



“Secretaría de Educación Pública”



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE
LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN
EXTRACTOS SECOS DE *Moringa oleífera*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.Q. Beatriz Juliana Yerena Prieto

Asesores:

Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes

Dr. Miguel Ángel García Alvarado

Dr. Víctor José Robles Olvera

H. VERACRUZ, VER.

OCTUBRE 2018

H. Veracruz, ver, a 19 de octubre del 2018
OFICIO 545/2018

C. BEATRIZ JULIANA YERENA PRIETO
PRESENTE

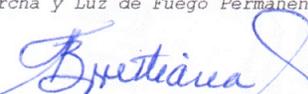
Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica Titulada:

“Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos en extractos secos de *Moringa oleifera*”

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®


DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ
JEFA DE LA UNIDA



EL H. JURADO


DRA. GUADALUPE DEL CARMEN RODRIGUEZ JIMENES
PRESIDENTE

SRIA. DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE VERACRUZ


DR. MIGUEL ANGEL GARCÍA ALVARADO
SECRETARIO
Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos


DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ
VOCAL 1


DR. VICTOR JOSÉ ROBLES OLVERA
VOCAL 2

DR. OSCAR GONZÁLEZ RÍOS
SUPLENTE

BTS/maribel®



El presente trabajo de tesis titulado "Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos en extractos secos de *Moringa oleifera*" presentado por la C. BEATRIZ JULIANA YERENA PRIETO, ha sido aprobado por su comité

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

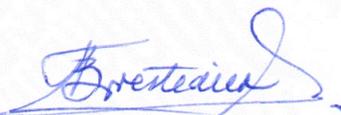
Asesor


Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes

Asesor


Dr. Miguel Ángel García Alvarado

Revisor


Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Revisor


Dr. Victor José Robles Olvera

Revisor

Dr. Oscar González Ríos

BTS/maribel



DEDICATORIA

A Dios

Por darme la fortaleza para realizar cualquier proyecto y por ser mi guía.

A mamá

Por todo lo que ha hecho por mí, por todas sus enseñanzas y ser una guerrera siempre, por mostrarme la vida a través del trabajo, la humildad y el coraje. Gracias por tantas cosas que no podré pagarle. Te amo

A papá

Por todo tu apoyo, por ser el mejor durante el tiempo que estuviste conmigo, porque cada título, cada logro es por ti y para ti. Te amo

A mi hermana

Por apoyarme en todo momento de forma incondicional, creyendo siempre en mí y apoyando mis decisiones, eres y serás siempre mi mayor ejemplo e inspiración para conseguir lo que deseamos a través del esfuerzo dedicación y trabajo.

A mis amigos

Especialmente a todos los miembros de los laboratorios de Ingeniería de Alimentos, Bioestadística y Enzimología por su apoyo, por compartir sus conocimientos.

A mis roomies

Por el gran equipo que hicimos.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por el apoyo financiero que hizo posible este y muchos otros proyectos de investigación.

Al Tecnológico Nacional de México

Por los proyectos aprobados a la Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jiménez que permitieron la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis

A la Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jiménez , el Dr. Miguel Ángel García y el Doctor Víctor José Robles Olvera por darme la oportunidad de participar en esta investigación como miembro de su equipo de trabajo, por su gran trabajo de asesoría y revisión, por su paciencia y tolerancia, pero sobre todo por la gran calidad humana que cada uno posee.

A mis revisores

Por su cooperación entusiasta y sus valiosos consejos.

Yerena Prieto Beatriz Juliana. M. C. en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Octubre 2018. **EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE EXTRACTOS SECOS DE *Moringa oleifera*.** Asesores: Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, Dr. Miguel Ángel García Alvarado, Dr. Víctor J. Robles Olvera.

RESUMEN

Las hojas del árbol de *Moringa oleifera* (Moringa) contienen compuestos bioactivos (CB) como fenoles, carotenoides y ácido ascórbico, los cuales son de interés para la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades antioxidantes. Los CB se recuperan de la matriz vegetal mediante extracción sólido-líquido, seguida de un proceso de secado por aspersión. Con el fin de conservar la integridad de los CB deshidratados, es necesario almacenarlos en condiciones adecuadas. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la cinética de degradación de CB de extractos secos de *Moringa oleifera*. El extracto etanólico de hojas deshidratadas de moringa fue obtenido por etapas múltiples a contracorriente y deshidratado en un secador por aspersión en ciclo cerrado con nitrógeno y posteriormente empacado en diferentes condiciones de temperatura, humedad relativa (HR), material de empaque e iluminación. Extractos secos con a_w de 0.35 y 0.39 se empacaron en bolsas metalizadas (PM) y se almacenaron a 5 °C, 22 °C y 40 °C. Otra parte se empacó en polietileno de baja densidad (LDPE) y se almacenó a 5°, 22 °C y 40 °C y a 40 % y 80 % de HR. Adicionalmente se estudió el efecto de la exposición a la luz en muestras empacadas en LDPE a 22 °C. Cada 15 días durante 6 meses, se determinó el contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu), carotenoides (espectrofotometría), actividad anti-radical (ensayos DPPH y ABTS), a_w (Higrómetro Aqualab Decagon Devices), humedad (AOAC 32.1.03), color (colorímetro Hunter Lab) y clorofila a (espectrofotometría). Con los datos obtenidos y ecuaciones de primer orden se determinó la constante de velocidad de degradación. La temperatura, la humedad relativa y la luz tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$), afectando negativamente al contenido de compuestos bioactivos, la actividad antiradical y el color. La a_w en los niveles evaluados no ejerció efecto significativo sobre la degradación de los compuestos analizados. Como se esperaba, la constante de velocidad de degradación de los compuestos analizados fue menor a bajas temperaturas y en empaque laminado. Después de 150 días de almacenamiento los porcentajes de degradación fueron: para fenoles, 20 %, carotenoides 17%, clorofila 24 % y AAR 27 %. Se determinaron los parámetros cinéticos del modelo que describen la degradación de carotenoides, fenoles totales, actividad antioxidante, y clorofila a partir de los cuales se puede predecir la vida de anaquel de los extractos deshidratados.

Contenido

Contenido	iv
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Moringa oleífera	3
2.1.1 Descripción botánica del árbol	3
2.1.2 Distribución potencial en México.....	5
2.1.3 Composición química de las hojas de Moringa oleífera	6
2.2 Variables de calidad en las hojas de Moringa	6
2.2.1 Carotenoides.....	7
2.2.2 Compuestos fenólicos.....	8
2.2.3 Clorofila.....	8
2.2.4 Color (L, a y b)	9
2.3 Extracción sólido-líquido o Lixiviación	10
2.3.1 Parámetros importantes en la lixiviación (extracción sólido-líquido)	11
2.3.2 Extracción en etapas múltiples	12
2.4 Extractos de hojas de moringa	13
2.5 Secado por aspersion	14
2.6 Almacenamiento y vida útil.....	15
2.6.1 Humedad relativa	16
2.6.2 Temperatura	17
2.6.3 Luminosidad.....	18

2.6.4	Material de empaque	19
2.6.5	Actividad de agua	21
2.7	Modelo para la cinética de degradación de alimentos.....	23
2.8	Síntesis de antecedentes	25
3.	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo general	26
3.2	Objetivos específicos	26
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1	Materia prima	27
4.2	Reactivos y solventes.....	27
4.3	Secado de hojas de moringa.....	27
4.4	Obtención del extracto	28
4.5	Secado por aspersion	29
4.6	Acondicionamiento de la muestra y almacenamiento	29
4.6.1	Modificación de la Humedad relativa	29
4.6.2	Modificación de la a_w de la muestra	29
4.6.3	Almacenamiento	30
4.7	Análisis físicos y químicos.....	31
4.7.1	Determinación del contenido de sólidos.....	31
4.7.2	Determinación del contenido de fenoles totales.....	32
4.7.3	Cuantificación de compuestos fenólicos por UHPLC	32
4.7.4	Evaluación de la actividad antirradical por ABTS.....	33
4.7.5	Evaluación de la actividad antirradical por DPPH	34
4.7.6	Determinación del contenido de carotenoides totales.....	34

4.7.7	Determinación del contenido de clorofila	35
4.7.8	Determinación del contenido de humedad	36
4.7.9	Determinación de la actividad de agua	36
4.7.10	Determinación de color	36
4.8	Cinéticas de degradación.....	37
4.9	Diseño experimental y análisis estadístico.....	38
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1	Cinética de degradación.....	40
5.1.1	Efecto del tipo de luz sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos.....	40
5.1.2	Evolución de la AAR por ensayos ABTS y DPPH durante el almacenamiento a obscuridad, luz artificial y luz natural de extracto seco de Moringa Oleífera....	41
5.1.3	Evolución de la concentración de fenoles totales, clorofila, carotenoides totales, quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido.....	43
5.1.4	Evolución de la a_w durante el almacenamiento de extracto seco de moringa	48
5.2	Efecto de la HR y temperatura sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos	50
5.2.1	Evolución de la AAR por ensayo ABTS durante el almacenamiento de extracto seco de moringa a diferente HR, temperatura en empaque de HDPE..	50
5.2.2	Evolución de la concentración de fenoles totales, clorofila y carotenoides quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido. durante el almacenamiento a diferente HR y temperatura en extracto seco de moringa.....	53
5.2.4	Evolución de la a_w durante el almacenamiento de extracto seco de <i>Moringa oleífera</i>	57

5.3 Efecto de la a_w inicial y temperatura sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos en extracto seco de moringa.....	59
5.3.1 Evolución de la AAR por ensayo ABTS durante el almacenamiento de extracto seco de moringa a diferente a_w inicial y temperatura	60
5.3.2 Evolución de concentración de fenoles totales, clorofila y carotenoides quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido. durante el almacenamiento a diferente a_w inicial y temperatura en extracto seco de moringa	62
5.3.3 Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la evolución de la a_w	66
6. CONCLUSIONES	69
7. REFERENCIAS	70
8. APÉNDICES	79
APÉNDICE A Rectas de calibración para los ensayos de actividad antirradical y fenoles totales.....	79
APÉNDICE B Recta de calibración para carotenoides totales.	80
APÉNDICE C Rectas de calibración para cuantificación de compuestos fenólicos de referencia.	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Contenido de nutrientes en hojas de <i>Moringa Oleífera</i> (AFPD, 2008).....	6
Tabla 2.2. Velocidad de transmisión de vapor de agua y oxígeno de películas de polipropileno (OPP). (Adaptado a Reilly y Man, 1994).	20
Tabla 4.1. Niveles de temperatura y aw evaluados durante el almacenamiento de extracto en polvo de <i>Moringa oleífera</i> en bolsas metalizadas.....	38
Tabla 4.2. Niveles de temperatura y HR evaluados durante el almacenamiento de extracto en polvo de <i>Moringa oleífera</i> en bolsas de polietileno.	38
Tabla 4.3. Condiciones de luminosidad evaluadas durante el almacenamiento de extracto en polvo de <i>Moringa oleífera</i> en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.	39
Tabla 5.1. Coeficientes de regresión lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la AAR por ensayos ABTS y DPPH de los tratamientos almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	43
Tabla 5.2. Constantes de velocidad de degradación de la AAR por ensayos ABTS y DPPH de los tratamientos almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	43
Tabla 5.3. Coeficientes de correlación egresión lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de clorofila, carotenoides y fenoles totales almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	46
Tabla 5.4. Constantes de velocidad de clorofila carotenoides y fenoles totales almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	47
Tabla 5.5. Efecto del tipo de luz sobre la evolución de color en las muestras secas de <i>Moringa oleífera</i>	49
Tabla 5.6. Coeficientes de correlación lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la actividad antioxidante para cada nivel de HR y temperatura en HDPE.....	52
Tabla 5.7. Constante de velocidad de degradación de actividad antioxidante por ensayos ABTS y DPPH para cada nivel de HR y temperatura en HDPE.....	52

Tabla 5.8. Coeficientes de correlación lineal y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la concentración de clorofila, fenoles y carotenoides totales para cada HR y temperatura.	56
Tabla 5.9. Constantes de velocidad de degradación de clorofila fenoles y carotenoides totales.	57
Tabla 5.10. Efecto de la HR y temperatura de almacenamiento sobre la evolución del color en las muestras secas de <i>Moringa oleífera</i>	58
Tabla 5.11. Coeficientes de correlación lineal y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la actividad antioxidante para cada a_w y temperatura a partir de los datos experimentales de concentración versus tiempo.	61
Tabla 5.12. Constante de velocidad de degradación de actividad antioxidante por ensayos ABTS y DPPH en extracto seco de moringa oleífera almacenado a diferentes a_w , T en empaque laminado.	61
Tabla 5.13. Coeficientes de correlación lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la concentración de fenoles totales, clorofila y carotenoides para cada a_w y temperatura a partir de los datos experimentales de concentración versus tiempo.	64
Tabla 5.14. Constantes de velocidad de degradación de clorofila, carotenoides y fenoles totales en extracto seco de moringa oleífera almacenado a diferentes a_w , y temperaturas en empaque laminado.	65
Tabla 5.15. Constantes de velocidad de degradación de quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido en extracto seco de moringa oleífera almacenado a diferentes a_w , T en empaque laminado.	65
Tabla 5.16. Efecto de la a_w inicial y temperatura de almacenamiento sobre la evolución del color en las muestras secas de <i>Moringa oleífera</i>	67
Tabla 5.17. Tratamientos con mayor y menor degradación bajo diferentes condiciones de almacenamiento.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Árbol de Moringa oleífera	4
Figura 2.2. Localidades y distribución potencial del cultivo de Moringa oleífera en México (Olson, 2016).	5
Figura 2.3. Escala de colores opuestos L, a, b (Hunterlab 2012).	10
Figura 2.4. Diagrama de flujo para la lixiviación en una sola etapa. (Ocón y Barreiro, 1986).	11
Figura 2.5. Diagrama de flujo del proceso para lixiviación a contracorriente en etapas múltiples (Castillo, 2012).	13
Figura 2.6. Extracto de moringa oleífera en base etanol-agua (80% p/p).	14
Figura 2.7. Cambios que ocurren en los alimentos en función de la a_w	23
Figura 4.1. Secador de lecho fluidizado por lote marca Apex.	28
Figura 4.2. Agitador modelo MaxQ4450.	28
Figura 4.3. Extractos secos de moringa almacenados en empaque de polietileno de alta densidad a diferentes humedades relativas (HR).	30
Figura 4.4. Extractos secos de moringa almacenados en empaque de polietileno de alta densidad a diferentes niveles de luz y temperatura ambiente.	31
Figura 5.1. Cinética de degradación de la actividad antioxidante en extracto seco de moringa oleífera, mediante ensayo ABTS almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	41
Figura 5.2. Cinética de degradación de la actividad antioxidante en extracto seco de moringa oleífera, mediante ensayo ABTS almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	42
Figura 5.3. Cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto diferentes tipos de luz.	44
Figura 5.4. Cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto diferentes tipos de luz.	44

Figura 5.5. Cinética de degradación de carotenoides totales en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto diferentes tipos de luz.	45
Figura 5.6. Cinética de degradación de quercetina 3 rutinosido en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	45
Figura 5.7. Cinética de degradación de kaempferol 3 glucosido en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.	46
Figura 5.8. Evolución de la a_w durante el almacenamiento de extracto seco de moringa almacenado en HDPE y diferentes tipos de luz.	48
Figura 5.9. Muestras almacenadas a temperatura ambiente: (a) obscuridad (b) luz artificial y (c) luz natural, después de 150 días de almacenamiento.	49
Figura 5.10. Efecto de la HR y temperatura sobre la cinética de degradación de la AAR en extracto seco de moringa mediante ensayo ABTS.	51
Figura 5.11. Efecto de la HR y temperatura sobre la degradación de AAR en extracto seco de moringa mediante ensayo DPPH.	51
Figura 5.12. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa.	53
Figura 5.13. Cinética de degradación de clorofila en extracto seco de moringa almacenado a diferentes Temperaturas y %HR empacado en HDPE.	54
Figura 5.14. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de carotenoides totales en extracto seco de moringa.	54
Figura 5.15. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de kaempferol 3 glucósido en extracto seco de moringa.	55
Figura 5.16. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de quercetina 3 rutinosido en extracto seco de moringa.	55
Figura 5.17. Efecto de la HR y temperatura sobre evolución de la a_w de extracto seco de <i>Moringa oleífera</i>	57

Figura 5.18. Muestras almacenadas :(a) 5°C-40 %HR (b) 5°C-80 %HR y (c) 22°C-40 %HR, (d) 22°C-80 %HR, (e) 40°C-40 %HR (f) 40°C-80 %HR después de 150 días de almacenamiento.	59
Figura 5.19. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de la AAR mediante ensayo ABTS en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	60
Figura 5.20. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de la AAR mediante ensayo DPPH en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	60
Figura 5.21. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.....	62
Figura 5.22. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de clorofila en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	62
Figura 5.23. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de carotenoides totales en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	63
Figura 5.24. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de kaempferol 3 glucósido en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	63
Figura 5.25. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de quercetina 3 rutinosido en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	64
Figura 5.26. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre la evolución de la a_w en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.	66
Figura 5.27. Muestras almacenadas :(a) 5°C- a_{w1} (b) 5°C- a_{w2} (c) 22°C- a_{w1} ,(d) 22°C- a_{w2} ,(e) 40°C- a_{w1} (f) 40°C- a_{w2} después de 150 días de almacenamiento.	67

1. INTRODUCCIÓN

El interés creciente en la caracterización de fitoquímicos antioxidantes en los vegetales y hortalizas se debe principalmente a sus diferentes propiedades bioactivas (Dillard y German, 2000, Shetty y McCue, 2003) dado que estos compuestos inhiben o disminuyen la oxidación evitando la propagación de las reacciones oxidativas en cadena (Bergman *et al.*, 2001). Recientes investigaciones han demostrado que los diversos compuestos fenólicos presentes en las frutas y hortalizas son responsables de la alta capacidad antioxidante mostrada por diferentes matrices vegetales (Olson y Fahey, 2011, Shetty y McCue, 2003) es por ello que se sugiere un aumento en el consumo de estos productos, con el fin de aprovechar los efectos beneficiosos de los antioxidantes fitoquímicos. Las hojas del árbol de *Moringa Oleifera* son fuente natural de nutrientes y compuestos bioactivos (Pinheiro *et al.*, 2008), debido a su alto contenido nutricional, ha sido utilizada para combatir la desnutrición y algunas enfermedades en comunidades tropicales y subtropicales de escasos recursos (Meena *et al.*, 2010). Una manera de obtener estos compuestos es mediante la extracción, sin embargo, estos compuestos se utilizan principalmente en forma de polvo en la industria alimentaria y farmacéutica siendo el secado por aspersion el proceso más utilizado para la obtención y preservación de compuestos bioactivos (Vázquez, 2013, Olson, 2016). Como clorofila fenoles y carotenoides totales En la industria alimentaria otro proceso importante para extender la vida útil de un alimento es el almacenamiento (Temiz, 2010). El cual tiene como funciones principales extender la vida útil de un alimento y preservar las características fisicoquímicas nutricionales sensoriales, así como la calidad del alimento. Para llevar a cabo un correcto almacenamiento es indispensable tomar en cuenta la naturaleza y las características del producto. El uso de polímeros en el embalaje dentro de la industria alimentaria es seleccionado debido a su versatilidad y baja permeabilidad a los gases, los mismos que necesitan cumplir con estrictos parámetros de calidad y mantener su contenido apto para el consumo Mahalik, y Nambiar, (2010). El polietileno de baja densidad (LDPE) es el polímero más utilizado y empaques metalizados (PM) debido a que no permite la permeabilidad del oxígeno y el dióxido de carbono evitando así el crecimiento bacteriano anaeróbico dentro de los alimentos (Temiz, 2010). Los alimentos tienen distintos comportamientos dependiendo de la naturaleza del ambiente donde se conservan, por lo que se han desarrollado diversos tipos de pruebas para

medir y verificar la estabilidad del mismo para su correcto almacenamiento (Mahalik, y Nambiar, 2010).

Durante el almacenamiento y procesamiento de alimentos existen cambios físicos, químicos y microbiológicos, particularmente influenciados por el contenido de humedad en el producto, la actividad de agua (a_w), temperatura y humedad relativa (HR) (Brody, 2003) Mediante la constante de velocidad de degradación (k) se puede determinar la vida de almacén, con el valor de k puede ser utilizado para seleccionar las condiciones de almacenamiento más apropiadas y los sistemas de empaque con los cuales se obtiene mayor la retención de color, capacidad antioxidante y estabilidad. Es por ello que en esta investigación se evaluó el efecto de las diferentes condiciones de almacenamiento del extracto en polvo de moringa oleífera sobre la cinética de degradación de los compuestos de interés y propiedades físicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Moringa oleífera*

Moringaceae, del orden *Brassicales*, es una familia de un solo género del cual se desprenden 13 especies de moringa identificadas. La más popular es *Moringa oleífera* también conocida como jazmín francés o marango (*Moringa oleífera*). Es un árbol perenne de rápido crecimiento y tolerante a la sequía (Olson y Fahey, 2011), originario de la India e importante en Etiopía, Filipinas y Sudán, se cultiva en África oriental, occidental y austral, Asia tropical, América Latina, el Caribe, Florida y las islas del Pacífico. La *Moringa oleífera* es la especie económicamente más valiosa del sur de Asia, actualmente lleva ya varios siglos como parte de la horticultura tradicional del trópico seco mexicano, donde se cultiva principalmente para fines ornamentales. Con el reconocimiento reciente de sus propiedades nutritivas, farmacocinéticas e industriales, existe un creciente interés en fomentar su cultivo en México y diferentes partes del mundo (Olson y Alvarado, 2016).

2.1.1 Descripción botánica del árbol

La explotación del árbol de moringa (Figura 2.1) en diferentes partes del mundo se debe a la facilidad de cultivo, rápido crecimiento, su baja demanda de agua y nutrientes después de haber sido plantados (Hsu *et al.*, 2006; Price, 2007). El árbol de moringa llega a alcanzar alturas de 12 a 15 m, con un tronco de 30 cm de diámetro (Foidl *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2006).

Presenta una copa abierta y esparcida de ramas inclinadas y frágiles, un follaje de hojas pinnadas en tres, las cuales están divididas en varios folíolos ovalados de 1 a 2 cm de largo dispuestos sobre un armazón llamado raquis (Olson y Fahey, 2011), es de madera blanda de baja calidad, mientras que la corteza es corchosa y gomosa (Hsu *et al.*, 2006). Las hojas son de color verde oscuro por encima y claro por debajo, crecen de forma alterna y tri-pinnada, creando una estructura triangular con su contorno, dicho arreglo alcanza desde 20 hasta 70 cm de largo. Las flores bisexuales son blancas o cremosas y fragantes, las componen 5 estambres y llegan a medir desde 1.5 a 2 cm de ancho (Parrotta, 1993; Hsu *et al.*, 2006; Meena *et al.*, 2010).

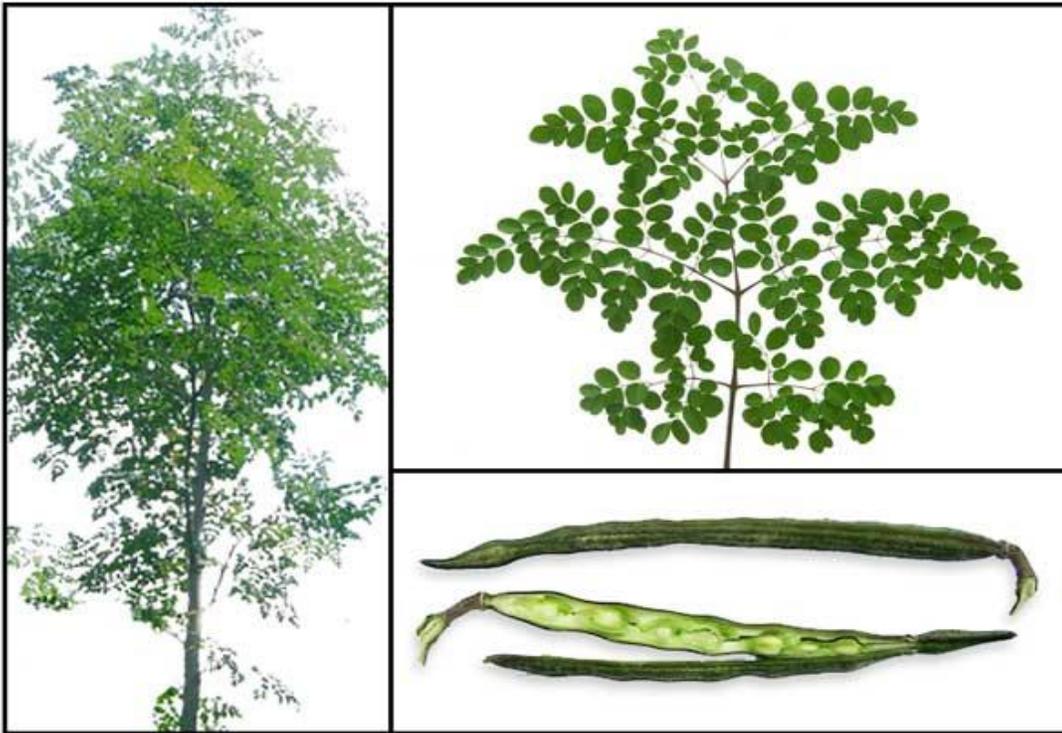


Figura 2.1. Árbol de Moringa oleífera

El contenido nutricional de las hojas depende de la edad del vegetal, la estación, humedad, radiación, variedad de la planta y nutrientes del suelo, principalmente con los contenidos de K y P (Vázquez *et al.*, 2017; Sreelatha y Padma, 2009), sugieren que los extractos de hojas provenientes de árboles desarrollados presentan mayor actividad antioxidante que aquellos de árboles jóvenes. La moringa es tolerante a las altas temperaturas y a la sequía, a diferencia de las inundaciones y heladas; es muy resistente a plagas y enfermedades (Price, 2007; Meena *et al.*, 2010).

Actualmente, existen numerosos reportes científicos de las cualidades y propiedades nutritivas de las hojas de moringa, con lo que se fundamenta su distribución como fuente alimentaria viable para los países en desarrollo (Fahey, 2005).

2.1.2 Distribución potencial en México

El árbol ha llegado a México en forma de semillas desde África y la India, generalmente para su cultivo en campos especializados, con la finalidad de cosechar hojas. La *Moringa oleifera* prospera preferentemente en zonas tropicales con temperaturas mínimas por encima de los 15°C, con una precipitación menor a los 1,000 mm y altitudes de hasta 600 msnm. Esta combinación de características climáticas se encuentra principalmente en el trópico seco de la depresión del Balsas y en la costa del Pacífico. Un total de 13 estados presentan localidades óptimas para el cultivo de la moringa, destacando por su área Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Jalisco la mayoría de ellos distribuidos en la costa del Pacífico (Figura 2.2), (Olson, 2016).

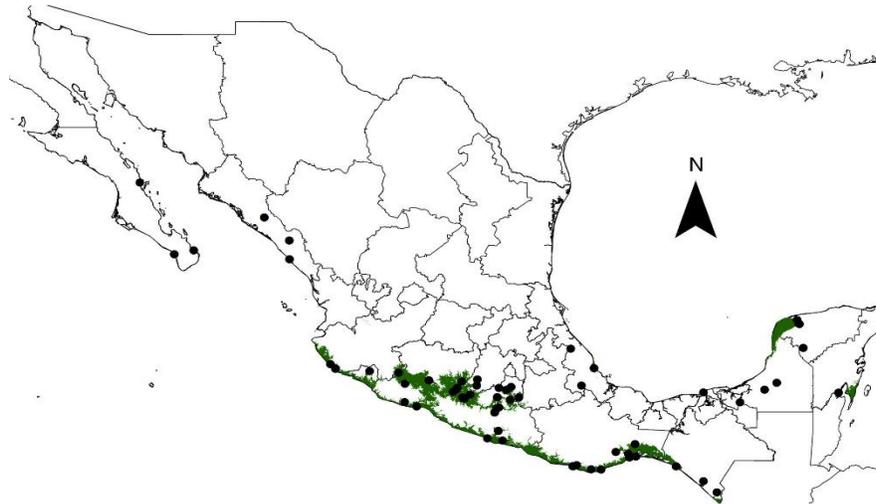


Figura 2.2. Localidades y distribución potencial del cultivo de *Moringa oleifera* en México (Olson, 2016).

Los puntos negros indican las 67 localidades donde se ha documentado el árbol de *Moringa oleifera* como parte de la horticultura tradicional. Las zonas sombreadas corresponden a las zonas con alta probabilidad de tener clima ideal para el cultivo de la moringa (Olson, 2016).

2.1.3 Composición química de las hojas de Moringa oleífera

En la tabla 2.1 se presenta el contenido nutricional de las hojas de *Moringa oleifera* por cada 100 g de hoja fresca.

Tabla 2.1. Contenido de nutrientes en hojas de *Moringa Oleifera* (AFPD, 2008).

Componente	Contenido
Agua	75 g
Proteínas	6.7
Grasa	1.7 g
Carbohidratos	14.3 g
Fibra	0.9 g
Calcio	440 mg
Fósforo	70 mg
Hierro	7 mg
Vitamina A	120 µg
Vitamina B	11.300 UI
Tocoferol	0.9 g

2.2 Variables de calidad en las hojas de Moringa

Las hojas de moringa son una fuente viable de antioxidantes naturales, identificando principalmente carotenoides y compuestos fenólicos (Manguero y Lemmen, 2007), también contiene antioxidantes los cuales representan un amplio grupo capaz de prevenir los procesos degenerativos asociados a un exceso de radicales libres en el organismo. Dichos compuestos

que tienen la propiedad de reaccionar con radicales libres y evitar de esta manera el efecto nocivo que puedan causar a las células (Guija y Troncoso, 2000).

2.2.1 Carotenoides

Los beta-carotenos con los alfa y gamma-carotenos son los responsables de la coloración de un gran número de alimentos vegetales. Se ha descrito recientemente en numerosos estudios el efecto benéfico de estos compuestos en la salud humana (Olson, 2016); el consumo de carotenoides está relacionado con la prevención de cataratas, aterosclerosis, degeneración muscular y esclerosis múltiple, así como, a una baja incidencia de cáncer de próstata (Giovannucci *et al.*, 1995). La ingesta de licopeno y beta-caroteno inhiben la oxidación de las LDL y de esta manera previene la formación de la placa (ateromatosa Weisburger, 1999); así mismo, protege la piel contra el efecto nocivo de la radiación ultravioleta solar que en la epidermis puede inducir a la lipoperoxidación (Lee y Min, 2006). Por lo que, desde un punto de vista nutricional, resulta de gran importancia conocer qué factores intervienen en la degradación de los carotenoides, ya que su pérdida, además de producir cambios de color en el alimento, conlleva una disminución de su valor nutritivo. La inestabilidad de los carotenoides se debe principalmente a que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos. Otros factores como la temperatura, la luz o el pH también pueden producir importantes cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización.

Wagner y Warthesen, (1999) evaluaron la estabilidad de α y β caroteno en polvo de zanahoria encapsulado en diferentes tipos de almidón hidrolizado obtenidos por secado por aspersión, comprobando que la degradación de los carotenos como consecuencia del almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 37°C y 65°C, seguía una cinética de primer orden. Los resultados del estudio mostraron que la encapsulación aumentaba la vida media del producto a 21°C hasta 70 veces, en función del tipo de almidón empleado.

2.2.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos polifenólicos presentan un mecanismo de acción de los polifenoles, el cual está vinculado a su capacidad para donar hidrógeno y a su acción quelante de iones metálicos; la potente actividad antioxidante reside en sus estructuras químicas con un grupo o-difenólico, un doble enlace conjugado 2-3 y grupos hidroxilos en posiciones 3 y 5 (Bravo, 1998) lo que los torna muy eficientes contra radicales hidroxilo y peroxilo.

Los compuestos fenólicos como tocoferoles tienen la capacidad para proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares de la acción nociva de las especies reactivas de oxígeno. El α -tocoferol tiene la propiedad de reducir la concentración de dióxido de nitrógeno de una manera más eficiente que otros tocoferoles. Su acción está vinculada con la reducción de enfermedades cardiovasculares y prevención del cáncer (Meydani, 2000).

2.2.3 Clorofila

La clorofila es un antioxidante, es conocida por su capacidad oxi-reductora, la cual, al bloquear los radicales libres, ejerce su efecto antioxidante, lo que ayuda al organismo a retrasar el efecto del envejecimiento.

La estructura del anillo de porfirina, posee en su núcleo, magnesio, mineral que se requiere para la adecuada transmisión de impulsos eléctricos que regulan al ritmo cardiaco y mejora el funcionamiento del corazón, y, por ende, al sistema circulatorio. También, evita la contracción de los vasos sanguíneos, baja la presión arterial y en general, contribuye de forma significativa a reducir los riesgos cardiovasculares. La clorofila posee potencial anti carcinogénico y antimutagénico. Se ha comprobado que la clorofila tiene efectos, como la reducción de algún tipo de tumores en animales de laboratorio (Badui, 2006).

2.2.4 Color (L, a y b)

La apariencia es el primer contacto que tiene el consumidor con un alimento, ya que condiciona sus preferencias e influencia su elección. El color está relacionado con las cualidades sensoriales, la composición química y, por lo tanto, es uno de los factores que define la calidad de un producto alimentario (Delmoro *et al.*, 2010). En la moringa el color verde no es la excepción, ya que cambios en su coloración son Indicadores de deterioro por almacenamiento prolongado o mal almacenamiento, ocasionando cambios en las características sensoriales del producto final.

En la industria alimentaria las medidas colorimétricas son necesarias para evaluar los objetivos relacionados con la calidad del producto, tanto en las etapas de producción como en la comercialización, indirectamente, también se pueden medir otros parámetros responsables de las características cromáticas finales del alimento que afectan en relación directa a los equilibrios químicos del producto como es degradación, humedad y actividad de agua entre otros.

La escala de color Hunterlab (Figura 2.3) está basada en la teoría de los colores opuestos. Esta teoría asume que los receptores de ojo humano perciben el color como los pares de colores opuestos los cuales se describen a continuación

Escala L: La luminosidad o brillo es la cantidad de luz emitida por un objeto un valor igual a 100 de saturación tendrá su máxima pureza, y con una luminosidad igual a 0 será negro absoluto.

Escala a: verde vs rojo, donde los valores negativos indican colores verdes y los valores positivos indican colores rojos.

Escala b: azul vs amarillo, donde los valores negativos indican colores azules y los valores positivos indican colores amarillos.

La escala **L** representa la luminosidad y la escala **a** y **b** representa la cromaticidad. Se requieren los tres valores para describir completamente el color de un objeto (Hunterlab 2012). El espacio de color tridimensional **L, a, b** es el siguiente.

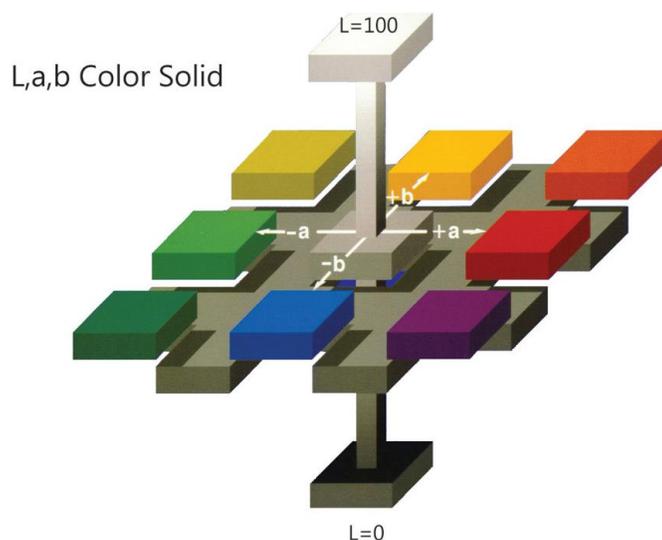


Figura 2.3. Escala de colores opuestos L, a, b (Hunterlab 2012).

Lovic *et al.*, (1970) estudiaron la estabilidad del color de espuma seca en polvo de tomate seco durante el almacenamiento bajo nitrógeno y atmósfera de aire a -10 , 2 , 20 y 37 ° Informaron que, después de 30 días de almacenamiento en aire o nitrógeno, el licopeno total fue mayor a 20 ° C (46.3 y 90.0%, respectivamente) comparado con 2 ° C (37.0 y 85,5%, respectivamente). Observaron que la isomerización de trans-licopeno a cis-licopeno tuvo lugar en polvo de tomate seco. Por lo tanto, para retener mejor color, almacenamiento a 20 ° C se consideró más favorable que almacenamiento a 2 ° C o 10 ° C debido a la isomerización.

2.3 Extracción sólido-líquido o Lixiviación

Desde el punto de vista de la ingeniería, la extracción sólido-líquido de los alimentos se considera como una operación de transferencia de masa en estado no estacionario multicomponente y multifase. La difusión molecular (Primera ley de Fick) en la fase fluida es ampliamente aceptada por los ingenieros de alimentos como mecanismo predominante de transferencia de masa dentro de los alimentos sólidos (por ejemplo, el secado y la lixiviación). Esta operación establece que dentro de un medio continuo y bajo la presencia de un gradiente de concentración, la migración neta de moléculas de soluto debido a movimiento aleatorio se

produce a partir de una región de alta concentración a una de menor concentración (Aguilera, 2003).

Como muchos otros procesos de separación, se puede describir como una sucesión de etapas individuales de equilibrio, modeladas por métodos gráficos o algoritmos matemáticos para determinar el número de etapas teóricas de contacto requeridas para una separación específica o para optimizar la relación sólidos/disolvente en una etapa de contacto único (Fernández *et al.*, 2012; Castillo, 2012).

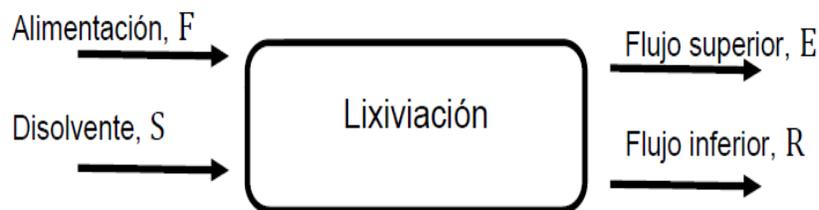


Figura 2.4. Diagrama de flujo para la lixiviación en una sola etapa. (Ocón y Barreiro, 1986).

Para analizar la lixiviación en una sola etapa y en etapas a contracorriente se requiere una ecuación de línea de operación o relación de balance de materia y las relaciones de equilibrio entre ambas corrientes. Se parte de la suposición que el sólido libre de soluto es insoluble; si hay suficiente disolvente presente para que todo el soluto del sólido de entrada pueda disolverse en el líquido, el equilibrio de la lixiviación se alcanza cuando se ha disuelto el soluto. Como se muestra en la figura 2.4, la corriente sólido-líquido se llama flujo inferior o corriente de la suspensión. En consecuencia, la concentración del soluto en el líquido o corriente superior, es igual a la concentración del soluto en el líquido que acompaña a la suspensión o flujo inferior (Geankoplis, 2010).

2.3.1 Parámetros importantes en la lixiviación (extracción sólido-líquido)

En lixiviación, los parámetros importantes son:

1. La reducción de tamaño del material a extraer (trituration, molienda, formación de escamas o de corte en trozos); el tamaño del sólido debe ser adecuado (área de superficie por unidad de volumen) para hacer que el soluto sea más accesible al disolvente y para favorecer la extracción.
2. La selección del solvente para la extracción se basa en diversas características como: selectividad, inercia química, propiedades termo físicas, inflamabilidad, toxicidad, costo, y disponibilidad.
Diversos autores han usado para la extracción de solventes como: acetona, diclorometano, etanol, éter de petróleo, etil acetato, tricloroetileno, o hexano, con la finalidad de extraer la mayor concentración de compuestos (Fernández *et al.*, 2012).
3. La selección de la temperatura de operación debe ser lo suficientemente alta para dar mayor solubilidad al soluto en el disolvente, pero no tan alta como para causar pérdidas de disolvente, extracción de componentes no deseados o daños de componentes termosensibles. En productos orgánicos la literatura sugiere una temperatura de entre 40 °C y 70 °C (Aguilera, 2003).
4. La selección del equipo, en función del modo de operación (por lotes o continuo), por el tipo de sólidos que se operan (lecho fijo, percolación o por inmersión total) o la mejora del rendimiento (una etapa o de múltiples etapas).

2.3.2 Extracción en etapas múltiples

Dentro de la literatura de ingeniería química se plantea que, para transferir más soluto se puede repetir el contacto en una sola etapa mezclando la corriente de salida del refinado R_j con disolvente de una etapa anterior de extracción S_j , como se muestra en la figura 2.5, este modo de operación permite usar menos disolvente y, obtener una corriente de extracto de salida más concentrada, generalmente se usa el contacto a contracorriente en etapas múltiples (Geankoplis, 2010).

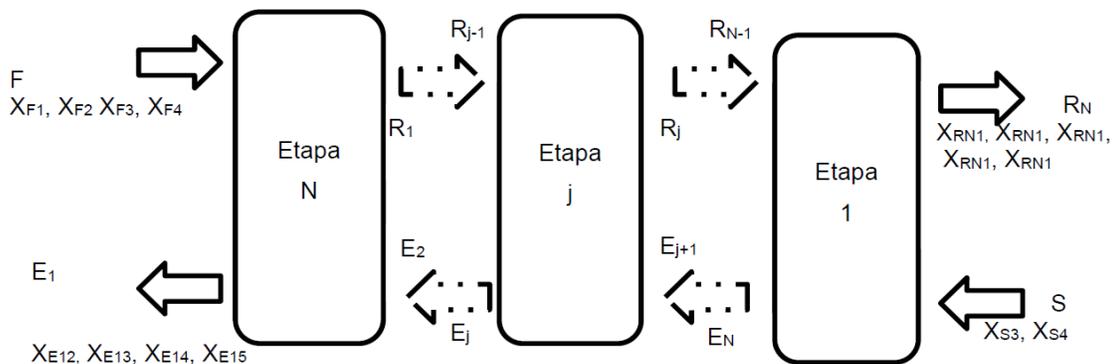


Figura 2.5. Diagrama de flujo del proceso para lixiviación a contracorriente en etapas múltiples (Castillo, 2012).

2.4 Extractos de hojas de moringa

Como se ha reportado anteriormente, las hojas de moringa contienen compuestos bioactivos de interés en la industria alimentaria y farmacéutica, sus propiedades se han aprovechado principalmente en forma de extracto, ya sea en base acuosa o en alcohol (Krishnaiah *et al.*, 2011). Los extractos de hojas de moringa se han aprovechado en medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades (Chumark *et al.*, 2008; Jaiswal *et al.*, 2009), o para la inhibición de microorganismos (Singh y Sharma, 2012), aunque también existen reportes que evalúan su función como antioxidante en alimentos (Reddy *et al.*, 2005) y como fuente de enriquecimiento nutritivo (Verdugo *et al.*, 2010; Castillo 2012).



Figura 2.6. Extracto de moringa oleífera en base etanol-agua (80% p/p).

2.5 Secado por aspersión

El método de secado por aspersión se basa en atomizar la solución que va a ser secada en forma de gotas muy finas, en el seno de una corriente de gas caliente que generalmente es aire o nitrógeno en ciclo cerrado. Se forman partículas de geometría esférica, con aspecto de esferillas huecas con un diámetro que puede estar entre los 20 μm y hasta los 200 μm (Masters, 1991; Perry y Green, 1999).

El aire caliente introducido al secador alcanza una temperatura que oscila entre 100 y 200 $^{\circ}\text{C}$. A pesar de las altas temperaturas del gas de secado, las gotas del líquido atomizado no alcanzan la temperatura de entrada debido a la corta duración del secado, lo que evita la degradación del producto, ya que, a pesar del aporte de aire caliente, este sustrae calor por la vaporización del disolvente. (Därr, 1981; Voigt 1982). Este método se puede utilizar en operaciones de recubrimiento de sólidos y líquidos porque a medida que se evapora el disolvente, el material de recubrimiento envuelve las partículas, lo cual es útil para encapsular compuestos volátiles y mejorar la estabilidad.

Una ventaja del secado por aspersión es la microencapsulación utilizando diferentes materiales de soporte como goma arábica, almidón, sílice y maltodextrina, entre otros y posteriormente sometiénolas al proceso de secado (Därr, 1981).

Los principales encapsulantes utilizados para este método son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas (arábica, mezquite, guar, alginato de sodio, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína, gluten, caseína). Estos encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación. (Goud y Park, 2005; Yoshi, y Soottitantawat, 2001).

Vázquez en el 2011, evaluó el efecto de las variables del proceso de secado por aspersión en ciclo cerrado a diferentes temperaturas de entrada (130 y 140 °C) y salida (60 y 70 °C) sobre el rendimiento, el contenido de humedad, la actividad de agua, la retención de compuestos bioactivos (fenólicos totales, carotenoides, ácido ascórbico) y la actividad antirradical de extractos etanólicos de hojas de *Moringa oleifera*, utilizando como gas de secado nitrógeno. Evaluó 3 diferentes materiales de soporte en diferentes proporciones respecto al contenido de sólidos del extracto (66.67 y 50 % de maltodextrina, 33.33 y 23.08 % de β -ciclodextrina y sílice precipitada) como resultados obtuvo que los compuestos estudiados fueron preservados empleando un 66.7 % de maltodextrina a temperatura de entrada de 140 °C y de salida de 60 °C.

2.6 Almacenamiento y vida útil

Un proceso fundamental en la industria alimentaria es el almacenamiento, este tiene como funciones principales la preservación de la calidad y la extensión de vida útil del alimento. Al implementar adecuadamente las condiciones adecuadas de almacenamiento se inhibe el crecimiento microbiano y se pueden conservar las características físicas, químicas y sensoriales del producto (Temiz, 2010).

El contenido de nutrientes en un alimento es una de las características principales de las que depende la calidad y valor nutritivo del alimento. Los estudios de vida útil son importantes para definir la duración de un alimento, son necesarios para no sub o sobre dimensionar el tiempo que realmente dura el producto. La vida útil de un alimento se define como el tiempo finito después de su producción en condiciones controladas de almacenamiento (Temiz, 2010).

Los diversos métodos de conservación de alimentos se basan en el control de una o más de las variables que influyen en la estabilidad del producto. Los principales factores que afectan la calidad y vida útil de un alimento son especialmente el material de empaque, la luminosidad, la HR, la temperatura, la a_w , del producto y el tiempo de almacenamiento, todos estos factores provocan diferentes cambios físicos, químicos y microbiológicos que se manifiestan en alteraciones de color, consistencia, textura y contenido nutricional. Controlar estos factores puede conducir a la optimización de la vida útil del producto, así como las predicciones relacionadas a la degradación de compuestos de interés presentes en un alimento. (Budai, 2006).

Los principales factores que influyen sobre la calidad del producto durante el almacenamiento se discuten a continuación.

2.6.1 Humedad relativa

El secado de alimentos es un proceso ampliamente utilizado desde la antigüedad para la conservación de alimentos, sin embargo el almacenamiento de los alimentos debe efectuarse en condiciones de baja HR, se denomina HR a la cantidad de vapor de agua presente en el aire, una humedad relativa elevada favorece el crecimiento de los microorganismos, especialmente de aquellos que se encuentran en la superficie, la humedad presente en la atmósfera aumenta la cantidad de agua del alimento, aumentando así el riesgo de proliferación microbiana.

Yan-li Xie *et al.*, (2006), estudiaron la influencia de la HR sobre la retención de vitamina A disuelta en aceite de coco secado por aspersion durante el almacenamiento. Almacenaron a temperatura ambiente (25°C) durante 30 días a tres HR: 33, 60 y 86% utilizando diferentes

soluciones sobresaturadas para cada HR de estudio. Los resultados mostraron que a medida que aumenta la humedad relativa aumenta el porcentaje de degradación de vitamina A. Por otro lado, Enríquez *et al.*, (2013) evaluaron la estabilidad de fenoles totales en polvo de cáscara de manzana durante el almacenamiento, utilizando dos materiales de empaque polietileno de alta densidad (HDPE) y películas metalizadas (PM), y 25 °C controlando la HR:70% durante un periodo de 120 días, estimó el tiempo de vida mediante ecuaciones de primer orden como resultado obtuvo $t_{1/2}$: PM: 298 ± 18.41 días y HDPE: 120 ± 4.59 días.

Bakowska-Barczak, (2010) evaluó la estabilidad de polifenoles en extracto de grosella negra secada por aspersión, almacenaron en soluciones saturadas de $MgCl_2$ y $Mg(NO_3)_2$, con el fin de proporcionar valores de humedad relativa de 32.8% y 52.3%, respectivamente, estas humedades relativas fueron elegidas con base al agua crítica. actividades de zumo de açai en polvo determinadas en un trabajo previo por. (Tonon *et al.*, 2009) temperaturas: 25 y 35 °C, que es una de las temperaturas recomendadas por Labuza y Schmidl, (1985) para estudios acelerados de vida útil.

Liang *et al.*, (2013) evaluaron la degradación del polvo de nanoemulsión secado por pulverización almacenado en una botella de vidrio de 10 ml con una capa delgada, y colocado en un desecador con HR constante de 11, 33, 52, 75 y 97% a 25 °C en condiciones de obscuridad, las retenciones de betacaroteno mostraron los valores más bajos (23.67 y 26,71%) a HR 75%. Resultados similares fueron obtenidos por Serris *et al.*, (2001) que la HR mostró un efecto significativo en la estabilidad de almacenamiento a mayor porcentaje HR la degradación de betacarotenos aumentaba.

2.6.2 Temperatura

La temperatura es un factor relevante e importante en la estabilidad y la seguridad alimentaria, puesto que actúa como acelerador en reacciones de degradación. Un mal control de la temperatura durante el almacenamiento de los alimentos apunta como la principal causa de descomposición y baja calidad de un alimento. (Aguayo, 2003).

Fang *et al.*, (2011), evaluaron el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la retención de fenoles totales (TPC) y antocianinas en jugo de cereza secado por aspersión utilizando como material encapsulante maltodextrina DE 10. Las temperaturas de

almacenamiento fueron: 4 °C, 25 °C y 40 °C durante 6 meses. Los resultados indicaron que el polvo debe almacenarse a temperaturas menores de 25°C para obtener una mayor estabilidad de polifenoles.

Bakowska-Barczak, (2010) evaluó la estabilidad de polifenoles en extracto de grosella negra secada por aspersión utilizando maltodextrina como material de pared, almacenó a dos temperaturas 8 y 25 °C durante 12 meses en botellas de color marrón La estabilidad de los polifenoles encapsulados durante 12 meses a ambas temperaturas mostraron estabilidad en polifenoles sin embargo los polifenoles a 8 °C mostraron una degradación menor con respecto a las muestras almacenadas a 25° C.

Coronel-Aguilera *et al.*, (2014) evaluaron la estabilidad de una emulsión que contenía 0.06 g de b-caroteno / 100 g de emulsión secada por aspersión, polvos recubiertos se almacenaron en botellas de vidrio ámbar con tapones, vaciados con nitrógeno, y almacenados a 4, 25 y 45 °C a determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento en el color y contenido de carotenoides. Se siguió la degradación del color y carotenoides la temperatura de almacenamiento más alta, 45 C, tuvo la mayor influencia en la degradación del color y carotenoides. Las muestras almacenadas a 45 C mostraron un aumento continuo en el ángulo de tono, mientras que la diferencia de color y croma disminuyó continuamente a través del tiempo.

2.6.3 Luminosidad

La acción intensa de la luz sobre los compuestos fotosensibles como es el caso de la clorofila y carotenoides induce su ruptura con la formación de compuestos incoloros de bajo peso molecular. Estas reacciones de degradación tienen mucha importancia en la industria alimentaria ya que el producto pierde, además de su función biológica y nutricional, su color característico. Existen investigaciones en las que se estudia la relación existente entre la pérdida de pigmentos y la exposición a la luz, encontrándose que debido a la iluminación con luz fluorescente sigue un modelo de degradación de primer orden (Espinoza y Asis, 1994; Aguayo, 2003).

En envases transparentes, el efecto de la luz se torna un factor de suma importancia en la conservación del producto, ya que la formación de iniciadores de reacción depende de la

energía absorbida y ésta varía de acuerdo con el tipo de material del envase. La radiación ultravioleta es más eficiente en la activación de la oxidación y el efecto protector del envase dependerá de su capacidad de impedir la entrada de este tipo de radiación (Espinoza y Asis, 1994).

Wagner *et al.*, (1995), evaluaron el efecto de la luz sobre la cinética de degradación de carotenoides en pulverizado de zanahorias, almacenando la muestra a 25°C y 45°C en presencia de luz (2150 lux) y oscuridad durante 56 días. Los resultados mostraron un 90% de degradación de carotenoides en condiciones de luz y oscuridad a 44°C mientras que para el tratamiento almacenado en condiciones de oscuridad a 25°C solo se degradó un 33% de carotenoides con respecto al porcentaje inicial.

Chen *et al.*, (1996) realizaron investigaciones sobre la estabilidad de los carotenoides y la vitamina A durante el almacenamiento del jugo de zanahoria, se sometió a un almacenamiento claro y oscuro a 4, 25 y 35 ° C durante 3 meses. Los resultados mostraron que las cantidades de luteína, α -caroteno, β -caroteno y vitamina A en el jugo de zanahoria disminuyeron al aumentar la temperatura de almacenamiento. La luz puede ser más destructiva para los carotenoides que la oscuridad. Los isómeros carotenoides 9-cis fueron los principales tipos formados en el jugo de zanahoria en condiciones de luz, mientras que los tipos 13-cis fueron favorecidos durante el almacenamiento en la oscuridad.

2.6.4 Material de empaque

Un empaque cubre las funciones de contener y proteger un producto para su consumo, transporte y venta, los materiales que se utilizan tradicionalmente en la industria alimentaria son principalmente polímeros (Tabla 2.2) a partir de hidrocarburos, los cuales involucran diferentes factores como son, tamaño, resistencia mecánica, transmisión de gases y/o permeabilidad, humedad y compatibilidad con el alimento, por otro lado los empaques están destinados no solo a proteger el producto, sino también a tomar en cuenta la duración del tiempo de almacenaje, distribución y condiciones de almacenaje de éste (Reilly y Man, 1994).

Davoodi *et al.*, (2007) evaluaron el efecto de diferentes materiales de empaque sobre la degradación de licopeno en microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión durante el almacenamiento, los materiales de empaque utilizados fueron LDPE y MP a temperatura

ambiente (24°C) durante 6 meses, como resultados obtuvieron que la pérdida de licopeno fue de 10-20% mayor en empaques LDPE en comparación con la muestra almacenada en MP.

Tabla 2.2. Velocidad de transmisión de vapor de agua y oxígeno de películas de polipropileno (OPP). (Adaptado a Reilly y Man, 1994).

Material	OTR^a (cm³/m²día atm)	WVTR^b (g/m²día)
Polipropileno	1500	5.5
Cubierto de acrílico	650	4.0
Metalizado	120	0.8
cloruro de polivinilideno	16	5.0
Metalizado / recubierto de acrílico 21 μm	1-2	1.0-1.5
^a 23 °C 90% HR ^b 38 °C 90% OTR=Velocidad de transferencia de oxígeno WVTR=Velocidad de transferencia de vapor de agua		

El polietileno, en todas sus formas ofrece una protección contra la humedad, es fácil de sellar mediante calor y conserva su flexibilidad a bajas temperaturas. Presenta alta resistencia al impacto, resistencia térmica, resistencia química, tiene una mayor flexibilidad en comparación con el polietileno de alta densidad y su coloración es transparente, aunque se opaca a medida que aumenta su espesor, es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria para el almacenamiento de productos derivados de dicha industria (Reilly y Man, 1994).

Los empaques metalizados son un termoplástico versátil de gran utilidad, que posee un equilibrio entre resistencia térmica y química, su estructura está compuesta de poliéster, tintas, adhesivos y polietileno. El poliéster actúa como una barrera contra la humedad, posee alta resistencia a la ruptura y a las altas temperaturas. Las tintas funcionan como barreras contra la luz. El adhesivo tiene la función de unir las capas de los demás materiales. (Henríquez *et al.*, 2013).

Entre los materiales empleados en la actualidad para la conservación están las películas poliméricas permeables (Kader, 2002) y, dentro de este grupo, las más empleadas son las de polietileno de alta densidad (HDPE), por su fácil producción y bajo costo. Le siguen las

películas de polietileno de baja densidad (LDPE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y poliestireno (PS) (Henriquez *et al.*, 2013).

Dayron, (2006) evaluaron la estabilidad de mora almacenado en dos materiales de empaque: bolsas de PP calibre 2 y HDPE calibre 2 utilizaron una cámara de empaque de alimentos, donde se aplicó un vacío de 90%, la temperatura de almacenamiento fue a 4 °C y la HR varió entre 90% y 95%, los resultados obtenidos muestran que el tiempo de vida media de las moras es mayor por 10 días en HDPE que en PP.

2.6.5. Actividad de agua

La estabilidad física, química y microbiológica de los alimentos depende en gran medida del contenido de agua y su interacción con ingredientes alimentarios. Reid, (2007) define a_w como la relación de la fugacidad del agua en un sistema entre la fugacidad del agua líquida pura a la misma temperatura, donde la fugacidad es una medida de la tendencia de escape de una sustancia en un sistema termodinámico en equilibrio. La actividad de agua es considerada como un parámetro importante en la conservación de alimentos porque a partir de este factor dependen las alteraciones fisicoquímicas y microbiológicas que pueden ocurrir durante la conservación y almacenamiento de un producto alimenticio. La actividad del agua (a_w) es una propiedad de equilibrio del agua en alimentos y otros materiales la cual se define como la relación de la presión parcial de vapor del agua en el sistema (P) y la presión parcial de vapor del agua pura (P_0) a la misma temperatura, o la humedad relativa (HR) de equilibrio del aire que rodea al sistema a la misma temperatura, como se muestra en la ecuación 1.

$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{HR}{100} \quad \text{Ec.1}$$

Por lo tanto, un valor de $a_w = 1$ indica que el 100% del agua está disponible, un valor "cero" indica que no hay agua disponible para el crecimiento microbiano, químico o enzimático. La relación entre el agua y las especies químicas contenidas en los alimentos se reflejan en las propiedades de sorción de los alimentos (Figura 2.7). El agua libre o no ligada pertenece a la

zona III esta se encuentra en macrocapilares de un alimento, forma parte de los compuestos de bajo peso molecular, es la más abundante, fácil de congelar, secar ligeramente y evaporar durante el periodo de deshidratación a velocidad constante del alimento de forma natural después de la cosecha, y su eliminación reduce la actividad del agua a 0.8. En la zona II, el agua físicamente ligada se localiza en capas internas y estructurales del alimento (microcapilares), se logra eliminar con procesos de secado y se llegan a obtener valores de a_w hasta 0.25. Finalmente, el agua químicamente ligada en la zona I equivale a las capas monomoleculares y es la más difícil de eliminar mediante los procesos de secado, su presencia ejerce un efecto protector, sobre todo contra las reacciones de oxidación de lípidos, porque actúa como barrera del oxígeno y los alimentos tienen una vida útil máxima (Badui, 2006).

En la Figura 2.7 se observan los cambios que presentan los alimentos en relación a su a_w como son: a) Oxidación de lípidos; b) Reacciones hidrolíticas; c) Oscurecimiento no enzimático; d) Isotherma de adsorción; e) Actividad enzimática; f) Crecimiento de hongos; g) Crecimiento de levaduras, y h) Crecimiento de bacterias. (Roos, 2007) señaló que la a_w es una medida bien establecida para controlar la capacidad del crecimiento de varios microorganismos en los alimentos, así como la temperatura y el pH. Labuza y Altunakar, (2007) mencionan que los límites de los valores críticos de a_w más importantes son 0.6 para el crecimiento de cualquier microorganismo y 0.86 para el crecimiento de bacterias patógenas.

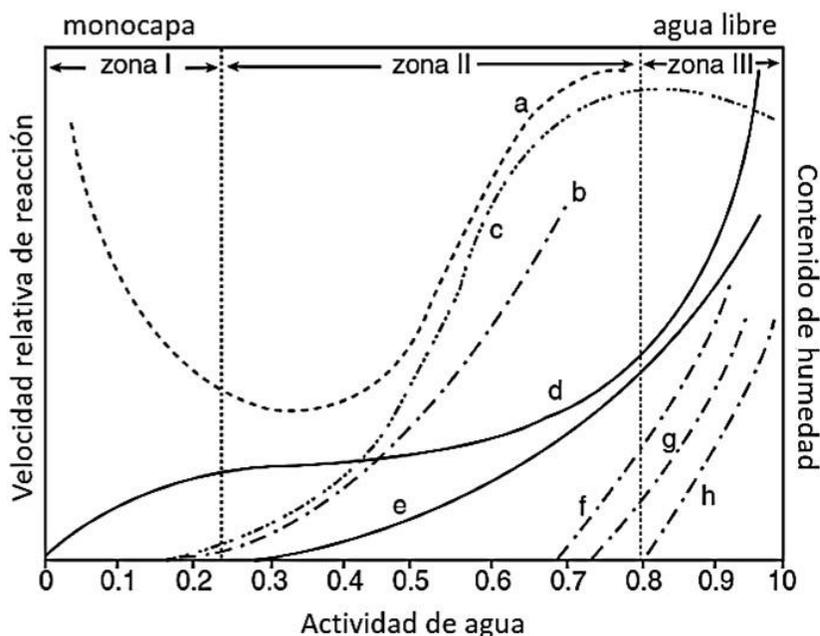


Figura 2.7. Cambios que ocurren en los alimentos en función de la a_w .

El agua contenida en la región de monocapa, es mantenida por fuertes enlaces hidrofílicos en sitios polares del alimento, lo que hace que no se encuentre disponible para solvatar reactantes. En la segunda región de la figura 2.7, el agua se encuentra más débilmente ligada mediante enlaces de hidrógeno dentro de los poros o estructura de la matriz, y su movilidad se incrementa; por lo que la velocidad de reacción (descomposición o degradación) aumenta, ya que el agua actúa como un medio en el cual existe suficiente movilidad de los reactantes, permitiéndoles interactuar por lo tanto el contenido de humedad en los alimentos afecta en la calidad y la actividad microbiana del producto durante el almacenamiento. En la industria alimentaria es muy importante comprender el comportamiento del agua en los alimentos para diseñar estrategias efectivas para su manejo, transporte y almacenamiento. (Vásquez *et al.*, 2013; Badui, 2006).

2.7 Modelo para la cinética de degradación de alimentos

Se ha encontrado que el deterioro de los alimentos generalmente sigue modelos de primer orden en este caso la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de una única especie A y es independiente de las concentraciones de todas las

demás. (Labuza, 1984; Labuza, 1985; Pozo, 1992; Casp y Abirl, 1999). Por lo tanto, la ecuación de la velocidad de reacción será presentada en la ecuación (2).

$$[C_C]=[C_0]\cdot e^{-k\cdot t} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde (k) es el coeficiente de velocidad específica, $[C_0]$ representa la concentración del reactivo A al iniciarse la reacción, es decir, cuando $t=0$, y $[C_C]$ es la concentración del mismo en el instante (t) cualquiera. Existen muchas reacciones que siguen este tipo de comportamiento. Entre ellas son frecuentes las descomposiciones y las isomerizaciones.

Tonon y brabet, (2009) evaluaron la estabilidad antioxidante y antocianinas del jugo de açai en polvo secado por aspersión y determinaron las constantes de velocidad de degradación mediante ecuaciones de primer orden. Matioli y Rodríguez, (2002), Wagner *et al.*, (1995), y Desobry y Labuza (1997), obtuvieron las constantes de velocidad de degradación en licopeno microencapsulado y beta-caroteno, respectivamente observando un comportamiento de primer orden.

Sharma, (1996) estudio la cinética de degradación del licopeno en la pulpa de tomate durante el almacenamiento a diferentes temperaturas con y sin exposición a la luz, la cinética de la degradación del licopeno siguió una reacción de primer orden, la pérdida de licopeno aumenta con la exposición del tomate a la luz y alta temperatura de almacenamiento.

2.8 Síntesis de antecedentes

El extracto seco de *Moringa oleifera* contiene fitoquímicos de interés para la industria farmacéutica y alimentaria debido a su actividad antioxidante (Pinheiro *et al.*, 2008), los cuales desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y que tienen efectos terapéuticos, incluyendo problemas cardiovasculares y algún tipo de cáncer, enfermedades que son de gran incidencia en países desarrollados y en desarrollo (Dillard y German, 2000).

La calidad del alimento puede definirse como la unión de propiedades las cuales se diferencian individualmente y están influenciadas por el grado de aceptabilidad del alimento por el consumidor las hojas de *Moringa oleifera* son una fuente viable de antioxidantes naturales, identificando principalmente, clorofila carotenoides y compuestos fenólicos (Hsu *et al.*, 2006; Price, 2007) sin embargo estos compuestos son susceptibles a la degradación por diferentes factores como son; humedad relativa; temperatura a_w y condiciones de almacenamiento (Merzlyak y Solovchenko 2002; Kader, 2002;) es por ello que es necesario conocer las cinéticas de degradación de los compuestos de interés para determinar su tiempo de vida media y velocidad de degradación mediante ecuaciones primer orden (Gidamis *et al.*, 2003; Sharma, 1996; Yang *et al.*, 2006; Chumark *et al.*, 2008; Labuza y Altunakar, 2007; Singh y Heldman., 2009). para cada alimento en particular hay un intervalo finito de tiempo después de la producción el cual retendrá un nivel seguro de calidad organolépticamente requerida, bajo condiciones de almacenamiento específico (Reilly y Man, 1994; Serris *et al.*, 2001; Tonon *et al.*, 2009).

Hasta el momento no se han encontrado reportes que evalúen la estabilidad de compuestos bioactivos en extractos secos de *Moringa oleifera* durante su almacenamiento tampoco existen datos cinéticos de degradación de compuestos bioactivos durante el almacenamiento de extracto en polvo de *Moringa oleifera*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos de extractos secos de *Moringa oleífera*.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las condiciones de la humedad relativa y la temperatura sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos y la evolución del color durante el almacenamiento de extracto seco de *Moringa oleífera* almacenado en HDPE.
- Evaluar el efecto de la luminosidad sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos y la evolución del color durante el almacenamiento de extracto seco de *Moringa oleífera*.
- Evaluar el efecto de la a_w inicial y de la temperatura sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos y la evolución del color durante el almacenamiento de extracto seco de *Moringa oleífera* almacenado en bolsas metalizadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materia prima

Las hojas de *Moringa oleifera* fueron cosechadas en el estado de Oaxaca. Fueron envueltas en papel absorbente en lotes de 2 kg y guardadas en bolsas para su transporte a la ciudad de Veracruz, Ver., en la unidad de investigación y desarrollo de alimentos (UNIDA) del ITVer donde se refrigeraron a 5 °C hasta su uso posterior. Las bolsas de polietileno de baja densidad y laminadas fueron obtenidas de la empresa ULINE S.A. de C.V.

4.2 Reactivos y solventes

El 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), persulfato de potasio, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, ácido metafosfórico, ácido gálico, Trolox, bicarbonato de sodio y clorofila, se adquirieron en Sigma-Aldrich. El hexano, la acetona y el metanol absoluto fueron adquiridos en J.T. Baker, México; el etanol absoluto, celite, óxido de magnesio, sulfato de sodio anhidro, cloruro de sodio y carbonato de potasio en Reactivos Golden Bell. Todos los solventes utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

4.3 Secado de hojas de moringa

Para realizar el secado de hojas de Moringa se utilizó el secador por lecho fluidizado Apex Modelo SSE65 (Figura 4.1). Se colocaron 150 g de hoja fresca en el secador controlando la temperatura a 55°C y velocidad del aire 1.5 m/s según lo descrito por (Pérez, 2013).



Figura 4.1. Secador de lecho fluidizado por lote marca Apex.

4.4 Obtención del extracto

Se realizó una extracción multietapas a contracorriente utilizando como solvente de extracción etanol-agua (80:20 p/p). Se utilizó un agitador modelo MaxQ4450 (Figura 4.2), a 150 rpm y 57 °C durante 120 minutos (Vázquez, 2013), el extracto se almacenó en garrafas de 20 L a -32 °C en un ultra-congelador hasta su uso posterior.



Figura 4.2. Agitador modelo MaxQ4450.

4.5 Secado por aspersión

El extracto se deshidrató mediante un secador por aspersión (BÜCHI B-290) acoplado a una bomba de calor (BÜCHI B-295) y un equipo deshumidificador (BÜCHI B-296), utilizando como gas inerte nitrógeno. Las temperaturas de entrada y salida de secado fueron 140 °C y 60 °C respectivamente. El material de soporte utilizado fue maltodextrina DE10 y sílice en una relación 1:3, por cada gramo de sólidos en el extracto alimentado al secador por aspersión.

4.6 Acondicionamiento de la muestra y almacenamiento

El polvo se empacó en dos materiales diferentes: polietileno de baja densidad (LDPE) y película metalizada (PM). Se colocaron aproximadamente 4 g del polvo en cada bolsa (180 bolsas LDPE y 180 bolsas PM). Todas las muestras se empacaron al vacío con una selladora Food and saver F3830.

4.6.1 Modificación de la Humedad relativa

Se utilizó una solución sobresaturada de carbonato de potasio (K_2CO_3) y NaCl para mantener una atmosfera con una humedad relativa del 40% y 80% respectivamente en un recipiente hermético. Para corroborar la humedad relativa se tomó una pequeña muestra de la solución sobresaturada y se midió la a_w en un equipo AQUALAB, DECAGON, Devices, modelo Series 3.

4.6.2 Modificación de la a_w de la muestra

Se utilizó una solución sobresaturada de K_2CO_3 , la cual junto con las muestras fue colocada en un desecador hasta que estas alcanzaron la a_w de 0.4. Para verificar la actividad

de agua final de las muestras se tomó aproximadamente 1 g y se midió su a_w en un equipo AQUALAB, DECAGON, Devices, modelo Series 3.

4.6.3 Almacenamiento

Las muestras fueron almacenadas bajo diferentes condiciones y empaques:

- Empacadas en película metalizada: se almacenaron a tres temperaturas 5 °C (refrigeración), 22 °C (ambiente climatizado) y 40 °C (incubadora BERTUZZI, modelo 2100).
- Muestras empacadas en LDPE: fueron mantenidas a dos humedades relativas 40 % (K_2CO_3) y 80% (NaCl) a 5 °C, 22 °C y 40°C.



Figura 4.3. Extractos secos de moringa almacenados en empaque de polietileno de alta densidad a diferentes humedades relativas (HR).

- Otro grupo de muestras se almacenaron en polietileno de baja densidad (LDPE) fueron expuestas a diferentes niveles de luminosidad: 1300 Lux (luz natural), 300 Lux (luz artificial) 0 Lux (obscuridad). Todas las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (22 °C).

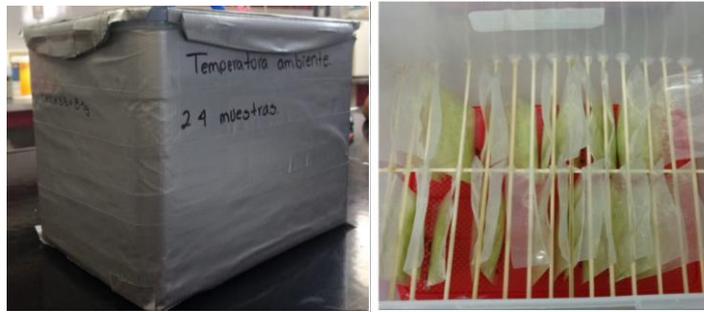


Figura 4.4. Extractos secos de moringa almacenados en empaque de polietileno de alta densidad a diferentes niveles de luz y temperatura ambiente.

4.7 Análisis físicos y químicos

Los análisis realizados fueron: actividad antirradical por los métodos ABTS y DPPH, determinación de clorofila, carotenoides, y fenoles. El muestreo se realizó cada 15 días durante seis meses, tomando como tiempo cero el día 1. Las determinaciones se realizan a partir de un extracto, el cual se obtuvo a partir de 0.5 g de polvo disuelto en 25 mL de metanol-agua al 80%(p/p), sónicado por 30 min y posteriormente filtrado con papel filtro Whatman No. 4. Para las determinaciones de humedad, color y a_w se utilizó una muestra en polvo tomada directamente del empaque en el que fue almacenada.

4.7.1 Determinación del contenido de sólidos

Se tomaron dos alícuotas de 5 mL del extracto a secar. Se concentraron en un rotaevaporador R-200/205 a una presión manométrica de 170 mbar y 40 mbar a una temperatura del baño a 40 ± 1 °C. Finalmente se llevó a peso constante en la estufa a 60 ± 1 °C y presión manométrica de 600 mbar. El porcentaje de sólidos se calculó por diferencia de peso. Se realizó la determinación de sólidos en el extracto ya que a partir de esta información se calculó la cantidad de material de soporte a adicionar al extracto.

4.7.2 Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo a lo descrito por Chumark *et al.* (2008). Se tomaron 100 μ L de extracto y adicióno 6 mL de agua destilada, se agitó durante 10 s. Se adicionaron 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se mezcló por 20 segundos. Después de 5 min, a la mezcla se adicionó 1.5 mL de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 20% previamente realizada y se volvió a agitar la mezcla. Finalmente, la mezcla se llevó a 10 mL con agua destilada.

La solución se dejó reposar durante 2 h en una incubadora a 25 ± 1 °C, tiempo estimado en que la reacción llega al equilibrio y posteriormente se realizaron las lecturas espectrofotométricas a 765 nm. La curva de calibración se realizó con una solución stock de ácido gálico con el disolvente de extracción (metanol al 80%) a 1 mg/mL que se diluyó para obtener 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 mg/mL. El blanco se preparó con todos los reactivos a excepción de la muestra que fue sustituida por el disolvente de extracción. Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de base seca del extracto (mg EAG/100 g bs).

4.7.3 Cuantificación de compuestos fenólicos por UHPLC

La cuantificación de los compuestos fenólicos seleccionados como referencia se realizó en las muestras almacenadas bajo las condiciones descritas en la sección 4.6.3. Se extrajeron muestras de cada uno de los extractos secos de moringa (0.25 g) usando 25 mL de una mezcla 80:20 (v/v) de metanol: agua. Cada muestra se sonicó en un procesador ultrasónico (Hielscher Ultrasonics Gmb; mod. UP200S; Berlin, Alemania) operado a 200 W y 24 kHz durante 10 min a 30 °C. Todas las muestras obtenidas a partir del extracto seco, y una alícuota del extracto de moringa alimentado al secador, se filtraron con un filtro de jeringa de nylon de 0.2 μ m (Membrane Solutions; Dallas, EE. UU.) y se analizaron 3.0 μ L mediante un sistema UHPLC (Waters Corp., ACQUITY™, UHPLC™ H-Class; Milford, MA, EE. UU.) para determinar la concentración de compuestos fenólicos. El sistema UHPLC estaba equipado con un sistema de bomba cuaternaria, un muestreador automático con control de temperatura ajustado a 15 °C, un horno de columna ajustado a 47 °C para la separación cromatográfica y un detector de

matriz de fotodiodos (Waters Corp., PDA100; Milford, MA, EE. UU.). El software Empower3™ (Waters Corp.; Milford, MA, EE. UU.) se usó para controlar el equipo y para la adquisición de datos. La columna analítica fue una Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno, 1.7 µm de tamaño de partícula). El detector PDA se estableció en el rango de longitud de onda de 200-400 nm para el escaneo 3D, con una tasa de recopilación de datos de 40 pts·s⁻¹ para la identificación de los compuestos. Para las integraciones de los picos y la cuantificación de los compuestos, el detector PDA se ajustó a 260 nm. Se empleó un método cromatográfico reportado previamente por Ruiz-Rodríguez *et al.*, (2017). La fase móvil fue agua acidificada (ácido acético al 2%, disolvente A) y acetonitrilo acidificado (ácido acético al 2%, disolvente B), y se usó un flujo de disolvente de 0.6 mL·min⁻¹. El gradiente utilizado para la separación cromatográfica fue el siguiente (tiempo, disolvente B): 0 min, 0%; 3.0 min, 5%; 4.0 min, 10%; 4.5 min, 10%; 5.0 min, 20%; 7.0 min, 20%; 8.0 min, 30%; 10.0 min, 30%; seguido de un lavado de la columna de 5 min con 100% de B. La identificación de compuestos fenólicos en las muestras se logró inicialmente comparando los tiempos de retención y los espectros de absorción UV-Vis con los del estándar. Los compuestos fenólicos individuales (quercetina-3-rutinósido y kaempferol-3glucósido) se cuantificaron basándose en el área detectada del pico de las muestras frente a sus respectivas curvas de calibración del estándar puro (Apéndice C). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

4.7.4 Evaluación de la actividad antirradical por ABTS

Para la formación de radicales, a una solución acuosa de persulfato de potasio (0.0066 g en 5 mL) se le adicionó una solución de ABTS (0.0384 g en 5 mL de agua) y se dejó en oscuridad durante 16 h a 25 ± 1 °C. Esta solución se diluyó con etanol absoluto hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ± 0.05 a 734 nm, en una proporción radical ABTS: etanol absoluto de 1:100. Para la determinación se colocaron 980 µL del radical diluido y se adicionaron 20 µL de extracto, después de 7 minutos se midió la absorbancia a 734 nm (Re *et al.*, 1999). La solución testigo se obtuvo añadiendo 20 µL del disolvente de extracción en lugar del extracto. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%AAR = \left[1 - \frac{Am}{Ar} \right] 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde AAR es la actividad antirradical, Am la absorbancia de las muestras y Ar la absorbancia del blanco. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de Trolox por cada 100 g de base seca del extracto (mg ET/100 g bs). La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución stock de Trolox en metanol al 80% de 1 mg/mL, la cual se diluyó con el mismo disolvente para obtener 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 mg/mL de concentración.

4.7.5 Evaluación de la actividad antirradical por DPPH

La determinación se realizó con 3.9 mL de solución de DPPH (1,1-difenil-2picrilhidrazilo) (concentración: 0.025 mg/mL MetOH) y 0.1 mL de extracto, según lo descrito por Siddhuraju y Becker, (2003). La mezcla se dejó incubar en la oscuridad durante 90 minutos a 25 ± 1 °C. La disminución en la absorbancia se midió a 517 nm. La solución de referencia se preparó con 0.1 mL del disolvente de extracción en lugar del extracto y 3.9 mL de solución de DPPH.

El porcentaje de inhibición se calcularon mediante la Ec. 3 y los resultados se expresa como miligramos equivalentes de Trolox por cada 100 g de base seca del extracto (mg ET/100 g bs).

4.7.6 Determinación del contenido de carotenoides totales

La extracción, separación y cuantificación de carotenoides totales en las muestras secas obtenidas por secado por aspersion y de los productos deshidratados se realizó de acuerdo a la siguiente metodología descrita por Ranganna (1999) y por Rodríguez (2001) se pesó una porción de 0.5 g de la muestra seca, se adicionaron 20 mL de una mezcla de acetona-hexano (30:70) en un matraz erlenmeyer para sonicar inmediatamente durante 15 min, posteriormente decantar el sobrenadante y particionar en un embudo de separación haciendo lavados con agua saturada con NaCl para remover la acetona y material de soporte. Se recuperó la fase superior y se reconstituyó con hexano a 20 mL, se colocaron los 20 mL de extracto en un embudo de separación y se adicionaron en una relación 1:1 v/v una solución metanolica de hidróxido de potasio al 20 % para separar bandas de xantofilas, productos de la oxidación de carotenos, y clorofilas las cuales permanecerán en la parte inferior del embudo

de separación y en la parte superior carotenoides. Se recuperó la fase superior y se reconstituyó con hexano, se midió la absorbancia a 445 nm.

La técnica se basa en que la mayoría de los carotenoides exhiben una absorción en la región visible del espectro entre 400 y 500 nm y al obedecer la ley de Lambert-Beer (es decir, la absorbancia es linealmente proporcional a la concentración), las mediciones de absorbancia se pueden usar para cuantificar la concentración de un carotenoide puro (estándar) o para estimar la concentración de carotenoides totales contenidos en una mezcla o extracto.

Cálculos

$$Ca = \frac{[A_{Total} * v * 10000]}{w2500} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

Ca = Concentración de carotenoides (mg/g)

v = Volumen (ml)

A_{Total} = Absorbancia de la muestra

w = Gramos de muestra (g)

4.7.7 Determinación del contenido de clorofila

La determinación de clorofila a y b se realizó con base en el procedimiento descrito por (Handsman 1973), con ligeras modificaciones. Se preparó un extracto de la muestra, para lo cual se pesó una porción de 0.5 g de la muestra seca, se adicionaron 25 mL de una mezcla de acetona-hexano (30:70) en un matraz erlenmeyer para sonicar inmediatamente durante 25 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y se particionó en un embudo de separación haciendo lavados con agua saturada con NaCl para remover la acetona y material de soporte. Se recuperó la fase superior y se reconstituyó con hexano a 25 mL, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una absorbancia alrededor de 0.8 a 665 nm. Para clorofila a y como blanco se empleó hexano en lugar del extracto. Los resultados se expresan en mg/mL de muestra.

La cuantificación de clorofilas se realiza aplicando las Ec. 5 (Vernon, 1960), expresada en mg/L.

$$\text{Clorofila } a = 25.38A_{662} + 3.64A_{645} \quad \text{Ec.5}$$

Dónde: *A* corresponde a la absorbancia de la muestra.

4.7.8 Determinación del contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad de las muestras se realizó mediante el método gravimétrico indirecto de estufa al vacío propuesto por la AOAC 32.1.03. (2006). Se tomaron muestras de aproximadamente 1 ± 0.1 g y se colocaron en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante y se introdujeron a una estufa de vacío a 60 °C con una presión de 600 mbar, donde las muestras se mantuvieron hasta llegar a peso constante; posteriormente, fueron retiradas de la estufa, enfriadas en un desecador y pesadas empleando una balanza analítica (OHAUS modelo AR2140).

4.7.9 Determinación de la actividad de agua

La actividad de agua en las muestras deshidratadas se determinó a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), se tomaron muestras de 0.5 ± 0.1 g, y se colocaron en charolas de plástico las cuales se introdujeron a un medidor de actividad de agua (AQUALAB, DECAGON, Devices, modelo Series 3).

4.7.10 Determinación de color

La determinación de color se realizó durante seis meses cada 15 días por medio de un

colorímetro Hunter Lab con una escala CIE Lab y se reportan mediante los parámetros. **L**, **a**, **b**, **H** y **C**.

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Ec.6}$$

$$H = \arctan \frac{b}{a} \quad \text{Ec.7}$$

4.8 Cinéticas de degradación

Con los datos obtenidos y por medio de ecuaciones de primer orden (Ec. 2, 8 y 9) se obtuvo la cinética de degradación de los compuestos de interés: carotenoides, fenoles totales, clorofila y la actividad antirradical mediante ensayos ABTS y DPPH, así como la evolución de la a_w y color en el producto.

$$k = f(T, L, a_w) \quad \text{Ec. 8}$$

$$C_c = C_0 e^{-kt} \quad \text{Ec.9}$$

Donde C_c es la concentración del compuesto, k constante de primer orden (día^{-1}) la cual puede estar en función de diferentes variables (Temperatura T , luminosidad L y a_w ; t es el tiempo expresado en días, para obtener el valor de k se traza la recta de mínimos cuadrados que se ajusta a los valores experimentales, representando el logaritmo de la concentración en función del tiempo, dando como resultado una recta cuya pendiente es $-k$.

4.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental 3 x 2 con dos repeticiones para cada tratamiento almacenado en película metalizada. La temperatura y a_w fueron las variables independientes evaluadas en diferentes niveles (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Niveles de temperatura y a_w evaluados durante el almacenamiento de extracto en polvo de Moringa oleífera en bolsas metalizadas.

Temperatura (° C)	5		22		40	
a_w	0.35	0.39	0.35	0.39	0.35	0.39

Para las muestras almacenadas en bolsas de polietileno se evaluó el efecto de la HR y temperatura de almacenamiento en diferentes niveles (Tabla 4.2), se utilizó un diseño factorial completo 3*2 con dos repeticiones para cada tratamiento. La HR y temperatura fueron las variables independientes.

Tabla 4.2. Niveles de temperatura y HR evaluados durante el almacenamiento de extracto en polvo de Moringa oleífera en bolsas de polietileno.

Temperatura (° C)	5		22		40	
%HR	40	80	40	80	40	80

Para evaluar el efecto de la luz sobre la degradación de los compuestos bioactivos almacenados a temperatura ambiente en bolsas de polietileno, se utilizó un diseño factorial completo 2*2. La a_w y la luminosidad fueron las variables independientes evaluadas en diferentes niveles (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Condiciones de luminosidad evaluadas durante el almacenamiento de extracto en polvo de *Moringa oleifera* en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

Oscuridad	Luz visible	Luz natural
Temperatura ambiente		

Las variables de respuesta para todos los tratamientos fueron fenoles totales, kaempferol 3 glucósido, quercetina 3 rutinosido, actividad antirradical determinada por ensayos ABTS y por DPPH, carotenoides, clorofila, a_w , color y humedad, estas determinaciones se realizaron durante un periodo de 6 meses cada 15 días. Cada tratamiento fue realizado por duplicado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de almacenamiento de extractos secos de moringa obtenido mediante secado por aspersion en ciclo cerrado empleando nitrógeno. Se evaluó el efecto de la temperatura, humedad relativa y la exposición a la luz sobre la evolución de la concentración de los compuestos bioactivos seleccionados como referencia. A continuación, se discuten los resultados obtenidos.

5.1 Cinética de degradación

El orden de reacción y las constantes de velocidad de la degradación de compuestos fenólicos, clorofila, carotenoides y actividad antioxidante se calculó, a partir de los datos experimentales de concentración versus tiempo de almacenamiento; realizando un análisis de regresión lineal simple, para un modelo cinético de primer orden y (Ec. 11). Se determinaron los valores de tiempo de vida media correspondientes, en función de la constante cinética obtenida a partir de la regresión lineal.

Para determinar el tiempo de vida media ($t_{\frac{1}{2}}$) de cada compuesto a una temperatura específica se utilizó la ecuación (Ec. 11).

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Ec.11})$$

5.1.1 Efecto del tipo de luz sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos

En las figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 5.5, 5.6 y 5.7 se muestran las cinéticas de degradación de AAR mediante ensayos ABTS y DPPH, fenoles totales, clorofila, carotenoides totales, quercetina 3 rutinosido y kampferol 3 glucósido respectivamente, en polvo de moringa oleífera almacenado a diferentes niveles de luz: obscuridad, luz artificial y luz natural. Los datos experimentales mostraron un ajuste a una cinética de primer orden.

5.1.2 Evolución de la AAR por ensayos ABTS y DPPH durante el almacenamiento a obscuridad, luz artificial y luz natural de extracto seco de Moringa Oleífera

En las figuras 5.1 y 5.2, se muestran las cinéticas de degradación de la actividad antioxidante del extracto seco de moringa oleífera determinado mediante ensayos ABTS Y DPPH. La constante de velocidad de degradación aumenta con respecto a los días de almacenamiento en los tres tratamientos. Sin embargo, los tratamientos expuestos a luz artificial y natural presentan una constante de velocidad degradación mayor con respecto a la constante obtenida del tratamiento almacenado en condiciones de obscuridad, debido a que la presencia de luz en el almacenamiento es un activador en reacciones de degradación lo cual indica la presencia de metabolitos secundarios y productos de degradación en el producto final como lo reportó (Golman *et al.*, 1983).

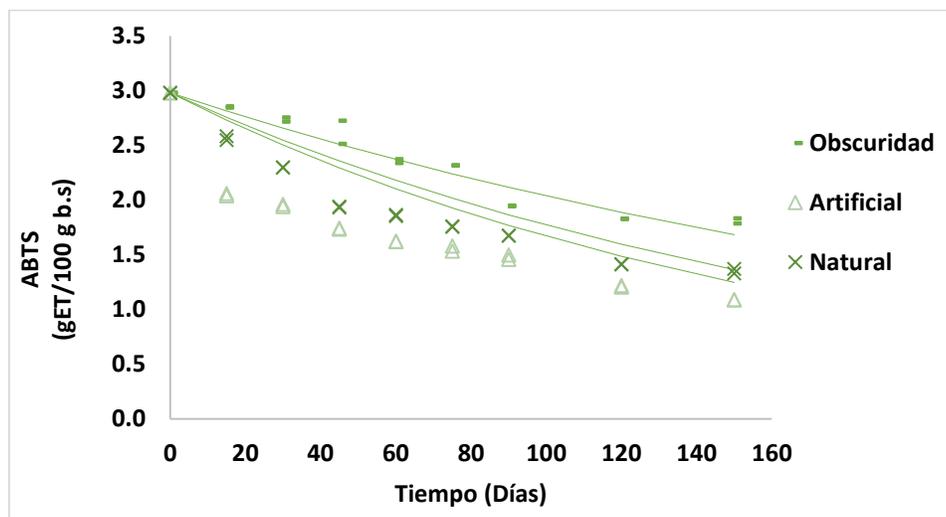


Figura 5.1. Cinética de degradación de la actividad antioxidante en extracto seco de moringa oleífera, mediante ensayo ABTS almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

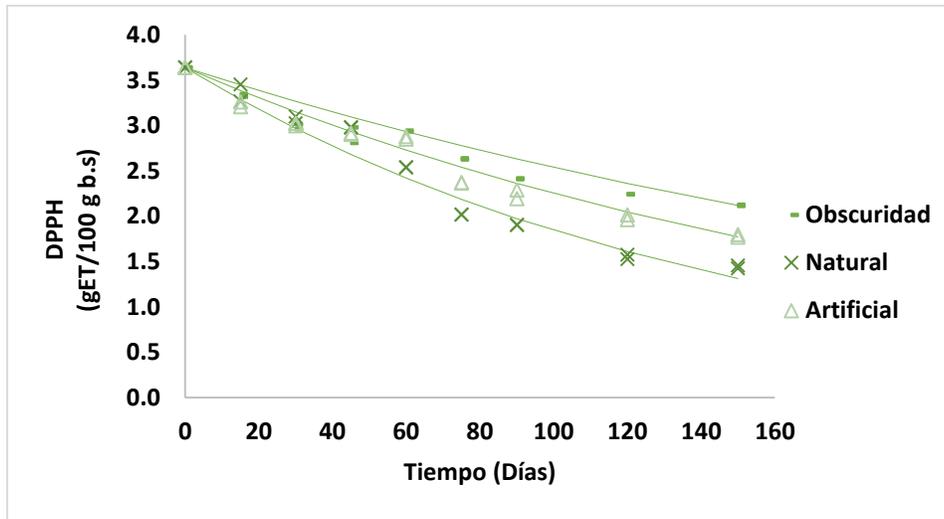


Figura 5.2. Cinética de degradación de la actividad antioxidante en extracto seco de moringa oleífera, mediante ensayo ABTS almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

En la tabla 5.1 se presentan la regresión lineal de AAR por ensayos ABTS y DPPH a partir de los datos experimentales obtenidos de concentración versus tiempo y el tiempo de vida media calculado a partir de la ecuación 11, el tratamiento con mayor retención de actividad antioxidante y por lo tanto de vida media es el almacenado bajo condiciones de oscuridad debido al contenido de compuestos fotosensibles en el extracto, la luz solar tiene fotones energéticos de longitudes de onda más corta, del ultravioleta. Estos fotones son perjudiciales a causa de sus interacciones destructivas con moléculas celulares. Se sabe sobradamente que la luz intensa perturba los procesos metabólicos de las plantas y alimentos (Gold y Galdwell, 1983).

Tabla 5.1. Coeficientes de regresión lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la AAR por ensayos ABTS y DPPH de los tratamientos almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

Tratamientos			DPPH		ABTS	
Empaque	T (°C)	Luz	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)
HDPE	22	Oscuridad	0.9547	192	0.9382	182
HDPE	22	Artificial	0.974	144	0.9083	120
HDPE	22	Natural	0.966	101	0.9392	133

Tabla 5.2. Constantes de velocidad de degradación de la AAR por ensayos ABTS y DPPH de los tratamientos almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

Tratamientos			ABTS	DPPH
Empaque	T (°C)	Luz	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)
HDPE	22	Oscuridad	3.6×10^{-3} ^{efg}	3.4×10^{-3} ^{efg}
HDPE	22	Artificial	4.8×10^{-3} ^c	4.2×10^{-3} ^{cd}
HDPE	22	Natural	6.8×10^{-3} ^d	5.8×10^{-3} ^{bcd}

En la tabla 5.2 se muestran las medias de los duplicados de las constantes de velocidad de degradación para la AAR por ensayos ABTS y DPPH. Los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) unos de otros entre los tratamientos.

5.1.3 Evolución de la concentración de fenoles totales, clorofila, carotenoides totales, quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido

En las figuras 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8, se muestran las cinéticas de degradación de fenoles totales, clorofila, carotenoides totales, quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucosido. en extracto seco de moringa oleífera.

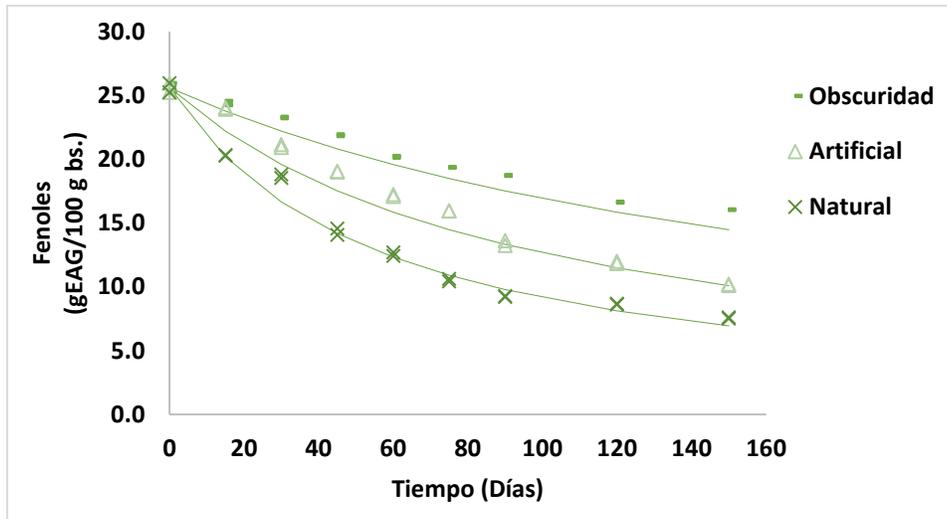


Figura 5.3. Cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto diferentes tipos de luz.

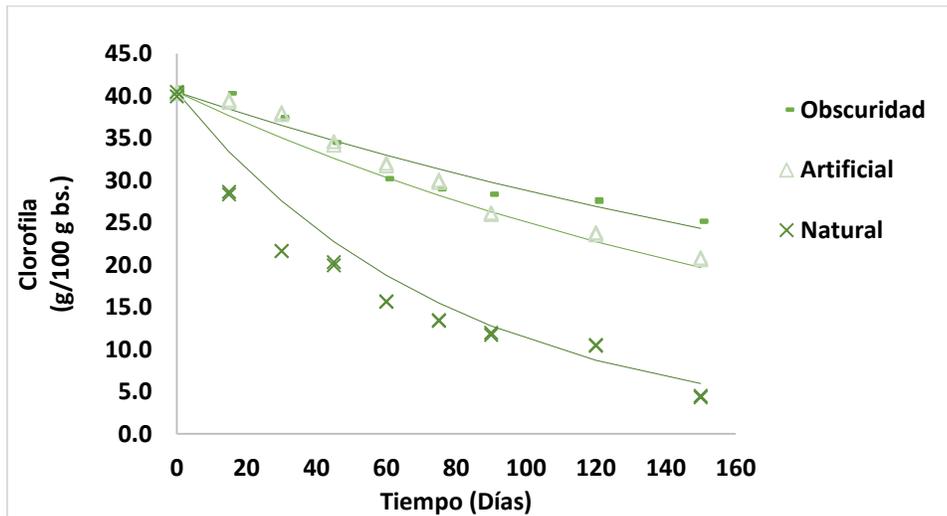


Figura 5.4. Cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto diferentes tipos de luz.

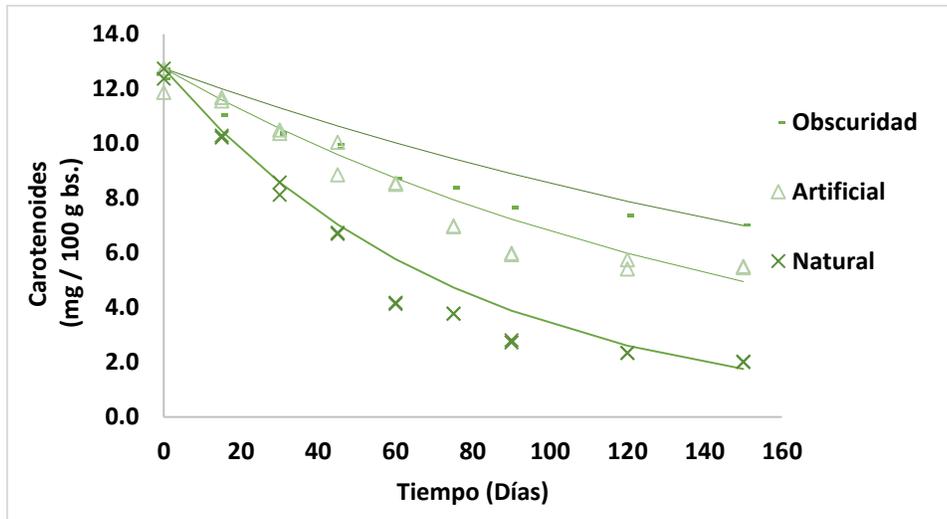


Figura 5.5. Cinética de degradación de carotenoides totales en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto diferentes tipos de luz.

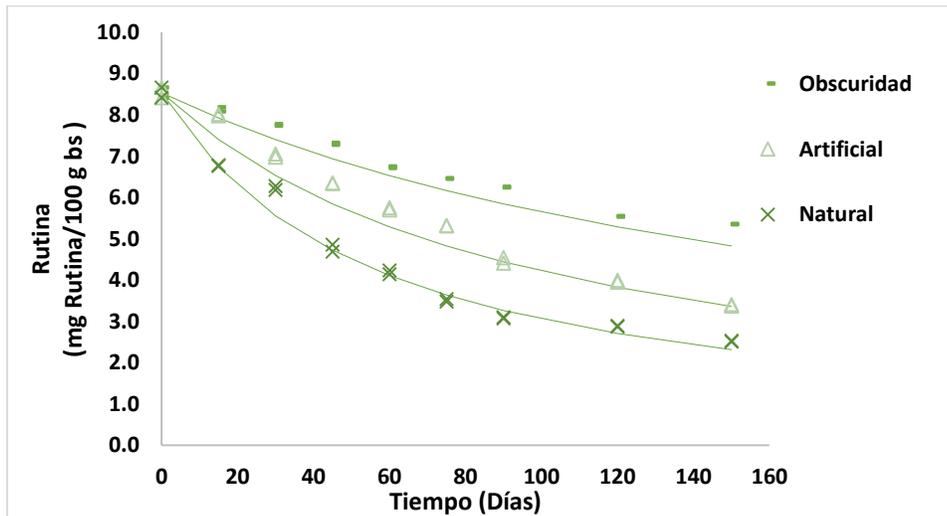


Figura 5.6. Cinética de degradación de quercetina 3 rutinosido en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

Resultados y discusión

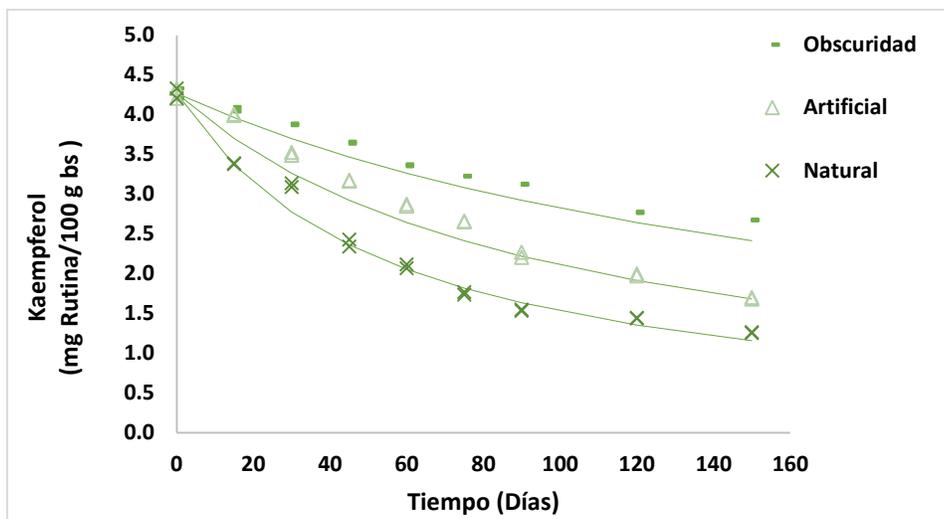


Figura 5.7. Cinética de degradación de kaempferol 3 glucosido en extracto seco de moringa oleífera, almacenado a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

Tabla 5.3. Coeficientes de correlación egresión lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de clorofila, carotenoides y fenoles totales almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

Tratamientos		Clorofila		Fenoles totales		Carotenoides totales	
Empaque	Tratamiento	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)
HDPE	Obscuridad	0.951	203	0.9803	203	0.9291	232
HDPE	Artificial	0.9855	144	0.9902	108	0.9254	147
HDPE	Natural	0.9176	54	0.9282	84	0.9427	70

En tabla 5.4 se muestran las medias de los duplicados de las constantes de velocidad de degradación de clorofila, fenoles y carotenoides totales. Los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) unos de otros.

Resultados y discusión

Tabla 5.4. Constantes de velocidad de clorofila carotenoides y fenoles totales almacenados a temperatura ambiente, en empaque de HDPE y expuesto a diferentes tipos de luz.

Tratamientos		Carotenoides totales	Clorofila	Fenoles totales	Quercetina	kampferol	
Empaque	T (°C)	Luz	k (día ⁻¹)				
HDPE	22	Obscuridad	3.4x10 ⁻³ ^d	3.3x10 ⁻³ ^{ef}	3.1x10 ⁻³ ^{ef}	4x10 ⁻³ ^g	3.4x10 ⁻³ ^{efg}
HDPE	22	Artificial	4.8x10 ⁻³ ^c	6.2x10 ⁻³ ^c	6.2x10 ⁻³ ^{bc}	6.3x10 ⁻³ ^e	6.4x10 ⁻³ ^c
HDPE	22	Natural	1.27x10 ⁻² ^b	8.2x10 ⁻³ ^b	8x10 ⁻³ ^b	1.32x10 ⁻² ^b	8.3x10 ⁻³ ^b

Las muestras almacenadas en la oscuridad mostraron constantes de velocidad de degradación entre 0.0034 y 0.004 día⁻¹ lo que indica mayor tiempo de vida media y menores porcentajes de degradación de fenoles totales, carotenoides totales, clorofila, quercetina, kampferol y actividad antirradical, seguidas de muestras que se expusieron a la luz visible (310 lux / día). Para los tratamientos expuestos a luz natural a los 60 días, se produjo una degradación de carotenoides y clorofila (a) de hasta el 50% esto debido a que la luz natural, pueden activar varios mecanismos de reacción que conllevan a la degradación del alimento y en consecuencia de estos mecanismos, pueden alterarse alimentos a magnitudes semejantes a la que son rechazados por el consumidor. Los carotenoides presentan una constante de velocidad de degradación mayor a la de la clorofila como lo reportan Merzlyak y Solovchenko, 2002 consideran que las clorofilas pueden influir sobre la degradación de algunos carotenoides durante su exposición a la luz; es decir, los carotenoides pueden presentar una mayor estabilidad a la luz en ausencia de estos pigmentos.

5.1.4 Evolución de la a_w durante el almacenamiento de extracto seco de moringa

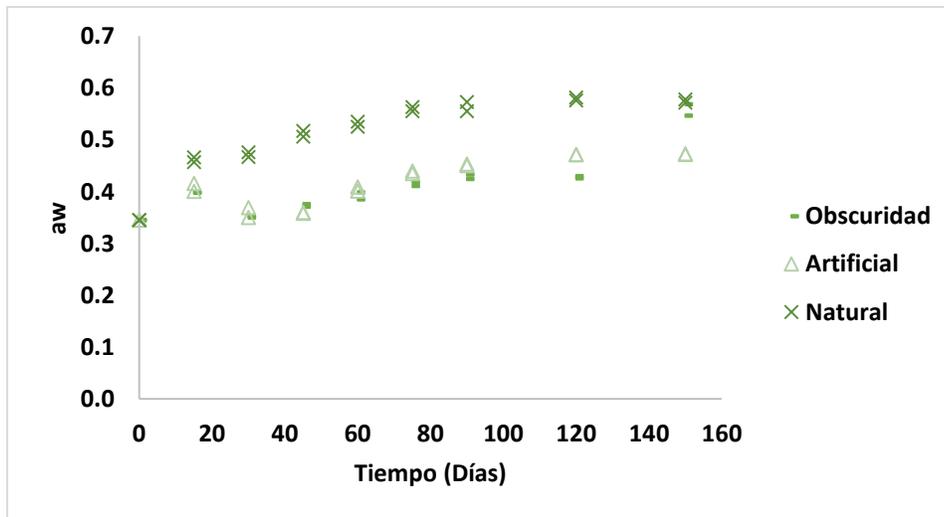


Figura 5.8. Evolución de la a_w durante el almacenamiento de extracto seco de moringa almacenado en HDPE y diferentes tipos de luz.

La a_w es un indicador útil de la estabilidad del producto y de la actividad microbiana Man y Jones, (1997), describen que, durante el proceso y almacenamiento de los alimentos, ocurren varios cambios químicos donde está involucrada la a_w . El ANOVA no muestra diferencia significativa entre los tratamientos expuestos a obscuridad y luz artificial, pero si para los tratamientos expuestos a luz natural, obteniendo una a_w de 0.57 lo que indica una velocidad de degradación mayor causando cambios que pueden causar la deterioración del alimento y reducción de la vida útil.

En tabla 5.5 se presentan los resultados obtenidos para los diferentes parámetros de color determinados por el método CIELab, al inicio y después de 150 días de almacenamiento de cada tratamiento. se muestran las medias de los duplicados y la desviación.

Tabla 5.5. Efecto del tipo de luz sobre la evolución de color en las muestras secas de *Moringa oleífera*.

Experimento	L	*a	*b	C
Inicial	71.49±0.873	-5.67±0.304	29.13±0.503	29.66±0.678
Oscuridad	71.23±0.17	-4.32±0.1	27.22±0.21	27.32±0.33
Artificial	72.98±0.17	-2.29±0.16	23.23±0.23	23.34±0.22
Natural	51.23±0.41	-0.61±0.13	18.83±0.41	18.83±0.41

Los resultados muestran diferencia significativa entre los tratamientos, el tratamiento expuesto a luz natural tuvo efecto en todos los parámetros evaluados con respecto a la muestra inicial obteniendo un producto oscuro debido a reacciones de oxidación de la clorofila e isomerización de carotenoides, el tratamiento expuesto a luz artificial tuvo diferencia significativa en el parámetro a* dando como resultado un producto pálido, mientras que el tratamiento almacenado a la oscuridad mantuvo los parámetros iniciales como se muestra en la figura 5.9.

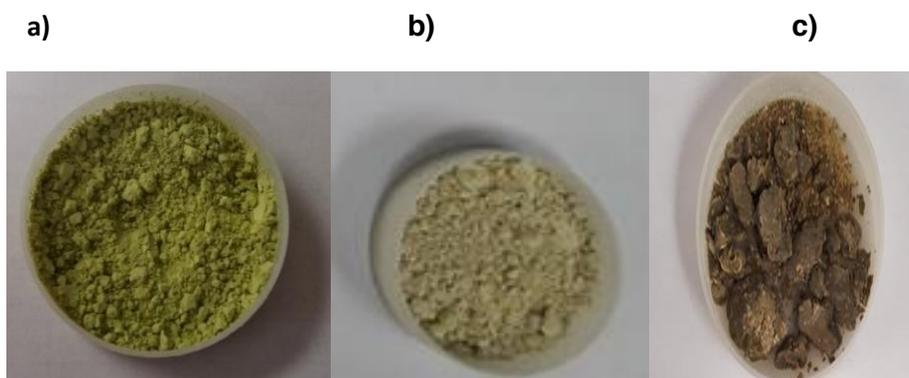


Figura 5.9. Muestras almacenadas a temperatura ambiente: (a) obscuridad (b) luz artificial y (c) luz natural, después de 150 días de almacenamiento.

5.2 Efecto de la HR y temperatura sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos

Los extractos etanólicos de hojas de moringa, que se secaron por aspersion, se almacenaron de acuerdo a las condiciones planteadas: empaque de polietileno de alta densidad al vacío y tres temperaturas: 5 °C, 22 °C y 40 °C y dos % de humedad relativa: 40 y 80%, antes de ser almacenados los polvos fueron caracterizados por las variables de respuesta a seguir.

A partir del análisis estadístico es posible inferir que el contenido de compuestos bioactivos de referencia (fenoles totales, clorofila, carotenoides totales y clorofila quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido) se degradan a una mayor velocidad a humedades relativas entre 60% y 80% y a temperaturas mayores a 35 °C. Este fenómeno ha sido ampliamente reportado por otros autores (Fang *et al.*, 2011, Yan-li Xie *et al.*, 2006) quienes concluyen que a mayor porcentaje de humedad relativa y mayor temperatura la velocidad de degradación aumenta es importante que ninguno de estos autores utiliza algún material de empaque para la protección del producto almacenado.

5.2.1 Evolución de la AAR por ensayo ABTS durante el almacenamiento de extracto seco de moringa a diferente HR, temperatura en empaque de HDPE

La actividad antirradical de las muestras almacenadas bajo condiciones de temperatura y HR fue medida por ensayos ABTS y DPPH, los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 5.10 y 5.11.

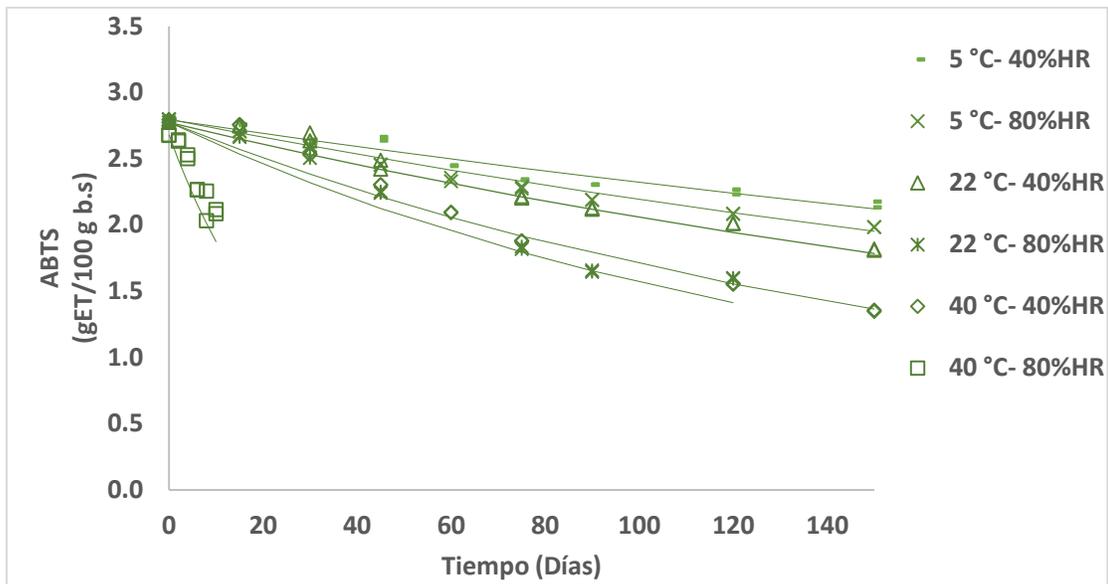


Figura 5.10. Efecto de la HR y temperatura sobre la cinética de degradación de la AAR en extracto seco de moringa mediante ensayo ABTS.

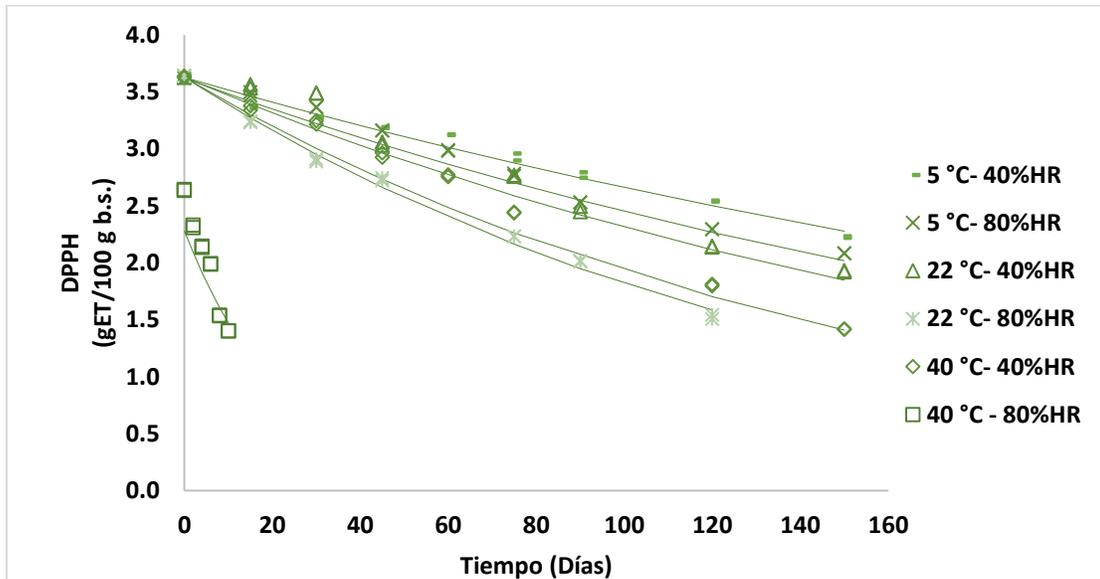


Figura 5.11. Efecto de la HR y temperatura sobre la degradación de AAR en extracto seco de moringa mediante ensayo DPPH.

Resultados y discusión

Se realizó el análisis de varianza multivariado (MANOVA) para determinar el efecto significativo de la humedad relativa y temperatura sobre la AAR, la temperatura y HR mostró tener efecto significativo ($p < 0.05$) sobre las constantes de velocidad de degradación por ensayos ABTS y DPPH, sin embargo, las constantes de velocidad de degradación por ensayo ABTS son menores a las de DPPH, debido a la naturaleza con los compuestos que reacciona el ABTS, actúa con compuestos altamente hidroxilados y liposolubles. .

Tabla 5.6. Coeficientes de correlación lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la actividad antioxidante para cada nivel de HR y temperatura en HDPE.

Tratamientos			DPPH		ABTS	
Empaque	T (°C)	%HR	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)
HDPE	5	40	0.9806	223	0.9437	315
HDPE	5	80	0.9907	177	0.9816	238
HDPE	22	40	0.9834	155	0.9833	192
HDPE	22	80	0.9913	100	0.9813	97
HDPE	40	40	0.9856	110	0.9816	115
HDPE	40	80	0.8853	9	0.9601	20

En tabla 5.7 se muestran las medias de los duplicados de las constantes de velocidad de degradación de la AAR por ensayos ABTS y DPPH, con base a las constantes de velocidad obtenidas para cada compuesto se determinó la $t_{1/2}$. (Tabla 5.6) Los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) unos de otros.

Tabla 5.7. Constante de velocidad de degradación de actividad antioxidante por ensayos ABTS y DPPH para cada nivel de HR y temperatura en HDPE.

Tratamientos			ABTS	DPPH
Empaque	T (°C)	%HR	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)
HDPE	5	40	$3.1 \times 10^{-3}{}^{gh}$	$2.2 \times 10^{-3}{}^{gh}$
HDPE	5	80	$3.9 \times 10^{-3}{}^{def}$	$2.9 \times 10^{-3}{}^{fgh}$
HDPE	22	40	$4.6 \times 10^{-3}{}^{cd}$	$3.6 \times 10^{-3}{}^{efg}$
HDPE	22	80	$6.9 \times 10^{-3}{}^b$	$6.1 \times 10^{-3}{}^b$
HDPE	40	40	$6.3 \times 10^{-3}{}^b$	$6 \times 10^{-3}{}^{bc}$
HDPE	40	80	$7.84 \times 10^{-2}{}^a$	$5.35 \times 10^{-2}{}^a$

Las constantes de velocidad de la actividad antioxidante por ensayos ABTS y DPPH en extracto seco de moringa son menores a temperatura de 5 °C resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por Ersus y Yurdagel, (2007) quienes estudiaron la estabilidad antioxidante de zanahoria negra y verificó una pérdida del 33% después de 64 días de almacenamiento a 25 ° C, mientras que a 4 ° C la pérdida fue del 11%.

5.2.2 Evolución de la concentración de fenoles totales, clorofila y carotenoides quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido. durante el almacenamiento a diferente HR y temperatura en extracto seco de moringa

El efecto de la HR y temperatura sobre la cinética de degradación fenoles totales, clorofila, carotenoides totales, quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido durante el almacenamiento se muestran en las figuras 5.12, 5.13, 5.14, 5.15 y 5.16.

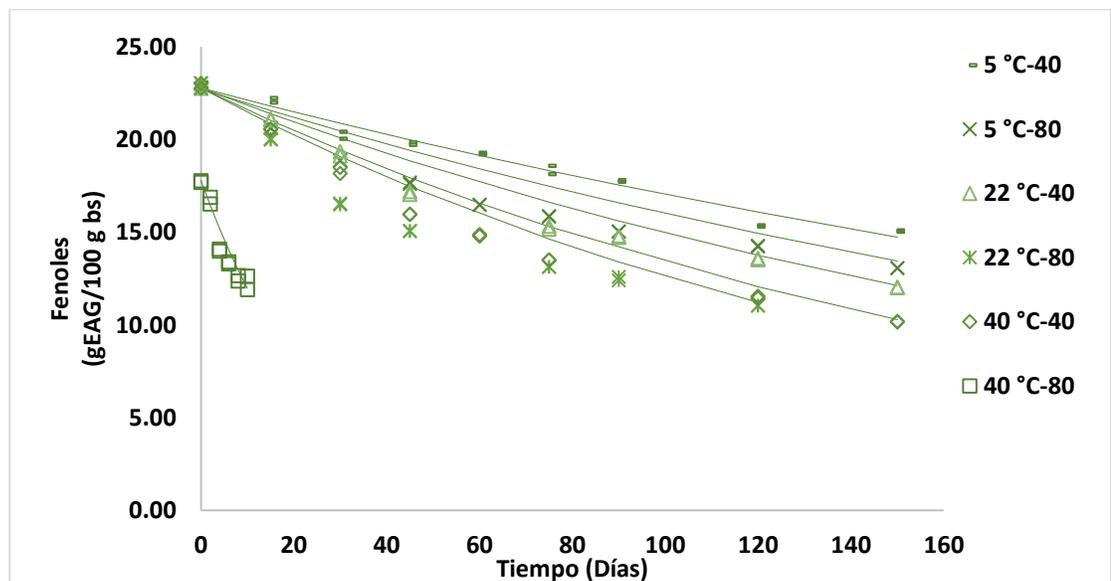


Figura 5.12. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa.

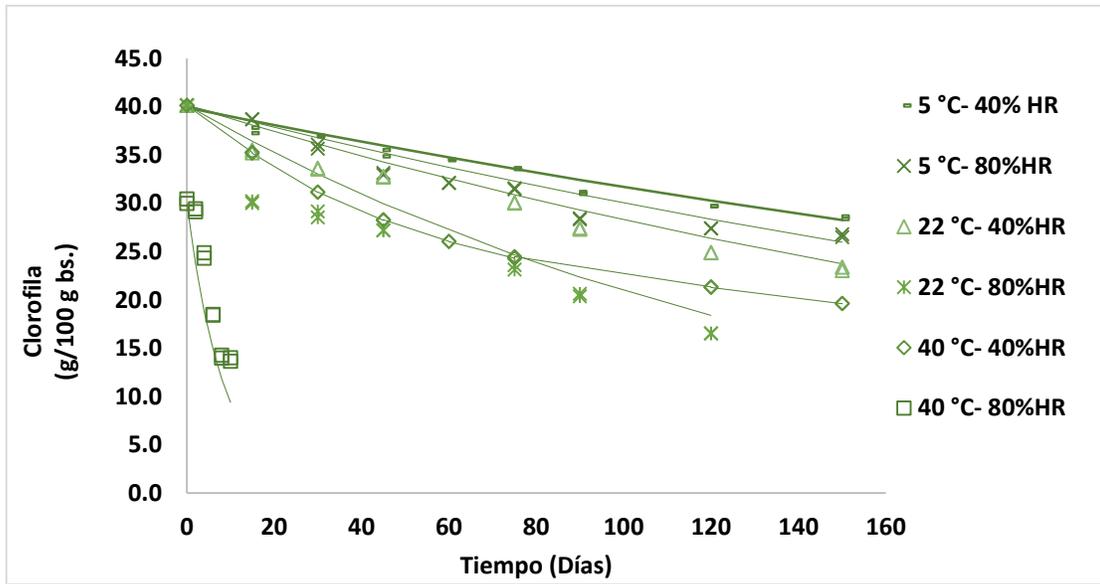


Figura 5.13. Cinética de degradación de clorofila en extracto seco de moringa almacenado a diferentes Temperaturas y %HR empacado en HDPE.

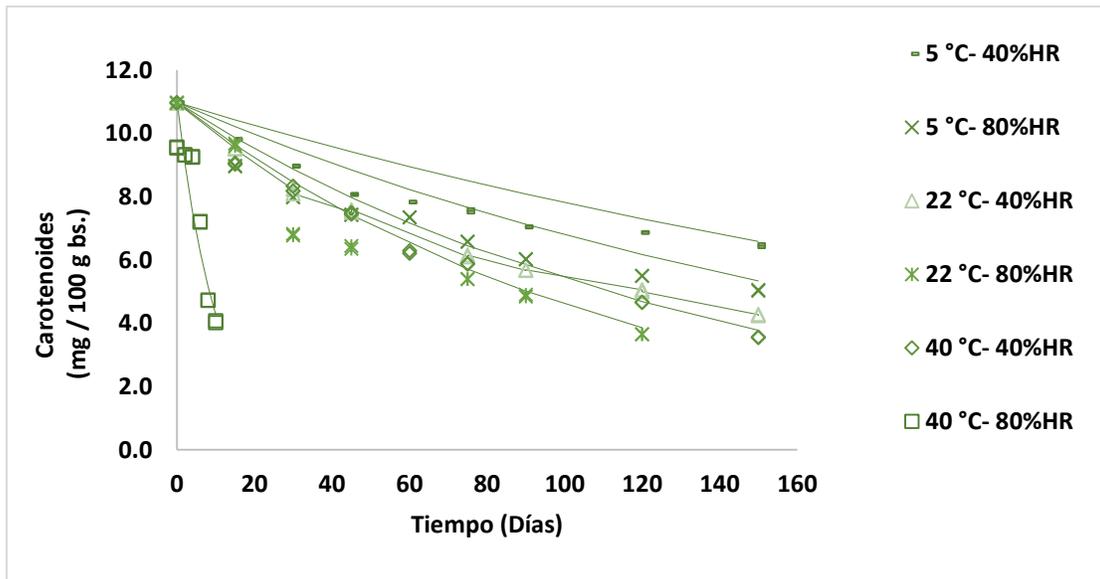


Figura 5.14. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de carotenoides totales en extracto seco de moringa.

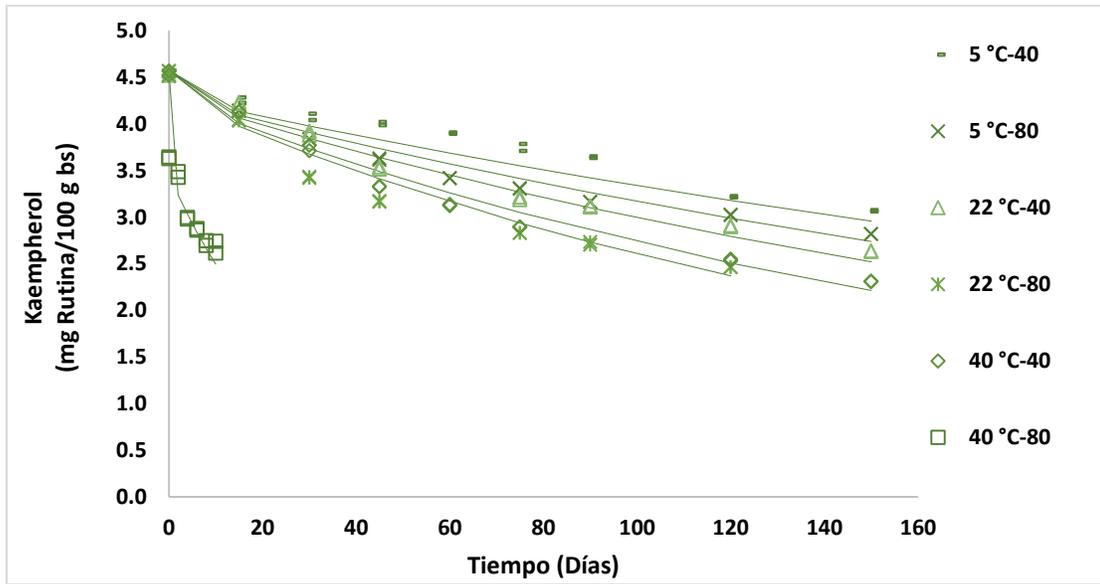


Figura 5.15. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de kaempferol 3 glucósido en extracto seco de moringa.

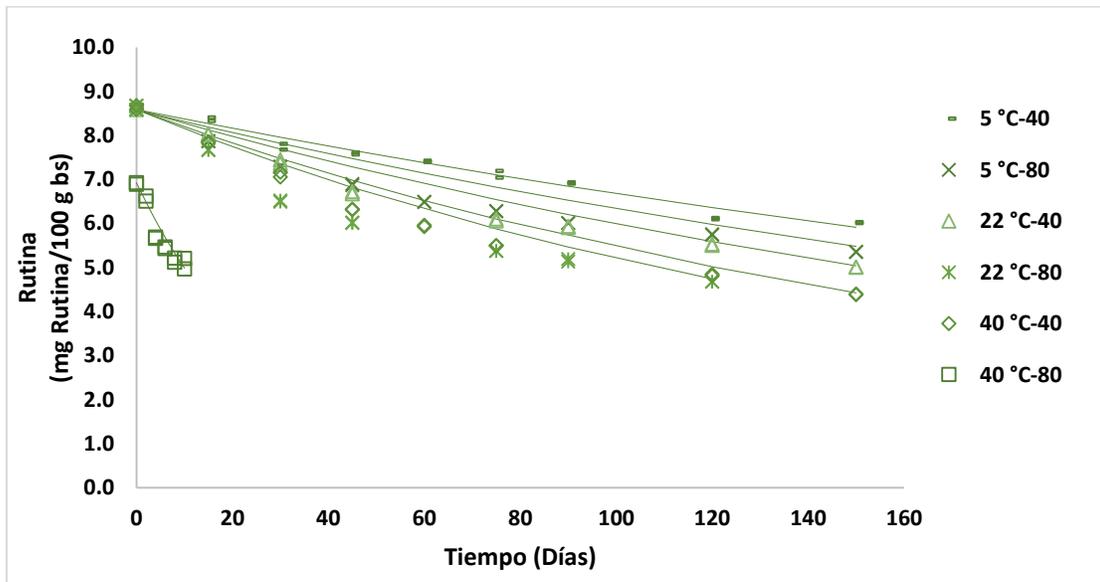


Figura 5.16. Efecto de la HR y temperatura sobre cinética de degradación de quercetina 3 rutinosido en extracto seco de moringa.

Resultados y discusión

En la tabla 5.8 se muestra el tiempo de vida media de clorofila carotenoides y fenoles totales estimado a partir de las constantes de velocidad de degradación de cada variable de respuesta.

Tabla 5.8. Coeficientes de correlación lineal y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la concentración de clorofila, fenoles y carotenoides totales para cada HR y temperatura.

Tratamientos			Clorofila		Fenoles totales		Carotenoides totales	
Empaque	T (°C)	%HR	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)
HDPE	5	40	0.978	301.000	0.9739	238	0.9592	203
HDPE	5	80	0.942	238.000	0.954	198	0.9429	144
HDPE	22	40	0.978	198.000	0.9722	165	0.9803	113
HDPE	22	80	0.956	106.000	0.9455	117	0.9548	79
HDPE	40	40	0.940	150.000	0.9676	130	0.9722	97
HDPE	40	80	0.969	6.000	0.9226	17	0.87701	7

En la tabla 5.9 se muestran las constantes de velocidad de degradación obtenidas mediante los datos experimentales de concentración de carotenoides totales, clorofila, fenoles totales, quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido. Los valores que comparten letras del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) unos de otros, el análisis de varianza multivariado (MANOVA) se realizó con base a la $t_{1/2}$ obtenida para determinar el efecto significativo de la humedad relativa y temperatura sobre la variable de respuesta, la temperatura mostró tener efecto significativo ($p < 0.05$) sobre carotenoides y clorofila de la misma forma la humedad relativa mostró efecto, el aumento de la HR produjo una mayor degradación, debido a la movilidad molecular, que permite una difusión más fácil del oxígeno acelerando las reacciones de oxidación e isomerización en clorofila y carotenoides respectivamente efecto significativo ($p < 0.05$) sobre las variables de respuesta evaluadas.

Resultados y discusión

Tabla 5.9. Constantes de velocidad de degradación de clorofila fenoles y carotenoides totales.

Tratamientos			Carotenoides totales	Clorofila	Fenoles totales	Quercetina	kampferol
Empaque	T (°C)	%HR	k (día ⁻¹)	k(día ⁻¹)	k(día ⁻¹)	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)
HDPE	5	40	2x10 ⁻³ ^f	3.4x10 ⁻³ ^h	2.9x10 ⁻³ ^{efgh}	2.8x10 ⁻³ ^{efgh}	2.6x10 ⁻³ ^{efgh}
HDPE	5	80	3x10 ⁻³ ^{ef}	4.8x10 ⁻³ ^f	3.6x10 ⁻³ ^{efg}	3.5x10 ⁻³ ^{efg}	3.3x10 ⁻³ ^{efg}
HDPE	22	40	3.4x10 ⁻³ ^e	6.1x10 ⁻³ ^e	4.4x10 ⁻³ ^{de}	4.3x10 ⁻³ ^d	4.1x10 ⁻³ ^{de}
HDPE	22	80	7x10 ⁻³ ^c	8.6x10 ⁻³ ^c	5.9x10 ⁻³ ^c	5.8x10 ⁻³ ^c	5.6x10 ⁻³ ^{cd}
HDPE	40	40	5x10 ⁻³ ^{cd}	7.1x10 ⁻³ ^d	5.3x10 ⁻³ ^{cd}	5.2x10 ⁻³ ^{cd}	5.6x10 ⁻³ ^{cd}
HDPE	40	80	0.111 ^a	9.42x10 ⁻² ^a	3.95x10 ⁻² ^a	3.94x10 ⁻² ^a	3.92x10 ⁻³ ^a

5.2.4 Evolución de la a_w durante el almacenamiento de extracto seco de *Moringa oleífera*

Para evaluar el efecto de la humedad relativa sobre la evolución de la a_w se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) la humedad relativa mostro tener un efecto significativo (p < 0.05) esto debido a la mayor transferencia de vapor de agua del exterior hacia las muestras almacenadas, causando el colapso de la partícula causando la pérdida de la estructura, este fenómeno ha sido reportado por Rooss, (1995).

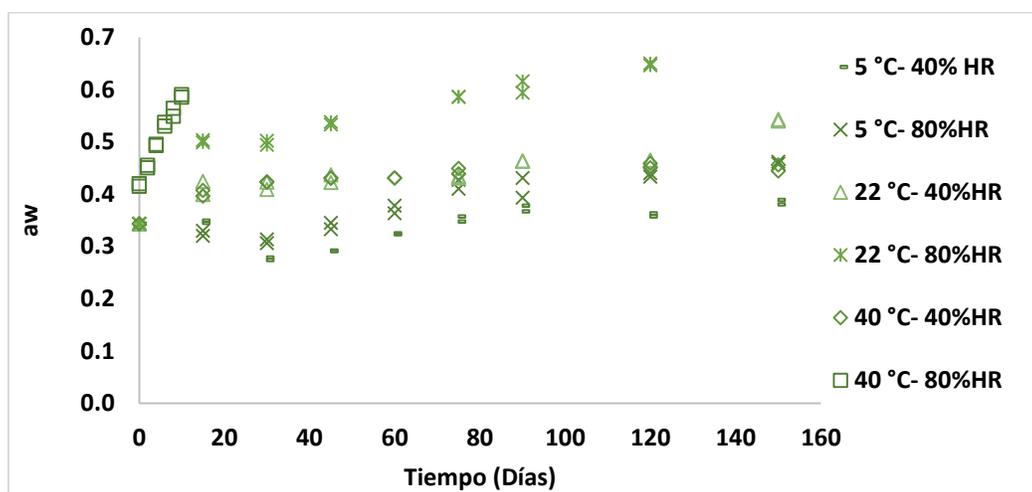


Figura 5.17. Efecto de la HR y temperatura sobre evolución de la a_w de extracto seco de *Moringa oleífera*.

Tabla 5.10. Efecto de la HR y temperatura de almacenamiento sobre la evolución del color en las muestras secas de *Moringa oleífera*.

Tratamiento	L	a*	b*	c*
5°-40%	68.72±0.190	-5.16±0.332	26.15±0.247	26.655±0.174
5°-80%	68.1±0.0848	-4.85±0.212	26±0.0459	26.448±0.490
22°-40%	69.09±0.035	-2.48±0.0	25.15±0.070	25.271±0.070
22°-80%	33.99±0.954	-0.02±0.332	15.7±1.060	15.703±1.063
40°-40%	68.52±0.169	-2.06±0.0226	24.92±0.565	25.004±0.588
40°-80%	34.04±0.106	-1.57±0.381	17.22±0.494	17.291±0.475

En la tabla 5.10 se muestran los parámetros evaluados con los cuales se realizó el análisis de varianza multivariado (MANOVA), la humedad relativa y temperatura mostró tener un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre L a*, b* y C mientras que la temperatura afecto el parámetro a*, responsable del color verde de las hojas y frutas debido al contenido de clorofilas presentes en el producto, la cual es degradada a altas temperaturas y humedades (Belitz y Grosch, 2012).

El extracto seco de moringa oleífera almacenada a 40 °C y 80 %HR se analizó solo durante 12 días debido a que presentó un estado inaceptable después de este tiempo de almacenamiento después de ese tiempo, el polvo perdió su integridad, comenzó a compactarse y a cambiar drásticamente sus parámetros de color como se muestra en la figura 5.18-f.

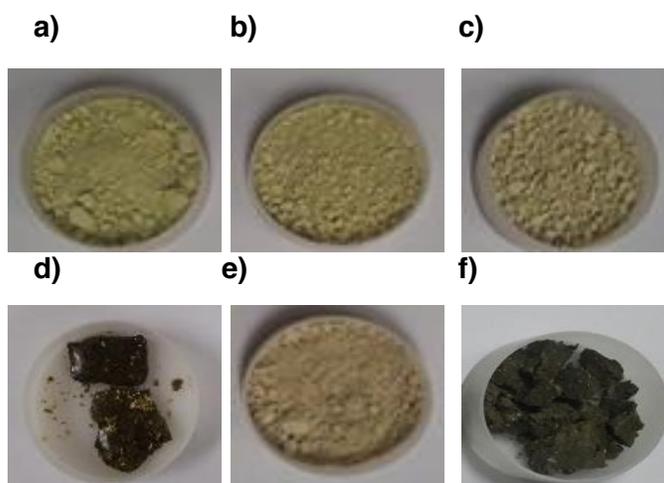


Figura 5.18. Muestras almacenadas :(a) 5°C-40 %HR (b) 5°C-80 %HR y (c) 22°C-40 %HR, (d) 22°C-80 %HR, (e) 40°C-40 %HR (f) 40°C-80 %HR después de 150 días de almacenamiento.

El cambio de color en las muestras (Figura 5.18) se debe principalmente a la degradación de la clorofila presente en la moringa; la eliminación del Mg de las clorofilas provoca que se transformen en feofitinas a y b que son de color oliva parduzco. La sustitución del ión Mg^{++} por Fe^{++} y Sn^{++} da lugar a la formación de productos pardo-grisáceos (Belitz, y Grosch, 2012).

5.3 Efecto de la a_w inicial y temperatura sobre la cinética de degradación de compuestos bioactivos en extracto seco de moringa

En las figuras 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.23, 5.24 y 5.25 se presentan las cinéticas de degradación de AAR por ensayos BATS Y DPPH, fenoles totales, carotenoides totales y clorofila quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido, así como el ajuste a una cinética de primer orden.

5.3.1 Evolución de la AAR por ensayo ABTS durante el almacenamiento de extracto seco de moringa a diferente a_w inicial y temperatura

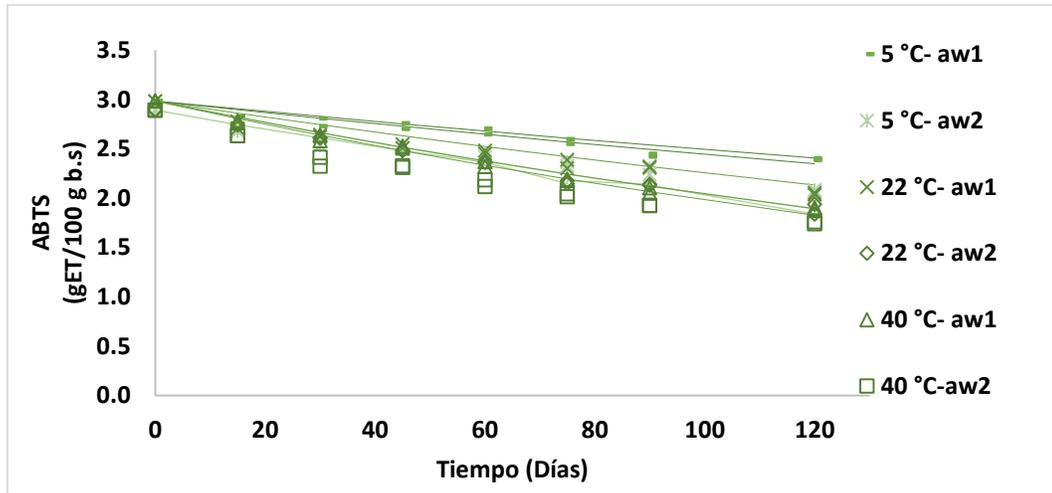


Figura 5.19. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de la AAR mediante ensayo ABTS en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

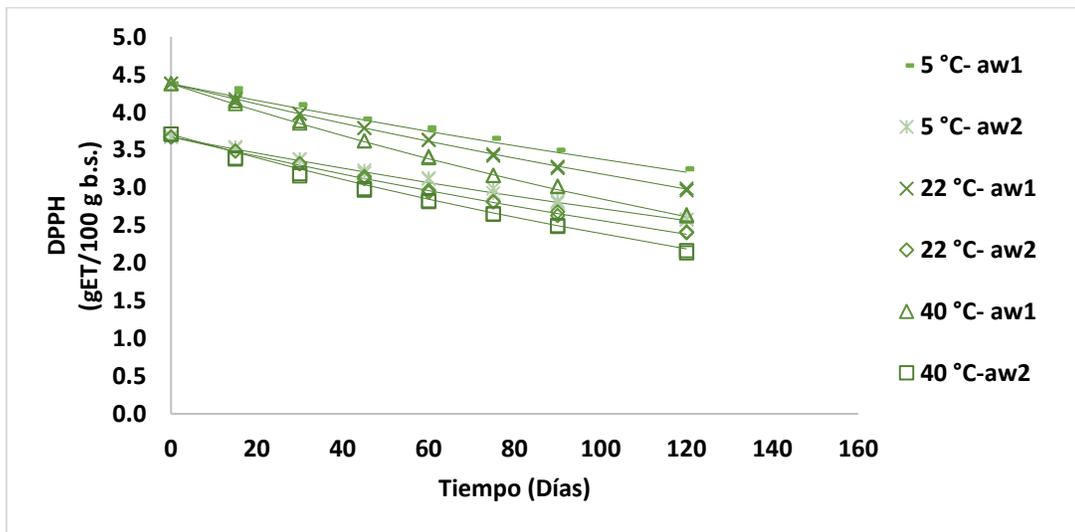


Figura 5.20. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de la AAR mediante ensayo DPPH en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

Resultados y discusión

El análisis de varianza multivariado (MANOVA) para determinar el efecto significativo de la temperatura y a_w de la muestra sobre la AAR, la temperatura mostró tener efecto significativo ($p < 0.05$) sobre los dos ensayos ABTS y DPPH, mientras que la a_w en los niveles evaluados en este trabajo no tuvo efecto sobre las variables de respuestas estudiadas.

En la tabla 5.11 se muestra el tiempo de vida media de los compuestos con actividad antioxidante determinada por ensayos ABTS y DPPH estimada a partir de las constantes de velocidad de degradación de cada variable de respuesta.

Tabla 5.11. Coeficientes de correlación lineal y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la actividad antioxidante para cada a_w y temperatura a partir de los datos experimentales de concentración versus tiempo.

Tratamientos			DPPH		ABTS	
Empaque	T (°C)	a_w	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)
Laminado	5	0.35	0.996	266	0.949	385
Laminado	5	0.39	0.998	231	0.9748	346
Laminado	22	0.35	0.996	216	0.9697	245
Laminado	22	0.39	0.9989	192	0.9878	192
Laminado	40	0.35	0.998	161	0.9922	182
Laminado	40	0.39	0.9962	157	0.9759	169

Tabla 5.12. Constante de velocidad de degradación de actividad antioxidante por ensayos ABTS y DPPH en extracto seco de moringa oleífera almacenado a diferentes a_w , T en empaque laminado.

Tratamientos			ABTS	DPPH
Empaque	T (°C)	a_w	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)
Laminado	5	0.35	$2.6 \times 10^{-3}^h$	$1.8 \times 10^{-3}^h$
Laminado	5	0.39	$3 \times 10^{-3}^{gh}$	$2.4 \times 10^{-3}^{gh}$
Laminado	22	0.35	$3.2 \times 10^{-3}^{fgh}$	$2.8 \times 10^{-3}^{fgh}$
Laminado	22	0.39	$3.6 \times 10^{-3}^{efg}$	$3.2 \times 10^{-3}^{efg}$
Laminado	40	0.35	$4.3 \times 10^{-3}^{cde}$	$3.8 \times 10^{-3}^{cd}$
Laminado	40	0.39	$4.4 \times 10^{-3}^{cd}$	$4.1 \times 10^{-3}^{def}$

5.3.2 Evolución de concentración de fenoles totales, clorofila y carotenoides quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido. durante el almacenamiento a diferente a_w inicial y temperatura en extracto seco de moringa

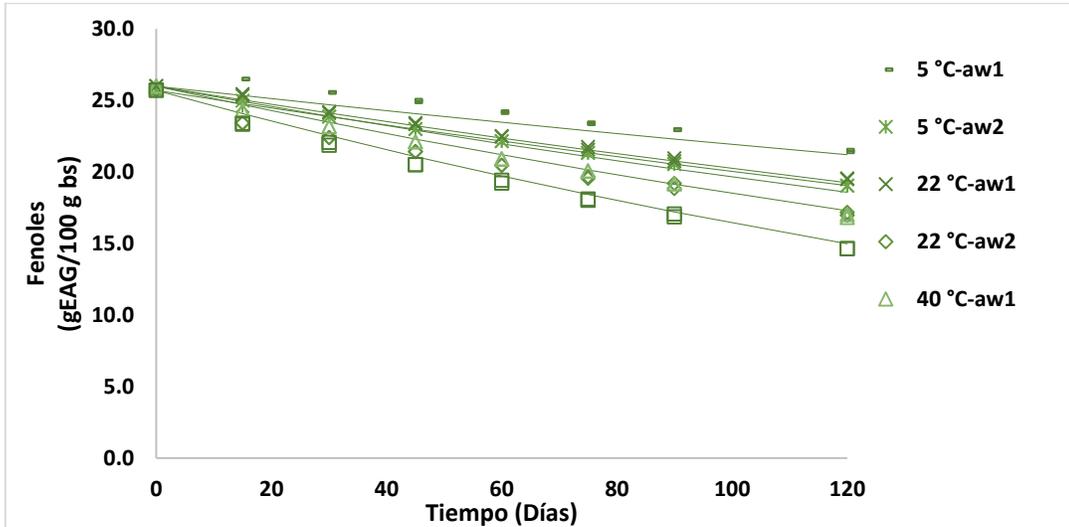


Figura 5.21. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de fenoles totales en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

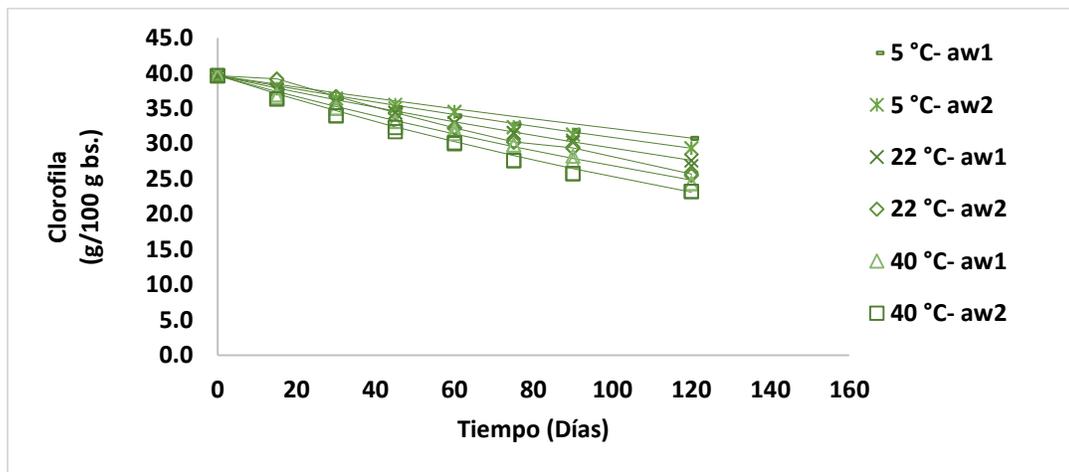


Figura 5.22. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de clorofila en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

Resultados y discusión

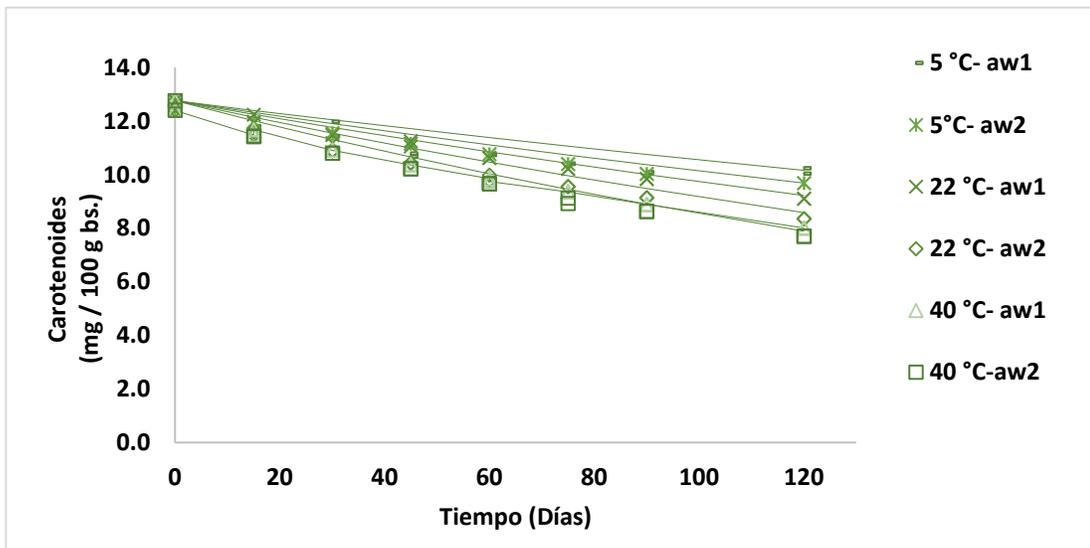


Figura 5.23. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de carotenoides totales en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

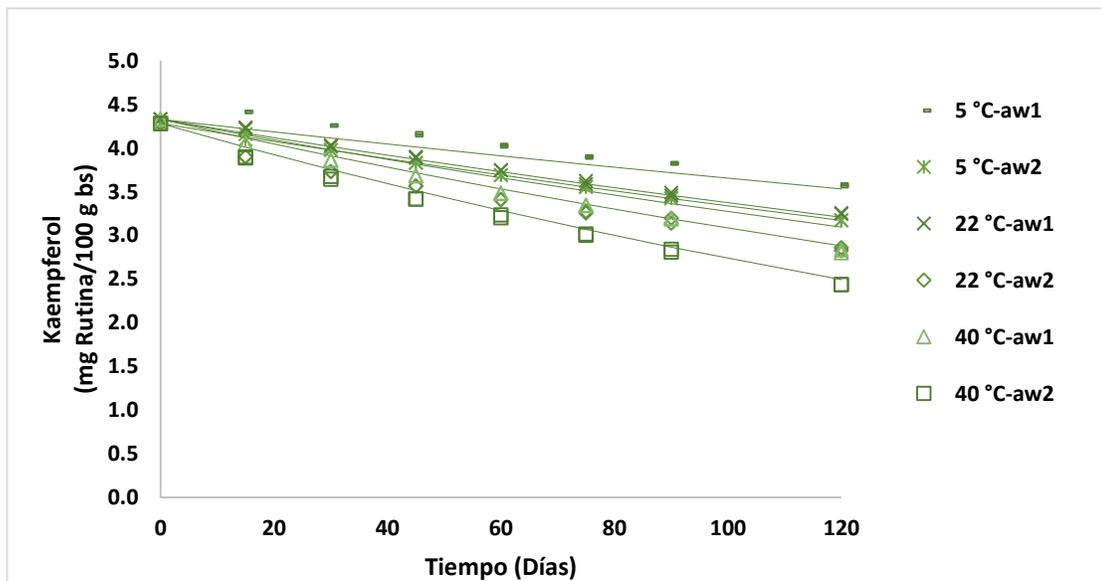


Figura 5.24. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de kaempferol 3 glucósido en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

Resultados y discusión

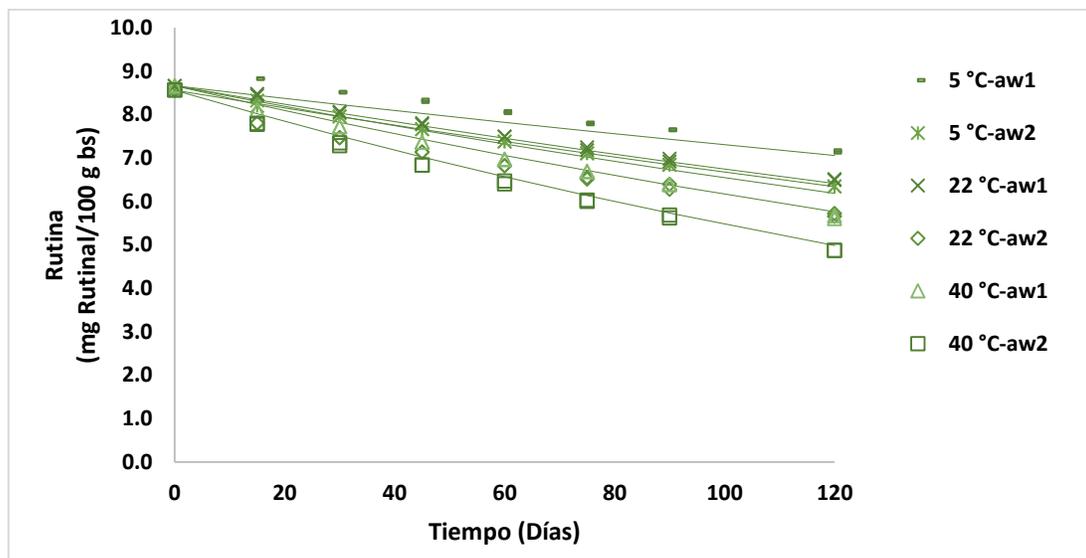


Figura 5.25. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre cinética de degradación de quercetina 3 rutinosido en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

Tabla 5.13. Coeficientes de correlación lineal simple y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la concentración de fenoles totales, clorofila y carotenoides para cada a_w y temperatura a partir de los datos experimentales de concentración versus tiempo.

Tratamientos			Clorofila		Fenoles totales		Carotenoides totales	
Empaque	T (°C)	a_w	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)	r^2	$t_{1/2}$ (días)
Laminado	5	0.35	0.9792	330	0.9598	407	0.8477	365
Laminado	5	0.39	0.992	277	0.992	315	0.9747	256
Laminado	22	0.35	0.9962	231	0.996	277	0.9864	192
Laminado	22	0.39	0.9898	182	0.9832	247	0.9829	301
Laminado	40	0.35	0.994	177	0.9965	203	0.9924	210
Laminado	40	0.39	0.9956	154	0.9969	177	0.9893	173

Resultados y discusión

Tabla 5.14. Constantes de velocidad de degradación de clorofila, carotenoides y fenoles totales en extracto seco de moringa oleífera almacenado a diferentes a_w , y temperaturas en empaque laminado.

Tratamientos			Carotenoides totales	Clorofila	Fenoles totales
Empaque	T (°C)	a_w	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)
Laminado	5	0.35	2.1x10 ⁻³ ^f	1.9x10 ⁻³ ^k	1.7x10 ⁻³ ^h
Laminado	5	0.39	2.5x10 ⁻³ ^f	2.3x10 ⁻³ ^j	2.32x10 ⁻³ ^{gh}
Laminado	22	0.35	3x10 ⁻³ ^e	2.7x10 ⁻³ ⁱ	2.5x10 ⁻³ ^{gh}
Laminado	22	0.39	3.8x10 ⁻³ ^d	3.3x10 ⁻³ ^h	2.8x10 ⁻³ ^{efg}
Laminado	40	0.35	3.9x10 ⁻³ ^d	3.6x10 ⁻³ ^h	3.4x10 ⁻³ ^{def}
Laminado	40	0.39	4.5x10 ⁻³ ^c	4x10 ⁻³ ^g	3.9x10 ⁻³ ^{def}

Tabla 5.15. Constantes de velocidad de degradación de quercetina 3 rutinosido y kaempferol 3 glucósido en extracto seco de moringa oleífera almacenado a diferentes a_w , T en empaque laminado.

Tratamientos			Quercetina	kampferol
Empaque	T (°C)	a_w	k (día ⁻¹)	k (día ⁻¹)
Laminado	5	0.35	1.6x10 ⁻³ ^h	1.4x10 ⁻³ ^h
Laminado	5	0.39	2.22x10 ⁻³ ^{gh}	2.02x10 ⁻³ ^{gh}
Laminado	22	0.35	2.4x10 ⁻³ ^{gh}	2.2x10 ⁻³ ^{gh}
Laminado	22	0.39	2.7x10 ⁻³ ^{fgh}	2.5x10 ⁻³ ^{fgh}
Laminado	40	0.35	3.3 x10 ⁻³ ^{efg}	3.1x10 ⁻³ ^{efgh}
Laminado	40	0.39	3.8x10 ⁻³ ^{def}	3.6x10 ⁻³ ^{def}

5.3.3 Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la evolución de la a_w

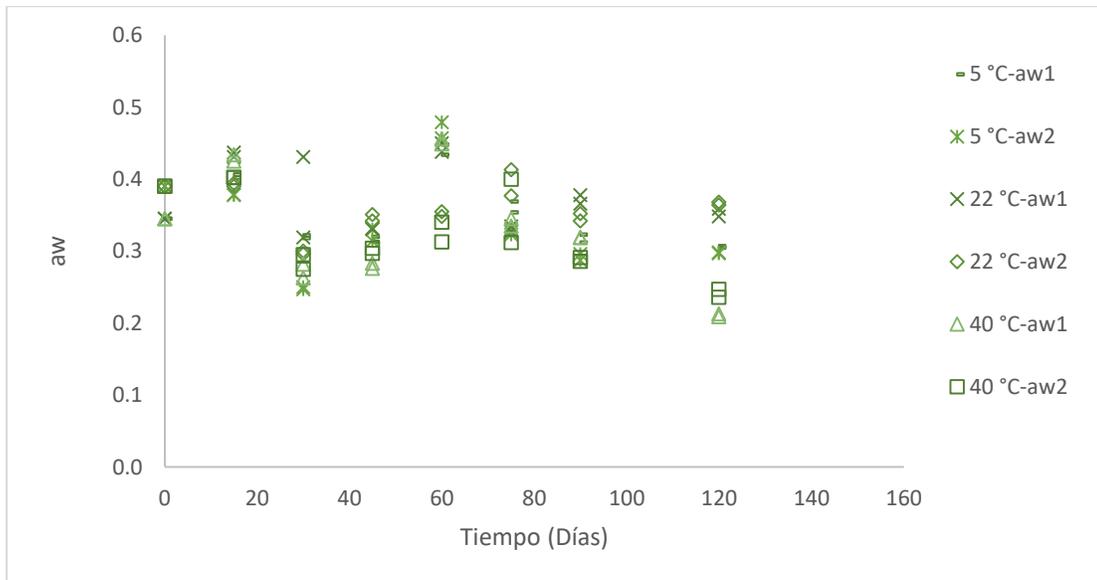


Figura 5.26. Efecto de la a_w en la muestra y la temperatura de almacenamiento sobre la evolución de la a_w en extracto seco de moringa empacado en bolsas laminadas.

Se realizó el análisis de varianza multivariado (MANOVA) con base a la $t_{1/2}$ obtenida para determinar el efecto significativo de la temperatura y a_w sobre la variable de respuesta: Clorofila, fenoles totales y carotenoides, la temperatura mostró tener efecto significativo ($p < 0.05$) sobre carotenoides, clorofila y fenoles totales, la a_w en los niveles evaluados no mostró tener efecto significativo sobre la degradación de las variables de respuesta estudiadas.

En la tabla 5.18 de presenta los valores de los parámetros L, a y b de extracto seco de moringa oleífera durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y diferentes actividades de agua.

Resultados y discusión

Tabla 5.16. Efecto de la a_w inicial y temperatura de almacenamiento sobre la evolución del color en las muestras secas de *Moringa oleífera*.

Tratamiento	L	a*	b*	c*
5°C- a_{w1}	66.13±0.544	-5.56±0.381	27.64±1.41	28.193±1.335
5°C- a_{w2}	66.04±0.219	-5.21±0.296	29.47±1.04	29.898±0.978
22°C- a_{w1}	67.74±0.0141	-2.03±0.070	25.52±0.212	25.600±0.205
22°C- a_{w2}	68.42±0.035	-2.61±0.098	26.47±0.162	26.598±0.151
40°C- a_{w1}	70.14±0.077	-1.52±0.325	20.81±0.106	20.865±0.132
40°C- a_{w2}	67.61±0.014	-1.67±0.141	22.43±0.120	22.492±0.129

Durante el tiempo de almacenamiento, se observa que el parámetro de luminosidad (L) no hay un incremento significativo ($p>0.05$) en los tratamientos. Por otra parte, los parámetros de color a y b tienden a disminuir durante el tiempo de almacenamiento, lo que indica que el color verde del extracto seco de moringa oleífera cambio de verde intenso a verde pálido. Estos resultados son similares a los reportados por Mercado *et al.*, 2008. Ellos observaron que después de 60 días de almacenamiento a 5-8°C, el color verde original cambió a un color verde “esmeralda” y a un color verde amarillento en el xoconostle. Después de 35 días de almacenamiento se observó un efecto significativo ($p<0.05$) de la temperatura (5 y 20°C) de almacenamiento sobre los parámetros de color a y b.

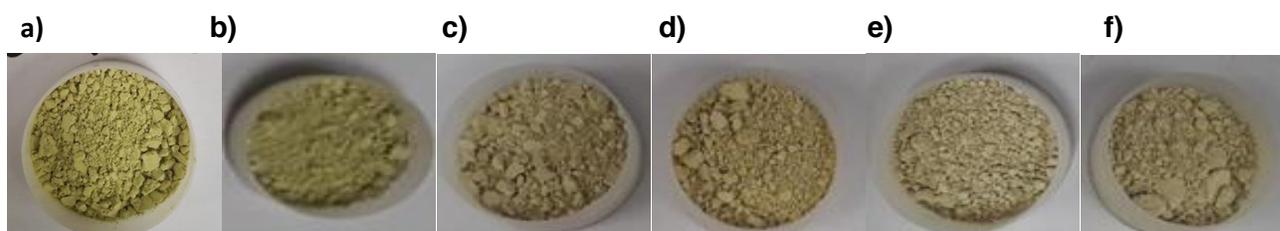


Figura 5.27. Muestras almacenadas : (a) 5°C- a_{w1} (b) 5°C- a_{w2} (c) 22°C- a_{w1} , (d) 22°C- a_{w2} , (e) 40°C- a_{w1} (f) 40°C- a_{w2} después de 150 días de almacenamiento.

Tabla 5.17. Tratamientos con mayor y menor degradación bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Respuesta	Tratamiento con mayor degradación	Tratamiento con menor degradación
Almacenados obscuridad, luz visible, luz natural y HDPE		
DPPH, ABTS, fenoles totales, carotenoides, quercetina, kampferol y clorofila	Luz natural	Obscuridad
Almacenados a diferentes HR ,temperaturas en HDPE		
DPPH, ABTS, fenoles totales, carotenoides, quercetina, kampferol y clorofila	80 %HR 40 °C	40 %HR 5 °C
Almacenados a diferentes a_w y temperaturas en bolsas laminadas		
DPPH, ABTS, fenoles totales, carotenoides, quercetina, kampferol y clorofila	0.39 a _w 40 °C	0.35 a _w 5 °C

En la tabla 5.17 se presentan las condiciones de almacenamiento donde se conserva mejor la protección de los pigmentos y la mayor actividad antioxidante de los compuestos evaluados en esta investigación, los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Bott *et al.* (2010) cuando evaluaron la estabilidad de los extractos secos de *Passiflora alata*; y con los resultados reportados por. Tonon y Brabet (2009).

6. CONCLUSIONES

La luz natural mostró tener un efecto significativo sobre la degradación de carotenoides totales, fenoles totales, clorofila, carotenoides y color, sin embargo, no mostró tener efecto sobre la actividad antirradical determinada por los métodos ABTS y DPPH.

La temperatura (40 °C) y humedad relativa (80%) tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la degradación de clorofila, carotenoides totales, fenoles totales, color y AAR por ensayos ABTS y DPPH.

La actividad de agua en los niveles evaluados no mostró tener efecto significativo sobre la degradación de los compuestos evaluados, pero si la temperatura.

Se determinaron las constantes de velocidad de degradación para carotenoides totales, clorofila, fenoles totales y para la actividad antioxidante por ensayos ABTS y DPPH

De las condiciones evaluadas, los extractos secos de moringa mantienen su estabilidad física a 40% de humedad relativa y temperatura de refrigeración 5 °C en empaque laminado, bajo estas condiciones se garantiza la estabilidad física del extracto seco y su composición.

7. REFERENCIAS

Aguayo E. 2003. Innovaciones tecnológicas en la conservación de melón y tomate procesado en fresco. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Cartagena, España.

Aguilera J.M. 2003. Solid-liquid extraction. In: Tzia, C. y Liadakis, G. Extraction optimization in food engineering. Edition by Atenas Marcel Dekker, Inc. p. 35-55.

AOAC 2006. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

AFPD 2008. African Flowering Plants Database - Base de Donnees des Plantes a Fleurs D'Afrique.

Badui D. S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. Editado por PEARSON EDUCACIÓN, México. ISBN: 970-26-0670-5. p. 1-28.

Bakowska-Barczaka A.M. y Paul P.K. 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* 34: 1301-1309.

Belitz H.D. y Grosch W. 2012. Química de los Alimentos, Editado por Acribia-Zaragoza. p. 619. 1985.

Bergman M., Varshavsky L., Gottlieb H.E. y Grossman S. 2001. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, 58: 143-152.

Bott, R.F., Labuza, T.P. y Oliveira, W.P. 2010. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. *Drying Technology* 28(11):1255-1265.

Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333.

Brody A.L. 2003. Modified Atmosphere Packaging. In: Heldman D.R. *Encyclopedia of Agricultural Food and Biological Engineering*. Taylor & Francis. p. 666-670.

- Casp A.V y Abril J.R. 2003. Procesos de conservación de alimentos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Castillo-Santos K. 2012. Optimización del proceso de extracción sólido-líquido de vainilla. Veracruz, México: Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Chen, H., Peng y B. H. Chen B. H (1996). Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice. *Food Chemistry* 497-503, 199.
- Chumark P., Khunawat P., Sanvarinda Y., Phornchirasilp S., Morales N.P., Phivthong-ngam L., Ratanachamnong P., Srisawat, S. y Pongrapeeporn, K.S. 2008. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 439-446.
- Coronel-Aguilera Claudia P. y San Martín-Gonzalez F. (2014). Encapsulación of spray dried b-carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *LWT - Food Science and Technology* 62:187-193.
- Davoodi M.G., Vijayanand P., Kulkarni S.G. y Ramana K.V.R. 2007. Effect of different pre-treatments and dehydration methods on quality characteristics and storage stability of tomato powder. *LWT-Food Science Technology* 40: 1832-1840.
- Dayron S. A., Fischer G. y Flórez R.2006. Refrigerated storage of mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) fruits in modified atmosphere packaging. *Agronomía Colombiana* 0120-9965.
- Därr A. 1981. *Tecnología farmacéutica*. Editorial Acribia. p. 33, 150-151.
- Delmoro J., Muñoz D., Nadal V., Clementz A. y Pranzetti V. 2010. El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Invenio* 13: 145-152.
- Desobry, S. A., Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for b-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62(6), 1158–1162.
- Dillard, C. J. y German J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1744-1756.

- Henriquez C. Córdoba A. Lutz M. y Saavedra J. 2013. Storage stability test of apple peel powder using two packaging materials: High-density polyethylene and metalized films of high barrier. *Industrial crops and products* 45: 121-127.
- Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments o black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray dryer. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 805–812.
- Espinoza A. E. y Assis, J. 1994. Fotoxidação de óleos comestíveis em embalagens plásticas transparentes». *Oleóse Graos* 4: 19.
- Fahey J.W. 2005. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. p. 15.
- Fang Z. y Bhandari B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*. 129: 1139-1147.
- Fernández M.P.R., Gracia I., De Lucas A. y Rodríguez J.F. 2012. Extraction of *Capsicum annuum* Oleoresin by Maceration and Ultrasound-Assisted Extraction: Influence of Parameters and Process Modeling. *Journal of Food Process Engineering*. 36: 343-352.
- Geankoplis C. 2010. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. México: Ed. CECSA.
- Gidamis A.B., Panga J.T., Sarwatt S.V., Chove B.E. y Shayo, N.B. 2003. Nutrient and antinutrient contents in raw and cooked young leaves and immature pods of *Moringa oleifera*, Lam. *Ecology of Food Nutrition*. 42: 399-411.
- Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz G.A. y Willett W.C. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 87: 1767-1776.
- Gold W.G. y Galdwell M.M. 1983. The effects of ultraviolet radiation on plant competition in terrestrial ecosystems. *Physiology of Plant*. 58: 435-444.
- Goud K. y Jin P.H. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 23: 1361-94.

- Guija E, y Troncoso L. 2000. Radicales libres y envejecimiento. Boletín Sociedad Química de Perú. 46: 33-55.
- Hansmann, E. 1973. Pigment analysis. En: J. R. Stein (Ed.). handbook of physiological methods. Culture method and growth measurement. V.1. Cambridge University Press, Reino Unido. p.359-368.
- Hsu R., Midcap S., Arbainsyah y Witte, L. 2006. *Moringa oleifera*: medicinal and socio-economic uses. p. 7-17.
- Jaiswal D., Kumar R.P., Kumar A., Mehta S. y Watal, G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. Journal of Ethnopharmacology. 123: 392-396.
- Kader, A.A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. Publication 3311. 3rd ed. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA. pp. 135-144.
- Krishnaiah D., Sarbatly R. y Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing. 89: 217-233.
- Foidl N., Makkar H.P.S. y Becker K. 2001. The Miracle Tree: The Multiple Uses of Moringa. Ed. Lowell J. Fuglie. The Netherlands. p. 45-76.
- Labuza T. 1984. Application of chemical kinetics to deterioration of foods. Chemical Education. 61: 348-358.
- Labuza T. y Schmidt M. 1985. Accelerated shelf-life dating of foods. Food Technology. 39: 57-134.
- Lee J., Koo N. y Min D.B. 2006. Reactive oxygen species, aging and antioxidants nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3: 21-33.
- Liang R., Qingrong Huang, Jianguo Ma, Charles F. Shoemaker, Fang Zhon 2013. Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried betacarotene nanoemulsions. Food Hydrocolloids 33 (2013) 225e233.

Lovric, T., Sablek, Z. & Boskovic, M. (1970). Cis-trans isomerisation of lycopene and colour stability of foam-mat dried tomato powder during storage. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 641647.

Mahalik N. y Nambiar A. 2010. Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. *Trends in Food Science & Technology*. 21: 117- 128.

Manguro L.O.A. y Lemmen P. 2007. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. *Natural Product Research*. 21: 56-68.

Masters K. 1991. *Spray Drying Handbook*. 5th edition. New York: Longman Scientific and Technical.

Matioli, G., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2002). Lycopene encapsulated with gum arabic and maltodextrin: Stability study. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5, 197–203.

Meena A.K., Sachan A., Kaur R., Pal B. y Singh B. 2010. *Moringa oleifera*: A review. *Journal of Pharmacy Research*. 3: 840-842.

Mercado J., López M., Martínez G. y Arias M. 2008. Estudio de las propiedades reológicas de la tuna en fresco. IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Meydani M. 2000. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71:1665-1668.

Merzlyak M.N. y Solovchenko A.E. 2002. Photo stability of pigments in ripening apple fruit: a possible photo protective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Science*. 163: 881-888.

Ocón G.J. y Tojo B.G. 1986. *Problemas de ingeniería química*. Aguilar S.A. de Ediciones.

Olson M. E. y Alvarado C.L.O. 2016. Dónde cultivar el árbol de *Moringa oleifera*, en México, y análisis de su distribución potencial. *Revista mexicana de biodiversidad*. 87: 1089-1102.

- Olson M.E. y Fahey J.W. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82: 1071-1082.
- Pacheco-Palencia, L. A., Hawken, P., & Talcott, S. T. (2007). Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. *Food Research International*, 40(5), 620–628.
- Parrotta J.A. 1993. *Moringa oleifera* Lam. Resedá, horseradish tree. Department of Agriculture. p. 6.
- Pérez I.D. 2013. Efecto de diferentes métodos de secado sobre la retención de antioxidantes en hojas de *Moringa oleifera*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Perry R.H. y Green D.W. 1999. *Chemical Engineers Handbook*. 7th edition. New York: Mc Graw-Hill Book Company.
- Pinheiro P. M., Farias D. F. De Abreu J.T. y Urano A. 2008. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. *Revista de Nutrição Campinas*. 21:431-437.
- Pozo R. M. 1992. Proceso de la rancidez oxidativa de los aceites y grasas. *Metodología, Anales de la Real Academia de Farmacia*. 58: 17-29.
- Price M.L. 2007. The Moringa tree. ECHO technical note.
- Ranganna S. 1999. *Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products*. 2nd edition. Tata McGraw-Hill Education. New Delhi, India, p. 105.
- Reilly A. y Man C.M.D. 1994. Potato crisps and savoury snacks, in *Self life Evaluation of Foods*, Man, C.M.D. and Jones, A.A., Eds., Blackie Academic and Professional, Glasgow. p. 202.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice E.C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.

- Reid D.S. 2007. Water activity: fundamentals and relationships. In: Barbosa-Canovas G., Fontana Jr., A.J., Schmidt S.J. y Labuza T.P. (Eds.), *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing, Australia, p. 15-28.
- Reddy V., Urooj A. y Kumar A. 2005. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*. 90: 317-321.
- Rodriguez D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI press Washington, DC. p. 41-46.
- Roos Y.H. 2007. Water activity and glass transition In: Barbosa-Canovas, G., Fontana Jr., A.J., Schmidt, S.J. y Labuza, T.P. (Eds.), *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing, Australia, p. 29-45.
- Ruiz-Rodríguez A., Carrera C.A., Setyaningsih W., Barbero G.F., Ferreiro-González M., Palma M. y Barroso C.G. 2017. Tryptophan Levels during Grape Ripening: Effects of Cultural Practices. *Molecules* 22: 941.
- Serris, G. S., & Biliaderis, C. G. (2001). Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(8), 691e700.
- Siddhuraju P. y Becker K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2144-2155.
- Singh G.P. y Sharma S.K. 2012. Antimicrobial evaluation of leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. *International Research Journal of pharmacy* 3: 212-215.
- Singh R.P. y Heldman D.R. 2009. *Introduction to Food Engineering*, 4a ed. Food Science and Technology. International Series. San Diego, California. USA. p. 653.
- Sharma K., Marc L. y Mague F. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Research International*, Vol. 29, Nos 3-4, pp. 309315.

- Shetty K., y McCue P. 2003. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of systems biology and biotechnological approaches. *Food Biotechnology*. 17: 67-97.
- Sreelatha S. y Padma P. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64: 303-311.
- Temiz H. 2010. Effect of modified atmosphere packaging on characteristics of sliced kashar cheese. *Food Processing and Preservation*. 34: 926-943.
- Tonon, R. V., Baroni, A. F., Brabet, C., Gibert, O., Pallet, D., & Hubinger, M. D. 2009. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering*, 94(3–4), 215–221.
- Tonon R. V a, Brabet C., Hubinger M. D. 2009. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* 43 (2010) 907–914
- Vázquez L.A. 2013. Efecto de las variables del proceso de secado por aspersion sobre compuestos bioactivos de extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Veracruz, México: Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Vázquez-León L.A., Páramo-Calderón D.E., Robles-Olvera V.J., O.A. Valdés-Rodríguez O.A., Pérez-Vázquez A., García-Alvarado M.A. y Rodríguez-Jimenes G.C. 2017. Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves: influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. *European Food Research and Technology*. 243: 1593-1608.
- Verdugo M.G., Pérez G.O., Canett R., Márquez A., Islas A.R. y Vázquez F. 2010. Formulación y evaluación de pan enriquecido con hojas de moringa (*Moringa oleifera*). Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Vernon L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Annals Chemistry* 32: 1144-1150.
- Voigt R. 1982. Tratado de tecnología farmacéutica. Editorial Acribia. p. 64-65.

Referencias

Wagner L.A. y Warthesen J.J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science* 60: 1048-1052.

Weisburger J.H. 1999. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chemistry and Toxicology*. 37: 943-948.

Yan-Li X., Hui-Ming Z. y Zhi-Rong Z. 2006. Effect of relative humidity on retention and stability of vitamin A microencapsulated by spray drying. *Journal of Food Biochemistry* 31: 68-80.

Yoshi H., Furuta T. y Sottitawat A. 2001. Microencapsulation of food flavors by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2: 55-61.

8. APÉNDICES

APÉNDICE A Rectas de calibración para los ensayos de actividad antirradical y fenoles totales

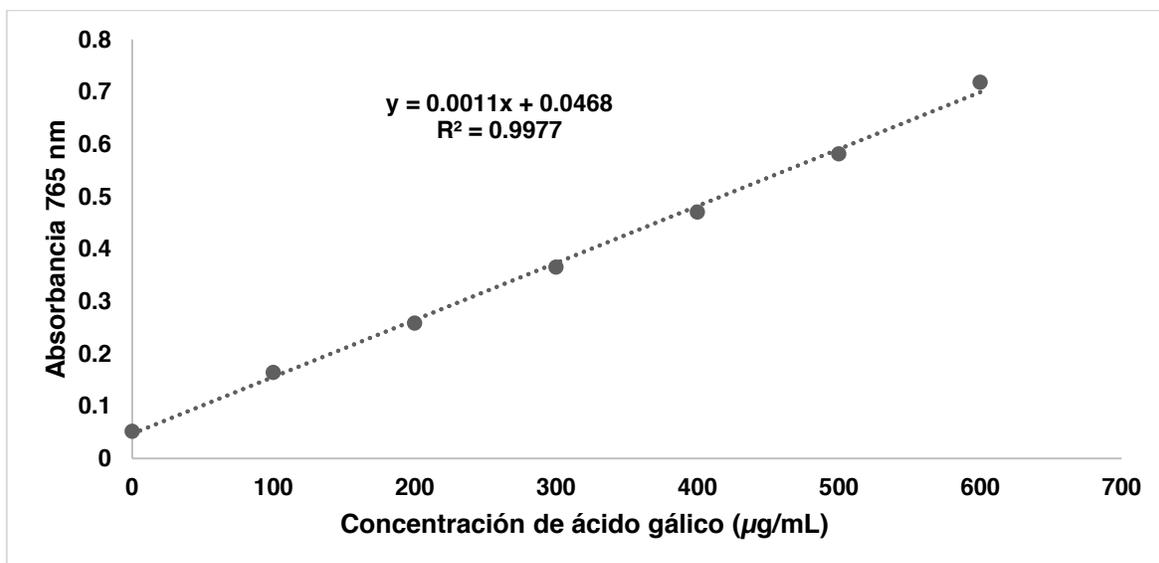


FIGURA A.1 Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales utilizando como disolvente metanol: agua 80:20 (v/v).

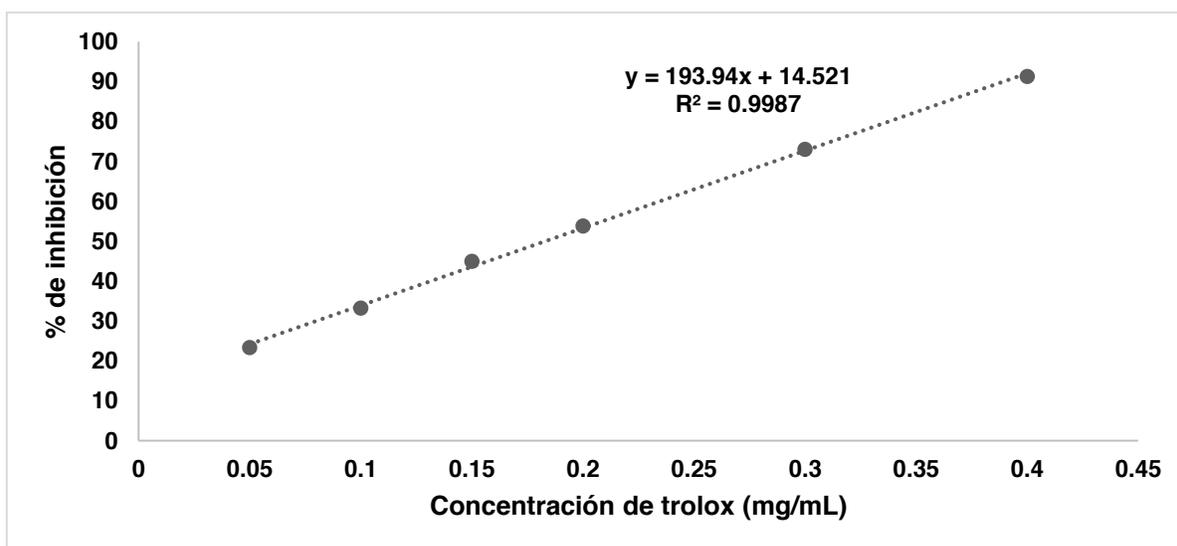


FIGURA A.2 Curva de calibración de trolox para la determinación de actividad antirradical por DPPH utilizando como disolvente metanol: agua 80:20(v/v).

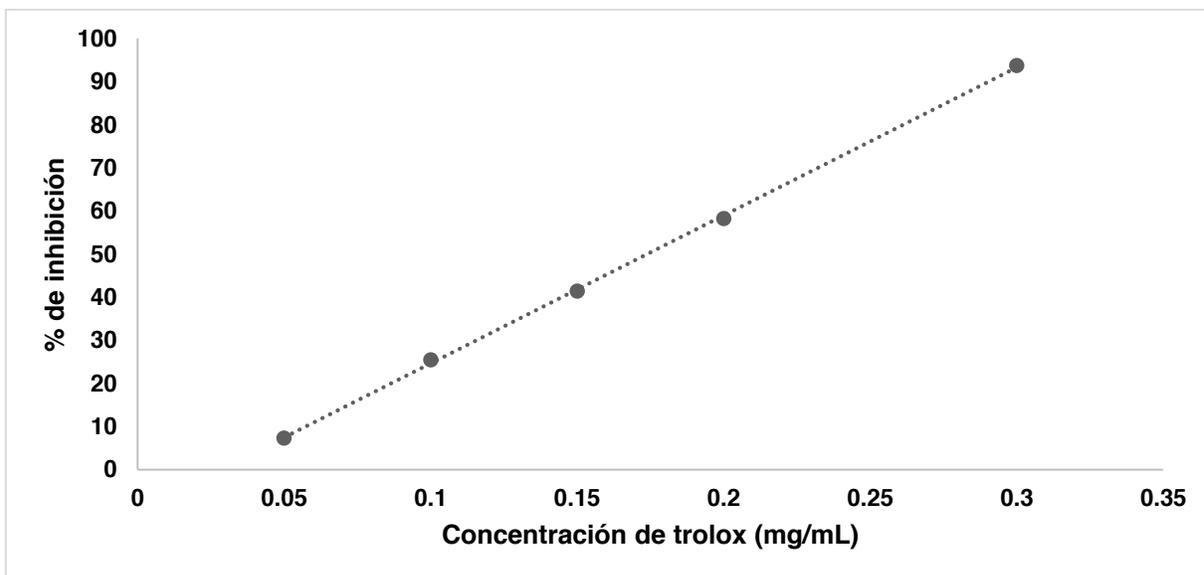


FIGURA A.3 Curva de calibración de trolox para la determinación de actividad antirradical por ABTS utilizando como disolvente metanol: agua 80:20 (v/v).

APENDICE B Recta de calibración para carotenoides totales.

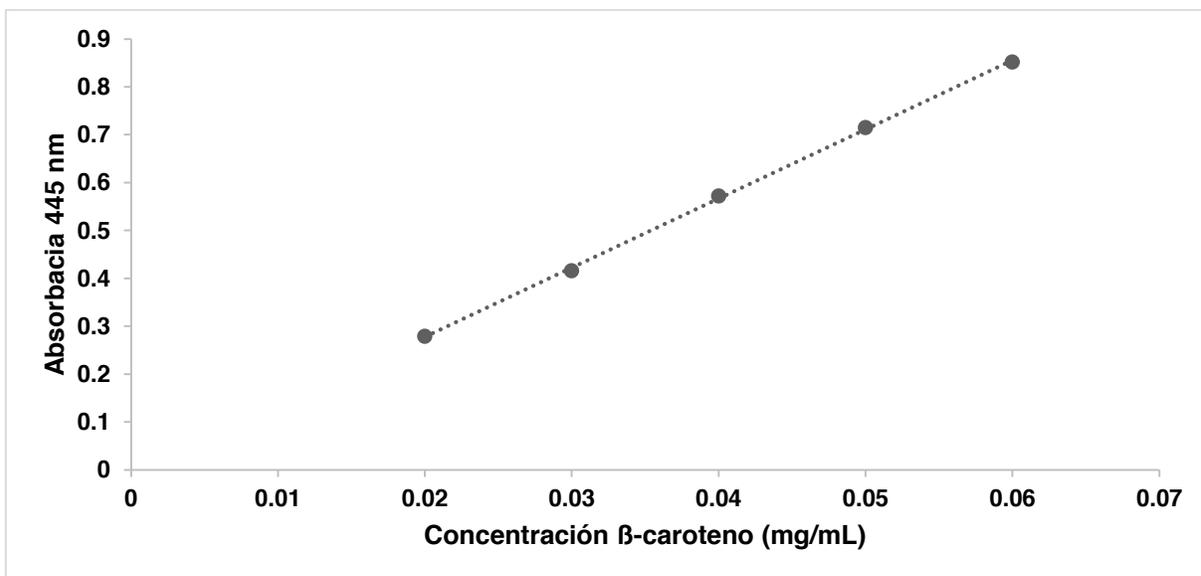
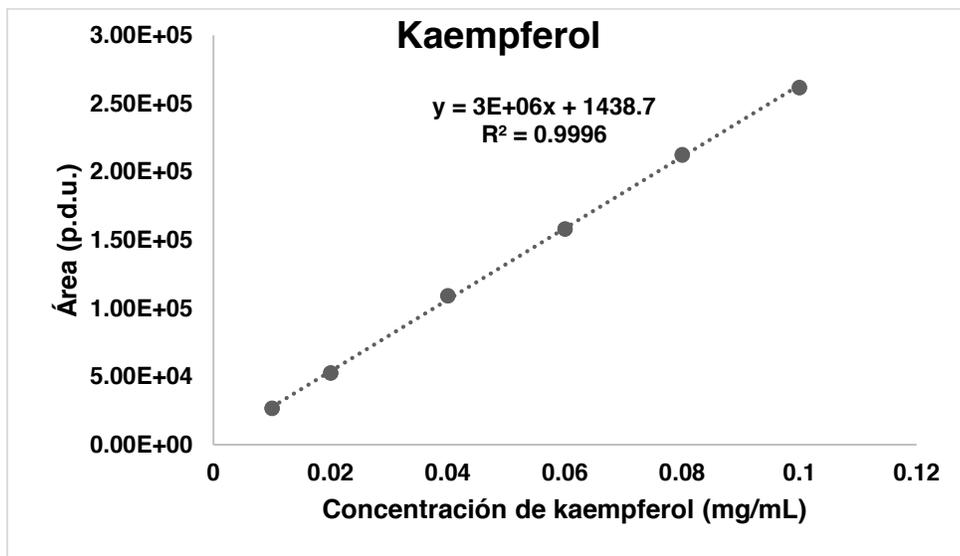
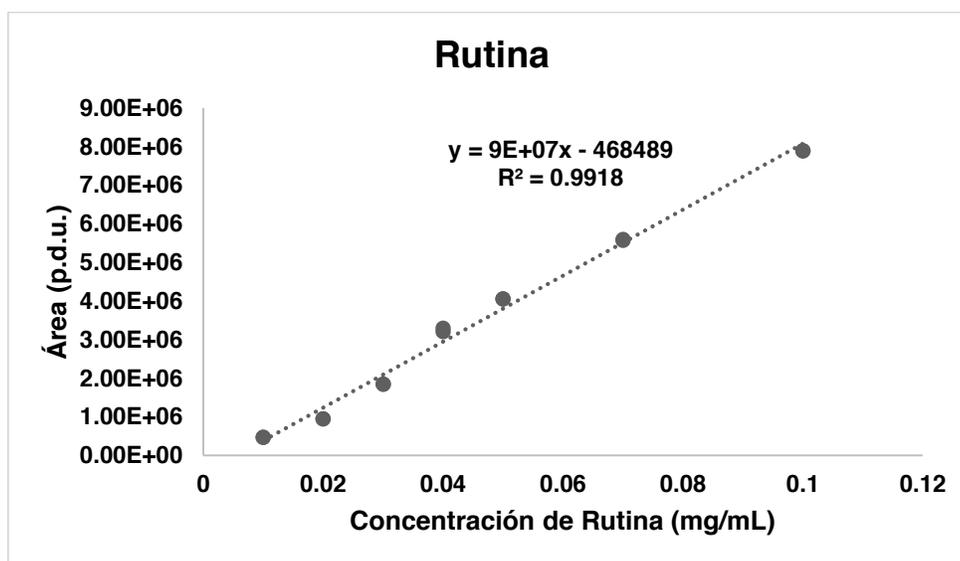


FIGURA B.1 Curva de calibración de β -caroteno para de determinación de carotenoides utilizando como disolvente hexano.

APENDICE C Rectas de calibración para cuantificación de compuestos fenólicos de referencia.



C.1 Curva de calibración de kaempferol-3-glucósido (pureza: > 99.0%) por UHPLC. Concentración de kaempferol-3-glucósido (en mg·mL⁻¹) versus área de los picos (en unidades definidas por procedimiento, p.d.u. por sus siglas en inglés).



C.2 Curva de calibración de quercetina-3-rutinósido (rutina) (pureza: 99.5%) por UHPLC. Concentración de ácido gálico (en mg·mL⁻¹) versus área de los picos (en unidades definidas por procedimiento, p.d.u. por sus siglas en inglés).