peso seco del ingrediente del filtrante ($\mu\text{mol ET/g PS}$) o por mililitro de infusiones ($\mu\text{mol ET/mL}$).

c. Capacidad antioxidante ORAC_{PGR} (CA-ORAC_{PGR})

La CA-ORAC_{PGR} de los filtrantes y del plasma se realizó según lo descrito en el método oficial AOAC 2012.03 (AOAC 2019). Brevemente, se mezclaron 25 μL de las muestras diluidas con tampón fosfato (75 mM, pH 7,4), 184 μL de tampón fosfato (para tener un volumen final de 250 μL) y 20 μL de solución de pirogalol (PGR) (concentración final de 5 μM), luego se incubó por 30 minutos a 37°C. Se inició la reacción agregando 21 μL de la solución de AAPH (Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina, concentración final de 10 mM) previamente incubada a 37°C. Finalmente, se registró la disminución de absorbancias cada 2 minutos por 3 horas a 540 nm en un lector de microplaca Synergy HTX Multi-Mode (Biotek Instruments Inc., VT, EE. UU.). La curva de calibración se calculó con diluciones seriadas del estándar trolox (0-1000 μM), lo cual resultó en la siguiente ecuación: ($Y=0,02x + 0,4882$; $R^2=0,996$). Los resultados se expresaron como μM de equivalente Trolox ($\mu\text{M ET}$) o $\mu\text{mol ET/g}$ de peso seco en el caso del filtrante.

d. Capacidad antioxidante en equivalente de Trolox (cuyas siglas conocidas en inglés TEAC)

La capacidad antioxidante en equivalente de trolox (TEAC) de los filtrantes y del plasma se evaluó según Re *et al.* (1999) adaptado a un lector de microplaca. Para ello, se preparó el radical ABTS^{•+} por la mezcla de soluciones acuosas de ABTS (7mM) y persulfato de potasio (2,45 mM, concentración final) y su posterior reposo por 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego, la solución de ABTS^{•+} se diluyó con tampón fosfato (5 mM) hasta alcanzar una absorbancia a 734 nm de $0,7 \pm 0,02$ (solución de trabajo). Para la reacción, se mezclaron 10 μL de la muestra diluida en tampón fosfato con 100 μL de la solución de trabajo, en una placa de 96 pocillos (Falcon®, EE. UU.), y se leyeron a 734 nm en un lector de microplaca Synergy HTX Multi-Mode (Biotek Instruments Inc., VT, EE. UU.). La curva de calibración se calculó con diluciones seriadas del estándar trolox (0 - 500 μM), lo cual resultó en la siguiente ecuación: ($Y=0,138x + 0,0906$; $R^2 = 0,999$). Los resultados se

expresaron como milimoles de equivalente Trolox por litro de plasma (mmol ET/L) o $\mu\text{mol ET/g}$ de peso seco en el caso del filtrante.

e. Contenido de polifenoles totales (PT)

El contenido de PT de los extractos de los ingredientes de los filtrantes y de los filtrantes se midió por el método de Folin-Ciocalteu (Magalhães *et al.* 2010) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 50 μL de las muestras diluidas, estándar o agua ultrapura (como blanco) con 50 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido en agua ultrapura (1:5, v/v)) en una microplaca de 96 pocillos (Falcon®, USA) y se dejó reposar 2 min. Luego, se agregaron 100 μL de la solución de hidróxido de sodio 0,3 M y de inmediato se llevó la placa a un lector de microplacas Synergy HTX Multi-Mode (Biotek Instruments Inc., USA), el cual fue previamente programado para agitar, reposar por 5 min y leer a 760 nm. Se elaboró una curva de calibración usando diferentes concentraciones (0,0 – 35,0 mg/L) de soluciones estándar de ácido gálico, resultando en la siguiente ecuación: ($Y = 0,014 x - 0,0057$; $R^2 = 0,999$). Los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco del ingrediente o del filtrante (mg EAG/g PS) y por litro de infusión (mg EAG/L).

f. Cuantificación de carbonilos de proteína

La concentración de carbonilos de proteína presentes en el plasma se evaluó con un método simplificado adaptado a un lector de microplaca (Quintana-Villamandos *et al.* 2016). Brevemente, 40 μL de muestras de plasma diluidas se mezclaron con 40 μL de la solución de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (10 mM, en HCl 2,5N) y se dejaron en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, a la mezcla se añadió 20 μL de una solución de NaOH 6N y se dejó en reposo otros 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplaca Synergy HTX Multi-Mode (Biotek Instruments Inc., VT, EE. UU.). La concentración se calculó usando el coeficiente de extinción molar del DNPH a 450 nm ($\epsilon=22308 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y un paso óptico de 0,249 cm y se expresó como nmol de carbonilos/mg proteína. La proteína total se calculó con un método basado en Azul Brillante de Coomassie G-250, teniendo como estándar a la albúmina de suero bovino (Grintzalis *et al.* 2015).

g. Contenido antocianinas monoméricas totales (AMT)

El contenido de AMT de los extractos e infusiones se determinó mediante el método de diferencial de pH de Giusti y Wrolstad (2005), adaptada a una microplaca de 96 pocillos (Falcon®, EE. UU.). Los extractos de las muestras se mezclaron con tampones (1:40), a pH 1 (cloruro de potasio ajustado con HCl) y pH 4,5 (acetato de sodio ajustado con HCl) en pocillos seleccionados para la medición a ambos pH. La placa se leyó a 520 y 700 nm con un lector de microplacas Synergy HTX Multi-Mode (Biotek Instruments Inc., EE. UU.). El contenido de AMT se calculó utilizando el peso molecular de cianidina-3-glucósido 449,2 y su absorptividad molecular 26.900 en tampón acuoso. Los resultados se expresaron en miligramos de cianidina-3-glucósido equivalente por gramo de peso seco de los ingredientes o del filtrante (mg EC3G/g PS) y por litro de infusión (mg EC3G/L).

3.4.2. ANÁLISIS DE HUMEDAD

El contenido de humedad se midió en todos los ingredientes del filtrante y en el filtrante. Se midió con el método de la AOAC (2019).

3.4.3. ANÁLISIS DE ACIDEZ

La acidez titulable se determinó en membrillo fresco para caracterizarla, y se midió con el método de la AOAC (2019), expresándolo en gramos de ácido cítrico anhidro por 100 g.

3.4.4. MEDICIÓN DE pH

El pH de las infusiones se midió con un potenciómetro HI9026 HANNA (Rumania), previamente calibrado.

3.4.5. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE AGUA

La actividad de agua de los filtrantes se midió con un medidor de actividad de agua AquaLab® 4TE DUO (Decagon, EE. UU.), previamente calibrado.

3.4.6. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

El perfil granulométrico de los ingredientes del filtrante se determinó tamizándolos con un tamiz vibratorio JEL (Siemens-Schuckertwerke, Alemania) durante 10 min. Se utilizaron mallas de tamiz de prueba estándar de EE. UU. (WS Tyler): 2000, 1000, 600, 425, 300, 250, 212, 180, 100 y 75 µm. Los ingredientes del filtrante retenidos en cada tamiz se pesaron, se

compararon con el peso total y se expresaron en porcentaje, como en reportes anteriores (Miao *et al.* 2011).

3.4.7. MEDICIÓN DE POROSIDAD Y TAMAÑO PROMEDIO DE PORO

La porosidad de la bolsita filtrante se determinó mediante análisis de imágenes. Las imágenes se adquirieron con un microscopio digital USB (Crenova, EE. UU.) utilizando un fondo negro, iluminación natural y un aumento de 300x. El brillo, el contraste y el umbral de las imágenes se ajustaron y convirtieron en imágenes binarias de 8 bits para analizarlas utilizando la herramienta de análisis de partículas del software ImageJ® (<https://imagej.nih.gov/ij/>). El software calculó el tamaño medio de los poros y la porosidad (%). El porcentaje de porosidad fue dado como la relación entre el área total de poros y el área total de la imagen (AlMarzooqi *et al.* 2016).

3.4.8. DETECCIÓN DE FUGAS DE SÓLIDOS

Se determinó la fuga de sólidos en la infusión para cada tipo de bolsita filtrante. La infusión se preparó como en la Sección 3.4.1 (a) y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min en tubos Falcon previamente pesados. Luego, se separó el sobrenadante y se secó el sedimento a 40 °C hasta peso constante. El porcentaje de fuga de sólidos se calculó como el peso de gránulos secos x 100/el peso del filtrante inicialmente en la bolsa.

3.4.9. CURVA DE ESPECTRO Y MEDICIÓN DE COLOR

Se determinó la curva de espectro y el color en los sobrenadantes de las infusiones obtenidas como en la Sección 3.4.1 (a) utilizando un espectrofotómetro CM-5 (Konica Minolta, Inc., Japón). La transmitancia de las infusiones se registró de 400 a 700 nm y el color se midió según las coordenadas CIELAB: L^* (luminosidad), a^* (componente rojo), b^* (componente amarillo) con el iluminante primario D65 y un ángulo de observador de 10 grados. Se usó una cubeta de 1 cm de paso óptico y se empleó agua desionizada como blanco.

3.4.10. MEDICIÓN DE ISOTERMA DE SORCIÓN DE HUMEDAD

La isoterma de sorción de humedad del filtrante se midió mediante el método estático (gravimétrico) (Sinija y Mishra 2008). Se usó diferentes soluciones salinas saturadas (cloruro de litio, acetato de potasio, cloruro de magnesio, nitrito de sodio, cloruro de sodio y cloruro de potasio) para conseguir humedades relativas (HR) que oscilaron entre 10,1 y

86,5 %, que corresponden a actividades de agua de 0,10 a 0,87 (6 puntos). Así mismo, se usó el ácido sulfúrico y el agua para generar actividades de agua de 0 y 1, respectivamente. Las diferentes soluciones se mantuvieron en desecadores herméticamente cerrados. Para la prueba, se colocaron 3g de muestra del filtrante optimizado en el desecador. Los desecadores se incubaron en una estufa Venticell® VC 111 Eco (Medcenter Einrichtungen GmbH, Alemania) a 25 °C y a presión atmosférica. Las muestras se pesaron cada 24 h hasta peso constante.

3.4.11. ANÁLISIS DE PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) del sobre bilaminado se determinó con el método ASTM E96-00e1 (ASTM 2010). Las muestras del sobre bilaminado fueron colocadas en celdas circulares de 0,00283 m² de área de permeación que contenían un desecante de gel de sílice (Fisher Chemical™, China). Luego, las celdas fueron pesadas y colocadas en un desecador que contenía agua, la cual generaba una humedad relativa de 100 %. El desecador fue colocado en una estufa Venticell® VC 111 Eco (Medcenter Einrichtungen GmbH, Alemania) a 25 °C. Se controló el peso cada día por 6 días. Se construyeron curvas la variación del peso en función del tiempo para conocer el valor de la pendiente y el cálculo fue como se muestra en la Ecuación 1:

$$PVA \left(\frac{g}{msPa} \right) = \frac{(pendiente (g) / 3600 (s) * espesor (m))}{\text{área de la permeación (m}^2) * 3162,5 (Pa)} \quad (1)$$

Donde 3600; tiempo de 1 hora en segundos y 3162,6; presión de vapor de agua a 25 °C multiplicado por la diferencia de actividades de agua del desecador menos de la celda (valor=1). El espesor del sobre bilaminado se midió con un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón).

3.4.12. ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS POR UHPLC

a. Preparación y semi-purificación de la muestra de infusión

La infusión del filtrante óptimo se extrajo como en la Sección 3.4.1 (a). Para la semi-purificación, primero se acondicionó un cartucho Sep-Pak Plus C18 (Waters Corporation, MA, EE. UU.) con metanol y agua acidificados al 0,01% con HCl, luego se hizo pasar 2 mL de la muestra de infusión y se lavó con 4 mL de agua acidificada para remover los componentes polares y posteriormente se recogió con 4 mL de metanol acidificado.

Finalmente, se diluyó a la mitad con agua acidificada y se filtró a través de un filtro de jeringa PVDF de 0,45 μm y 25 mm de diámetro (Teknokroma Analítica S.A., España) dentro de un vial ámbar listo para análisis.

b. Hidrólisis ácida de la muestra

Para detectar las antocianidinas del maíz morado presentes en la infusión del filtrante óptimo se realizó la hidrólisis ácida de ésta según Lao y Giusti (2016). Brevemente, se colocó 2 mL de la infusión en un tubo de prueba con tapa rosca y se le adicionó 10 mL de HCl 2N. Se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz y se dejó por 90 minutos en un baño de agua hirviente. Después del tiempo señalado, se enfrió en un baño helado. Para evitar la degradación de las antocianidinas, la muestra hidrolizada se corrió en HPLC dentro de 60 minutos. Para identificar las antocianidinas del maíz morado; se corrieron extractos previamente hidrolizados de uva concord (cianidina y peonidina) y de fresa (pelargonidina) con la metodología ya descrita.

c. Preparación de la curva estándar

La curva estándar fue preparada con la inyección de varias concentraciones (0 - 25 $\mu\text{g/mL}$) de cianidina-3-glucósido (C-3-G) y graficando éstas con sus respectivas áreas de picos obtenidas. Se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 43809x - 5988,7$; $R^2 = 0,999$. Para obtener la concentración de antocianinas (expresada en mg EC3G/L de infusión) se sumó todas las áreas de los picos de las diferentes antocianinas, los cuales fueron reconocidas por sus espectros de absorción a 520 nm de longitud de onda.

d. Sistema UHPLC y condiciones cromatográficas

El sistema de UHPLC incluyó un cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con dos bombas de ultra alta velocidad L-2160U (Hitachi High-Technologies, China), un inyector automático L-2200U (Hitachi High-Technologies, Japón), un horno de columna L2300 (Hitachi High-Technologies, China) y un detector de arreglo de diodos L-2455U (Hitachi High-Technologies, Japón). Las separaciones se realizaron en una columna de fase reversa C18 con taponamiento de cloruro de trimetilsililo (TMS) Kinetex $\text{\textcircled{R}}$ (30 x 2,1 mm), tamaño de partícula de 1,7 μm y tamaño de poro 100 \AA , protegido por una guarda columna (Phenomenex Inc., California, EE. UU.). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una fase móvil que consistió en ácido fórmico al 4,5 % (v/v) (fase A) y 100 % de acetonitrilo (fase B) a una velocidad de flujo de 0,55 mL/min. Los solventes fueron filtrados a través de

filtros de membrana de poliamida Whatman™ 0,45 µm x 47 mm. El programa de gradiente fue de A (97 %) – B (3 %) (0 - 3 min), A (75 %) – B (25 %) (3 - 4 min), A (97 %) – B (3 %) (4 - 5 min). El tiempo de corrida total fue de 5 minutos y los picos de las antocianinas se detectaron a una longitud de onda de 520 nm. El volumen de inyección fue de 2 µL y la temperatura de columna fue de 50 °C. El método cromatográfico fue ligeramente modificado de Fibigr *et al.* (2017).

3.4.13. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La actividad de la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en el plasma se midieron según el protocolo del fabricante de los Kits comerciales (Cayman Chemical, EE. UU.).

3.4.14. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Todos los microorganismos se analizaron de acuerdo con los lineamientos de la ICMSF (2000). Para el análisis microbiológico del filtrante se consideró los criterios microbiológicos de la NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01, según se indica en la RM N° 591-2008-MINSA (2008) en las secciones XVII.2 “Hierbas de uso alimentario para infusiones” y XIV.3 “Frutas y hortalizas desecadas, deshidratadas o liofilizadas”, esto debido a que, aparte de hierbas, el filtrante incluyó una fruta desecada (membrillo). La NTS N° 071 señala analizar mohos y enterobacterias a las hierbas destinadas a infusiones, mientras que mohos, levaduras, *E. coli* y *Salmonella sp.* a las frutas desecadas.

Se pesó 10 g de muestra de filtrante homogenizada y se colocó en un frasco con 90 mL de agua peptona estéril (10^{-1}). A partir de esta dilución se realizó las diluciones seriadas de 10^{-2} y 10^{-3} .

a. Recuento de Mohos y levaduras

Se realizó mediante el recuento estándar en placa en agar papa dextrosa. De cada una de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) se tomó 0,1 mL; se colocó en placas de agar papa dextrosa con cloranfenicol al 0,01 % y se extendió por toda la superficie usando una espátula de Drilgalsky. Las placas fueron incubadas a 25 °C por 3 a 5 días. Para el recuento, se consideraron las placas menores a 300 colonias; colonias cremosas, opacas o pastosas para levaduras, y colonias algodonosas, lanosas para mohos. El resultado se expresó como Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/g de filtrante.

b. Recuento de Enterobacterias

Se realizó el recuento en placa en agar MacConkey. De las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} se tomó 0,1 mL y se colocó en placas con agar MacConkey; se extendió por toda la superficie usando una espátula de Drilgalsky y luego se incubó a 37 °C por 24 h. Para el recuento, se consideraron las placas menores a 150 colonias y el resultado se expresó como UFC/g de filtrante.

c. Recuento de *Escherichia coli*

De las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , se tomó 0,1 mL y se colocó en placas con agar bilis rojo violeta (VRBA); se extendió por toda la superficie usando una espátula de Drilgalsky y luego se incubó a 37 °C por 24 h. Para el recuento se consideraron las placas menores a 300 colonias y el resultado se expresó como UFC/g de filtrante.

d. Detección de *Salmonella sp.*

Se pesó 25 g de muestra de filtrante, se colocó en 225 mL de agua de peptona tamponada y se incubó a 37 °C por 24 horas. Se tomó 1 mL del cultivo y se colocó a un tubo con 10 mL de Caldo Selenito Cistina y a otro tubo con 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis y se incubaron a 37 °C por 24 h y a 43 °C por 24 h respectivamente.

De los cultivos de caldo de Selenito Cistina y Rappaport Vassiliadis se realizó la siembra en superficie por agotamiento en Agar Xilosa - Lisina - Desoxicolato (XLD) y se incubó a 35 °C por 24 horas. Se verificó en la placa la presencia de colonias características para *Salmonella sp.* y el resultado se reportó como presencia o ausencia en 25 g de muestra.

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La primera parte del presente trabajo de investigación consistió en el procesamiento de las materias vegetales a usar en la elaboración del filtrante para luego caracterizarlos; contenido de polifenoles totales, antocianinas y medición de la capacidad antioxidante *in vitro*. En base a ello, se realizó la optimización de la fórmula del filtrante a base de coronta de maíz morado con los ingredientes mencionados en función del contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante *in vitro* y se evaluó la estabilidad en almacenamiento del filtrante óptimo. Finalmente, se realizó la evaluación del efecto antioxidante *in vivo* del filtrante óptimo.

En la Figura 7 se muestra el diseño metodológico y en la Figura 8 se puede observar el diagrama de flujo de la elaboración del filtrante.

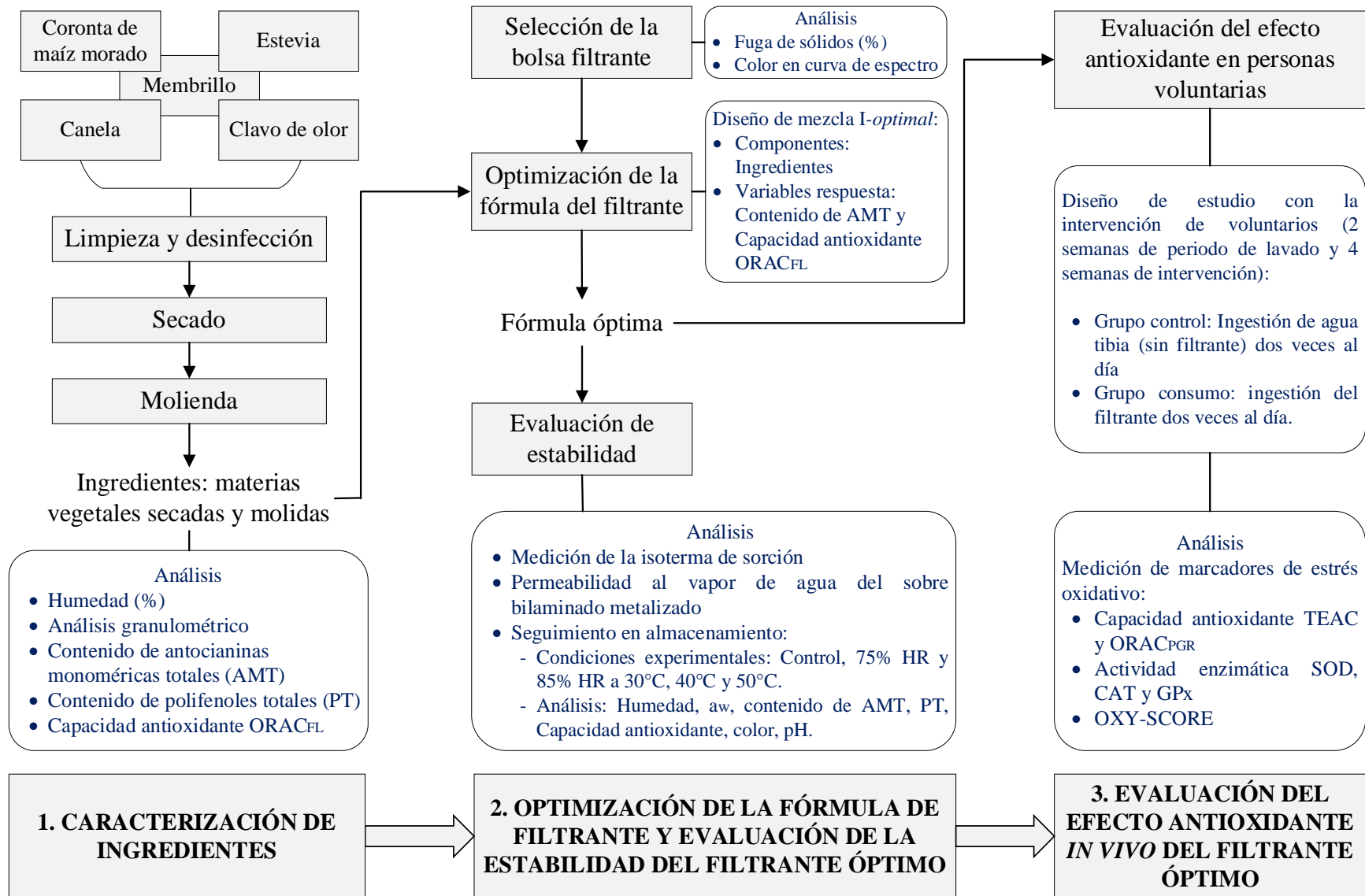


Figura 7: Diseño metodológico

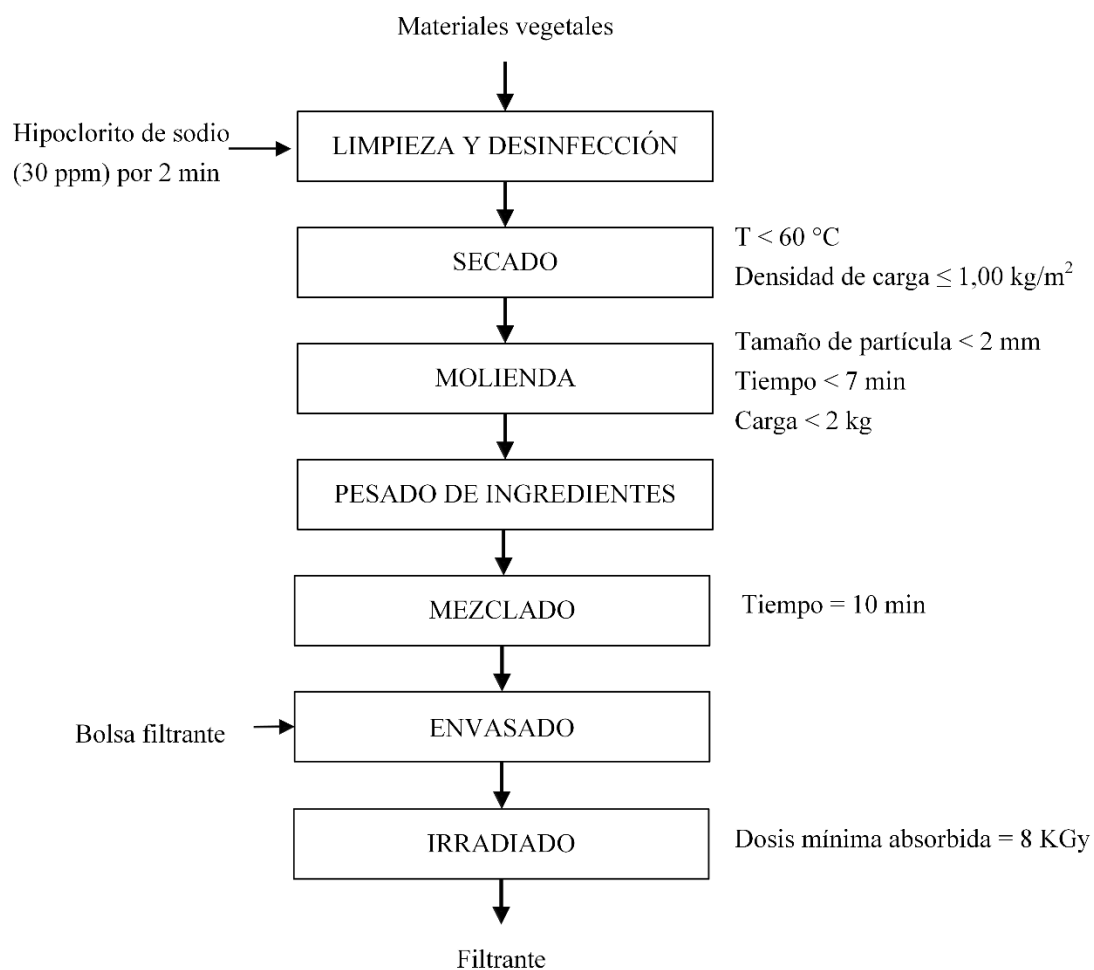


Figura 8: Diagrama de flujo del filtrante a base de coronta de maíz morado

3.5.1. CARACTERIZACIÓN DE INGREDIENTES

a. Procesamiento de las materias vegetales

Limpieza y desinfectado

Las corontas de maíz morado, membrillo, canela y clavo de olor se limpiaron, desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (30 ppm) por 2 min, y enjuagaron con agua potable. La estevia se compró desecada y envasada.

Secado

Los ingredientes previamente lavados se secaron en corriente de aire (3,0 - 3,5 m/s) a diferentes temperaturas en un secador de aire caliente DRR-200 (Reter, Perú). La coronta de maíz fue picada y secada a 58 ± 2 °C por 3 h (Khanal *et al.* 2010) con una densidad de carga de aproximadamente $0,67$ kg/m². El membrillo fresco se rebanó (2 mm) con un procesador

de verduras CL 50 Ultra (Robot Coupe, Francia) y se secó a 56 ± 2 °C durante 3 h (Baltacioğlu *et al.* 2015) con una densidad de carga de aproximadamente $1,00 \text{ kg/m}^2$. Las hojas de estevia también se secaron adicionalmente para tener una humedad por debajo del 10%, a 40 ± 2 °C durante 7 h (Lemus-Mondaca *et al.* 2016) con una densidad de carga de aproximadamente $0,50 \text{ kg/m}^2$. La canela y el clavo de olor fueron secados a 50 ± 2 °C por 3 h (Arabhosseini *et al.* 2007) con una densidad de carga de aproximadamente $1,00 \text{ kg/m}^2$.

Molienda

Después del secado, los ingredientes se molieron para reducir el tamaño de la muestra de partículas a < 2 mm, utilizando diferentes métodos de molienda basados en la dureza de los ingredientes: la coronta de maíz morado se molió con un molino de martillos (diseñado y construido en la Planta Piloto de Alimentos, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú), usando un tamiz de 2,5 mm de diámetro y con una duración promedio de 7 minutos por cada 2 kg de carga dosificado lentamente para prevención de atoros, los clavos de olor se molieron utilizando un molino GRINDOMIX GM 200 (Retsch GmbH, Alemania) a 5000 RPM por 3 minutos por cada 100 g de carga y tamizado con una malla de $2000 \mu\text{m}$ y los demás ingredientes secos se trituraron utilizando un cortador R5VV (Robot Coupe, Francia) a 2000 RPM por 3 minutos por cada 500 g de carga y tamizado con una malla de $2000 \mu\text{m}$. Luego, todos los ingredientes procesados se envasaron en bolsas de aluminio negro y se almacenaron a -18 °C hasta análisis y uso en la formulación del filtrante.

b. Análisis de los ingredientes

Se analizaron el contenido de humedad, análisis granulométrico, capacidad antioxidante ORAC_{FL} , contenido de antocianinas monoméricas totales y contenido de polifenoles totales.

3.5.2. OPTIMIZACIÓN DE LA FÓRMULA DEL FILTRANTE Y EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE FILTRANTE ÓPTIMO

a. Selección del tipo de bolsa filtrante

Se probaron cuatro tipos de bolsas compostables de Andean Jungle® (Junín, Perú): bolsa de papel filtro redonda de $6,5 \times 6,0$ cm (B1), bolsa de fibra de maíz rectangular de $6,0 \times 8,0$ cm (B2), bolsa de textil no tejido rectangular de $6,0 \times 8,0$ cm (B3) y bolsa de nylon tejido rectangular de $6,0 \times 7,0$ cm (B4). La elección de la bolsa a utilizar se basó en el porcentaje mínimo de fuga de sólidos y máximo color medido con la curva de espectro a 530 nm de las

infusiones resultantes. Para ello se preparó una formulación de filtrante a base de mazorca de maíz morado, membrillo, estevia, canela, clavo (20 % de cada uno), luego se embolsaron en las diferentes bolsas y finalmente se preparó las infusiones como se describe en la Sección 3.4.1. (a).

b. Optimización de la fórmula del filtrante

Se utilizó el diseño de mezcla *I-optimal* (DMO) para optimizar las proporciones de los principales ingredientes del filtrante: coronta de maíz morado, membrillo y estevia. Se usó este tipo de diseño porque tiene la ventaja de que la varianza promedio es minimizada sobre la región de diseño restringida (Anastácio y De Carvalho 2016). El DMO constó de seis puntos por modelo, cinco puntos por *lack of fit* y cinco réplicas, las cuales fueron ordenadas aleatoriamente. La canela (3,33%) y el clavo de olor (0,25%) correspondieron al 3,58 % de la fórmula del filtrante y se fijaron basado en pruebas preliminares. La fracción de estevia se restringió a un rango de 0,0864 a 0,1556 teniendo en cuenta reportes anteriores (Savita *et al.* 2004, Mogra y Dashora 2009, Castañeda-Saucedo *et al.* 2020), mientras que las fracciones de coronta de maíz morado (de 0,0166 a 0,8928) y membrillo (de 0 a 0,8908) se asignaron automáticamente de acuerdo con el diseño, y correspondieron al 96,42 % restante de las formulaciones (Tabla 2). Las formulaciones (3 g) se mezclaron y envasaron en la bolsa previamente seleccionada, y se prepararon infusiones del filtrante como en la Sección 3.4.1. (a) para su análisis. Las variables respuesta fueron la capacidad antioxidante ORAC_{FL} (CA-ORAC_{FL}) y el contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT), las cuales se midieron en las infusiones resultantes y se ajustaron a un modelo cuadrático de Scheffe por el método de regresión de mínimos cuadrados para estimar los valores de los coeficientes (Ecuación 2):

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (2)$$

donde Y es la respuesta, b es el valor del coeficiente del efecto de uno o dos ingredientes, y x_1 , x_2 y x_3 son las proporciones de los tres ingredientes del filtrante.

La bondad de ajuste de los modelos se comprobó mediante la significancia del *lack of fit* ($p > 0,05$), el coeficiente de determinación (R^2), el R^2 ajustado y el R^2 predicho.

Tabla 2: Diseño de mezcla I-optimal para la optimización de la fórmula del filtrante

Corrida	Formulación del filtrante		
	A: Coronta de maíz morado	B: Membrillo	C: Estevia
1	0,4677	0,3767	0,1556
2	0,3790	0,4993	0,1218
3	0,3790	0,4993	0,1218
4	0,8307	0,0137	0,1556
5	0,0166	0,8908	0,0926
6	0,3790	0,4993	0,1218
7	0,8928	0,0000	0,1073
8	0,8928	0,0000	0,1073
9	0,1863	0,6581	0,1556
10	0,5943	0,3193	0,0864
11	0,7360	0,1777	0,0864
12	0,3790	0,4993	0,1218
13	0,8307	0,0137	0,1556
14	0,0243	0,8201	0,1556
15	0,1387	0,7749	0,0864
16	0,3077	0,6059	0,0864

Los ingredientes son expresados en fracciones decimales, que suma 1.

Se midieron experimentalmente la CA-ORAC_{FL} y el contenido de AMT de la fórmula optimizada por el modelo para corroborar los valores predichos mediante el cálculo de los intervalos de confianza al 95 %.

c. Estudio de estabilidad de características del filtrante óptimo

Irradiación de filtrantes

Las muestras de filtrantes fueron sometidas a irradiación-gamma, método común para asegurar la calidad microbiológica y prolongar la vida en anaquel de especias y productos secos (Farkas y Mohácsi-Farkas 2011). La irradiación se realizó con un Irradiador Panorámico Tipo II del radioisótopo Co 60, emisión de rayos gamma y con una dosis mínima absorbida de 8 KGy, ejecutado como servicio por el Centro de Diagnóstico y Producción del Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA (Perú).

Medición y modelado de la isoterma de sorción del filtrante

Se midió la isoterma de sorción del filtrante como se describe en la Sección 3.4.10 y con los datos generados se hizo el modelado. Se usó el modelo GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) como se muestra en la Ecuación 3 para ajustar los datos de la isoterma dentro de una actividad de agua de 0,05 a 0,95 (Van den Berg y Bruin 1981).

$$M_e = \frac{M_g C K a_w}{[(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)]} \quad (3)$$

Donde, M_e es la humedad de equilibrio, M_g es el contenido de humedad de la monocapa GAB (es decir, peso seco, g/100 g PS) y C es una constante correlacionada con la sorción de calor de la monocapa (J/g-mol), y K es una constante relacionada con el calor de sorción de la multicapa.

El agua de la monocapa GAB es el agua fuertemente unida considerando la isoterma hasta a_w de 0,9. En el modelo GAB se considera la adsorción de energías de monocapa y multicapa y se separan; así, el valor C refleja la sorción de calor de la monocapa, mientras que el valor K , los efectos del calor de sorción multicapa (Van den Berg y Bruin 1981).

Se realizó el análisis de regresión y el mejor ajuste a los modelos fue determinado por el coeficiente de determinación ajustado (R^2) y la raíz del error medio cuadrático (REMC).

Permeabilidad al vapor del agua del envase secundario

Se midió la permeabilidad al vapor del agua de un sobre bilaminado metalizado de dimensiones de 8 x 11,3 cm como se describe en la Sección 3.4.11, el cual fue usado como envase secundario de los filtrantes para protegerlo de la luz, agua y oxígeno durante el almacenamiento.

De acuerdo con la Ficha Técnica del producto, la estructura del material del sobre bilaminado metalizado fue: Teraftalato de polietileno (PET) cristal (25 μ m) y polietileno de baja densidad (PEBD) metalizado (65 μ m). En la Figura 9 se puede observar la imagen del sobre bilaminado.



Figura 9: Sobre bilaminado metalizado usado para envasar las bolsitas filtrantes

Evaluación de parámetros fisicoquímicos, compuestos bioactivos, capacidad antioxidante, pH y color del filtrante en almacenamiento

Las muestras del filtrantes (en sobres) se colocaron en desecadores que contenían las sales de cloruro de sodio y cloruro de potasio, generando las humedades relativas de 75 % y 85 %, respectivamente, las cuales fueron verificadas con un termohigrómetro portátil (Lascar Electronics, EE. UU.). Los desecadores fueron colocados en estufas Venticell® VC 111 Eco (Medcenter Einrichtungen GmbH, Alemania) con temperaturas controladas a 30, 40 y 50 °C, teniendo en total 6 condiciones de almacenamiento. Adicionalmente, se almacenó muestras de filtrantes a condiciones ambientales como control. Se hizo seguimiento de los filtrantes en todas las condiciones de almacenamiento hasta que la condición más severa (85 % - 50 °C) llegare a una humedad de 10 %, de acuerdo con la normativa peruana para el filtrante de menta (INACAL 2021). Se evaluó la humedad, actividad de agua, contenido de antocianinas monoméricas totales, polifenoles totales, y capacidad antioxidante ORAC_{PGR}, TEAC, pH y color. Para las condiciones de control y 75 % de humedad relativa se evaluó los días 0, 2, 7 y 14 días, mientras que para las condiciones de almacenamiento de 85 % de humedad relativa, los días 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16 y 19 días. Con todos los valores, se hizo análisis de correlación de Pearson para ver las relaciones entre ellas. Se realizó un análisis microbiológico al inicio y final del estudio de las muestras almacenadas como control. Al iniciar el estudio se analizó también las antocianinas por UHPLC.

Estudio cinético de degradación de antocianinas

El estudio cinético se realizó de acuerdo con Moratalla-López (2019). Los parámetros cinéticos considerados de la reacción fueron orden de reacción, constante de velocidad (k) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Se realizó tres gráficas suponiendo la linealidad de los datos: concentración en función del tiempo (orden 0), Ln (concentración) en función del tiempo (orden 1) y $1/(concentración)$ en función del tiempo (orden 2). Se eligió el orden de reacción a la gráfica con el coeficiente de correlación (R^2) más alto y se consideró la pendiente de la ecuación generada (k). El tiempo de vida media y el valor Q_{10} se calcularon mediante las Ecuaciones 4 y 5, donde k_T es la constante de velocidad de la reacción a una temperatura T y k_{T-10} es la constante de velocidad de la reacción a una temperatura $T-10$ °C.

$$t_{1/2} = \frac{Ln(2)}{k} \quad (4)$$

$$Q_{10} = \frac{k_T}{k_{T-10}} \quad (5)$$

3.5.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE *IN VIVO*

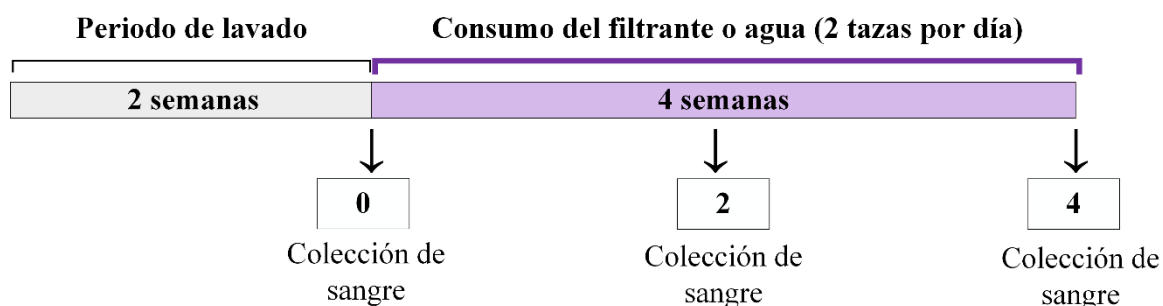
a. Diseño del estudio y voluntarios

Fue un estudio clínico, de investigación experimental, longitudinal prospectivo y diseño de intervención paralelo, llevado a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki, y aprobado por un Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Código de estudio N° 0152). Los voluntarios participantes incluidos en el estudio ($n=18$, ambos sexos, $IMC=19-25,5$ Kg/m^2 , edad=18 - 45 años) fueron personas sanas (Tabla 3); con examen físico normal y que no estaban tomando medicamentos. Además, no eran fumadores o consumidores de alcohol, no consumían suplementos alimenticios o cualquier forma suplementaria de antioxidantes o de preparados de hierbas (hasta dos meses antes del inicio del estudio), no presentaban alergia alimentaria ni practicaban excesivamente deporte. Los participantes otorgaron su consentimiento informado y fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (control y consumo) de nueve integrantes en cada uno. El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Lima y duró seis semanas, entre octubre y diciembre de 2021, consistió en un periodo de lavado de dos semanas, luego un periodo de intervención de cuatro semanas, en cual el grupo de consumo tomaba dos tazas de infusión diariamente (en horas de media mañana y merienda), mientras que el grupo control consumía agua tibia con la misma frecuencia (Figura 10).

Tabla 3: Características basales de los voluntarios (n=18)

	Grupo control (n=9)	Grupo consumo (n=9)
Edad (años)	28,00 ± 7,76	27,67 ± 6,24
Peso (kg)	58,8 ± 10,96	57,21 ± 5,03
Talla (m)	1,59 ± 0,1	1,59 ± 0,07
IMC (kg/m ²)	22,96 ± 2,05	22,82 ± 2,29

Con el fin de evitar las interferencias en la medición del efecto del filtrante, los participantes recibieron la instrucción de restringirse de alimentos ricos en polifenoles, para ello se les proveyó una lista de alimentos tomado de Kuntz *et al.* (2014), donde se incorporó debido al tema de estudio; que debían de evitar alimentos con el aditivo de glucósidos de esteviol (E 960), la “chicha morada” y otros productos que incluían al maíz morado o a la estevia. Se les hizo seguimiento del cumplimiento tanto de los alimentos que debían de evitar como de la toma del filtrante o agua según sea el caso por medio de un recordatorio telefónico y seguimiento de registros dietéticos.

**Figura 10: Diseño del estudio del efecto antioxidante**

b. Registro dietético y cálculos de consumo

Todos los voluntarios registraron su consumo de siete días previos a la recolección de sangre en un registro diario digitalizado en programa Excel, que en total fueron tres registros, ya que fueron tres recolecciones de sangre. La hoja de registro se dividió en 5 tomas (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda y cena) e incluyó los datos de lugar y hora de las tomas, foto de la comida, descripción de los alimentos o ingredientes, medidas caseras y si había sobras de comida o no, con una fotografía (En el Anexo 6 se observa un ejemplo del registro dietético).

Las hojas de registro fueron analizadas en Excel, tomando como referencia la Tablas Peruanas de Composición de Alimentos (Reyes García *et al.* 2017); se calculó la energía (kcal) y los nutrientes (proteínas, carbohidratos totales, fibra dietaria, grasa total, calcio, hierro, sodio, vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, ácido fólico, vitamina B12 y vitamina C) consumidos por persona. Además, para valorar la calidad de la dieta se calculó el índice de alimentación saludable (IAS) con la metodología desarrollada por (Kennedy *et al.* 1995, Norte Navarro y Ortiz Moncada 2011). El cálculo del IAS consistió en la ponderación de 0 a 10 puntos de 10 variables de consumo, haciendo una suma total de 100 puntos y categorizándolas en:

- 0-50: dieta inadecuada
- 51-60: dieta aceptable
- 61-70: dieta buena
- 71-80: dieta muy buena
- >80: dieta excelente

c. Medidas antropométricas, presión y frecuencia cardiaca

Se midió la estatura y el peso corporal de los voluntarios con una balanza-tallímetro GREETMED GT131-200 (Ningbo Greetmed Medical Instruments Co., Ltd., China) y se calculó su IMC (kg/m^2) de acuerdo con lo establecido por la OMS. Las mediciones se realizaron con los voluntarios en ayunas, en posición horizontal y vejiga vacía. Se midió la presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca con un tensiómetro digital de brazo BM 28 (Beurer, Alemania).

d. Procesamiento de muestra de sangre

Las muestras de sangre fueron extraídas en tubos EDTA por el Laboratorio de Servicio de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Luego, las muestras fueron trasladadas en cadena de frío hacia la Universidad Nacional Agraria La Molina para la separación del plasma a 1000 xg y 4 °C por 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5430R (Eppendorf AG, Alemania) dosificado en crio viales y almacenados a -70 °C hasta análisis.

e. Biomarcadores de estrés oxidativo

Se realizó los análisis de biomarcadores de protección frente al estrés oxidativo (antioxidantes); enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPx), TEAC, ORAC_{PGR} y un biomarcador de daño causado por el estrés oxidativo (prooxidante); carbonilos de proteínas.

f. Cálculo del índice OXY-SCORE del estrés oxidativo

Los valores obtenidos de los biomarcadores evaluados pro- y antioxidantes fueron combinados para calcular un índice denominado OXY-SCORE de acuerdo con Veglia *et al.* (2010). Primero se analizó la distribución normal de las variables y los que no cumplían se transformó a Log10. Luego, se estandarizó los valores de las variables para homogenizar sus unidades. Posteriormente, se calculó el promedio en conjunto de los valores estandarizados de las actividades de las enzimas CAT, SOD y GPx, TEAC y ORAC_{PGR}, el cual se denominó *protection-score (PS)* y el promedio de los valores estandarizados de carbonilos de proteína, denominado como *damage-score (DS)*. Finalmente, el OXY-SCORE se calculó por la sustracción de PS de DS.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron con tres pruebas independientes y paralelas.

Para el análisis de la primera parte de la investigación se realizó el ANOVA unidireccional y comparaciones HSD-Tukey ($\alpha = 0,05$) entre los ingredientes con el programa *Statgraphics Centurion 18* (Statgraphics Technologies, Inc., VA, EE. UU.).

Para la segunda parte de la investigación, las diferencias entre las bolsas filtrantes se evaluaron con un ANOVA unidireccional y comparaciones HSD-Tukey ($\alpha = 0,05$) usando el programa *Statgraphics Centurion 18* (Statgraphics Technologies, Inc., VA, EE. UU.), la optimización de la fórmula del filtrante con la versión prueba del programa *Design Expert 13* (Stat-Ease, Inc., MN, EE. UU.), el análisis de regresión para el modelado de las isotermas de sorción y los estudios cinéticos con una hoja de cálculo Excel®, versión 2307 (Microsoft 365, 2022) y el análisis de correlación de Pearson se realizó con la versión de prueba del programa GraphPad (GraphPad Software, MA, EE. UU.).

Para la tercera parte de la investigación, se evaluó las diferencias estadísticas en cada grupo con la prueba t de muestras relacionadas o con la prueba Wilcoxon las que no seguían

distribución normal con el programa estadístico SPSS, versión 27 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS INGREDIENTES DEL FILTRANTE

4.1.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Los ingredientes individuales mostraron la siguiente humedad: coronta de maíz morado (2,4 %), estevia (8,0 %), membrillo (2,9 %), canela (3,8 %) y clavo de olor (7,8 %), que cumple con las normas técnicas peruanas para filtrantes (por debajo del 10 %) (INACAL 2021) y garantizar la calidad microbiológica y estabilidad fitoquímica (Corey *et al.* 2011, Vidović *et al.* 2013). Con relación al membrillo, su acidez titulable fue 0,9 g/100 g en concordancia con el valor de 0,8 g/100 g reportado anteriormente (Cascales y García 2020). La acidez del membrillo influye en el color y la estabilidad de las antocianinas del antioxidante del filtrante formulado en el presente estudio (Giusti y Wrolstad 2005).

4.1.2. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

En la Figura 11 se muestra el porcentaje de retención en tamiz de los ingredientes del filtrante. El tamaño de partícula varió de 212 a $< 2000 \mu\text{m}$, para $> 80 \%$ de retención en los tamices. Los ingredientes del filtrante se molieron a tamaños de partículas que ofrecen mayores tasas de lixiviación (Farakte *et al.* 2016) y una fuga mínima de sólidos de las bolsas filtrantes durante el proceso de infusión.

Además, para todos los ingredientes la retención de partículas $\geq 2000 \mu\text{m}$ fue $< 10 \%$, y para el clavo de olor (CO) y la estevia (E) no se encontró ninguna. Las distribuciones granulométricas fueron más heterogéneas para la coronta de maíz morado (CMM), canela (C) y CO, mientras que el membrillo (M) y E exhibieron retenciones porcentuales uniformes entre los tamices de 300 y 1000 μm ; esto podría atribuirse a los diferentes molinos utilizados. Fue importante evaluar el tamaño de partícula de los ingredientes del filtrante ya que modifica la tasa de lixiviación, la cual aumenta a medida que se reduce el tamaño de 1990 a 330 μm (Farakte *et al.* 2016); por lo tanto, es esencial una mezcla apropiada de ingredientes. La fuga de sólidos está inversamente relacionada con el tamaño de las partículas, y dado que

la fuga modifica la percepción sensorial de las bolsitas filtrantes herbales, esto debería también ser considerado en el procesamiento de partículas de ingredientes (Farakte *et al.* 2016).

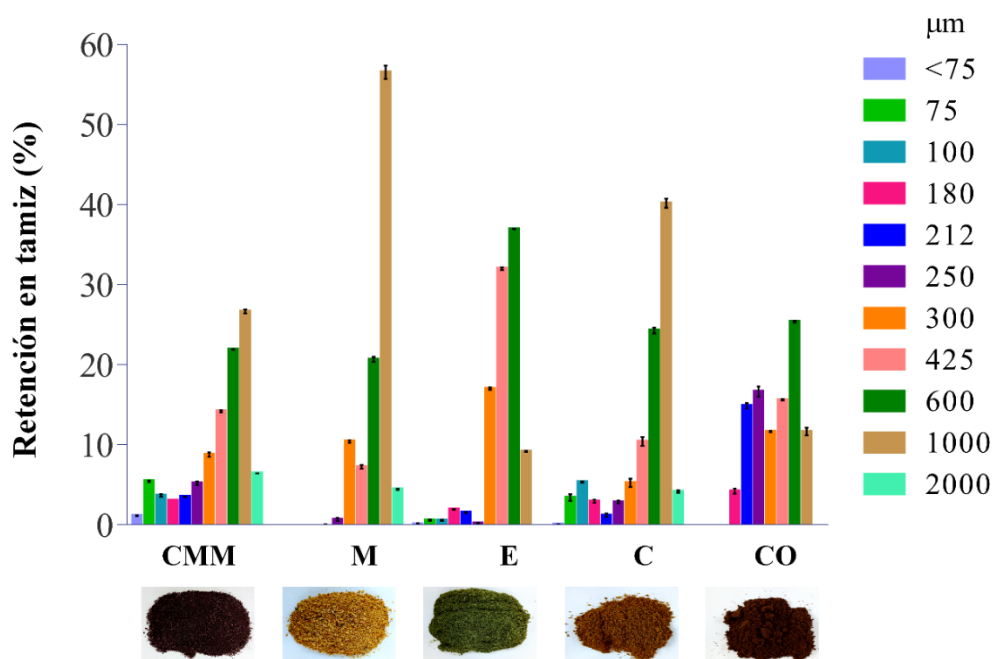


Figura 11: Retención en tamiz (%) de los ingredientes del filtrante

4.1.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES Y POLIFENOLES TOTALES

Todos los ingredientes del filtrante también se caracterizaron por su capacidad antioxidante medida por ORAC_{FL} (CA-ORAC_{FL}), antocianinas monoméricas totales (AMT) y contenido de polifenoles totales (PT) como se muestra en la Tabla 4.

Los valores más altos de CA-ORAC_{FL} fueron del clavo de olor ($2106,33 \pm 201,00 \mu\text{mol ET/g PS}$) y la coronta de maíz morado ($2029,61 \pm 33,43 \mu\text{mol ET/g PS}$) sin diferencias significativas. El valor de CA-ORAC_{FL} del clavo de olor fue menor al reportado previamente ($8764,78 \mu\text{mol ET/g PS}$) (Bi *et al.* 2015), lo que podría explicarse por la existencia de diferentes calidades de clavo de olor (INACAL 2015). En contraste, la CA-ORAC_{FL} de la coronta de maíz morado fue más alta que la reportada previamente para dos variedades de maíz ceroso morado ($267,83$ y $313,50 \mu\text{mol ET/g PS}$) (Saikaew *et al.* 2018). La CA-ORAC_{FL}

de la estevia ($1304,15 \pm 137,06 \mu\text{mol ET/g PS}$) y canela ($1197,60 \pm 66,67 \mu\text{mol ET/g PS}$) no mostró diferencias significativas y concordó con reportes previos (Bender *et al.* 2015). Finalmente, la CA-ORAC_{FL} del membrillo fue de $381,62 \mu\text{mol ET/g PS}$: ligeramente superior a investigaciones anteriores (Torres *et al.* 2015).

Tabla 4: Capacidad antioxidante medido por ORAC_{FL}, antocianinas monoméricas totales y polifenoles totales de los ingredientes del filtrante

Ingredientes	Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g PS}$)	Antocianinas monoméricas totales (mg EC3G/g PS)	Polifenoles totales (mg EAG/g PS)
Coronta de maíz morado	$2029,61 \pm 33,43^a$	$41,32 \pm 0,95$	$70,33 \pm 2,81^d$
Membrillo	$381,62 \pm 20,99^c$	n.d.	$20,30 \pm 0,24^e$
Estevia	$1304,15 \pm 137,06^b$	n.d.	$82,07 \pm 1,19^c$
Canela	$1197,60 \pm 66,67^b$	n.d.	$95,12 \pm 0,89^b$
Clavo de olor	$2106,33 \pm 201,00^a$	n.d.	$228,69 \pm 1,65^a$

Los valores son promedios \pm DE (n=3). ET: Equivalente Trolox, EC3G: Equivalente Cianidina-3-Glucósido, EAG: Equivalente Ácido Gálico, PS: peso seco, n.d.: no detectado. Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0,05$).

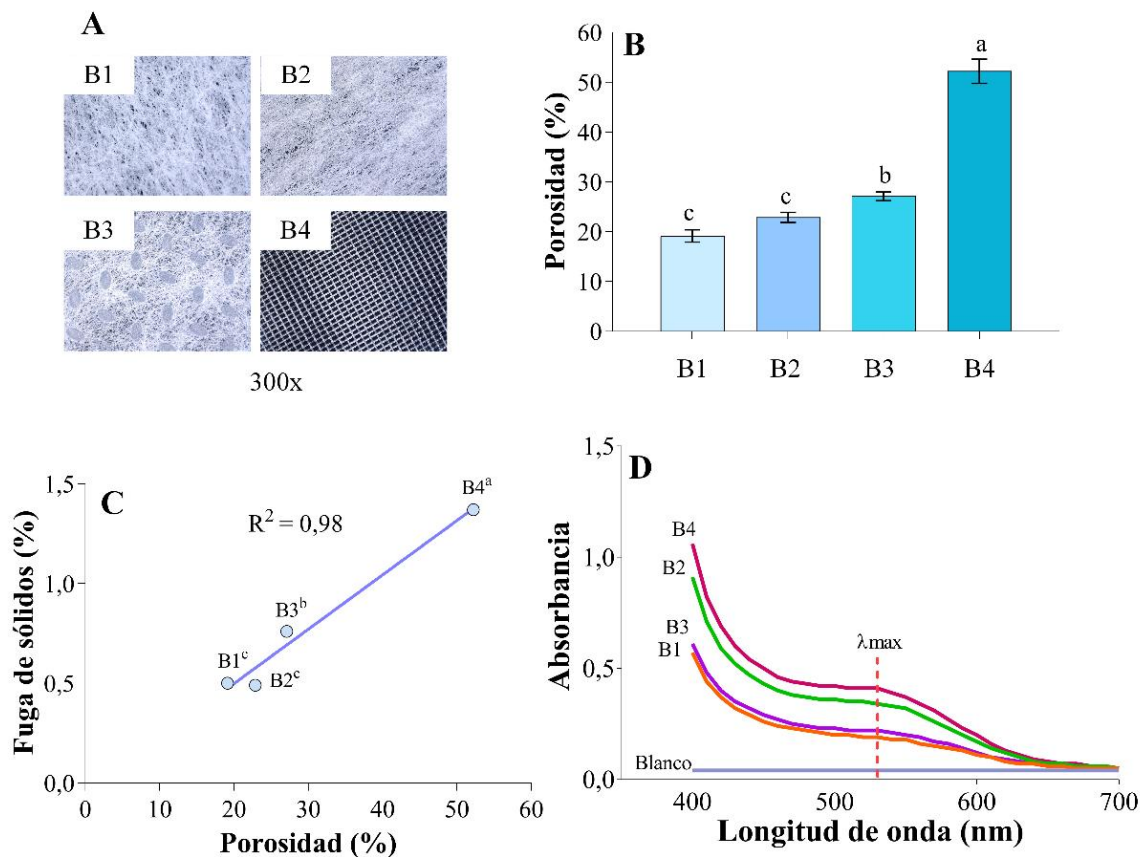
El contenido de AMT de la coronta de maíz morado variedad INIA-601 fue de $41,32 \pm 0,95$ mg EC3G/g PS, superior a lo encontrado en otro estudio que analizó algunas variedades de maíz morado y con el mismo método de pH diferencial: 9,30 a 15,16 mg EC3G/g PS (Jing *et al.* 2007). Sin embargo, AMT en CMM fue similar al valor reportado de alrededor de 40,7 mg EC3G/g PS (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos 2003), pero inferior a los valores que oscilan entre 53,3 y 71,5 mg de antocianinas totales/g de peso fresco (PF), cuando en ambos casos se utilizó el método desarrollado por Fuleki y Francis (Piña 2018). Este último método sobreestima el contenido de AMT en la coronta de maíz morado debido a que las medidas se toman a 535 nm, considerando que todos los colores rojizos se deben a las antocianinas (Lao y Giusti 2016). Por el contrario, el método pH diferencial cuantifica las AMT aprovechando el hecho de que las antocianinas son de color rojo vivo e incoloras a valores de pH de 1,0 y 4,5, respectivamente. Esto permite eliminar la interferencia de otros pigmentos rojizos y, por lo tanto, cuantificar las AMT con precisión (Giusti y Wrolstad 2005).

El contenido de PT de los ingredientes del filtrante difería de uno a otro. El mayor contenido de PT ($228,69 \pm 1,65$ mg EAG/g PS) se encontró en el clavo de olor, lo que concuerda con un rango previamente reportado de 118,40 a 220,20 mg EAG/g PS utilizando diferentes solventes para las extracciones (Adaramola y Onigbinde 2016). El contenido de PT de la canela fue de $95,12 \pm 0,89$ mg EAG/g PS, lo que concuerda con valores de 101,4 para convencional y 94,3 mg EAG/g PF para extracciones orgánicas (Lv *et al.* 2012). El contenido de PT de la estevia fue de $82,07 \pm 1,19$ EAG/g PS y fue superior a los reportes anteriores; 25,18 mg EAG/g PS (Shukla *et al.* 2012) y 56,73 mg EAG/g PS (Tadhani *et al.* 2007). La coronta de maíz morado variedad INIA-601 presentó un contenido de PT de $70,33 \pm 2,81$ mg EAG/g PS, superior a otras variedades que oscilan entre 9,5 y 14,31 mg EAG/g PS (Jing *et al.* 2007). Finalmente, el contenido de PT más bajo fue de $20,30 \pm 0,24$ mg EAG/g PS para membrillo: similar a un estudio anterior que reportó 16,12 mg EAG/g PS para membrillos chinos (Hamauzu *et al.* 2005), pero más alto que lo reportado para los membrillos eslovacos que oscilan entre 3,52 y 5,55 mg EAG/g PS (Bystrická *et al.* 2017). En el presente trabajo se procesó todo el fruto del membrillo para preparar los filtrantes, aprovechando así tanto el contenido de PT de la cáscara como la acidez de la pulpa (Silva *et al.* 2002).

4.2. SELECCIÓN DE LA BOLSA FILTRANTE

Para seleccionar el tipo de bolsa (B) monodosis más adecuada para contener el filtrante herbal, es necesario considerar la porosidad y el tamaño de poro del material (Bassi *et al.* 2020).

En la Figura 12A se puede observar las imágenes al microscopio y en la Figura 12B las porosidades (%) de las bolsas evaluadas. Las porosidades siguieron el orden de: B4 ($52,2 \% \pm 2,4 \%$) > B3 ($27,1 \% \pm 0,9 \%$) > B2 ($22,9 \% \pm 1,0 \%$) y B1 ($19,1 \% \pm 1,2 \%$). Esto coincidió con un estudio de materiales de bolsas que reveló que las bolsas de nylon tejido tuvieron una porosidad del 62 %, con poros más grandes y estructura uniforme que las otras evaluadas en su estudio (Jha *et al.* 2020). Las bolsas que evaluamos tenían tamaños de poro promedio de 153,42 (B4), 32,89 (B3), 28,49 (B1) y 18,70 μm (B2), lo que confirmó que la orientación de las fibras está relacionada con el tamaño del poro (Jha *et al.* 2020).



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. *Las bolsas estudiadas (B): B1 de papel de filtro, B2 de fibra de maíz, B3 de tela no tejida y B4 de nailon tejido.

Figura 12: Imágenes al microscopio (A) y porosidad (%) de las bolsas (B). Fuga de sólidos (%) en las infusiones vs. porosidad (%) de las bolsas (C). Curva de absorbancia de las infusiones (blanco = agua destilada) medida en un espectrofotómetro CM-5 de 400 a 700 nm (D)

Además, en la Figura 12C se muestra los valores de porcentaje de fuga de sólidos; los valores más bajos fueron para B1 y B2, sin diferencias significativas entre los dos. La fuga de sólidos en infusiones es indeseable e incluso las normas técnicas peruanas especifican que una infusión preparada con una bolsita filtrante en agua caliente durante 5 min no debe dejar ningún sedimento (INACAL 2021). Para decidir entre B1 y B2, se midió la curva del espectro de absorbancia de 400 a 700 nm para evaluar la extracción de antocianinas a 500 - 550 nm (Giusti y Wrolstad 2005) de nuestro filtrante de coronta de maíz morado. El valor de absorbancia más alto a 530 nm fue sin duda para B2 y, por lo tanto, se seleccionó para embolsar la formulación resultante del diseño de mezcla (Figura 12D).

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FÓRMULA DEL FILTRANTE

En la Tabla 5 se puede observar los valores de las variables respuesta y en la Tabla 6 el análisis del modelo resultante y el efecto de la formulación del filtrante en el contenido de AMT y CA-ORAC_{FL}.

Tabla 5: Valores de las variables respuesta del diseño de mezcla I-optimal

Corrida	Formulación del filtrante			Variables respuesta	
	A: Coronta de maíz morado	B: Membrillo	C: Estevia	CA-ORAC _{FL} ($\mu\text{mol ET/mL}$)	Contenido de AMT (mg EC3G/L)
1	0,4677	0,3767	0,1556	10,84 \pm 1,16	68,75 \pm 9,52
2	0,3790	0,4993	0,1218	3,39 \pm 0,38	43,81 \pm 5,09
3	0,3790	0,4993	0,1218	3,59 \pm 0,42	49,99 \pm 6,05
4	0,8307	0,0137	0,1556	10,14 \pm 0,56	92,14 \pm 6,14
5	0,0166	0,8908	0,0926	2,86 \pm 0,27	2,81 \pm 0,19
6	0,3790	0,4993	0,1218	3,75 \pm 0,28	49,01 \pm 7,8
7	0,8928	0,0000	0,1073	5,87 \pm 0,6	98,51 \pm 11,02
8	0,8928	0,0000	0,1073	6,18 \pm 0,27	100,01 \pm 12,25
9	0,1863	0,6581	0,1556	3,87 \pm 0,44	27,94 \pm 3,84
10	0,5943	0,3193	0,0864	10,32 \pm 1,21	64,49 \pm 5,21
11	0,7360	0,1777	0,0864	9,42 \pm 1,18	94,56 \pm 8,94
12	0,3790	0,4993	0,1218	4,00 \pm 0,39	49,42 \pm 5,89
13	0,8307	0,0137	0,1556	7,67 \pm 0,17	83,13 \pm 12,07
14	0,0243	0,8201	0,1556	2,39 \pm 0,14	3,57 \pm 0,10
15	0,1387	0,7749	0,0864	4,31 \pm 0,18	20,49 \pm 2,37
16	0,3077	0,6059	0,0864	6,91 \pm 0,26	48,34 \pm 4,57

Los ingredientes son expresados en fracciones decimales y los valores de las variables respuesta son dados en media \pm DE (n = 3). CA-ORAC_{FL}: Capacidad antioxidante ORAC_{FL}, ET: Equivalente trolox, AMT: Antocianinas monoméricas totales, EC3G: Equivalente de cianidina-3-glucósido.

4.3.1. ANÁLISIS DE LOS MODELOS

El modelo cuadrático de Scheffe para CA-ORAC_{FL} proporcionó un buen ajuste de los datos (p = 0,0002), el *lack of fit* no fue significativa (p = 0,0992), un R² ajustado de 0,8253 y un R² predicho de 0,6601.

Tabla 6: Análisis de varianza para modelos cuadráticos Scheffe ajustados a las variables respuestas

Fuente	CA-ORAC _{FL} (μmol ET/mL)					Contenido de AMT (mg EC3G/L)				
	SC	GL	CM	Valor F	Valor p	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
Modelo	111,80	5	22,36	15,17	0,0002	15109,78	5	3021,96	84,00	< 0,0001
Mezcla lineal	52,53	2	26,27	17,82	0,0005	14876,47	2	7438,24	206,76	< 0,0001
AB	17,25	1	17,25	11,70	0,0065	196,84	1	196,84	5,47	0,0414
AC	48,42	1	48,42	32,85	0,0002	23,25	1	23,25	0,6462	0,4402
BC	50,03	1	50,03	33,94	0,0002	21,14	1	21,14	0,5878	0,4610
Residuales	14,74	10	1,47			359,75	10	35,97		
<i>Lack of fit</i>	11,44	5	2,29	3,47	0,0992	293,50	5	58,70	4,43	0,0640
<i>Pure Error</i>	3,30	5	0,6596			66,25	5	13,25		
Total	126,54	15				15469,53	15			
R ²	0,8835					0,9767				
R ² ajustado	0,8253					0,9651				
R ² predicho	0,6601					0,9389				

CA-ORAC_{FL}: Capacidad antioxidante por ORAC_{FL}, ET: Equivalente de Trolox, AMT: Antocianina monomérica total, EC3G: Equivalente de cianidina-3-glucósido, SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrado medio.

De manera similar, el modelo cuadrático de Scheffe para AMT dio $p < 0,0001$, el *lack of fit* no fue significativo ($p = 0,0640$), un R^2 ajustado de 0,9651 y un R^2 predicho de 0,9389 y, por lo tanto, pudo predecir AMT a partir de las formulaciones del filtrante.

4.3.2. EFECTO DE LA FORMULACIÓN DE FILTRANTE SOBRE EL CONTENIDO DE CA-ORAC_{FL} Y AMT

El modelo cuadrático de Scheffe para CA-ORAC_{FL} mostró que la mezcla lineal (CMM, M y E, $p = 0,0005$), las interacciones entre CMM y M ($p = 0,0065$), CMM y E ($p = 0,0002$), y M y E ($p = 0,0002$) tuvieron un efecto significativo en la CA-ORAC_{FL}. En contraste, el modelo cuadrático de Scheffe para contenido de AMT mostró que la mezcla lineal (CMM, M y E, $p < 0,0001$), la interacción entre CMM y M ($p = 0,0414$) tuvo un efecto significativo en el contenido de AMT, mientras que la interacción entre CMM y E ($p = 0,4402$), y M y E ($p = 0,4610$) no tuvieron efectos significativos.

En la Figura 13 se puede observar la relación entre los ingredientes del filtrante (CMM, M y E) con la CA-ORAC_{FL} y el contenido de AMT en los gráficos de superficie-contorno y de Piepel.

La CA-ORAC_{FL} varió de 2,39 a 10,84 y aumentó con la cantidad de CMM hasta alcanzar un valor máximo, pero disminuyó con M. Este comportamiento muestra que CMM es una fuente más rica de compuestos antioxidantes que M (Silva *et al.* 2002, Lao *et al.* 2017). Mientras tanto, E mostró una relación parabólica con CA-ORAC_{FL}, es decir, la CA-ORAC_{FL} disminuyó con E para alcanzar un valor mínimo, luego la CA-ORAC_{FL} aumentó cuando E disminuyó por debajo de ese valor (Figura 13 A-B). La ecuación de regresión para CA-ORAC_{FL} con los ingredientes del filtrante viene dada por la Ecuación (6)

$$CA-ORAC_{FL} = 54,52CMM + 46,66M + 2626,63E + 14,29CMM*M - 3389,81CMM*E - 3416,35M*E \quad (6)$$

El contenido de AMT varió de 2,81 a 100,01 y aumentó con la cantidad de CMM, ya que la CMM es el único ingrediente que contiene antocianinas (Figura 13C-D). La ecuación de regresión para el contenido de AMT con los ingredientes del filtrante viene dada por la Ecuación 7:

$$Contenido\ de\ AMT = 150,21CMM + 25,68M + 1753,49E + 48,27CMM*M \quad (7)$$

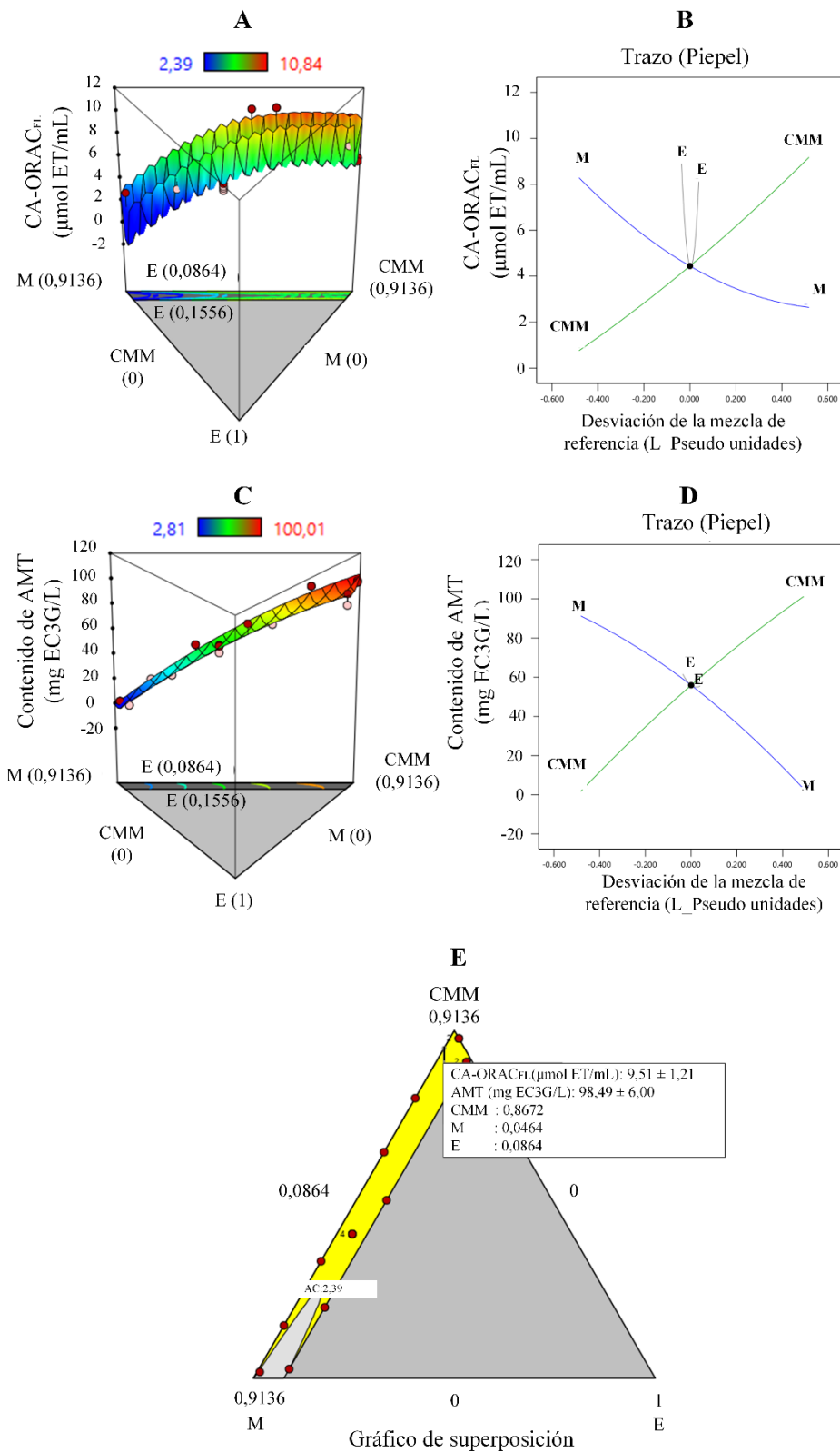


Figura 13: Gráfica tridimensional de superficie-contorno y gráfica de Piepel del modelo cuadrático de Scheffe de capacidad antioxidante medida por ORAC_{FL} (A-B) y contenido de antocianina monomérica total (C-D). Gráfica de optimización con las variables respuesta (E)

4.3.3. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN

Los criterios de optimización para la formulación del filtrante fueron maximizar tanto la CA-ORAC_{FL} como el contenido de AMT, de acuerdo con el objetivo principal del estudio: obtener un filtrante antioxidante a base de coronta de maíz morado (alto en antocianinas). Se ha demostrado que el contenido de AMT tiene una correlación positiva con la aceptabilidad del sabor en un filtrante de hibisco (Bechoff *et al.* 2014). La formulación óptima dada por el diseño consistió en fracciones decimales de 0,8672 para CMM, 0,0464 para M y 0,0864 para E (Figura 13E), con una deseabilidad de 91,2 %. Por ello, la fórmula óptima del filtrante fue de (%): 83,62 de coronta de maíz morado, 8,33 de estevia, 4,47 de membrillo, 3,33 de canela y 0,25 de clavo de olor. Los valores óptimos predichos por el modelo fueron $9,51 \pm 1,21$ $\mu\text{mol ET/mL}$ para CA-ORAC_{FL} y $98,49 \pm 6,00$ mg EC3G/L para AMT. Estos valores de CA-ORAC_{FL} y contenido de AMT predichos se validaron experimentalmente.

Los intervalos de confianza para CA-ORAC_{FL} (6,91 a 12,11) y contenido de AMT (85,65 a 111,32) confirmaron que los resultados del modelo son adecuados y efectivos (Tabla 7).

Tabla 7: Valores predichos y medidos experimentalmente de CA-ORAC_{FL} y contenido de AMT de la infusión del filtrante óptimo

Variables respuesta	Datos					
	Valores predichos			Valores medidos experimentalmente (n=3 muestras independientes)		
	Media \pm DE	-IC al 95%	+IC al 95%	Media \pm DE	-IC al 95%	+IC al 95%
CA-ORAC _{FL} ($\mu\text{mol ET/mL}$)	$9,51 \pm 1,21$	6,91	12,11	$9,09 \pm 0,29$	8,36	9,81
Contenido de AMT (mg EC3G/L)	$98,49 \pm 6,00$	85,65	111,32	$97,19 \pm 4,40$	86,26	108,13

IC: intervalo de confianza.

La CA-ORAC_{FL} para la infusión del filtrante óptimo ($9,09 \mu\text{mol ET/mL}$) estuvo dentro de los rangos reportados para los filtrantes herbales, desde 2,51 (infusiones utilizadas para “aliviar la gastritis”) hasta $40,76 \mu\text{mol ET/mL}$ (infusión de gayuba) (Tahirović *et al.* 2014) e infusiones comerciales de *Salvia officinalis* L. ($4,0$ a $18,0 \mu\text{mol ET/mL}$) (Walch *et al.* 2011). La CA-ORAC_{FL} de la infusión del filtrante óptimo fue similar a un valor reportado para vinos rosados chilenos de $9 \mu\text{mol ET/mL}$, mientras que menor que para otras bebidas:

46 $\mu\text{mol ET/mL}$ para vino (López-Alarcón *et al.* 2011), 17,03 $\mu\text{mol ET/mL}$ para jugo de frambuesa y 34,43 $\mu\text{mol ET/mL}$ para jugo de frambuesa suplementado con estevia al 1 % (p/v) (Bender *et al.* 2018). La principal diferencia entre los filtrantes y otras bebidas es que las infusiones herbales requieren un tiempo de extracción más corto (cinco minutos en este trabajo) comparado con la preparación de otras bebidas.

Por su parte, el contenido de AMT de la infusión del filtrante óptimo (97,19 mg EC3G/L) fue superior al de algunas infusiones de filtrante de frutos rojos: 26,4 a 56,06 mg EC3G/L (Moldovan *et al.* 2016). También estuvo dentro del contenido de AMT de las infusiones de *Hibiscus sabdariffa* L. conocida como “flor de Jamaica”, que varió de 73 a 174 mg equivalente de delfinidina-3-xilosilglucósido/L (Bechoff *et al.* 2014). Se han informado cantidades más altas de antocianinas en los vinos, de 230 a 624 mg de malvidina-3-O-glucosa/L (Salaha *et al.* 2008), y en un batido comercial de bayas con 403 mg EC3G/L (Hellström *et al.* 2013).

Además, la infusión del filtrante óptimo presentó un contenido de PT de $278,17 \pm 10,77$ mg EAG/L y valores de color en escala CIELAB de $44,45 \pm 1,01$ para L^* , $55,29 \pm 0,58$ para a^* y $21,02 \pm 0,78$ para b^* . En cuanto al contenido de PT de la infusión del filtrante óptimo (278,17 mg EAG /L), estuvo dentro del rango reportado para extractos de varias plantas medicinales, de 9 a 2218 mg equivalentes de catequina/L (Katalinic *et al.* 2006), y para el filtrante de hibisco (flor de jamaica), de 175 a 695 mg EAG/L (Bechoff *et al.* 2014). Con relación a las características de color, el valor L^* para la infusión del filtrante óptimo (44,45) fue mayor que para las infusiones de *Hibiscus sabdariffa* L., de 23,72 a 29,87 (Bechoff *et al.* 2014), por lo que nuestra infusión resultó menos oscura. Sin embargo, los extractos de antocianina de la coronta de maíz morado presentaron un valor L^* de 25,70 (Yang y Zhai 2010) lo que claramente se debe a una alta concentración por un largo tiempo de extracción. Además, los valores a^* y b^* de la infusión del filtrante óptimo fueron más altos que los de la infusión de flor de jamaica, lo que indica tonos más rojizos y amarillentos.

4.4. ESTABILIDAD DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL FILTRANTE ÓPTIMO

4.4.1. ISOTERMA DE SORCIÓN DE HUMEDAD DEL FILTRANTE

En la Figura 14 se muestra el comportamiento de la isoterma de adsorción de humedad generada por el filtrante a temperatura ambiente (25 °C) de acuerdo con el modelo GAB.

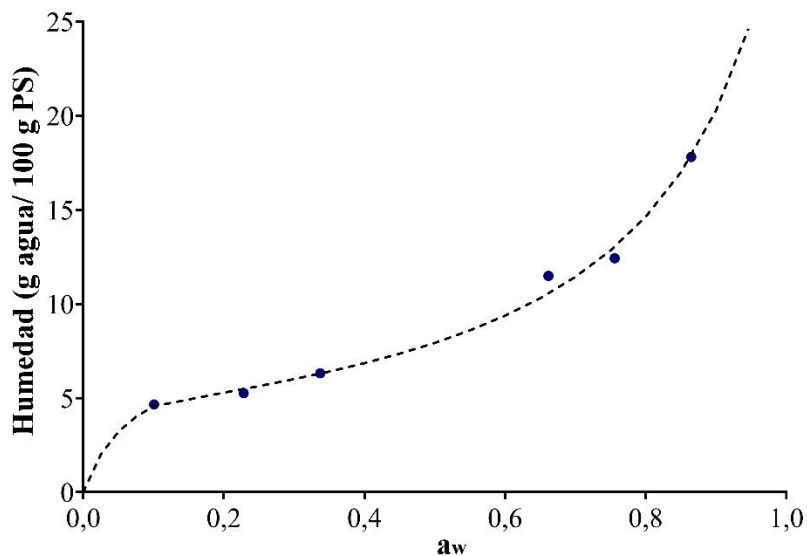


Figura 14: Isoterma de sorción de la humedad del filtrante

El contenido de humedad, la a_w , y la relación entre ambos constituyen los factores más importantes que afectan la estabilidad de las muestras secas o en polvo. La forma de la isoterma de sorción permite identificar el mecanismo característico de unión del agua en un material determinado (Labuza y Altunakar 2020). La curva de la isoterma con el modelo GAB mostró un comportamiento sigmoideal tipo II, esto es característico de polvos no porosos o microporosos con interacciones débiles (Al-Muhtaseb *et al.* 2002). La humedad de equilibrio de la muestra aumentó con el aumento de la actividad del agua, esto puede deberse al aumento de la porosidad y de contenido de humedad de la muestra de filtrante a medida que se incrementa la humedad relativa (%) o a_w .

La Tabla 8 muestra los parámetros de la ecuación con el modelo GAB para el filtrante. El estudio de la isoterma de sorción de humedad brinda información sobre las condiciones de almacenamiento apropiadas para un alimento en polvo y ayuda a elegir el material de envase en función de las características de adsorción del alimento seco (Labuza y Altunakar 2020).

El modelo GAB describió bien la isoterma de sorción de humedad del filtrante, presenta un valor R^2 alto y un REMC bajo ($< 5\%$) comparado con lo reportado por Ocieczek *et al.* (2023) en isotermas de filtrantes de té verde y negro y ajustadas también con el modelo GAB (13,96 y 7,66, respectivamente).

Tabla 8: Parámetros del modelo de la isoterma de sorción para el filtrante

Parámetros	Modelo GAB
M (g agua/100 g PS)	4,6525
C (J/g-mol)	106,502
K	0,8775
a_w correspondiente a M	0,1109
R^2	0,9908
REMC (%)	4,2254

M: contenido de humedad en la monocapa, C: constante de energía, K: constante relacionada con el calor de sorción de la multicapa y REMC: raíz del error medio cuadrático.

El contenido de humedad de la monocapa (M) para la adsorción indicó que 4,65 g agua/100 g PS es el nivel de contenido de humedad en el que presenta la mayor estabilidad, correspondiente a la cobertura de la superficie de la capa monomolecular del filtrante, este valor obtenido es semejante a lo reportado por Ocieczek *et al.* (2023) en las isotermas de filtrantes de té verde y negro, donde obtuvo humedades en la monocapa de 4,99 y 5,38 g de agua/100 g PS, respectivamente con el modelo GAB. Sin embargo, viendo la isoterma, la humedad del filtrante tiene un ligero incremento solo por debajo de una a_w de 0,34 correspondiendo a una humedad de 6,32 g agua/100 g PS, la cual sería un límite máximo para mantener la estabilidad del filtrante si se conserva a 25 °C. El valor de la constante K expuesto en el modelo GAB fue de 0,88, lo que demuestra que se ajusta bien a la ley de adsorción de capas multimoleculares (Cui *et al.* 2020). El valor C fue 106,50 (J/g-mol), el cual está en el intervalo de 50 a 200, confirmando que la isoterma es del tipo II (Labuza y Altunakar 2020).

4.4.2. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA DEL SOBRE BILAMINADO

Los envases de alimentos deben evitar en la medida de lo posible la transferencia de agua entre el ambiente interno y externo. El sobre bilaminado (PET cristal + PEBD metalizado) tuvo un valor de permeabilidad al vapor de agua de $1,0745 \pm 0,0049 \times 10^{-12}$ g/msPa, similar a las láminas de PEBD ($0,914 \times 10^{-12}$ g/msPa), polietileno de alta densidad ($0,231 \times 10^{-12}$ g/msPa) y policloruro de vinilideno ($0,222 \times 10^{-12}$ g/msPa) (García *et al.* 2009), lo cual asegura una protección considerable al filtrante. El valor de la permeabilidad del sobre bilaminado fue mayor al de un material trilaminado (PET/óxido de aluminio/PEBD); $1,1 \times 10^{-14}$ g/msPa (Song *et al.* 2022), lo que muestra que el número de capas y el tipo de material

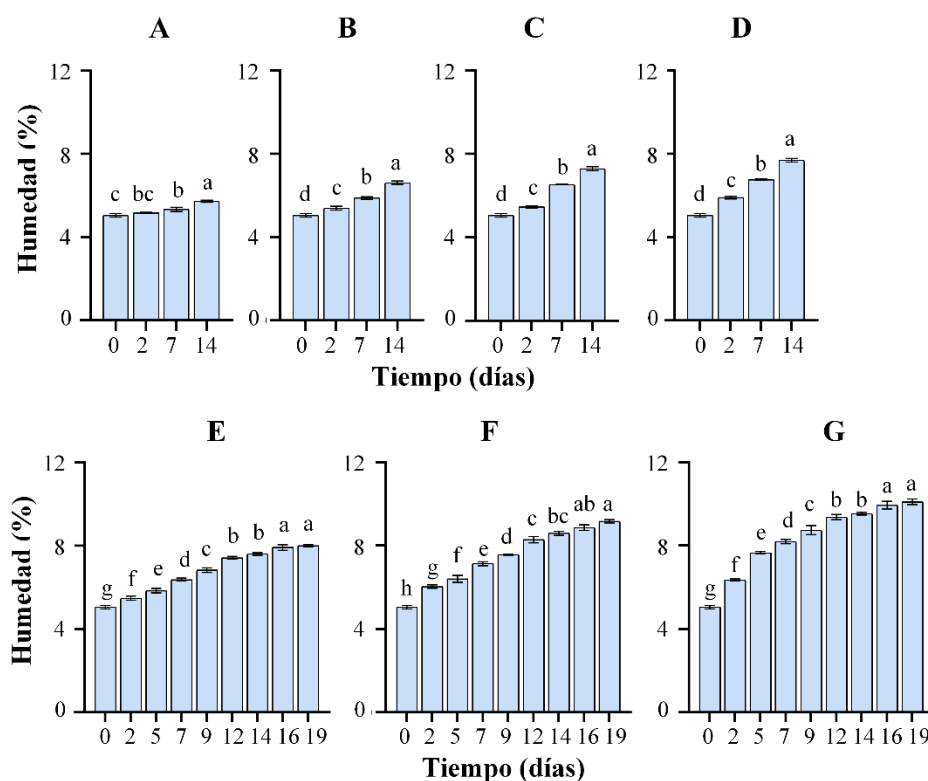
están estrechamente relacionados con las propiedades de barrera al vapor de agua, pero también afectarían el costo del producto.

4.4.3. EVALUACIÓN DE HUMEDAD, ACTIVIDAD DE AGUA, COMPUESTOS BIOACTIVOS, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, PH Y COLOR DEL FILTRANTE EN ALMACENAMIENTO

a. Humedad y actividad de agua del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

La humedad y la actividad de agua son dos parámetros que tienen un efecto directo en la estabilidad química, afecta las reacciones de varias maneras; el agua influye en las propiedades dieléctricas de las soluciones, en la movilidad molecular de los componentes de los alimentos y puede afectar la sensibilidad de la reacción a la temperatura (Bell 2020).

En la Figura 15 se muestra la variación de la humedad del filtrante durante el tiempo de almacenamiento. La humedad (%) del filtrante al iniciar el seguimiento fue $5,05 \pm 0,09$ % y aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) en todas las condiciones de almacenamiento.

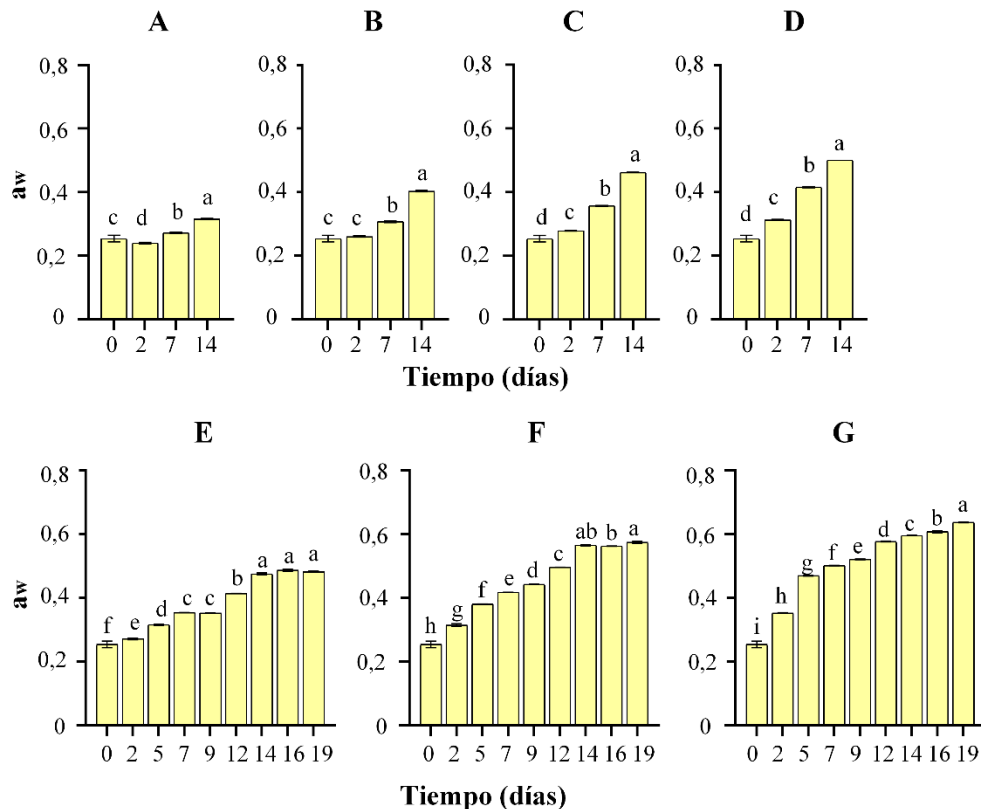


*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura (°C): control (A), 75 % - 30 °C (B), 75 % - 40 °C (C), 75 % - 50 °C (D), 85 % - 30 °C (E), 85 % - 40 °C (F), 85 % - 50 °C (G).

Figura 15: Humedad del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

La humedad es un factor crítico de estabilidad; las Normas Técnicas Peruanas para filtrantes tienen un límite máximo de humedad típico del 10 % (INACAL 2021). Sin embargo, según el estudio de isoterma de sorción del filtrante, un nivel máximo para mantener la estabilidad del filtrante desarrollado sería 6,32 g de agua/100 g de peso seco si se almacena a 25 °C. En el caso de las muestras control, almacenadas en condiciones ambientales, el contenido de humedad aumentó hasta $6,07 \pm 0,06$ g/100 g PS en 14 días, cifra inferior a ese último límite. El contenido de agua de un filtrante varía principalmente con la humedad relativa y temperatura de almacenamiento, pero también con el material de empaque (Jayani *et al.* 2022). Como ya se describió anteriormente, el sobre bilaminado proporciona una barrera considerable al vapor de agua del ambiente externo a la mezcla del filtrante. Sin embargo, se sabe que todos los productos recién envasados alcanzan una humedad de equilibrio según el contenido de agua de la atmósfera en la que se almacenan (Ociczek *et al.* 2023), lo que explica la variación de humedad en las muestras control.

En la Figura 16 se muestra la variación de la actividad de agua del filtrante en almacenamiento.



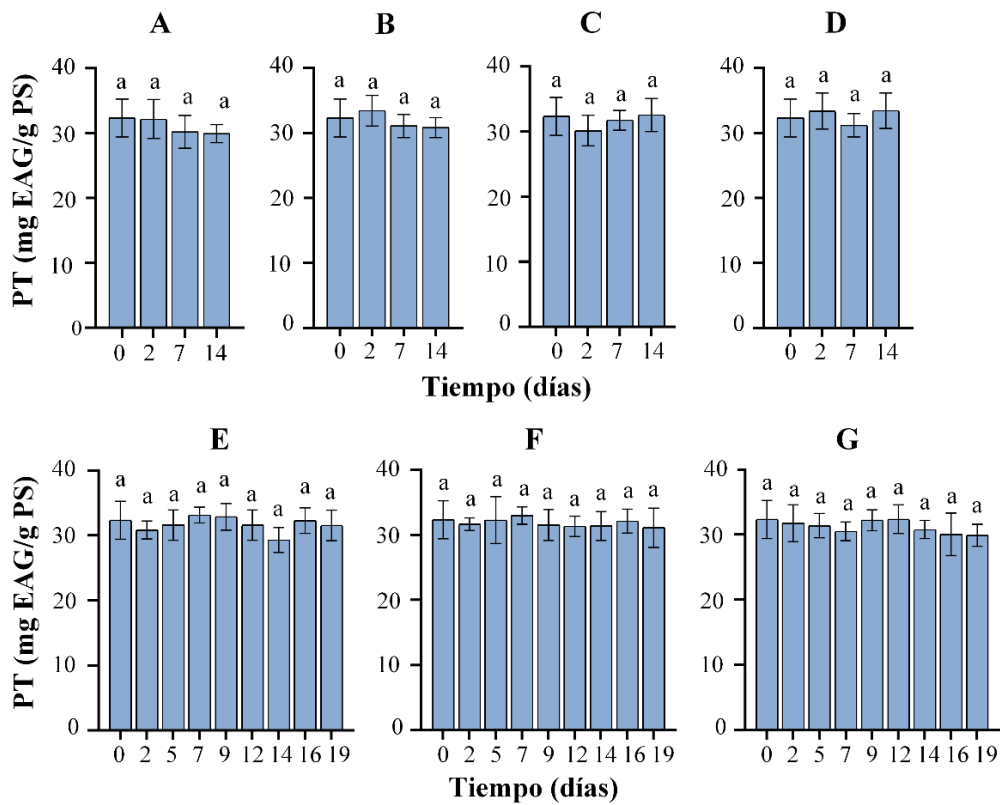
*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura (°C): control (A), 75 % - 30 °C (B), 75 % - 40 °C (C), 75 % - 50 °C (D), 85 % - 30 °C (E), 85 % - 40 °C (F), 85 % - 50 °C (G).

Figura 16: Actividad de agua del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

El filtrante mostró un valor inicial de a_w de $0,25 \pm 0,01$ y éste se incrementó ($p \leq 0,05$) en todas las condiciones de almacenamiento, muy idéntico a lo ocurrido con el contenido de humedad, confirmando igual que Ocieczek *et al.* (2023) que la humedad es el principal determinante de actividad de agua, quienes analizaron en filtrantes de té verde y negro. Cabe señalar que cuando la humedad fue 10 %, el valor de la actividad de agua fue alrededor de 0,6; valor de a_w que coincide con el tope que mantiene la estabilidad microbiológica (Labuza y Altunakar 2020).

b. Contenido de PT del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

En la Figura 17 se puede evidenciar el contenido de PT del filtrante durante el tiempo de almacenamiento.



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura (°C): control (A), 75 % - 30 °C (B), 75 % - 40 °C (C), 75 % - 50 °C (D), 85 % - 30 °C (E), 85 % - 40 °C (F), 85 % - 50 °C (G).

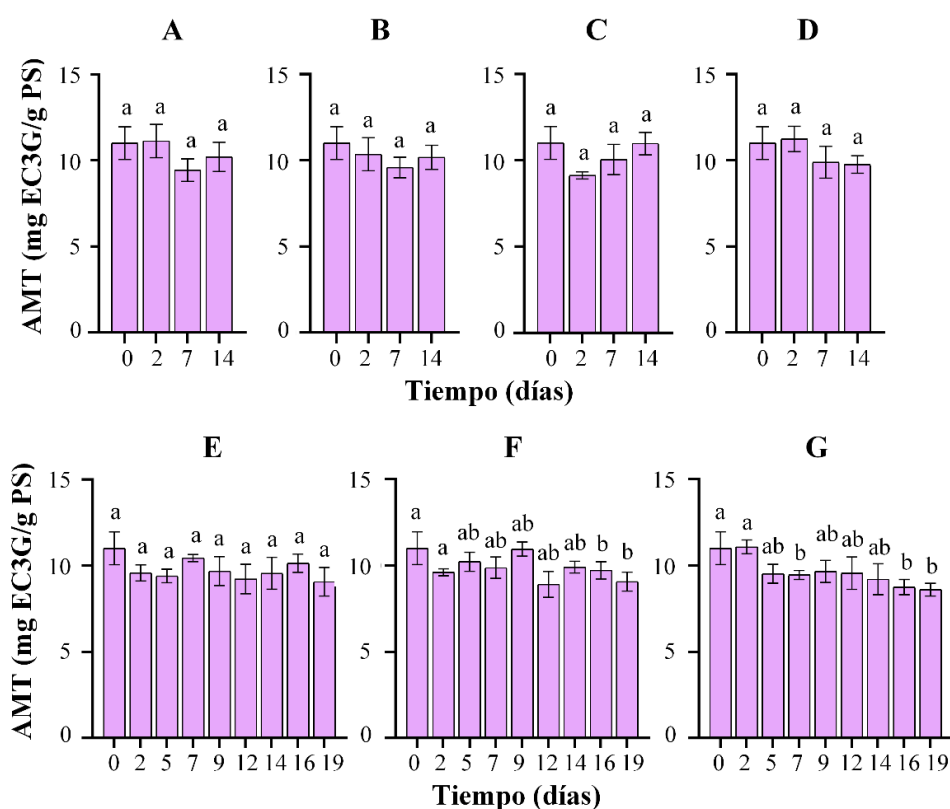
Figura 17: Contenido de PT del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

El filtrante inició con un contenido de polifenoles totales de $32,33 \pm 2,91$ mg EAG/g PS y no existió variación estadísticamente significativa del contenido de PT en ninguna condición

de almacenamiento. Los compuestos fenólicos del filtrante incluyen una gran variedad de moléculas que le proporciona la coronta de maíz morado, la estevia, el membrillo, la canela y el clavo de olor, principalmente flavonoides y ácidos fenólicos (Silva *et al.* 2002, Su *et al.* 2007, Cortés-Rojas *et al.* 2014, Lemus-Mondaca *et al.* 2016, Gálvez *et al.* 2017). Hay fenólicos que son muy estables; por ejemplo, se ha encontrado que la concentración de ácido gálico, la catequina, la epicatequina, el ácido cafeico y el resveratrol se mantuvieron casi constantes en vino dealcolizado en polvo encapsulado durante 145 días de almacenamiento a temperatura de 38 °C y humedad relativa de 11 %, mientras que el ácido gálico fue además estable hasta la humedad relativa más alta estudiada (58 %) (Rocha-Parra *et al.* 2016).

c. Contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

En la Figura 18 se puede evidenciar el contenido de AMT del filtrante durante el tiempo de almacenamiento.



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura (°C): control (A), 75 % - 30 °C (B), 75 % - 40 °C (C), 75 % - 50 °C (D), 85 % - 30 °C (E), 85 % - 40 °C (F), 85 % - 50 °C (G).

Figura 18: Contenido de antocianinas monoméricas totales del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

El filtrante inició con un contenido de antocianinas monoméricas totales de $11,01 \pm 0,95$ mg EC3G/g PS y no existió variación estadísticamente significativa en el control y en las condiciones de almacenamiento de; 75 % HR - 30, 40 y 50 °C, y a 85 % - 30 °C. La termo estabilidad de las antocianinas ha sido reportada en productos secos, tales como orujos de arándanos y de uvas liofilizados, los cuales fueron sometidos a calentamiento a varias temperaturas y tiempos, encontrando que el contenido de antocianinas no varió a 40°C durante 72 horas, ni a 60°C durante 48 horas (Khanal *et al.* 2010). Se usó un sobre bilaminado metalizado para retrasar el paso del agua al producto y evitar el efecto de otros factores que también alteran las antocianinas como la luz o el oxígeno (Enaru *et al.* 2021). Akhavan *et al.* (2016) evaluaron el efecto de luz en diferentes muestras con antocianinas, no encontrando cambios significativos del contenido de estos compuestos en ausencia de luz durante el periodo de almacenamiento.

Aunque el contenido de PT no varió significativamente en ninguna condición, se presentó una disminución estadísticamente significativa del contenido de AMT del filtrante en las condiciones de 85 % - 40 °C y 50 °C hasta en un 21,89 % del valor inicial. En el caso de la condición de 85 % HR - 40 °C disminuyó hasta 9,07 mg EC3G/g PS y en la condición de 85 % - 50 °C disminuyó hasta 8,6 mg EC3G/g PS. Esto revela la degradación de las antocianinas a valores altos de humedad relativa y temperatura. Algunas antocianinas monoméricas pasan a ser pigmentos poliméricos o chalconas con el efecto de la temperatura (Enaru *et al.* 2021, Mohammadalinejad *et al.* 2023). Se ha reportado que la cianidina-3-glucósido por efecto de la alta temperatura puede sufrir una deglicosilación y escisión, y convertirse en un ácido protocatéquico, lo que pudiera explicar también que el contenido de fenólicos totales se mantuvo sin cambios significativos (Sadilova *et al.* 2006). La actividad de agua juega un rol importante en la aceleración de reacciones enzimáticas y por ello sería una de las causas también de la degradación de AMT, ya que se incrementó mucho en las condiciones más severas (Labuza y Altunakar 2020).

d. Parámetros de la cinética de degradación del contenido de AMT del filtrante

En la Tabla 9 se puede evidenciar los parámetros de la cinética de la degradación del contenido de AMT del filtrante durante el tiempo de almacenamiento.

Tabla 9: Parámetros de la cinética de degradación de AMT del filtrante

HR (%)	T (°C)	Parámetros				
		Orden de la reacción	k (d ⁻¹)	R ²	Tiempo de vida media (t _{1/2}) (días)	Q ₁₀
85	40	1	0,0105	0,86	66,01	1,19
	50	1	0,0125	0,84	55,45	

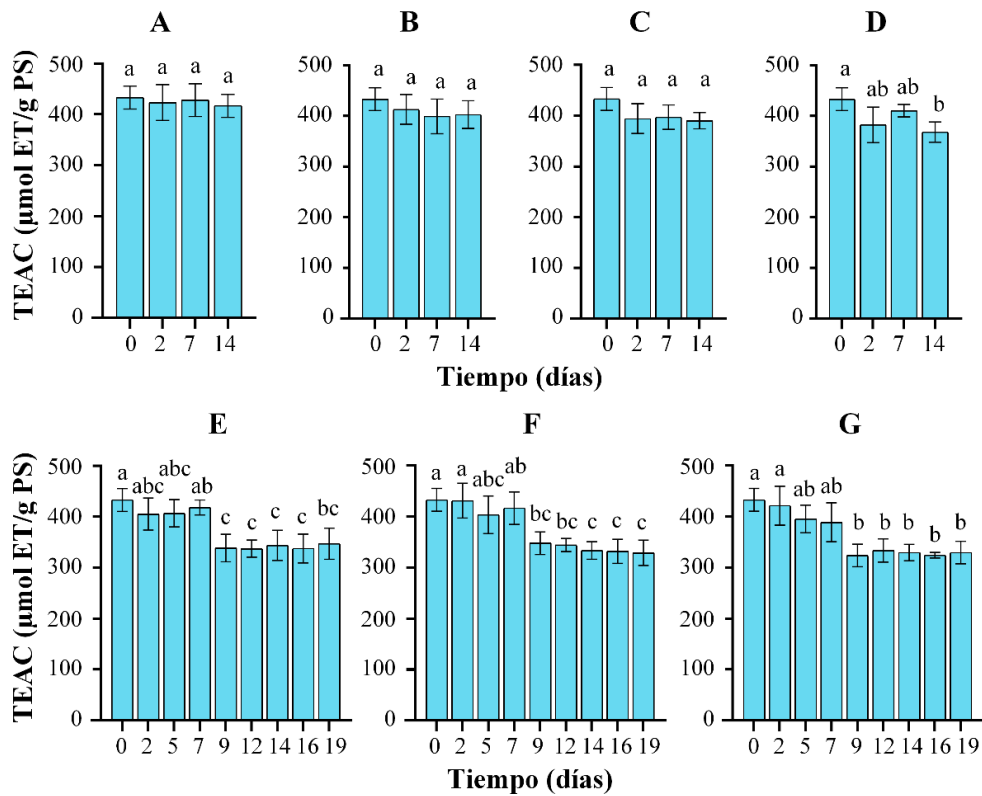
HR: humedad relativa, T: temperatura. *No se muestra las condiciones experimentales con R² < 0,8.

El contenido de AMT siguió una cinética de degradación de primer orden en las condiciones de almacenamiento más severas (85 % de humedad relativa, tanto a 40 °C como a 50 °C), igual modelo de reacción fue encontrado por Mohammadinejhad *et al.* (2023) en la degradación de antocianinas de maíz morado encapsulado. También se puede evidenciar que el valor de Q₁₀ fue 1.19, lo cual es superior a 1, indicando que al incremento de la temperatura se presenta un incremento de la degradación del contenido de AMT, comprobando la alta sensibilidad de estos compuestos al calor.

e. Capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC) del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

En la Figura 19 se puede evidenciar los valores de la capacidad antioxidante TEAC del filtrante durante el tiempo de almacenamiento.

El valor inicial de TEAC del filtrante fue de 433,10 ± 22,42 μmol ET/g PS. Este valor es muy superior a los valores reportados por Shopova *et al.* (2023) en hojas secas de *Haberlea rhodopensis* L. e *Hibiscus sabdarrifa* L. con 18,4 y 72,3 μmol ET/g, respectivamente; con extracción típica de infusión y con el mismo método de capacidad antioxidante. Como se muestra en la Figura 19 no hubo variaciones significativas de TEAC en el control y en las condiciones de 75 % HR a 30 y 40 °C. Esto es similar a lo encontrado en vino en polvo encapsulado, que exhibió una buena estabilidad de capacidad antioxidante DPPH durante 145 días en condiciones de almacenamiento a 38 °C y 33 % de humedad relativa (Rocha-Parra *et al.* 2016). En cambio, si hubo una disminución en las condiciones de almacenamiento de; 75 % HR a 50 °C y 85 % HR a 30, 40 y 50 °C hasta en un 23,83 % del valor inicial. Estas disminuciones de capacidad antioxidante equivalente trolox estarían reflejando las pérdidas de antocianinas monoméricas totales ocurridas en casi las mismas condiciones críticas.



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$): control (A), 75 % - 30 $^{\circ}\text{C}$ (B), 75 % - 40 $^{\circ}\text{C}$ (C), 75 % - 50 $^{\circ}\text{C}$ (D), 85 % - 30 $^{\circ}\text{C}$ (E), 85 % - 40 $^{\circ}\text{C}$ (F), 85 % - 50 $^{\circ}\text{C}$ (G).

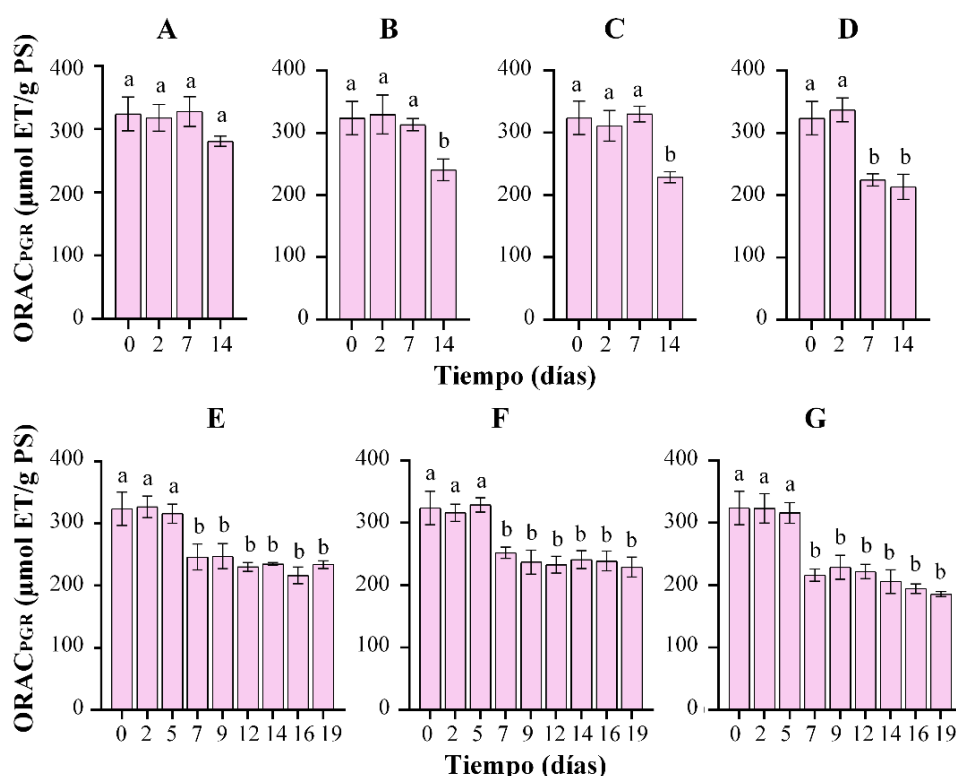
Figura 19: Capacidad antioxidante equivalente trolox del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

f. Capacidad antioxidante ORAC_{PGR} del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

En la Figura 20 se puede evidenciar la variación que presentó la capacidad antioxidante ORAC_{PGR} del filtrante en las diferentes condiciones de almacenamiento.

El valor ORAC_{PGR} inicial del filtrante fue de $323,98 \pm 26,80 \mu\text{mol ET/g PS}$, lo cual se encuentra dentro del rango ORAC_{FL} reportados por Thennakoon *et al.* (2022) en filtrantes de la tradicional planta del té (*Camellia sinensis*); con valores aproximados de 89,74 a 1943,07 $\mu\text{mol ET/g}$ de té negro y de 161,37 a 354.83 $\mu\text{mol ET/g}$ de té verde. Como se muestra en la Figura 20, el valor ORAC_{PGR} se mantuvo constante en el control, mientras que disminuyó significativamente en las demás condiciones de almacenamiento hasta en un 42,66 % del valor inicial. En un seguimiento de la capacidad antioxidante ORAC_{FL} en jugos de arándanos almacenados a condiciones ambientales (25°C) se observó una disminución ligera

pero continuada después de 1 día, 1-, 3- y 6 meses (Brownmiller *et al.* 2008), lo que corrobora la inevitable pérdida de la propiedad antioxidante en almacenamiento.



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura (°C): control (A), 75 % - 30 °C (B), 75 % - 40 °C (C), 75 % - 50 °C (D), 85 % - 30 °C (E), 85 % - 40 °C (F), 85 % - 50 °C (G).

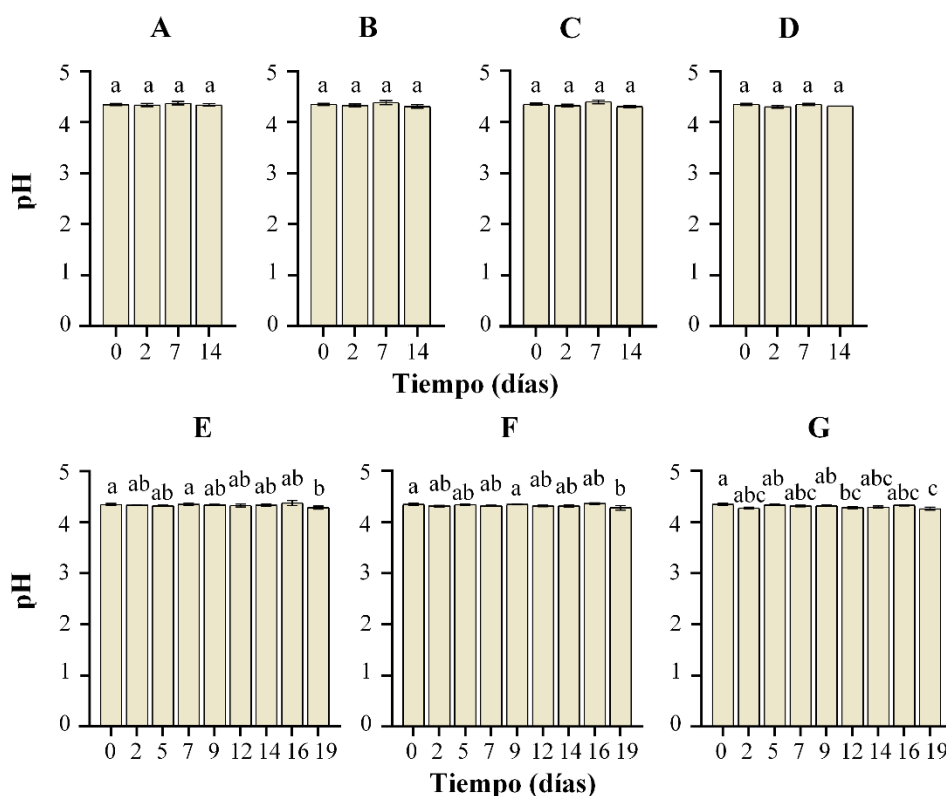
Figura 20: Capacidad antioxidante ORAC_{PGR} del filtrante durante el tiempo de almacenamiento

g. Valores de pH en la infusión durante el tiempo de almacenamiento

En la Figura 21 se observa el cambio del pH en las infusiones.

El pH inició con un valor de $4,35 \pm 0,02$ y se mantuvo constante en el control y en las condiciones de 75 % HR a 30 °C, 40 °C y 50 °C, reflejando buena estabilidad durante el tiempo de seguimiento. Se conoce que el pH impacta dramáticamente en la estabilidad de las antocianinas, principal compuesto bioactivo del filtrante (Sui *et al.* 2014), siendo éstas generalmente más estables a pH bajos (Schwartz *et al.* 2017). En cambio, en las condiciones de 85 % HR a 30, 40 y 50 °C el pH disminuyó muy ligeramente con significancia estadística a 4,29, 4,28 y 4,26, respectivamente, indicando una probable degradación química de los

componentes del filtrante. Los resultados de pH fueron ligeramente superiores a los reportados por Lakshan *et al.* (2019) al evaluar una bebida funcional a base de arveja azul (*Clitoria ternatea* L.) con valores de pH de 3,5 a 4,0, que mantuvo sus cualidades estables durante 28 días a temperatura ambiente sin aditivos.

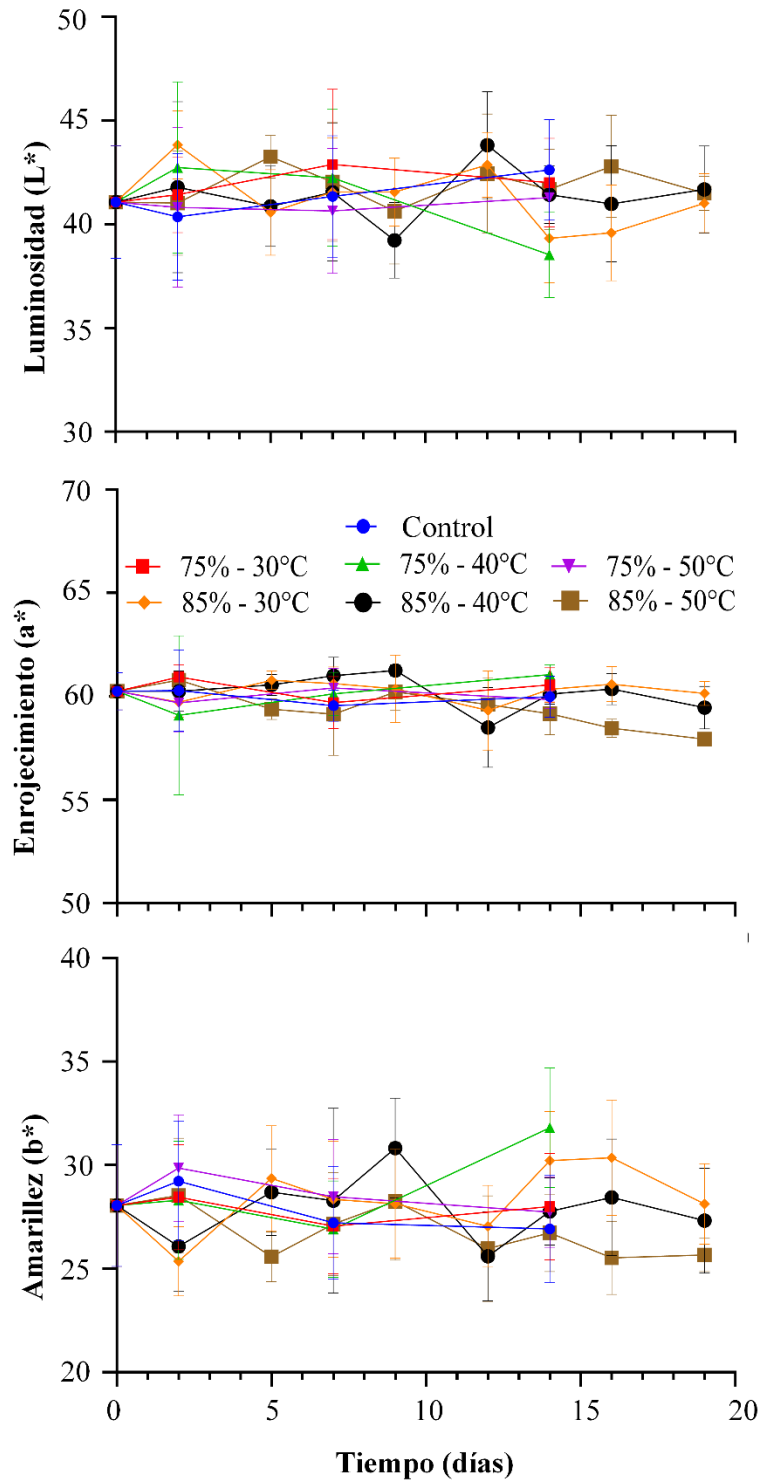


*Letras diferentes indican diferencias estadísticas utilizando una prueba de comparación de Tukey con $p \leq 0,05$. Condiciones de almacenamiento de humedad relativa (%) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$): control (A), 75 % - 30 $^{\circ}\text{C}$ (B), 75 % - 40 $^{\circ}\text{C}$ (C), 75 % - 50 $^{\circ}\text{C}$ (D), 85 % - 30 $^{\circ}\text{C}$ (E), 85 % - 40 $^{\circ}\text{C}$ (F), 85 % - 50 $^{\circ}\text{C}$ (G).

Figura 21: Valores de pH de la infusión durante el tiempo de almacenamiento

h. Color (escala CIELAB) de la infusión durante el tiempo de almacenamiento

En la Figura 22 se observa los valores del color de las infusiones obtenidas de los filtrantes durante el almacenamiento. Los componentes del color iniciaron con valores de $L^* = 41,07 \pm 2,71$, $a^* = 60,25 \pm 0,90$ y $b^* = 28,05 \pm 2,95$, lo cual corresponde a una intensa coloración roja y oscura de la infusión. Estos valores no presentaron variación significativa ($p > 0,05$) a lo largo del tiempo de seguimiento en ninguna condición experimental.



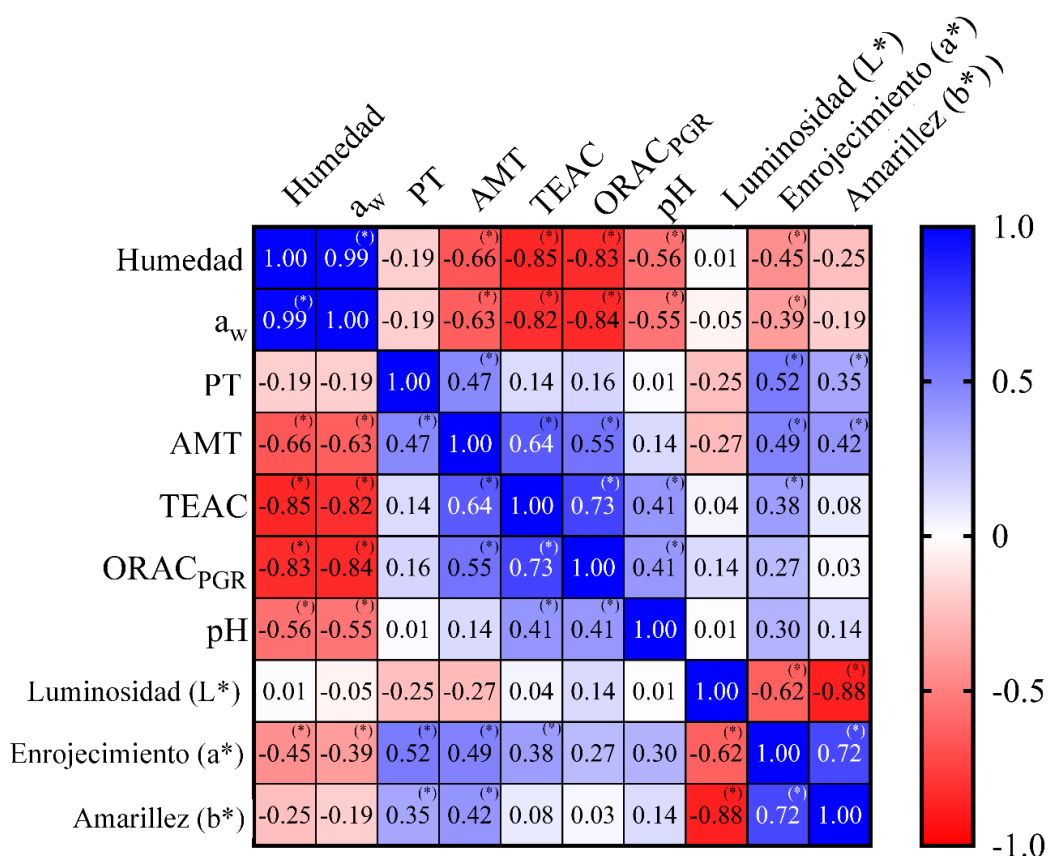
*No hay variación estadísticamente significativa en ninguna condición de almacenamiento (Tukey; $p > 0,05$). Humedades relativas expresados en % y temperaturas en °C.

Figura 22: Color en escala CIELAB de la infusión durante el tiempo de almacenamiento

El color de la infusión se mantuvo bastante estable pese a ligeras variaciones del pH en algunas condiciones de los 19 días de almacenamiento. Esto podría explicarse por la polimerización de las antocianinas en almacenamiento, aumentando la proporción de antocianinas poliméricas y por tanto también aportando color (Brownmiller *et al.* 2008) Además, se añadiría una formación de co-pigmentaciones naturales de las antocianinas con otros compuestos no coloreados como otros fenólicos, favorecidas por el incremento de la humedad durante el tiempo de almacenamiento (Ertan *et al.* 2020). La co-pigmentación es el proceso por el cual las antocianinas forman asociaciones moleculares o complejas con otros compuestos orgánicos incoloros o iones metálicos, por lo que suele ocurrir un cambio o aumento en la intensidad del color (Enaru *et al.* 2021).

i. Correlación entre humedad, actividad de agua, contenido de PT, contenido de AMT, capacidad antioxidante por TEAC y ORAC_{PGR}, pH y color del filtrante

En la Figura 23 se muestra los coeficientes de correlación resultantes de la relación entre todos los parámetros evaluados.



(*): La correlación es significativa (valor p de dos colas $\leq 0,05$).

Figura 23: Correlación entre humedad, actividad de agua, contenido de PT, contenido de AMT, capacidad antioxidante, pH y color del filtrante

Se puede evidenciar correlaciones positivas altas entre; humedad y a_w (0,99), TEAC y CA-ORAC_{PGR} (0,73) y los valores a^* y b^* del color de la infusión (0,72). Acerca de la relación entre la humedad y la actividad de agua, es muy difundido por la literatura que ambos tienen una estrecha relación en muchos productos (Bell 2020), y definitivamente se evidencia una correlación alta en el filtrante, cual es un producto seco y molido.

Con respecto a los valores obtenidos con los dos métodos de capacidades antioxidantes se observa buena correlación. Lo común de estas dos determinaciones es que ambas son reacciones colorimétricas, se calcula a partir de las absorbancias medidas, se usaron como estándar al trolox para generar la curva de calibración y tampón fosfato para las diluciones. Lo que diferencia a ambos métodos es el tipo de mecanismo de reacción; ORAC_{PGR} usa un reactivo sonda y se genera una competición con los antioxidantes de los alimentos, mientras que TEAC no. Se puede observar también una correlación entre los valores a^* y b^* , indicando que, si el tono es más amarillo, también es más rojizo, esto se debe directamente a los componentes del filtrante en la infusión.

Hubo correlaciones negativas altas entre; TEAC y humedad (-0,85), TEAC y a_w (-0,82), CA-ORAC_{PGR} y humedad (-0,83), CA-ORAC_{PGR} y a_w (-0,84) y los valores L^* y b^* del color de la infusión (-0,88). Se evidencia que las capacidades antioxidantes tienen relaciones inversamente proporcionales al contenido de agua, esto es explicada debido a que cuando la humedad aumenta, la oxidación aumenta y por lo tanto se mide una menor capacidad antioxidante (Bell 2020). Así como la relación entre los valores a^* y b^* , también existe fuerte relación inversa de L^* y b^* , indicando que cuanto más clara fue la infusión, menos rojiza fue ésta.

4.4.4. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL FILTRANTE

En la Tabla 10 se puede observar los valores de los diferentes microorganismos analizados en el filtrante al iniciar el seguimiento y cuando finalizó.

Los recuentos microbiológicos al inicio y al término del estudio de estabilidad indicaron cumplimiento con los límites de las especificaciones descritas en la NTS N° 071; mohos < 10² UFC/g, levaduras < 10² UFC/g, enterobacterias < 10² UFC/g, *Escherichia coli* < 10 UFC/g y *Salmonella sp.* debe estar ausente en 25 g (RM N° 591-2008-MINSA 2008).

Tabla 10: Características microbiológicas del filtrante

Microorganismos	Tiempo (días)	
	0	19
Mohos (UFC/g)	<10	<10
Levaduras (UFC/g)	<10	<10
Enterobacterias (UFC/g)	<10	<10
<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<10	<10
<i>Salmonella sp.</i> (Ausencia/25 g)	Ausencia	Ausencia

*UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

4.4.5. ANTOCIANINAS POR UHPLC DEL FILTRANTE

El análisis de antocianinas por UHPLC del filtrante reveló un contenido de $9,03 \pm 0,62$ mg EC3G/g PS, siendo el valor ligeramente menor ($p = 0,039$, prueba-t) que el obtenido por el método de pH diferencial ($11,01 \pm 0,95$) que se muestra en la Figura 17. Este hallazgo es similar al obtenido por (Lao y Giusti 2016) para algunas muestras de coronta de maíz morado, en la que compararon un método de HPLC con el de pH diferencial.

En la Figura 24 se muestra un cromatograma obtenido de una muestra típica de la infusión analizada, donde se resalta la presencia de 11 antocianinas diferentes. El pico 1 corresponde a la cianidina-3-glucósido, identificada con el estándar, mientras que del pico 2 al 11 no se podrían decir con exactitud los nombres debido a que no se contó con acoplamiento a espectrometría de masas. Estudios previos revelaron entre 7 y 14 antocianinas diferentes en extractos de coronta de maíz morado; Guillén Sánchez *et al.* (2023) encontraron 7 antocianinas en extractos obtenidos con alta presión dinámica, mientras que Lao y Giusti (2016) reportaron hasta 14 antocianinas en extractos con maceración, los cuales fueron principalmente cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, y sus respectivos derivados malonílicos. Las variaciones en la cantidad de antocianinas podrían deberse a varios factores como las variedades de maíz morado, condiciones de cultivo de las muestras analizadas y tipos de solventes de extracción, que en el caso del presente estudio fue con agua caliente por 5 minutos, simulando la realización de una infusión.

En la Figura 25 se muestra un cromatograma típico de la infusión hidrolizada, se visualiza la presencia de las 3 antocianidinas del maíz morado, previamente identificadas en diferentes estudios (de Pascual-Teresa *et al.* 2002, Jing y Giusti 2005, Lao y Giusti 2016); cianidina,

pelargonidina y peonidina, con tiempos de retención de; 1,80, 2,08 y 2,27 min respectivamente. Se puede evidenciar que la cianidina es la aglicona mayoritaria presente en la infusión hidrolizada.

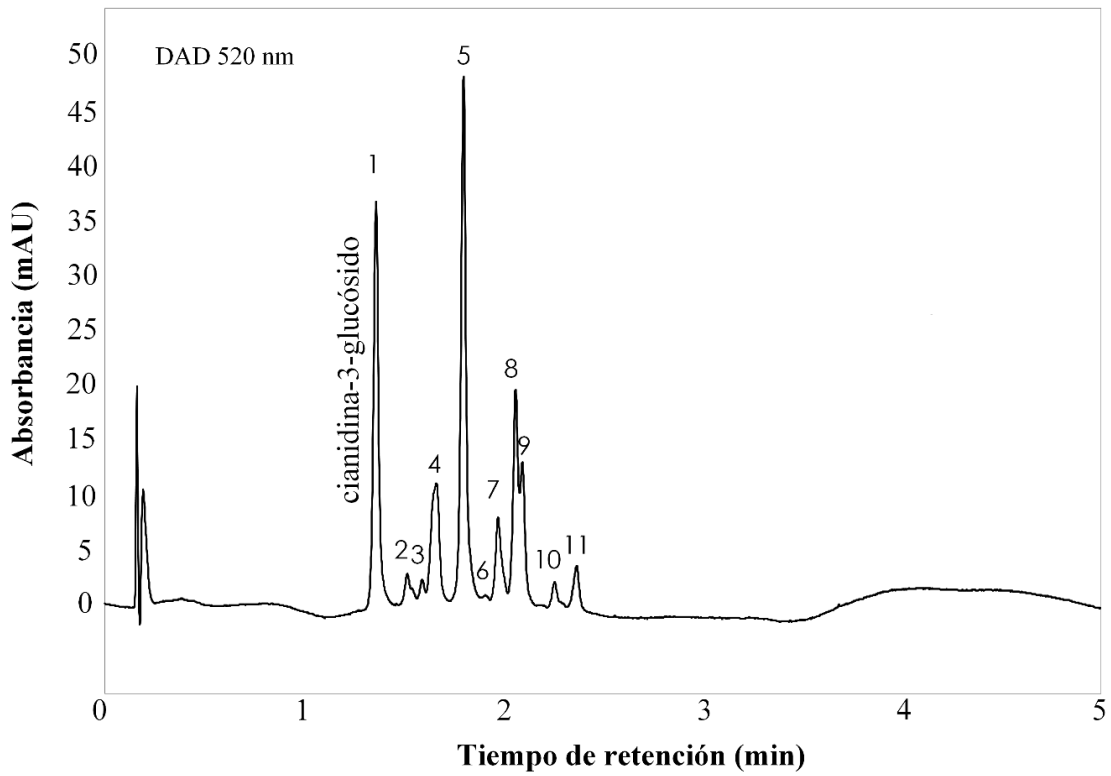


Figura 24: Cromatograma de la infusión del filtrante óptimo

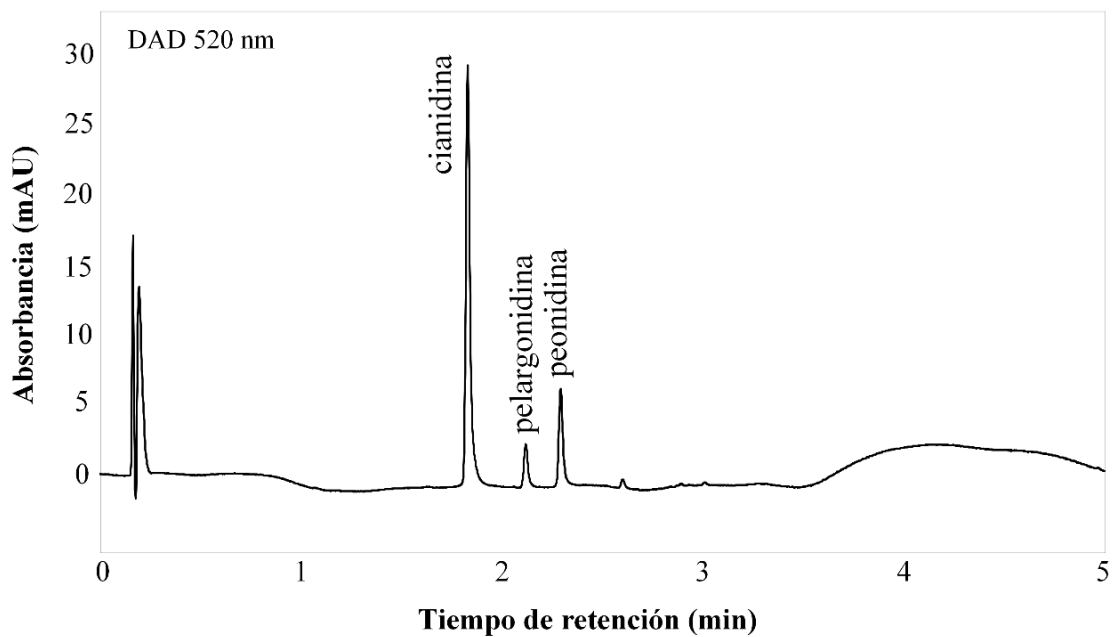


Figura 25: Cromatograma de la infusión hidrolizada del filtrante óptimo

4.5. EFECTO ANTIOXIDANTE *IN VIVO*

4.5.1. SEGUIMIENTO DEL CONSUMO DE NUTRIENTES DE LOS VOLUNTARIOS

En la Tabla 11 se puede observar el seguimiento del consumo de nutrientes de los voluntarios.

Tabla 11: Consumo de nutrientes de los voluntarios después del periodo de lavado (0 semanas) y después de 2 y 4 semanas de estudio

	Tiempo (semanas)		
	0	2	4
Grupo control			
Energía (kcal)	1882,13 ± 319,82	1861,75 ± 166,55	1768,88 ± 188,04
Proteínas (g)	70,61 ± 10,16	67,84 ± 5,17	66,36 ± 8,81
Carbohidratos totales (g)	241,38 ± 60,20	236,13 ± 46,93	219,88 ± 43,37
Fibra dietaria (g)	20,00 ± 6,49	20,74 ± 6,46	17,65 ± 5,11
Grasa total (g)	66,40 ± 23,93	68,31 ± 13,63	66,46 ± 14,17
Calcio (mg)	462,38 ± 152,13	390,25 ± 203,23	431,13 ± 221,54
Hierro (mg)	10,30 ± 2,32	11,40 ± 2,54	9,76 ± 2,11
Sodio (mg)	2388,50 ± 346,75	2527,75 ± 382,93	2177,88 ± 298,10
Vitamina A (µg)	1359,63 ± 2234,34	570,38 ± 203,99	994,25 ± 1139,20
Vitamina B1 (mg)	0,94 ± 0,20	0,92 ± 0,18	0,85 ± 0,16
Vitamina B2 (mg)	1,17 ± 0,34	1,23 ± 0,61	1,21 ± 0,49
Vitamina B3 (mg)	25,74 ± 2,65	25,41 ± 4,42	25,23 ± 3,45
Ácido fólico (µg)	251,88 ± 71,14	254,13 ± 85,22	206,24 ± 60,45
Vitamina C (mg)	114,54 ± 39,94	87,01 ± 29,02	102,79 ± 38,97
Proteínas (%)	14,96 ± 1,95	14,86 ± 1,65	14,83 ± 1,50
Grasa total (%)	30,83 ± 9,24	33,18 ± 7,24	33,55 ± 6,87
Carbohidratos totales (%)	54,24 ± 9,48	52,28 ± 7,47	51,74 ± 7,43
Índice de alimentación saludable	66,51 ± 11,75	63,78 ± 5,21	65,58 ± 7,09

«continuación»

Grupo consumo			
Energía (kcal)	1673,00 ± 389,96	1655,63 ± 380,30	1705,25 ± 433,10
Proteínas (g)	59,73 ± 14,35	58,51 ± 13,36	68,01 ± 21,63
Carbohidratos totales (g)	231,00 ± 68,14	222,63 ± 50,58	224,25 ± 57,80
Fibra dietaria (g)	20,99 ± 7,14	23,05 ± 9,08	24,35 ± 15,60
Grasa total (g)	52,55 ± 14,35	56,14 ± 18,50	55,61 ± 15,13
Calcio (mg)	415,63 ± 223,47	430,38 ± 172,68	431,63 ± 226,51
Hierro (mg)	11,70 ± 3,25	10,89 ± 2,95	13,31 ± 7,01
Sodio (mg)	3011,38 ± 2233,11	2224,38 ± 646,31	2252,13 ± 485,79
Vitamina A (µg)	887,75 ± 1067,04	662,25 ± 309,81	1301,63 ± 2314,09
Vitamina B1 (mg)	0,94 ± 0,28	0,91 ± 0,24	1,00 ± 0,44
Vitamina B2 (mg)	1,36 ± 0,90	1,16 ± 0,66	1,25 ± 0,67
Vitamina B3 (mg)	21,33 ± 5,71	20,76 ± 4,86	26,53 ± 9,93
Ácido fólico (µg)	257,38 ± 116,87	253,75 ± 92,32	306,50 ± 226,43
Vitamina C (mg)	107,45 ± 56,82	104,45 ± 73,25	88,91 ± 59,67
Proteínas (%)	14,19 ± 1,47	14,03 ± 1,20	15,46 ± 1,56
Grasa total (%)	28,36 ± 5,74	29,60 ± 6,03	29,36 ± 5,09
Carbohidratos totales (%)	57,44 ± 6,33	56,34 ± 6,26	55,15 ± 5,05
Índice de alimentación saludable	63,64 ± 6,10	65,81 ± 5,51	68,01 ± 9,51

Los nutrientes son calculados por 100 g de porción comestible. Los datos son medias ± DE. Sin diferencias significativas en comparación con las 0 semanas, $p > 0,05$.

Como se muestra en la Tabla 11, no hubo diferencias significativas del consumo de nutrientes de los voluntarios en ambos grupos comparado con el tiempo de inicio del estudio, esto evidencia que los voluntarios mantuvieron su dieta habitual global. Así mismo, el índice de alimentación saludable estuvo en el rango de 61-70, indicando en promedio que ambos grupos se mantuvieron en la categoría de dieta “buena” (Kennedy *et al.* 1995, Norte y Ortiz 2011).

4.5.2. SEGUIMIENTO DE LOS VALORES DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (PAS), PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD) Y FRECUENCIA CARDIACA (FC) DE LOS VOLUNTARIOS

En la Tabla 12 se puede observar los valores de la presión arterial y frecuencia cardiaca de los voluntarios para hacer seguimiento de su condición de salud.

Tabla 12: Valores de PAS, PAD y FC de los voluntarios después del período de lavado (0 semanas), después de 2 y 4 semanas de estudio

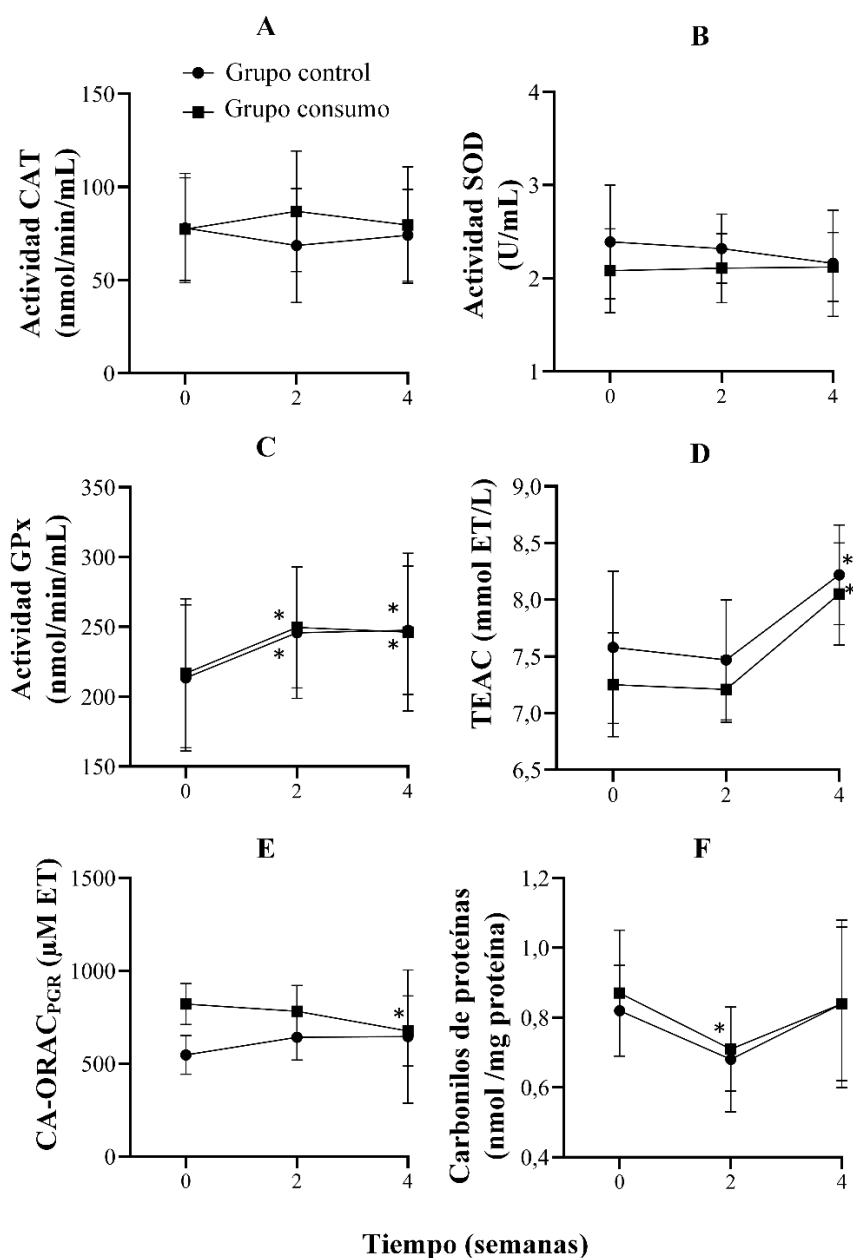
	Tiempo (semanas)		
	0	2	4
Grupo control			
PAS (mmHg)	104,72 ± 14,87	107,61 ± 8,41	109,39 ± 5,04
PAD (mmHg)	67,67 ± 10,61	66,50 ± 5,87	69,72 ± 4,56
FC (lat/min)	75,39 ± 8,96	71,67 ± 7,82	76,33 ± 9,77
Grupo consumo			
PAS (mmHg)	103,50 ± 9,20	103,94 ± 8,20	102,11 ± 11,22
PAD (mmHg)	62,61 ± 5,74	61,83 ± 6,75	66,94 ± 7,63
FC (lat/min)	70,83 ± 8,12	69,72 ± 9,88	72,28 ± 12,81

Los datos son medias ± DE. Sin diferencias significativas en comparación con las 0 semanas, $p > 0,05$. PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, FC: frecuencia cardiaca.

De acuerdo con la *American Heart Association*, la presión arterial es normal cuando es menor de 120 y de 80 mmHg en la PAS y PAD, respectivamente y como se observa los valores de presión fueron normales y no sufrieron cambios significativos dentro de los dos grupos ($p > 0,05$). De acuerdo con el conocimiento popular la “chicha morada” reduce la presión arterial por contener el maíz morado, cual es también ingrediente principal de la infusión herbal estudiada, sin embargo, este efecto no se evidenció en los voluntarios, esto podría deberse a que tuvieron la presión arterial normal. Sería importante el estudio con población hipertensa para tal vez evidenciar el posible efecto.

4.5.3. SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO DEL PLASMA EN LOS VOLUNTARIOS

En la Figura 26 se muestra el efecto del filtrante sobre los biomarcadores de protección antioxidante del plasma sanguíneo (las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, capacidad antioxidante TEAC y ORAC_{PGR}) y un biomarcador de daño oxidativo (carbonilos de proteína).



Diferencias significativas en comparación con 0 semanas: * ($p \leq 0,05$).

Figura 26: Efecto del filtrante sobre los parámetros de estrés oxidativo del plasma sanguíneo después del período de lavado (0 semanas), después de 2 y 4 semanas de estudio

Con respecto a las actividades enzimáticas CAT y SOD; no se encontró diferencias significativas de éstos en ninguno de los grupos a lo largo del estudio. Estos resultados son diferentes a estudios experimentales de extractos de maíz morado *in vivo*; donde se incrementó significativamente las actividades CAT y SOD en órganos aislados de rata (Ramos-Escudero *et al.* 2012) y en otros animales (Kim *et al.* 2023), este efecto tal vez se deba a que son estudios que en su mayoría inducen previamente un daño oxidativo, mientras que el presente estudio se realizó con humanos sanos. Bakuradze *et al.* (2019) sí encontraron un incremento significativo en la actividad SOD tras el consumo de una bebida rica en antocianinas por voluntarios sanos.

Hubo un incremento significativo en la actividad GPx después de dos y cuatro semanas de seguimiento en ambos grupos (control y consumo). Una revisión sistemática previa reportó que existen estudios que muestran un incremento de la actividad GPx tras la ingesta de fuentes de antocianinas, pero que también existen otros donde no hay efecto significativo en este parámetro (Fallah *et al.* 2020).

En relación con la capacidad antioxidante del plasma de los voluntarios; se incrementó significativamente el TEAC tanto en el grupo control como en el de consumo después de cuatro semanas de estudio. Fallah *et al.* (2020) propuso que la capacidad antioxidante TEAC puede ser un parámetro más útil en humanos no sanos que ingieren alimentos ricos en antocianinas, comparado con humanos sanos, de acuerdo con estudios previos, lo que se corrobora la presente evaluación del filtrante con voluntarios sanos. Por otro lado, hubo una disminución significativa en la CA-ORAC_{PGR} en el grupo de consumo después de cuatro semanas de estudio, mientras que en el grupo control se mantuvo sin diferencias significativas. El rango de valores de CA-ORAC_{PGR} en ambos grupos son cercanos a lo reportado por Torres *et al.* (2008), $510 \pm 80 \mu\text{M ET}$. Sin embargo, no se encontró estudios previos de la evolución de la capacidad antioxidante medida con el método ORAC_{PGR} en el plasma después del consumo de alimentos, por lo que sería un biomarcador interesante para seguir incluyéndolo en los estudios.

La concentración de carbonilos de proteína, que es considerado uno de los principales biomarcadores de daño oxidativo (Sies *et al.* 2017), se mantuvo sin cambios significativos en el grupo control después de dos y cuatro semanas de estudio, mientras que en el grupo consumo si hubo una disminución significativa tras dos semanas de intervención, indicando

un efecto de reducción de la oxidación de proteínas, lo cual sería un posible efecto positivo. Sin embargo, a las cuatro semanas pareciera que volviera a su estado original, tal vez por un ligero desbalance del sistema antioxidante debido posiblemente a una ligera variación en la dieta y/o ejercicios físicos. Gutiérrez *et al.* (2015) reportaron diferencia significativa de la concentración de carbonilos de proteína de personas normo pesos y con obesidad; 0,65 y 0,89 nmoles de osazonas/mg de proteínas, respectivamente, pero que no hubo variación significativa en ambos grupos después de 90 días de seguimiento con dieta hipocalórica y la adición de ejercicio y suplemento vitamínico. Chevion *et al.* (2003) si encontraron una reducción significativa de este parámetro, de 0,7 a 0,52 a nmol de carbonilos de proteína/mg de proteína después de un ejercicio intenso (50 km de marcha).

4.5.4. VALORES DE *PROTECTION SCORE*, *DAMAGE SCORE* Y *OXY-SCORE*

En la Tabla 13 se muestra los valores del *protection score*, *damage score* y *OXY-SCORE* en los grupos control y consumo del filtrante.

Tabla 13: Valores de *protection score*, *damage score* y *OXY-SCORE* del grupo control y consumo después del período de lavado (0 semanas), después de 2 y 4 semanas de estudio

	Tiempo (semanas)		
	0	2	4
Grupo control			
<i>Protection score</i>	$3,82 \times 10^{-16} \pm 0,18$	$2,34 \times 10^{-16} \pm 0,12$	$-9,25 \times 10^{-17} \pm 0,18$
<i>Damage score</i>	$0 \pm 0,33$	$5,61 \times 10^{-16} \pm 0,33$	$-2,2 \times 10^{-16} \pm 0,33$
<i>OXY-SCORE</i>	$-3,95 \times 10^{-16} \pm 0,34$	$3,45 \times 10^{-16} \pm 0,38$	$0 \pm 0,47$
Grupo consumo			
<i>Protection score</i>	$-4,07 \times 10^{-16} \pm 0,16$	$9,62 \times 10^{-16} \pm 0,15$	$7,03 \times 10^{-16} \pm 0,16$
<i>Damage score</i>	$2,10 \times 10^{-16} \pm 0,33$	$-1,5 \times 10^{-15} \pm 0,33$	$-7,50 \times 10^{-16} \pm 0,33$
<i>OXY-SCORE</i>	$5,92 \times 10^{-16} \pm 0,43$	$-2,53 \times 10^{-15} \pm 0,40$	$-1,47 \times 10^{-15} \pm 0,33$

Los datos son medias \pm SEM (error estándar de la media). Sin diferencias significativas en comparación con las 0 semanas ($p > 0,05$).

Los valores de OXY-SCORE del grupo control y de consumo se encontraron cercanos a cero, indicando un equilibrio entre el sistema de defensa antioxidante y el daño oxidativo. No se encontró diferencias significativas de estos valores después de dos y cuatro semanas de estudio en cada grupo ($p > 0,05$). El OXY-SCORE ha sido usado como un índice global de estrés oxidativo que combina los biomarcadores pro- y antioxidante (Veglia *et al.* 2006, 2010). En este estudio, no se encontró diferencias estadísticas entre ambos grupos y a lo largo del estudio, esto podría ser principalmente por la restricción de fuentes de antocianinas, estevia y otros alimentos con alto contenido fenólico de la dieta y así observar el efecto únicamente del filtrante y evitar cualquier efecto sinérgico. Sin duda, como lo menciona Brown (2018), es todo un reto aplicar un ensayo clínico con un alimento funcional debido a sus múltiples cuestiones técnicas. Así mismo, el otro gran reto también es que los alimentos funcionales logren variar los valores de los parámetros de estrés oxidativo de personas sanas, ya que su dieta es buena, como se observó en el índice de alimentación saludable, pero debe hacerse para mostrar una completa valoración (incluyendo en humanos sin patologías) del efecto antioxidante de un alimento con propiedades antioxidantes *in vitro*.

Hay pocos estudios del efecto en el estrés oxidativo del maíz morado en humanos como se puede evidenciar en un reciente artículo de revisión (Kim *et al.* 2023), por ello este trabajo puede aportar en esa línea, además de ser una referencia de los niveles de algunos parámetros sanguíneos de la población peruana evaluados en este trabajo.

V. CONCLUSIONES

1. Se analizaron los ingredientes del filtrante y se encontró que la capacidad antioxidante $ORAC_{FL}(CA-ORAC_{FL})$ más alta lo presentaron el clavo de olor y la coronta de maíz morado sin diferencias significativas, seguidos de la estevia, canela y membrillo. El contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) de la coronta de maíz morado fue de $41,32 \pm 0,95$ mg EC3G/g PS. El contenido de polifenoles totales (PT) siguió el siguiente orden; clavo de olor ($228,69$ mg EAG/g PS) > canela > estevia > coronta de maíz morado > membrillo ($20,30$ mg EAG/g PS).
2. La fórmula del filtrante se optimizó por el diseño de mezcla *I-optimal* con una deseabilidad de 91,2 % basado en la maximización de la $CA-ORAC_{FL}$ y AMT. El filtrante óptimo presentó un contenido de (%): 83,62 de coronta de maíz morado, 8,33 de estevia, 4,47 de membrillo, 3,33 de canela y 0,25 de clavo de olor. La infusión del filtrante óptimo tuvo $CA-ORAC_{FL}$ de $9,09 \pm 0,29$ μ mol ET/mL y AMT de $97,19 \pm 4,40$ mg EC3G/L. En 19 días de evaluación de estabilidad del filtrante óptimo se encontró que PT (contenido inicial de $32,33 \pm 2,91$ mg EAG/g PS) y el color no variaron significativamente en todas las condiciones evaluadas. Las AMT con contenido inicial de $11,01 \pm 0,95$ mg EC3G/g PS se degradaron con una cinética de primer orden en las condiciones más severas, perdiéndose hasta en un 21,89 % de su contenido inicial. La capacidad antioxidante disminuyó, hasta en un 23,83 y 42,66 % de sus valores iniciales TEAC y $ORAC_{PGR}$, respectivamente, sin embargo, los valores fueron similares a otros filtrantes reportados, como el clásico té negro.
3. Se evaluó el efecto antioxidante en plasma del filtrante óptimo en dieciocho voluntarios sanos. No se encontró efecto significativo en las actividades enzimáticas CAT, SOD, GPx y en TEAC. Se encontró una disminución significativa en $ORAC_{PGR}$ y el contenido de carbonilos de proteína (biomarcador de daño oxidativo), en el grupo de consumo después de 4 y 2 semanas, respectivamente. Sin embargo, los índices OXY-SCORE en ambos grupos fueron cercanos a cero y no variaron significativamente después de 2 y 4 semanas, indicando un equilibrio entre el sistema de defensa antioxidante y los oxidantes.

VI. RECOMENDACIONES

- Proponer el desarrollo de más productos a base de maíz morado con fines de exportación, debido a que actualmente este importante cereal peruano sólo se exporta como producto entero o como colorante. Se recomienda productos secos por su buena estabilidad, así como se evidenció en el filtrante desarrollado.
- Continuar con más estudios del efecto antioxidante (en humanos) de productos a base de maíz morado; se puede continuar con el tipo de ensayo clínico llevado a cabo en el presente trabajo de investigación, pero con un mayor tiempo de intervención, número de voluntarios y evaluación de otros biomarcadores de estrés oxidativo. Así mismo, sería interesante probar el efecto con diferentes poblaciones; por ejemplo, en personas con enfermedades (diabetes, hipertensión y obesidad) o con otro tipo de ensayo clínico, por ejemplo, el ensayo clínico controlado, aleatorizado y cruzado.
- Realizar un análisis sensorial del filtrante óptimo con el fin de identificar descriptores con la mirada hacia una comercialización del producto.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaramola, B; Onigbinde, A. 2016. Effect of Extraction Solvent on the Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Capacity Of Clove Bud (en línea). IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 11(3):33-38. DOI: <https://doi.org/10.9790/3008-1103013338>.
- Akhavan, S; Jafari, SM; Assadpour, E; Ghorbani, M. 2016. Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. Journal of Food Engineering 181:59-66. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2016.03.003>.
- AlMarzooqi, FA; Bilad, MR; Mansoor, B; Arafat, HA. 2016. A comparative study of image analysis and porometry techniques for characterization of porous membranes. Journal of Materials Science 51(4):2017-2032. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9512-0>.
- Al-Muhtaseb, AH; McMinn, WAM; Magee, TRA. 2002. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: A review. Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C 80(2):118-128. DOI: <https://doi.org/10.1205/09603080252938753>.
- Anastácio, A; De Carvalho, IS. 2016. Development of a beverage benchtop prototype based on sweet potato peels: optimization of antioxidant activity by a mixture design. International Journal of Food Sciences and Nutrition 67(5):496-506. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1174984>.
- AOAC (Association of Analytical Communities). 2019. Official methods of analysis of AOAC international. 21 ed. Washington, AOAC International.
- Apak, R; Capanoglu, E; Shahidi, F. 2017. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications (en línea). s.l., wiley. 1-337 p. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119135388>.

- Apak, R; Özyürek, M; Güçlü, K; Çapanoğlu, E. 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(5):997-1027. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.
- Arabhosseini, A; Huisman, W; van Boxtel, A; Müller, J. 2007. Long-term effects of drying conditions on the essential oil and color of tarragon leaves during storage. *Journal of Food Engineering* 79(2):561-566. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.014>.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2010. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Designation: E96-00e1 (en línea). Philadelphia, ASTM International. Consultado 24 ago. 2023. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/336879226_Standard_Test_Methods_for_Water_Vapor_Transmission_of_Materials_1.
- Bakuradze, T; Tausend, A; Galan, J; Groh, IAM; Berry, D; Tur, JA; Marko, D; Richling, E. 2019. Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. *Free Radical Research* 53(sup1):1045-1055. DOI: <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1618851>.
- Baltacıoğlu, C; Uslu, N; Musa Özcan, M. 2015. Optimization of microwave and air drying conditions of quince (*Cydonia oblonga*, Miller) using response surface methodology. *Italian Journal of Food Science* 27(1):1-7. DOI: <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v85>.
- Bassi, P; Kumar, V; Kumar, S; Kaur, S; Gat, Y; Majid, I. 2020. Importance and prior considerations for development and utilization of tea bags: A critical review (en línea). *Journal of Food Process Engineering* 43(1). DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13069>.
- Bechoff, A; Cissé, M; Fliedel, G; Declémy, AL; Ayessou, N; Akissoe, N; Touré, C; Bennett, B; Pintado, M; Pallet, D; Tomlins, KI. 2014. Relationships between anthocyanins and other compounds and sensory acceptability of Hibiscus drinks. *Food Chemistry* 148:112-119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.132>.
- Bell, LN. 2020. Moisture Effects on Food's Chemical Stability (en línea). *In 4 (ed.)*. 2, 5. p. 227-253 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch9>.

- Bender, C; Graziano, S; Zimmermann, BF. 2015. Study of Stevia rebaudiana Bertoni antioxidant activities and cellular properties (en línea). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 66(5):553-558. DOI: <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1038223>.
- Bender, C; Killermann, K V.; Rehmann, D; Weidlich, HH. 2018. Effect of Stevia rebaudiana Bert. Addition on the Antioxidant Activity of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Juices (en línea). *Beverages* 4(3):52. DOI: <https://doi.org/10.3390/beverages4030052>.
- Van den Berg, C; Bruin, S. 1981. WATER ACTIVITY AND ITS ESTIMATION IN FOOD SYSTEMS: THEORETICAL ASPECTS. *Water Activity: Influences on Food Quality* :1-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-591350-8.50007-3>.
- Bi, X; Soong, YY; Lim, SW; Henry, CJ. 2015. Evaluation of antioxidant capacity of Chinese five-spice ingredients (en línea). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 66(3):289-292. DOI: <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1007452>.
- Bradley, J; Goos, P. 2012. I-optimal versus D-optimal split-plot Response surface designs. *Journal of Quality Technology* 44(2):85-101. DOI: <https://doi.org/10.1080/00224065.2012.11917886>.
- Brainina, K; Stozhko, N; Vidrevich, M. 2019. Antioxidants: Terminology, methods, and future considerations. *Antioxidants* 8(8). DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8080297>.
- Brown, L; Caligiuri, SPB; Brown, D; Pierce, GN. 2018. Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *Journal of Functional Foods* 45:233-238. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.01.024>.
- Brownmiller, C; Howard, LR; Prior, RL. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science* 73(5). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00761.x>.
- Buruk, Y; Aktar, E; Burnak, N. 2016. Mixture design: A review of recent applications in the food industry. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences* 22(4):297-304. DOI: <https://doi.org/10.5505/pajes.2015.98598>.

- Bystrická, J; Musilová, J; Lichtnerová, H; Lenková, M; Kovarovic, J; Chalas, M. 2017. The content of total polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity in selected varieties of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) (en línea). *Potravinárstvo: Slovak Journal of Food Sciences* 11(1):77-81. DOI: <https://doi.org/10.5219/699>.
- Carrera, EJ; Cejudo-Bastante, MJ; Hurtado, N; Heredia, FJ; González-Miret, ML. 2023. Revalorization of Colombian purple corn *Zea mays* L. by-products using two-step column chromatography. *Food Research International* 169:112931. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2023.112931>.
- Cascales, EV; García, JMR. 2020. Characteristics of the raw fruit, industrial pulp, and commercial jam elaborated with Spanish quince (*Cydonia oblonga* Miller) (en línea). *Emirates Journal of Food and Agriculture* 32(8):623-633. DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i8.2140>.
- Castañeda-Saucedo, MC; Ramírez-Anaya, JDP; Tapia-Campos, E; Diaz-Ochoa, EG. 2020. Comparison of total phenol content and antioxidant activity of herbal infusions with added *Stevia rebaudiana bertonii*. *Food Science and Technology* 40(1):117-123. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.29718>.
- Cevallos-Casals, BA; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Stoichiometric and Kinetic Studies of Phenolic Antioxidants from Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweetpotato (en línea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3313-3319. DOI: <https://doi.org/10.1021/JF034109C>.
- Chevion, S; Moran, DS; Heled, Y; Shani, Y; Regev, G; Abbou, B; Berenshtein, E; Stadtman, ER; Epstein, Y. 2003. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise (en línea). . Disponible en <https://www.pnas.org>.
- Chimbetete, N; Verghese, M; Sunkara, R; Walker, LT. 2019. Phytochemical Content, Radical Scavenging Ability & Enzyme Inhibiting Activities of Selected Spices (Cinnamon, Cardamom and Cloves) (en línea). *Food and Nutrition Sciences* 10(03):266-275. DOI: <https://doi.org/10.4236/fns.2019.103020>.
- Corey, ME; Kerr, WL; Mulligan, JH; Lavelli, V. 2011. Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties (en línea). *LWT -*

Food Science and Technology 44(1):67-74. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.07.005>.

Cornell, JA. 2011. A Primer on Experiments with Mixtures. Nueva York, Wiley. 1-351 p.
DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470907443>.

Cortés-Rojas, DF; de Souza, CRF; Oliveira, WP. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(2):90-96. DOI:
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X).

Cui, Y; Gao, S; Zhang, R; Cheng, L; Yu, J. 2020. Study on the Moisture Absorption and Thermal Properties of Hygroscopic Exothermic Fibers and Related Interactions with Water Molecules (en línea). *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 98 12(1):98. DOI:
<https://doi.org/10.3390/POLYM12010098>.

Embuscado, ME. 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. *Journal of Functional Foods* 18:811-819. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>.

Enaru, B; Dreţcanu, G; Pop, TD; Stănilă, A; Diaconeasa, Z. 2021. Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants* 10(12). DOI:
<https://doi.org/10.3390/antiox10121967>.

Ertan, K; Türkyılmaz, M; Özkan, M. 2020. Color and stability of anthocyanins in strawberry nectars containing various co-pigment sources and sweeteners. *Food Chemistry* 310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125856>.

Espinoza, M; Gómez, E; Aguilar, J; Cabanillas, J; Santa, M; Rodríguez, I; Ríos, R; Zuta, I; Siche, R. 2015. Aprovechamiento de los residuos del membrillo (*Cydonia oblonga* L.) como fuente de compuestos bioactivos (en línea). *Agroindustrial science* 5:133-141. DOI: <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2015.02.05>.

Fallah, AA; Sarmast, E; Jafari, T. 2020. Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of oxidative stress and antioxidative capacity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Functional Foods* 68:103912. DOI:
<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103912>.

- FAO (Food and Agriculture Organization). 2013. Traditional High Andean Cuisine (en línea). 1 ed. Escudero, D (ed.). Santiago de Chile, FAO. 1-222 p. Consultado 11 abr. 2019. Disponible en <http://www.fao.org/3/i1466e/i1466e.pdf>.
- Farakte, RA; Yadav, G; Joshi, B; Patwadhan, AW; Singh, G. 2016. Role of Particle Size in Tea Infusion Process. *International Journal of Food Engineering* 12(1):1-16. DOI: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0213>.
- Farkas, J; Mohácsi-Farkas, C. 2011. History and future of food irradiation. *Trends in Food Science and Technology* 22(2-3):121-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.002>.
- Fibigr, J; Šatínský, D; Solich, P. 2017. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 143:204-213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.045>.
- Flores-Aguilar, E; Flores-Rivera, E del P. 2018. Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays* L.) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp) (en línea). *Información tecnológica* 29(2):175-184. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000200175>.
- Forman, HJ; Zhang, H. 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *s.l., Nature Research*, vol.20. p. 689-709 DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.
- Gálvez, L; Christopher, A; Sarkar, D; Shetty, K; Chirinos, R; Campos, D. 2017. Phenolic Composition and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Free and Bound Phenolic Fractions from a Peruvian Purple Corn (*Zea mays* L.) Accession. *Journal of Food Science* 82(12):2968-2976. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13973>.
- García, MA; Pinotti, A; Martino, MN; Zaritzky, NE. 2009. *Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings*. Nueva York, Springer New York. p. 169-209 DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_6.

- Giusti, MM; Wrolstad, RE. 2005. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. Nueva York, John Wiley and Sons Ltd., vols.2-2. p. 7-17 DOI: <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>.
- Grintzalis, K; Georgiou, CD; Schneider, YJ. 2015. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry* 480:28-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.AB.2015.03.024>.
- Guillén Sánchez, JS; Betim Cazarin, CB; Canesin, MR; Reyes, FR; Iglesias, AH; Cristianini, M. 2023. Extraction of bioactive compounds from Peruvian purple corn cob (*Zea Mays L.*) by dynamic high pressure (en línea). *Scientia Agropecuaria* 14(3):367-373. DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.032>.
- Gutiérrez, L; García, JR; Rincón, M de J; Ceballos, GM; Olivares, IM. 2015. Effect of a hypocaloric diet in the oxidative stress in obese subjects without prescription of exercise and antioxidants. *Medicina Clínica (English Edition)* 145(1):1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2015.12.043>.
- Hamauzu, Y; Yasui, H; Inno, T; Kume, C; Omanyuda, M. 2005. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits (en línea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4):928-934. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0494635>.
- Hellström, J; Mattila, P; Karjalainen, R. 2013. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis* 31(1):12-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.010>.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 2000. *Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración* (en línea). 2 ed. España, Editorial Acribia. 462 p. Consultado 24 ago. 2023. Disponible en https://www.editorialacribia.com/libro/microorganismos-de-los-alimentos-1-su-significado-y-metodos-de-enumeracion_54436/.
- INACAL (Instituto Nacional de Calidad). 2015. NTP 209.127:1976 (Revisada el 2015) - ESPECIAS Y CONDIMENTOS. Clavo de olor. Lima, INACAL. 7 p.

- _____. 2021. NTP 209.250:2021 - ESPECIAS, CONDIMENTOS Y HIERBAS AROMÁTICAS. Menta en bolsas filtrantes. Requisitos. Lima, INACAL. p. 9.
- Jayani, NIE; Hean, MR; Krisnayanthi, NLA; Islamie, R; Rani, KC; Parfati, N. 2022. Evaluation of stability and quality characteristics of moringa (*Moringa oleifera*) herbal tea during storage. *Food Research* 6(4):399-406. DOI: [https://doi.org/10.26656/FR.2017.6\(4\).568](https://doi.org/10.26656/FR.2017.6(4).568).
- Jha, DK; Dhekne, PP; Patwardhan, AW. 2020. Characterization and evaluation of tea bag papers (en línea). *Journal of Food Science and Technology* 57(8):3060-3070. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04339-z>.
- Jing, P; Giusti, MM. 2005. Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk (en línea). *Journal of agricultural and food chemistry* 53(22):8775-8781. DOI: <https://doi.org/10.1021/JF051247O>.
- Jing, P; Noriega, V; Schwartz, SJ; Giusti, MM. 2007. Effects of growing conditions on purple corncob (*Zea mays* L.) anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21):8625-8629. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf070755q>.
- Kamali, L; Ghandehari, A; Amini, M. 2020. Optimization of athletic pasta formulation by D-optimal mixture design (en línea). *Food Science & Nutrition* :1-9. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1764>.
- Kappele, WD. 1998. Using I-Optimal Designs for Narrower Confidence Limits (en línea). *In* IASI conference. México, AT&T. Disponible en www.research.att.com/~njas/gosset/.
- Katalinic, V; Milos, M; Kulisic, T; Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols (en línea). *Food Chemistry* 94(4):550-557. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>.
- Kennedy, ET; Ohls, J; Carlson, S; Fleming, K. 1995. The Healthy Eating Index: Design and Applications. *Journal of the American Dietetic Association* 95(10):1103-1108. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(95\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(95)00300-2).

- Khanal, RC; Howard, LR; Prior, RL. 2010. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International* 43(5):1464-1469. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.018>.
- Kim, HY; Lee, KY; Kim, M; Hong, M; Deepa, P; Kim, S. 2023. A Review of the Biological Properties of Purple Corn (*Zea mays* L.). *Scientia Pharmaceutica* 91(1):6. DOI: <https://doi.org/10.3390/scipharm91010006>.
- Kuntz, S; Kunz, C; Herrmann, J; Borsch, CH; Abel, G; Fröhling, B; Dietrich, H; Rudloff, S. 2014. Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: Results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOCyanins in Nutrition). *British Journal of Nutrition* 112(6):925-936. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114514001482>.
- Labuza, TP; Altunakar, B. 2020. Water Activity Prediction and Moisture Sorption Isotherms. In *Barbosa-Cánovas, G; Fontana, AJ; Schmidt, SJ; Labuza, TP (eds.)*. USA, John Wiley & Sons, Inc. p. 161-205 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch7>.
- Lakshan, SAT; Jayanath, NY; Abeysekera, WPKM; Abeysekera, WKSM. 2019. A commercial potential blue pea (*Clitoria ternatea* L.) flower extract incorporated beverage having functional properties. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2916914>.
- Lao, F; Giusti, M. 2016. Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation (en línea). *Food Analytical Methods* 9(5):1367-1380. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0318-0>.
- Lao, F; Giusti, MM. 2018. Extraction of purple corn (*Zea mays* L.) cob pigments and phenolic compounds using food-friendly solvents. *Journal of Cereal Science* 80:87-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.01.001>.
- Lao, F; Sigurdson, GT; Giusti, MM. 2017. Health Benefits of Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16(2):234-246. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12249>.

- Lemus-Mondaca, R; Ah-Hen, K; Vega-Gálvez, A; Honores, C; Moraga, NO. 2016. Stevia rebaudiana Leaves: Effect of Drying Process Temperature on Bioactive Components, Antioxidant Capacity and Natural Sweeteners. *Plant Foods for Human Nutrition* 71(1):49-56. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0524-3>.
- López-Alarcón, C; Ortíz, R; Benavides, J; Mura, E; Lissi, E. 2011. Use of the ORAC-pyrogallol red/ORAC-fluorescein ratio to assess the quality of antioxidants in Chilean wines. *Journal of the Chilean Chemical Society* 56(3):764-767. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072011000300009>.
- Lv, J; Huang, H; Yu, L; Whent, M; Niu, Y; Shi, H; Wang, TTY; Luthria, D; Charles, D; Yu, LL. 2012. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. *Food Chemistry* 132(3):1442-1450. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.135>.
- Magalhães, LM; Santos, F; Segundo, MA; Reis, S; Lima, JLFC. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* 83(2):441-447. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>.
- Martínez Cruz, M. 2015. Revisión bibliográfica Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. Una revisión (en línea). *Cultivos Tropicales* 36:5-15. Consultado 24 feb. 2019. Disponible en <https://ediciones.inca.edu.cu>.
- Mesquita, CS; Oliveira, R; Bento, F; Geraldo, D; Rodrigues, J V.; Marcos, JC. 2014. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry* 458:69-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>.
- Miao, Z; Grift, TE; Hansen, AC; Ting, KC. 2011. Energy requirement for comminution of biomass in relation to particle physical properties. *Industrial Crops and Products* 33(2):504-513. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.016>.
- MIDAGRI (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego). 2023. Sección de análisis del valor bruto de la producción agropecuaria y sección de estadísticas de agroexportación (en línea, sitio web). Consultado 24 ago. 2023. Disponible en https://siea.midagri.gob.pe/portal/siea_bi/index.html.

- MINAN (Ministerio del Ambiente). 2018. Línea de Base de da diversidad genética del maíz peruano con fines de bioseguridad (en línea). Perú, MINAN, vol.1. 146 p. Disponible en <https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2019/01/Linea-de-base-maíz-LowRes.pdf>.
- Mogra, R; Dashora, V. 2009. Exploring the use of Stevia rebaudiana as a sweetener in comparison with other sweeteners. *Journal of Human Ecology* 25(2):117-120. DOI: <https://doi.org/10.1080/09709274.2009.11906143>.
- Mohammadalinejhad, S; Almonaitytė, A; Jensen, IJ; Kurek, M; Lerfall, J. 2023. Alginate microbeads incorporated with anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) using electrostatic extrusion: Microencapsulation optimization, characterization, and stability studies. *International Journal of Biological Macromolecules* 246:125684. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.125684>.
- Moldovan, B; Hosu, A; David, L; Cimpoi, C. 2016. Total phenolics, total anthocyanins, antioxidant and pro-oxidant activity of some red fruits teas (en línea). *Acta Chimica Slovenica* 63(2):213-219. DOI: <https://doi.org/10.17344/acsi.2015.1421>.
- Nolazco, D; Araujo, M. 2015. Obtención de un filtrante de maiz morado (*Zea mays* L.), evaluación de pérdida de color y degradación de antocianinas en el almacenaje. *Anales Científicos* 76(2):350-359. DOI: <https://doi.org/10.21704/ac.v76i2.801>.
- Norte, AI; Ortiz, R. 2011. Calidad de la dieta española según el índice de alimentación saludable. *Nutricion Hospitalaria* 26(2):330-336. DOI: <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.2.4630>.
- Nurdjannah, N; Bermawie, N. 2012. Cloves. Indonesia, Elsevier Inc., vol.1. p. 197-215 DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857095671.197>.
- Ocieczek, A; Pukszta, T; Żyłka, K; Kirieieva, N. 2023. The influence of storage conditions on the stability of selected health-promoting properties of tea. *LWT* :115029. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115029>.
- Olszowy-Tomczyk, M. 2021. How to express the antioxidant properties of substances properly? *Chemical Papers* 75(12):6157-6167. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01799-1>.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2023. World Health Statistics 2023: Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals (en línea). Geneva, World Health Organization. 119 p. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240074323>.
- de Pascual-Teresa, S; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, JC. 2002. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(9):1003-1006. DOI: <https://doi.org/10.1002/JSFA.1143>.
- Pedreschi, R; Cisneros-Zevallos, L. 2007. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.) (en línea). *Food Chemistry* 100(3):956-963. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.11.004>.
- Piña, PC. 2018. Comparativo de rendimiento y contenido de antocianinas en 6 variedades de maíz morado (*Zea mays* L.) en el distrito de Ichocán, provincia de San Marcos, Región Cajamarca (en línea). Tesis Ing. Cajamarca, UNC. 68 p. Disponible en <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/2874>.
- Pisoschi, AM; Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review (en línea). *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2015.04.040>.
- Pisoschi, AM; Pop, A; Iordache, F; Stanca, L; Predoi, G; Serban, AI. 2021. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry* 209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>.
- Quintana-Villamandos, B; González, MC; Delgado-Martos, MJ; Condezo-Hoyos, L; Böger, RH; Lüneburg, N; Pazó-Sayós, L; Gutiérrez-Arzapalo, PY; Delgado-Baeza, E. 2016. Short-term esmolol attenuates remodeling of the thoracic aorta in hypertensive rats by decreasing concentrations of ADMA down-regulated by oxidative stress. *European Journal of Pharmacology* 791:502-509. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.020>.
- Quispe-Jacobo, F; Arroyo-Condorena, K; Gorriti-Gutiérrez, A. 2011. Características morfológicas y químicas de 3 cultivares de maíz morado (*Zea mays* L.) en Arequipa - Perú (en línea). *Revista de la Sociedad Química del Perú* 77(3):205-217. Disponible en

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edssci&AN=edssci.S1810.634X2011000300006&lang=es&site=eds-live&scope=site&custid=s4608367>.

Rabanal-Atalaya, M; Medina-Hoyos, A. 2021. Analysis of anthocyanins in the purple corn (*Zea mays* L.) from Peru and its antioxidant properties. *Terra Latinoamericana* 39. DOI: <https://doi.org/10.28940/TERRA.V39I0.808>.

Ramos-Escudero, F; Muñoz, AM; Alvarado-Ortíz, C; Alvarado, Á; Yáñez, JA. 2012. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs (en línea). *Journal of Medicinal Food* 15(2):206-215. DOI: <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0342>.

Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay (en línea). *Free radical biology & medicine* 26(9-10):1231-1237. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

Reyes, MM; Gómez-Sánchez Prieto, I; Espinoza, C. 2017. Tablas peruanas de composición de alimentos (en línea). 10 ed. Lima, Instituto Nacional de Salud. 141 p. Consultado 24 ago. 2023. Disponible en <https://repositorio.ins.gob.pe///handle/20.500.14196/1034>.

RM N° 591-2008-MINSA. 2008. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01) (en línea). *Diario Oficial El Peruano*. Perú, 27 ago. Consultado 24 ago. 2023. Disponible en <http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM591MINSANORMA.pdf>.

Rocha-Parra, DF; Lanari, MC; Zamora, MC; Chirife, J. 2016. «Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine». *LWT* 70:162-170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.038>.

Sadilova, E; Stintzing, FC; Carle, R. 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science* 71(8). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00148.x>.

- Sahraee, S; Ghanbarzadeh, B; Falcone, PM. 2022. Application of mixture design methodology for development of high antioxidant fruity functional beverage. *Food Science and Nutrition* 10(7):2245-2254. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2834>.
- Saikaew, K; Lertrat, K; Ketthaisong, D; Meenune, M; Tangwongchai, R. 2018. Influence of variety and maturity on bioactive compounds and antioxidant activity of purple waxy corn (*Zea mays* L. var. *ceratina*). *International Food Research Journal* 25(5):1985-1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14980>.
- Salaha, MI; Kallithraka, S; Marmaras, I; Koussissi, E; Tzourou, I. 2008. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content (en línea). *Journal of Food Composition and Analysis* 21(8):660-666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.010>.
- Savita, SM; Sheela, K; Sunanda, S; Shankar, AG; Ramakrishna, P; Sakey, S. 2004. Health Implications of *Stevia rebaudiana* (en línea). *Journal of Human Ecology* 15(3):191-194. DOI: <https://doi.org/10.1080/09709274.2004.11905691>.
- Schwartz, SJ; Cooperstone, JL; Cichon, MJ; Elbe, JH Von; Giusti, MM. 2017. *Colorants*. Boca Ratón, CC Press. p. 682-752.
- Segura Munguía, S; Torres Ripa, J. 2009. *Historia de las plantas en el mundo antiguo* (en línea). Bilbao, Universidad de Deusto; Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 480 p. Consultado 24 feb. 2019. Disponible en <https://editorial.csic.es/publicaciones/libros/11733/978-84-00-08860-6/historia-de-las-plantas-en-el-mundo-antiguo.html>.
- Shopova, E; Ivanov, S; Brankova, L; Moyankova, D; Georgieva, D; Polizoev, D; Djilianov, D. 2023. Antioxidant capacity of herbal teas from Bulgarian market. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 29(6):1159-1164.
- Shukla, S; Mehta, A; Mehta, P; Bajpai, VK. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64(7-8):807-811. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.02.002>.

- Sies, H; Berndt, C; Jones, DP. 2017. Oxidative Stress (en línea). Annual review of biochemistry 86:715-748. DOI: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-045037>.
- Silva, BM; Andrade, PB; Ferreres, F; Domingues, AL; Seabra, RM; Ferreira, MA. 2002. Phenolic of quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) pulp and peel. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:4615-4618. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0203139>.
- Silva, BM; Andrade, PB; Valentão, P; Ferreres, F; Seabra, RM; Ferreira, MA. 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity (en línea). Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(15):4705-4712. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf040057v>.
- Singh, DP; Kumari, M; Prakash, HG; Rao, GP; Solomon, S. 2019. Phytochemical and Pharmacological Importance of Stevia: A Calorie-Free Natural Sweetener (en línea). Sugar Tech 21:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00704-1>.
- Sinija, VR; Mishra, HN. 2008. Moisture sorption isotherms and heat of sorption of instant (soluble) green tea powder and green tea granules. Journal of Food Engineering 86(4):494-500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.026>.
- Song, H geon; Choi, I; Lee, JS; Chang, Y; Yoon, CS; Han, J. 2022. Whey protein isolate coating material for high oxygen barrier properties: A scale-up study from laboratory to industrial scale and its application to food packaging. Food Packaging and Shelf Life 31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100765>.
- Su, L; Yin, JJ; Charles, D; Zhou, K; Moore, J; Yu, L (Lucy). 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. Food Chemistry 100(3):990-997. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.058>.
- Sui, X; Dong, X; Zhou, W. 2014. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. Food Chemistry 163:163-170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.075>.

- Sun, Y; Yang, C; Tsao, R. 2018. Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays. *In Apak, R; Capanoglu, E; Shahidi, F (eds.)*. Reino Unido, John Wiley & Sons Ltd. p. 1-19.
- Tadhani, MB; Patel, VH; Subhash, R. 2007. In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3-4):323-329. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.004>.
- Tahirović, I; Kožljak, M; Toromanović, J; Čopra-Janićijević, A; Klepo, L; Topčagić, A; Demirović, H. 2014. Total phenolic content and antioxidant capacity in infusions of various herbal teas. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 42(1):51-55.
- Thennakoon, TMES; Abeysinghe, PD; Ranasinghe, P; Pathirana, RN; White, A; Fernando, WGD; Abeysinghe, S; Premakumara, S. 2022. Total phenolic content, total flavonoid content and in vitro antioxidant activities measured by the FRAP, ABTS, DPPH and ORAC assays of Sri Lankan black and green tea (*Camellia sinensis*) infusions. *Food Biology* :1-10. DOI: <https://doi.org/10.25081/fb.2022.v11.7800>.
- Thiagarajah, K; Ong, MK; Teh, LK; Lye, HS. 2019. Plants Infused Water as Preferred Healthy Drinks. Malaysia, Elsevier. p. 367-402 DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815272-0.00013-1>.
- Thomas, J; Kuruvilla, KM. 2012. Cinnamon. India, Elsevier Inc., vol.1. p. 182-196 DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857095671.182>.
- Torres, C; Romero, L; Diaz, R. 2015. Quality and sensory attributes of apple and quince leathers made without preservatives and with enhanced antioxidant activity (en línea). *LWT - Food Science and Technology* 62(2):996-1003. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.01.056>.
- Torres, P; Galleguillos, P; Lissi, E; López-Alarcón, C. 2008. Antioxidant capacity of human blood plasma and human urine: Simultaneous evaluation of the ORAC index and ascorbic acid concentration employing pyrogallol red as probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(20):9171-9175. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.09.024>.

- Veglia, F; Cavalca, V; Tremoli, E. 2010. OXY-SCORE: A global index to improve evaluation of oxidative stress by combining pro-and antioxidant markers (en línea). USA, Humana Press Inc., vol.594. p. 197-213 DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_14/COVER.
- Veglia, F; Cighetti, G; De Franceschi, M; Zingaro, L; Boccotti, L; Tremoli, E; Cavalca, V. 2006. Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index (en línea). <http://dx.doi.org/10.1080/13547500600898623> 11(6):562-573. DOI: <https://doi.org/10.1080/13547500600898623>.
- Vidović, S; Cvetkovic, D; Ramić, M; Dunjić, M; Malbaša, R; Tepić, A; Šumić, Z; Velićanski, A; Jokić, S. 2013. Screening of changes in content of health benefit compounds, antioxidant activity and microbiological status of medicinal plants during the production of herbal filter tea. *Industrial Crops and Products* 50:338-345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.005>.
- Vining, GG; Cornell, JA; Myers, RH. 1993. A Graphical Approach for Evaluating Mixture Designs. *Applied Statistics* 42(1):127. DOI: <https://doi.org/10.2307/2347415>.
- Walch, SG; Tinzoh, LN; Zimmermann, BF; Stühlinger, W; Lachenmeier, DW. 2011. Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality indicators for aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Frontiers in Pharmacology* 2:1-6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00079>.
- Wattanathorn, J; Kirisattayakul, W; Suriharn, B; Lertrat, K. 2018. Functional drink containing the extracts of purple corn cob and pandan leaves, the novel cognitive enhancer, increases spatial memory and hippocampal neuron density through the improvement of extracellular signal regulated protein kinase expression, choli (en línea). *Rejuvenation Research* 21(5):431-441. DOI: <https://doi.org/10.1089/rej.2017.2009>.
- Wojdyło, A; Oszmiański, J; Bielicki, P. 2013. Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties (en línea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(11):2762-2772. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf304969b>.

- Wu, X; Beecher, GR; Holden, JM; Haytowitz, DB; Gebhardt, SE; Prior, RL. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11):4069-4075. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf060300l>.
- Yang, Z; Zhai, W. 2010. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.) (en línea). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(1):169-176. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2009.08.012>.
- Yokohira, M; Yamakawa, K; Saoo, K; Matsuda, Y; Hosokawa, K; Hashimoto, N; Kuno, T; Imaida, K. 2008. Antioxidant Effects of Flavonoids Used as Food Additives (Purple Corn Color, Enzymatically Modified Isoquercitrin, and Isoquercitrin) on Liver Carcinogenesis in a Rat Medium-Term Bioassay (en línea). *Journal of Food Science* 73(7):561-568. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00862.x>.
- Zhang, Z; Zhou, B; Wang, H; Wang, F; Song, Y; Liu, S; Xi, S. 2014. Maize purple plant pigment protects against fluoride-induced oxidative damage of liver and kidney in rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11(1):1020-1033. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph110101020>.
- Zurita-Cruz, JN; Márquez-González, H; Miranda-Novales, G; Villasís-Keever, MÁ. 2018. Experimental studies: Research designs for the evaluation of interventions in clinical settings. *Revista Alergia Mexico* 65(2):178-186. DOI: <https://doi.org/10.29262/ram.v65i2.376>.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de calidad de la coronta de maíz morado variedad INIA-601

**AGRÍCOLA
PRO CAMPO S.R.L**
De: Lizbeth Y. Tello Seminario,
RUC: 20600589076

CERTIFICADO

Calidad de Coronta:

La coronta de Maíz Morado comercializada a la persona de ANGELA CINDY DIAZ GARCIA, procede del campo semillero de la variedad INIA-601 conducido por la Empresa Agrícola Pro Campo S.R.L. en la localidad de Laguna Santa Úrsula del distrito de Namora a una altitud de 3140 m.s.n.m.

El cultivo se fertilizo con guano de Isla, fosfato di amónico y urea al deshierbo, el control del gusano mazorquero se realizó con la aplicación de aceite de comer.

El periodo vegetativo a este nivel del mar se prolonga en 30 días aproximadamente, pero la concentración de antocianina se incrementa, los reportes de los análisis de la campaña 2019-2020 nos indican que dicha variedad alcanza 4.5 % de antocianina en la coronta.

Cajamarca, 26 de julio del 2021.

Jr. Tupac Amaru N° 359 Barrio Miraflores – Cajamarca Cel 981644654 – CEL. 976673731
E – mail: alipiobriones@yahooo.es

ANEXO 2: Informe de ensayo de la determinación de micotoxinas en la coronta de maíz morado



SENASA
PERU

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA

Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos



AT-1824

Av. La Molina Nº 1915, Lima 12 - La Molina, Perú Teléfono (0511)-313- 3300 Anexo 6060 - 6065

Pag 1 de 2

INFORME DE ENSAYO Nº 03637.001.2021-AG-SENASA-OCDP-UCCIRT

1 - Datos del Solicitante		Nº Solicitud : 03637.2021	
Nombre o Razon Social : DÍAZ GARCÍA ANGELA CINDY		Motivo Análisis : Servicios Terceros	
Dirección : CALLE CIRO ALEGRÍA 156, SANTA PATRICIA 3ERA ETAPA		Doc. Identificación : DNI: 46885106	
Lugar de Registro : SENASA - NIVEL CENTRAL		Doc. Referencia :	
Componente : NO APLICA			
Producto : NO APLICA			
Meta : NO APLICA			

2 - Datos de la Muestra:		Código de Muestra : 03637.001.2021	
Identificación Muestra : CORONTA DE MAIZ MORADO VARIEDAD INIA 601		Fecha de Muestreo : 03/09/2021	
Variedad :		Responsable Muestreo : USUARIO - NO CONSIGNA	
Cantidad recibida : 1 BOLSAS 1 Kg		Lugar Muestreo : NO CONSIGNA	
Fabricante o Productor : AGRICOLA PRO CAMPO SRL		Procedencia : CAJAMARCA / CAJAMARCA / NAMORA	
Código Lugar de Producción :		Fundo o Predio : NO CONSIGNA	
Fecha Fabricación : NO CONSIGNA		Fecha Recepción : 03/09/2021	
Fecha Vencimiento : NO CONSIGNA		Fecha Inicio Análisis : 13/09/2021	
Nº Lote : RAFA-CAMPO		Fecha Conclusión Análisis : 14/09/2021	
Nº Registro SENASA : NO APLICA			
Titular Registro : NO APLICA			
Obs. en Recep. Muestra : VARIEDAD INIA -601			

3. Ensayo(s) Solicitados(s)			
Cod. Metodo	Ensayo(s)	Referencia Método	Análisis
MET-UCCIRT/RES-78 (*)	DETERMINACION SIMULTANEA DE VARIAS MICOTOXINAS EN ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASA EN TANDEM (UPLC-MS/MS)	MET-UCCIRT-RES-78	Micotoxinas
			Contenido Declarado
			NO APLICA

(*) Los métodos indicados no han sido acreditados por ANAB

4. Resultados							
Descripción Analito	Método/Técnica	Resultados	LoD	LoQ	Incertidumbre	Unidad	
MICOTOXINAS							
1	Aflatoxina B1	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	0.3	1.0	N/A	µg/kg



Nombre y Firma del Director (Sello Oficial)

La Molina, 16 de Septiembre del 2021

Los resultados mencionados en este informe de ensayo solo corresponden a la muestra entregada por el cliente.

- Los datos del solicitante y de la muestra consignados en este informe de ensayo constituyen una declaración y son de responsabilidad unicamente del cliente.
- Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

- Este informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente sin la aprobación escrita del SENASA.
- El diseño del informe de ensayo puede variar sin alterar los resultados (PRO-UCCIRT-Lab-09).

OLUCAS - 18/09/2021 14:19
REG-UCCIRT/Lab-14

LoQ: Limite de Cuantificación; LoD: Limite de Detección.

N.D.: NO DETECTABLE; N/A: NO APLICA

!03637.001.2021!

«continuación»



SENASA
PERU

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA

Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos



AT-1824

Av. La Molina N° 1915, Lima 12 - La Molina, Perú Teléfono (0511)-313- 3300 Anexo 6060 - 6065

Pag 2 de 2

INFORME DE ENSAYO N° 03637.001.2021-AG-SENASA-OCDP-UCCIRT

4. Resultados							
Descripción Analito	Método/Técnica	Resultados	LoD	LoQ	Incertidumbre	Unidad	
MICOTOXINAS							
2	Aflatoxina B2	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	0.3	1.0	N/A	µg/kg
3	Aflatoxina G1	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	0.3	1.0	N/A	µg/kg
4	Aflatoxina G2	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	0.3	1.0	N/A	µg/kg
5	Aflatoxinas totales (B1+B2+G1+G2)	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	0.3	1.0	N/A	µg/kg
6	Deoxynivalenol	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	6.0	20.0	N/A	µg/kg
7	Fumonisin B1	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	6.0	20.0	N/A	µg/kg
8	Fumonisin B2	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	6.0	20.0	N/A	µg/kg
9	Ocratoxina A	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	0.3	1.0	N/A	µg/kg
10	Zearalenona	MET-UCCIRT-RES-78	N.D.	1.0	4.0	N/A	µg/kg
Información Adicional					Especialista Responsable		
Incertidumbre de la medición: Factor de cobertura k=2 N.D. : No Detectable N/A : No Aplica					TORO VILCHEZ CRISTINA ELIZABETH		



Nombre y Firma del Director (Sello Oficial)

La Molina, 16 de Septiembre del 2021

Los resultados mencionados en este informe de ensayo solo corresponden a la muestra entregada por el cliente.

- Los datos del solicitante y de la muestra consignados en este informe de ensayo constituyen una declaración y son de responsabilidad unicamente del cliente.
- Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

- Este informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente sin la aprobación escrita del SENASA.
- El diseño del informe de ensayo puede variar sin alterar los resultados (PRO-UCCIRT-Lab-09).

OLUCAS - 16/09/2021 14:19
REG-UCCIRT/Lab-14

LoQ: Limite de Cuantificación; LoD: Limite de Detección.
N.D.: NO DETECTABLE; N/A: NO APLICA

!03637.001.2021!

ANEXO 3: Fotos de algunos materiales y equipos empleados en la tesis

		
<p>Lector de microplacas</p>	<p>Medidor de actividad de agua</p>	<p>Celdas en el desecador, usado para análisis de permeabilidad al vapor del agua del sobre bilaminado</p>
		
<p>Filtrantes en un desecador para el estudio de estabilidad</p>	<p>Celda y espectrofotómetro, usados en la medición de color de infusiones</p>	
		
<p>Centrífuga refrigerada</p>	<p>Sistema UHPLC para análisis de la infusión</p>	

ANEXO 4: Fotos del filtrante e infusión óptima



Bolsita filtrante en sobre bilaminado



Filtrante a base de coronta de maíz morado en bolsita

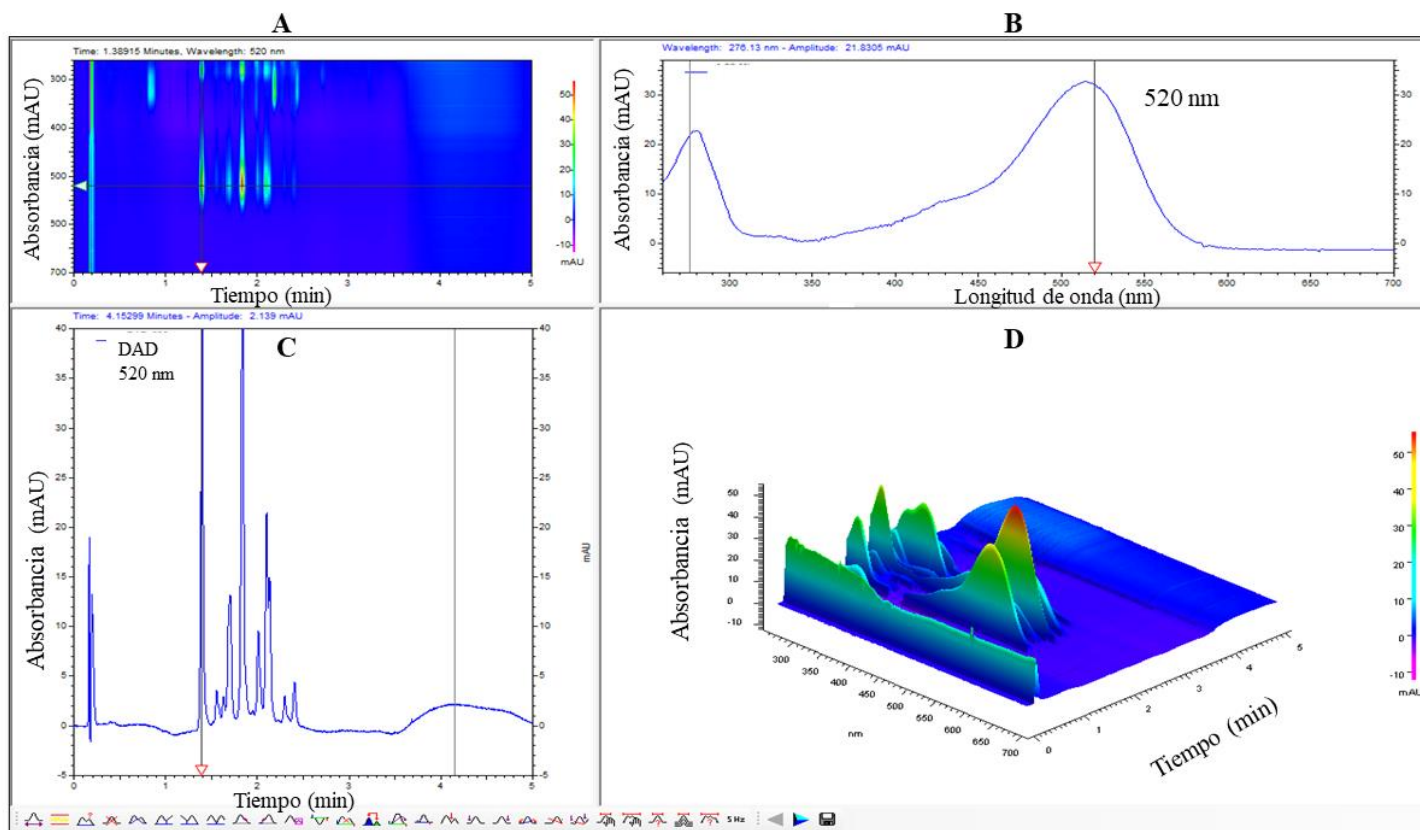


Contenido del filtrante



Infusión

ANEXO 5: Vistas generadas por el UHPLC en la tesis para análisis de los cromatogramas de las antocianinas de la infusión del filtrante óptimo

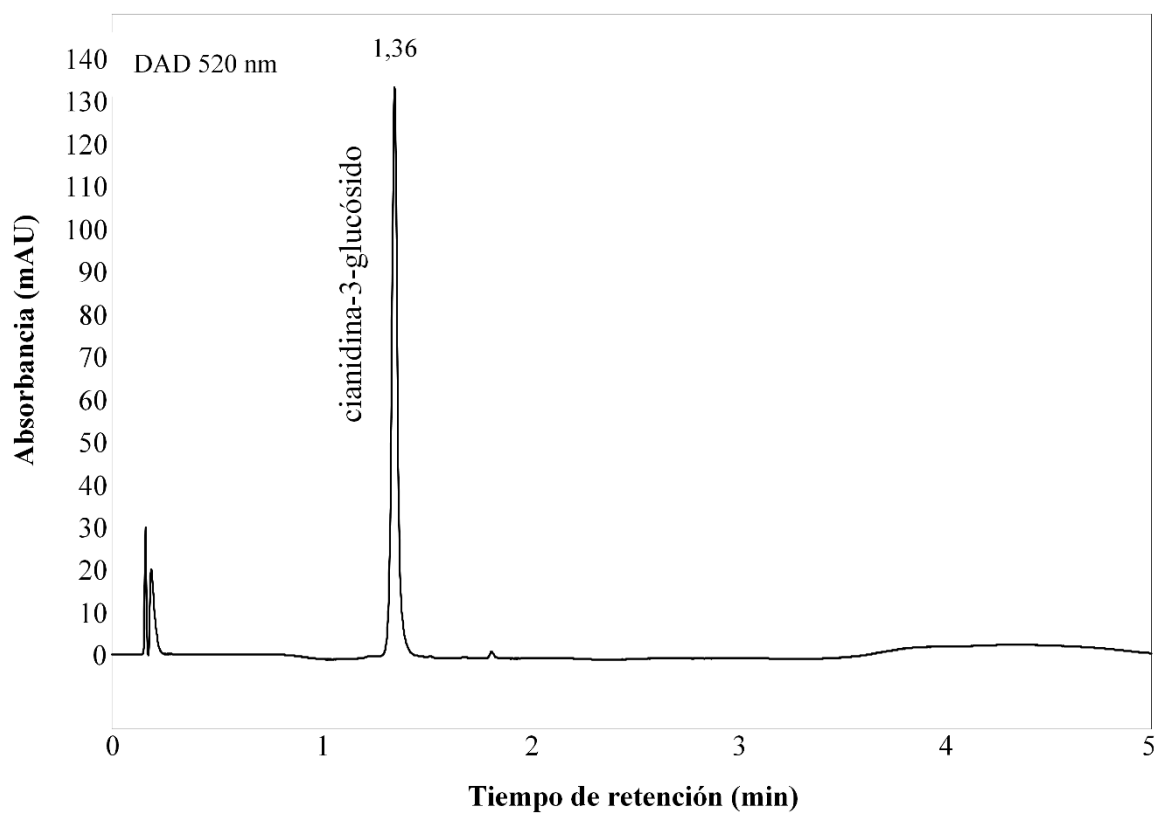


A: Vista de intensidad de absorbancia a diferentes longitudes de onda y tiempo

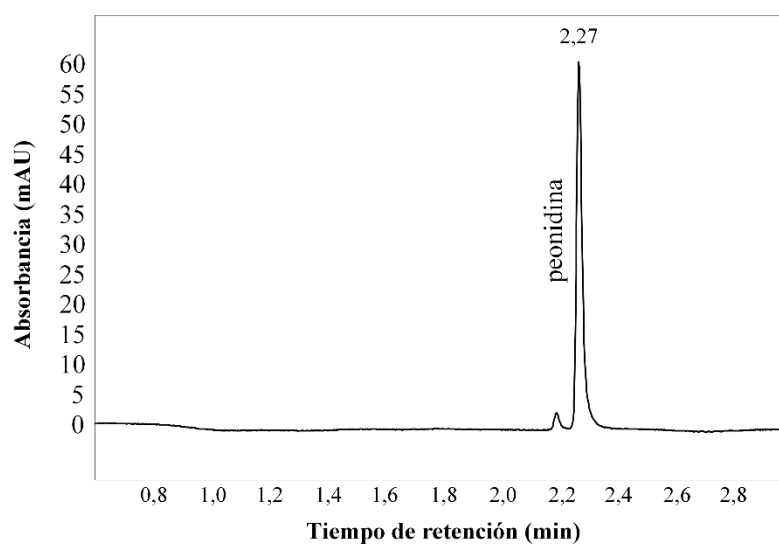
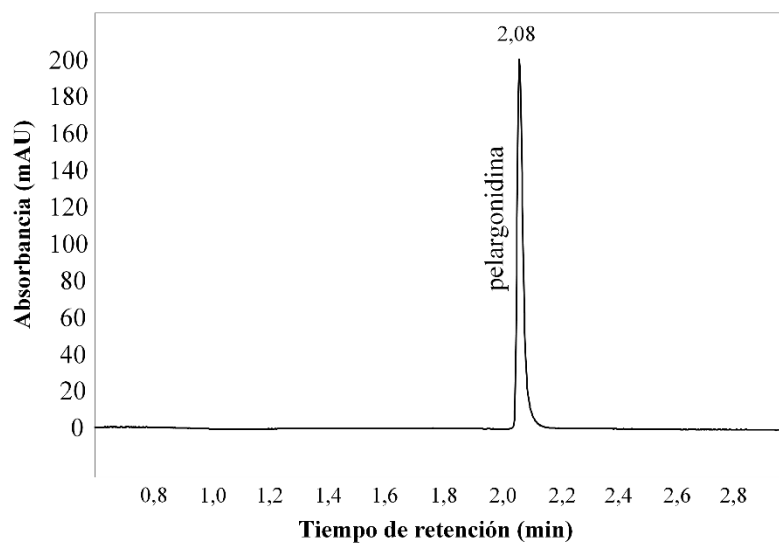
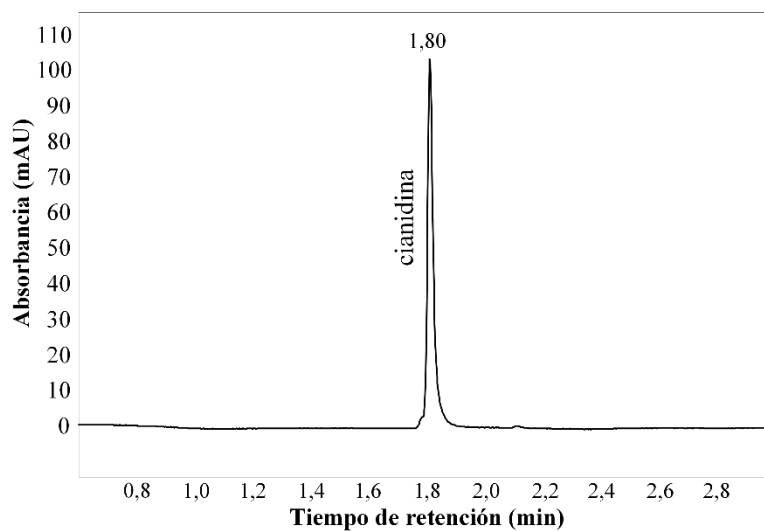
B: Espectro de absorbancia de una antocianina típica
C: Cromatograma representativo de la infusión a 520 nm

D: Vista tridimensional de intensidad de absorbancia a diferentes longitudes de onda y tiempo

ANEXO 6: Cromatograma del estándar cianidina-3-glucósido



ANEXO 7: Cromatogramas de antocianidinas



ANEXO 8: Ejemplo de registro diario de alimentos en Excel

REGISTRO DIARIO DE ALIMENTOS							
	Nombre						
	Peso	Talla			Fecha		
		Foto de la comida	Descripcion de alimentos o ingredientes	Medida casera	¿Hubo sobra de la comida?	Foto de la sobra de comida	
Desayuno	Lugar: Casa	FOTO			SI	NO	
					SI	NO	
						SI	NO
	Hora: 9:30 am						
						No sobró	
Almuerzo	Lugar:						
	Hora:						
Cena	Lugar:						
	Hora:						
Merienda 1 (Media mañana)	Lugar:						
	Hora:						
Merienda 2 (Media tarde)	Lugar:						
	Hora:						

ANEXO 9: Artículos científicos generados en la tesis

Artículo (publicado)

Título: Optimization of a natural low-calorie antioxidant tea prepared from purple corn (*Zea mays* L.) cobs and stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Revista científica: LWT

Volumen: 150

Año: 2021

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111952>

Artículos (en proceso de publicación)

Título: Stability of an antioxidant tea prepared from purple corn (*Zea mays* L.) cob and stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) under accelerated storage conditions

Título: Study of antioxidant effect of a tea prepared from purple corn (*Zea mays* L.) cobs and stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in healthy volunteers