

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**



**“USO DE RESIDUOS SÓLIDOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL  
CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) PARA LA  
EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS”**

**Presentada por:**

**SILVIA VIRGINIA MELGAREJO CABELLO**

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

**Lima - Perú**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**“USO DE RESIDUOS SÓLIDOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL  
CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) PARA LA  
EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**SILVIA VIRGINIA MELGAREJO CABELLO**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

M S Francisco Salas Valerio  
**PRESIDENTE**

Dr. David Campos Gutiérrez  
**PATROCINADOR**

Mg.Sc. Rosa Miglio Toledo  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Juan Carlos Palma  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

A Daniel, mi querido hijo.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. David Campos Gutiérrez por facilitarme las instalaciones del laboratorio del Instituto de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para la realización de la investigación.
- Al Ing. Mg. Sc. Eduardo Morales Soriano por su orientación en la parte estadística de la presente investigación.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Camu-camu.....	3
2.2 Oxidación.....	5
2.3 Antioxidantes.....	6
2.4 Compuestos fenólicos.....	7
2.4.1 Principales clases de compuestos fenólicos.....	9
2.5 Extracción de compuestos fenólicos.....	9
2.5.1 Extracción líquido-líquido.....	11
2.5.2 Extracción sólido-líquido.....	11
2.6 Tipos de solventes usados en la extracción de compuestos fenólicos.....	12
2.7 Frutas y vegetales como fuentes de compuestos fenólicos.....	16
2.8 Valorización de residuos agroindustriales.....	17
2.9 Compuestos funcionales recuperados a partir de residuos agroindustriales .....	19
2.10 Gestión de residuos sólidos generados por las industrias agroalimentarias.....	22
2.11 Optimización por diseños experimentales.....	25
2.12 Método de superficie respuesta (RSM).....	26
2.12.1 Experimentos factoriales.....	30
2.12.2 Diseño central compuesto rotatable.....	31
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 Lugar de ejecución.....	33
3.2 Materia prima.....	33
3.3 Materiales, equipos y reactivos.....	33
3.3.1 Materiales.....	33
3.3.2 Equipos.....	33
3.3.3 Reactivos.....	35
3.4 Métodos de análisis.....	35
3.4.1 Determinación de humedad y materia seca.....	35

3.4.2	Análisis granulométrico.....	36
3.4.3	Determinación de los compuestos fenólicos totales.....	36
3.4.4	Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-PDA.....	36
a.	Preparación de la muestra.....	36
b.	Identificación de compuestos fenólicos por HPLC-PDA.....	37
3.5	Metodología experimental.....	37
3.5.1	Determinación de la generación de residuos sólidos a partir de la industrialización del camu-camu.....	37
3.5.2	Acondicionamiento de los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu.....	38
3.5.3	Caracterización de los residuos sólidos del camu-camu.....	38
3.5.4	Optimización de la extracción de los compuestos fenólicos totales (CF).....	38
3.6	Diseño experimental.....	39
3.6.1	Screening.....	39
3.6.2	Diseño central compuesto.....	40
3.7	Análisis estadístico.....	42
3.8	Metodología para la estimación del beneficio ambiental y económico para la producción de extractos fenólicos a partir de residuos sólidos provenientes de la industrialización del camu-camu.....	42
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
4.1	Generación de residuos sólidos a partir de la industrialización del camu-camu.....	43
4.2	Contribución de compuestos fenólicos por tipo de residuo sólido generado del procesamiento de camu-camu.....	44
4.3	Determinación de la humedad.....	46
4.4	Análisis granulométrico.....	46
4.5	Screening, empleando un diseño factorial.....	48
4.6	Optimización empleando un diseño central compuesto.....	52
4.7	Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto obtenido en condiciones óptimas.....	59
4.8	Identificación por HPLC-PDA del perfil fenólico del extracto purificado obtenido a partir de los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu.....	61

<b>4.9</b> Estimación del beneficio ambiental y económico para la producción de extractos fenólicos a partir de residuos sólidos provenientes de la industrialización del camu-camu.....	<b>65</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>
<b>VIII ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Composición físico química de 100 g de pulpa de camu-camu .....	4
<b>Cuadro 2:</b> Rendimientos promedios del camu-camu .....	4
<b>Cuadro 3:</b> Solventes orgánicos usados para la extracción de polifenoles .....	14
<b>Cuadro 4:</b> Relación de los residuos generados por las empresas agroindustriales en Medellín y el sur del valle del Aburrá – Colombia.....	23
<b>Cuadro 5:</b> Costo mensual de la disposición de residuos en las empresas agroindustriales de Medellín y el sur del valle de Aburrá – Colombia. ....	24
<b>Cuadro 6:</b> Número de puntos en los diseños de segundo orden .....	32
<b>Cuadro 7:</b> Factores y niveles ensayados para el screening .....	39
<b>Cuadro 8:</b> Matriz del screening .....	40
<b>Cuadro 9:</b> Factores, códigos de niveles y sus valores ensayados para diseño central compuesto rotable .....	40
<b>Cuadro 10:</b> Matriz del diseño central compuesto rotable .....	41
<b>Cuadro 11:</b> Residuos generados en el procesamiento del camu-camu .....	44
<b>Cuadro 12:</b> Contenido de compuestos fenólicos por tipo de residuos sólidos generado en el procesamiento de camu-camu .....	44
<b>Cuadro 13:</b> Análisis granulométrico de residuos sólidos (cáscara y pepa) deshidratados y molido del procesamiento del camu-camu .....	46
<b>Cuadro 14:</b> Contenido de compuestos fenólicos totales empleando el diseño factorial.....	48
<b>Cuadro 15:</b> Contenido de compuestos fenólicos totales empleando el diseño central compuesto .....	52
<b>Cuadro 16:</b> Coeficientes de regresión del modelo predictivo de segundo orden para las respuestas de compuestos fenólicos totales .....	53
<b>Cuadro 17:</b> Factores, niveles óptimos y respuesta maximizada.....	56
<b>Cuadro 18:</b> Cromatograma de compuestos fenólicos detectados a 280nm en residuos sólidos de la industrialización del camu-camu por HPLC – PDA .....	64
<b>Cuadro 19:</b> Alternativas de aprovechamiento y/o disposición de residuos sólidos generados en la industrialización del camu-camu.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Algunos compuestos fenólicos presentes en alimentos.....	8
<b>Figura 2:</b> Las estructuras químicas de las principales clases de compuestos fenólicos.....	10
<b>Figura 3:</b> Tecnologías de valorización de los residuos y subproductos orgánicos.....	19
<b>Figura 4:</b> Diagrama de flujo para la utilización de residuos de frutas y vegetales.....	20
<b>Figura 5:</b> Superficie de respuesta tridimensional donde se indica el rendimiento esperado ( $\eta$ ) como una función de las variables $x_1$ y $x_2$ .....	28
<b>Figura 6:</b> Grafica de Contornos de una superficie de respuesta.....	29
<b>Figura 7:</b> El carácter secuencial de la metodología de superficie respuesta (RSM).....	29
<b>Figura 8:</b> Representación y construcción de los DCC para $k=2$ factores.....	31
<b>Figura 9:</b> Esquema de proceso para la obtención de pulpa de camu-camu atomizada .....	34
<b>Figura 10:</b> Diagrama de Pareto de los efectos principales obtenidos del diseño factorial $2^3$ .....	50
<b>Figura 11:</b> Grafica de interacción para fenólicos totales obtenidos del diseño factorial $2^3$ .....	51
<b>Figura 12:</b> Diagrama de Pareto de los efectos principales obtenidos del diseño Central Compuesto Rotable.....	55
<b>Figura 13:</b> Superficie de respuesta estimada para la extracción de compuestos fenólicos totales de los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu respecto a la temperatura de extracción y relación materia prima / solvente .....	55
<b>Figura 14:</b> Líneas de contornos de la respuesta estimada para la extracción de compuestos fenólicos totales de los residuos sólidos de la industrialización del camu- camu respecto a la temperatura de extracción y relación materia prima / solvente .....	56
<b>Figura 15:</b> Perfil de compuestos fenólicos por HPLC – PDA a partir de la fracción F II del tratamiento óptimo (DCC <sub>6</sub> ) de los residuos sólidos de la industrialización del camu- camu corridos a 280nm .....	61

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1</b> .....	83
Cuadro 1: Análisis Granulométrico de residuos sólidos (cáscara y pepa) deshidratada y molida del camu-camu .....	83
<b>ANEXO 2</b> .....	83
Cuadro 2: Resultados de Contenidos de Compuestos Fenólicos totales en la etapa del Screening .....	83
Cuadro 3: Análisis de varianza del contenido de Compuestos Fenólicos en la etapa del Screening .....	84
<b>ANEXO 3</b> .....	84
Cuadro 4: Resultados de Contenido de Compuestos Fenólicos totales mediante el diseño central compuesto rotatable .....	84
Cuadro 5: Análisis de varianza del contenido de compuestos fenólicos mediante el diseño central compuesto rotatable .....	85
<b>ANEXO 4</b>	
Precio de venta de forrajes para alimentación animal.....	86
<b>ANEXO 5</b>	
Costo de traslado de residuos sólidos orgánicos al relleno sanitario.....	86
<b>ANEXO 6</b>	
Análisis económico- Flujo de caja económico para la producción de pulpa congelada de camu-camu para exportación al mercado japonés.....	87

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo usar los residuos sólidos (cáscara y pepa) procedentes de la industrialización del camu-camu como fuente de compuestos fenólicos, las variables consideradas para la extracción de los compuestos fenólicos fueron: la relación materia prima / solvente, la temperatura y el tiempo de extracción. En relación al solvente; se utilizó una solución de etanol al 50% que fue constante en todo el trabajo. En la obtención de camu-camu atomizada se generó 42.2% de residuos sólidos entre cascara y pepa respecto al fruto entero que secadas y molidas presentaron una humedad de 3.1% y un tamaño de partícula, en un 56.2%,  $\leq 0.42$  mm. Se empleó el diseño factorial para el *screening* con un arreglo de  $2^3$  para identificar aquellas variables que afectan sensiblemente en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos. Mediante el *diseño central compuesto* rotatable con 5 réplicas en el punto central se optimizaron las variables para el contenido de compuestos fenólicos totales expresados en mg ácido gálico equivalente (GEA)/100g materia seca. Las condiciones que maximizan la cantidad de compuestos fenólicos fueron: 55°C para temperatura y 1/42 para relación materia prima/solvente conjuntamente con tiempo de extracción 30 minutos obteniéndose un valor de 5939.1 mg de ácido gálico equivalente (GEA)/100 g materia seca. La identificación de compuestos fenólicos por la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC), a 280nm, reveló 22 picos principales los que estuvieron agrupados en: derivados del ácido elágico, derivados del flavan -3- ol (o derivados del flavanoles) y derivados de las flavanonas, además se identificó el ácido elágico tal cual. A 360 nm se identificó rutina. Se concluye que los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu son una fuente importante de compuestos fenólicos por lo que es una buena alternativa para su aprovechamiento, evitando su destino al relleno sanitario, logrando su valorización y planteándose una solución ambiental dentro de la gestión integral de residuos.

*Palabras claves: camu-camu, residuos sólidos agroindustriales, superficie respuesta, compuestos fenólicos, valorización de residuos.*

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was to use solid wastes (peel and seed) from the industrialization of camu-camu as a source of phenolic compounds, the variables considered for extraction of phenolic compounds were: the raw material / solvent ratio, the temperature and the extraction time. In relation to the solvent, a 50% ethanol solution was used, which was constant all the time. In the production of atomized camu- camu, 42.2% of solid waste was generated including the peel and the seed compared to the whole fruit, which, when dried and ground, had a humidity of 3.1% and a particle size of  $56.2\% \leq 0.42$  mm. A factorial design was used for the *screening* with an array of  $2^3$  to identify those variables that significantly affect the extraction yield of the phenolic compounds. The variables used for the content of total phenolic compounds expressed in mg of equivalent gallic acid (EGA) / 100g dry matter were optimized through a rotatable *central composite design* with 5 replications in the central point. The conditions to maximize the phenolic compound content were: 55 ° C for temperature and 1/42 for the raw material / solvent ratio together with the extraction time of 30 minutes, obtaining a value of 5939.1 mg of equivalent gallic acid (EGA) / 100g of dry matter. The identification of phenolic compounds by the high performance liquid chromatography (HPLC) technique, at 280 nm, revealed 22 main peaks grouped into: ellagic acid derivatives, flavan -3- ol derivatives (or flavanols derivatives) and flavanone derivatives, in addition ellagic acid was identified the way it is. At 360 nm, rutin was identified. In conclusion, the solid waste from the industrialization of camu-camu is an important phenolic compound source, making it a good alternative to use, avoiding a sanitary landfill destination, achieving its valorization, and a solution within the environmental integral management of wastes.

*Keywords: camu-camu, agroindustrial solid waste, surface response, phenolic compounds, waste recovery.*

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la agroindustria peruana ha crecido, aprovechando nuestra gran diversidad climática y natural, que permite la producción agroindustrial durante todo el año pero a la vez producen un gran porcentaje de subproductos de desechos, como cáscaras, semillas, etc. donde el manejo de éstos se realizan sin la prudencia necesaria y de forma poco saludable con el medio ambiente siendo una realidad que enfrentan la mayoría de las plantas de procesamiento de alimentos (Oreopoulou y Russ, 2007; Mirabella *et al.*, 2014; Olascoaga, 2016).

Camu-camu es una fruta tropical del Amazonas, ampliamente transformada en pulpa de fruta y otros derivados generando alrededor del 42 – 50% de residuos sólidos perecibles donde una inadecuada gestión traería problemas ambientales. En la mayoría de los casos el principal destino es la alimentación animal o el traslado al relleno sanitario que puede resultar costoso (Ros *et al.*, 2012; Silva de Azevedo *et al.*, 2014).

La exportación de pulpa congelada de camu-camu, en el año 2015 fue de 139.45 toneladas (Agrodata Perú/SUNAT 2016) y en el año 2007 fue de 1229.8 toneladas (SUNAT 2008); considerando un 42.2 por ciento de residuos sólidos generados en el procesamiento de camu- camu, se habrían generado 101.64 y 897.3 toneladas de residuos, respectivamente. Estos residuos adecuadamente gestionados se destinarían para obtener compuestos fenólicos con lo que se lograría darles una valorización y evitaría su disposición final en un relleno sanitario.

Existen muchos trabajos de investigación que buscan valorizar los residuos agroindustriales ya que contienen aún compuestos de gran valor. La concentración de compuestos fenólicos en la cáscara y pepa del camu-camu es muy superior en cuanto a flavonoides y antocianinas además de presentar una actividad antioxidante apreciable (Sotero, *et al.*, 2009). También se han identificado compuestos y carotenoides fenólicos relevantes para la salud (Fracassetti *et al.*, 2013, Fujita *et al.*, 2013 y Zanatta y Mercadante 2007). A la vez que muestran la

multifuncionalidad de los compuestos fenólicos de residuos de camu-camu debido a que presentan actividades antioxidantes, anti-microbianos y anti-enzimáticos. Por lo tanto el potencial de estos fitoquímicos constituyentes de material vegetal para el mantenimiento y protección de la salud de enfermedades coronarias del corazón y cáncer; está aumentando el interés entre los investigadores y procesadores de alimentos así como entre los consumidores, quienes han empezado a mirarlos con especial interés como alimentos funcionales (Babbar *et al.*, 2011).

La industria alimentaria genera un alto volumen de subproductos y residuos de procesamiento, que podrían plantear severos problemas medioambientales. La valorización de residuos es ampliamente reconocida como una solución de preferencia para la gestión de residuos y proporciona oportunidades para el desarrollo de nuevos productos naturales. Una de las opciones de mayor valor es la recuperación de los fitoquímicos polifenólicos bioactivos (Amyrgialaki *et al.*, 2014).

Por lo que en la presente investigación el objetivo general fue:

- Usar los residuos sólidos procedentes de la industrialización del camu-camu como fuente de compuestos fenólicos.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar los parámetros de extracción que maximizan el rendimiento de compuestos fenólicos totales.
- Identificar mediante HPLC-PDA, el perfil de compuestos fenólicos del extracto obtenido.
- Estimar el beneficio ambiental y económico para la producción de extractos fenólicos a partir de éstos residuos.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 CAMU-CAMU

Según Sotomayor (2000) el camu-camu es un arbusto que alcanza 4 m de altura; se ramifica desde la base formando varios tallos secundarios que a su vez se ramifican en forma de vaso abierto. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricos, lisos de color marrón claro o rojizo y con corteza que se desprende de forma natural. El fruto es globoso de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro, hasta negro púrpura al madurar; puede tener 2 a 4 cm de diámetro; con una a cuatro semillas. Peso promedio alrededor de 8.4 g por fruto. Las semillas son reniformes, aplanadas con 8 a 11 mm de longitud y 5.5 a 11 mm de ancho (Villachica, 1996).

El camu-camu al estado silvestre vegeta en la orilla de los ríos, cochas y cursos menores de agua en la Amazonía, sumergido una parte del tronco en el agua hasta una altura de 30 a 40% de su estatura total (Calzada, 1980; Sotomayor, 2000).

Los frutos se colectan cuando empiezan a madurar, es decir cuando están al estado semi-maduro (se reconoce por que la piel o cáscara que es de color verde adquiere algunas pintas color granate). La composición físico química del fruto en 100 g de pulpa se presenta en el Cuadro 1. Como se observa el mayor componente es el ácido ascórbico, presentando 2994 mg por 100g de pulpa (2780 mg como ácido ascórbico reducido) (Sotomayor, 2000).

El camu-camu es un buen antioxidante natural porque aporta importantes cantidades de vitamina C con lo cual el organismo tendría siempre los niveles adecuados de esta vitamina y por lo tanto estaría mejor protegido contra los radicales libres.

En el Cuadro 2 se muestra el rendimiento en pulpa y residuos (cáscara, semilla, fibra) del camu-camu, citado por Sotomayor (2000) donde se observa que la cantidad de residuos sólidos (cáscara, semilla, fibra) del fruto del camu-camu representa un 45.2% del total del fruto fresco.

**Cuadro 1: Composición físico química de 100 g de pulpa de camu-camu**

<b>COMPONENTES</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>VALOR</b>
Energía	kcal	24.0
Agua	g	93.3
Proteínas	g	0.5
Grasa	g	0.1
Carbohidratos	g	5.9
Fibra	g	0.4
Ceniza	g	0.2
Calcio	mg	28.0
Fosforo	mg	15.0
Hierro	mg	0.5
Tiamina	mg	0.01
Riboflavina	mg	0.04
Niacina	mg	0.61
Acido ascórbico reducido	mg	2780.00
Acido ascórbico total	mg	2994.00

Fuente: Collazos *et al.*(1996)

**Cuadro 2: Rendimientos promedios del camu-camu**

<b>COMPONENTE</b>	<b>RENDIMIENTO (%)</b>
Fruto fresco	100.00
Pulpa total	54.80
Cascara, semilla y fibra	45.20

Fuente: Sotomayor, 2000

## 2.2 OXIDACIÓN

En un principio, se utilizaba el término de *oxidación* para designar aquellos procesos en los que una sustancia reaccionaba con el oxígeno; de esta forma, se decía que un compuesto se oxidaba cuando aumentaba su cantidad de oxígeno (igualmente, se decía que se reducía cuando ésta disminuía).

A partir de este primer concepto de oxidación, y con el tiempo, dicho vocablo ha ido evolucionando y generalizándose hasta abarcar hoy en día una gran cantidad de reacciones en algunas de las cuales ni siquiera interviene el oxígeno. De hecho, en la actualidad se entiende por oxidación el proceso mediante el cual un compuesto pierde electrones.

Es inevitablemente, para que un compuesto pierda electrones otro los han de ganar: así surge estrechamente ligado al concepto de oxidación el de reducción; se entiende por reducción el proceso mediante el cual un compuesto gana electrones. Así pues, cada vez que se habla de oxidación se tiene que hablar también de la reducción (ya que es el proceso contrario, y sin uno de ellos no existiría el otro) (Mahan *et al.*, 2006).

Las reacciones oxidativas de los alimentos son la mayor causa en el deterioro de los alimentos. Reacciones semejantes son responsables en la disminución del valor nutricional, en la pérdida del aroma, del gusto y textura de los alimentos. La oxidación es esencial en muchos organismos vivos para la producción de energía necesaria para los procesos biológicos; al darse este proceso se generan los radicales libres de oxígeno también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) como los superóxidos, peróxido de hidrógeno, hidroxilos, etc. Los ROS juegan un papel importante en los procesos degenerativos y patológicos en varias enfermedades en seres humanos como el envejecimiento, cáncer, enfermedades coronarias del corazón, enfermedad del Alzheimer, trastornos neurodegenerativos, arterioesclerosis, catarata e inflamaciones. Los antioxidantes son sustancias que son capaces de prevenir o inhibir los procesos de oxidación en el cuerpo humano y en productos alimenticios. El butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y terc-butilhidroquinona (TBHQ) son utilizados como antioxidantes sintéticos, pero cabe la posibilidad que estos antioxidantes sintéticos son promotores de carcinogénesis, inflamación del hígado; muchas investigaciones están enfocados en el uso de antioxidantes

naturales y la repercusión que tienen estos sobre la salud. Estudios previos han demostrado que antioxidantes naturales se encuentran en las plantas (Babbar *et al.*, 2011).

### **2.3 ANTIOXIDANTES**

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los radicales libres son moléculas oxidadas por lo que son protagonistas de numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena, estas reacciones solo son eliminadas por la acción de otras moléculas, los llamados sistemas antioxidantes defensivos. Este sistema está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como vitamina E,  $\beta$ -caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albumina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn entre otros (Ramos *et al.*, 2008).

Los antioxidantes naturales son aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y los animales y a aquellos que se forman durante el cocinado o el procesado de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales. La mayoría son compuestos fenólicos, entre los cuales los grupos principales son los tocoferoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos (Pokorny *et al.*, 2005).

Los antioxidantes naturales son apreciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud (funcionales o nutraceuticos). La importancia de los antioxidantes es crucial para la salud, debido a su capacidad de neutralizar radicales libres (RL) asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrófilos dañadores del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de pre-carcinógenos, hasta carcinógenos (Friedman, 1997 mencionado por Villanueva *et al.*, 2010).

El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no toxico (Perón *et al.*, 2001; mencionado por Villanueva *et al.*, 2010).

## 2.4 COMPUESTOS FENÓLICOS

Compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, tanto durante el desarrollo normal y en respuesta a condiciones de estrés tales como: lesiones, infecciones, y radiación UV, entre otros. Estos compuestos son un grupo muy diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina y tirosina, por la vía del shikimato (Dixon y Paiva, 1995 citado por Muñoz *et al.*, 2007). Las plantas pueden contener fenoles simples y ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolizables y condensados, ligninas y lignanos. En las plantas, los fenoles pueden actuar como fitoalexinas, anti-alimentadores, atrayentes para los polinizadores, colaboradores de la pigmentación de la planta, antioxidantes y agentes protectores contra la luz ultravioleta, entre otros.

La distribución de los compuestos fenólicos en las plantas tanto en el tejido celular y a niveles sub-celulares no es uniforme. Los compuestos fenólicos insolubles se encuentran en paredes celulares, mientras que los solubles están presentes dentro de las vacuolas de las células vegetales. Las capas externas de las plantas contienen niveles más altos de compuestos fenólicos que los situados en su interior. Los compuestos fenólicos de la pared celular, ligado a los diferentes componentes celulares, contribuyen a la resistencia mecánica de la célula, así como también desempeña un papel regulador en el crecimiento de las plantas y su morfogénesis (Naczki y Shahidi, 2006).

Existe una enorme variedad de compuestos fenólicos con actividad biológica, que contienen uno o más anillos aromáticos y que son constituyentes naturales de los alimentos vegetales y proporcionan, en gran medida, al amargor, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad a la oxidación de los alimentos. Las sustancias fenólicas más simples incluyen los monofenoles, con un anillo benceno único, tales como el 3-etilfenol y el 3,4-dimetilfenol, encontrados en frutas y semillas, el grupo del ácido hidroxicinámico, que incluye los ácidos ferulico y cafeico, y los flavonoides y sus glucósidos que incluyen las catequinas, proantocinas, antocianidinas y los flavonoles. Los taninos son un grupo complejo y escasamente definido de sustancias fenólicas de alto peso molecular, solubles en agua (Pokorny *et al.*, 2005). En la Figura 1 se muestra algunos de los antioxidantes frecuentes en alimentos correspondientes a este grupo.

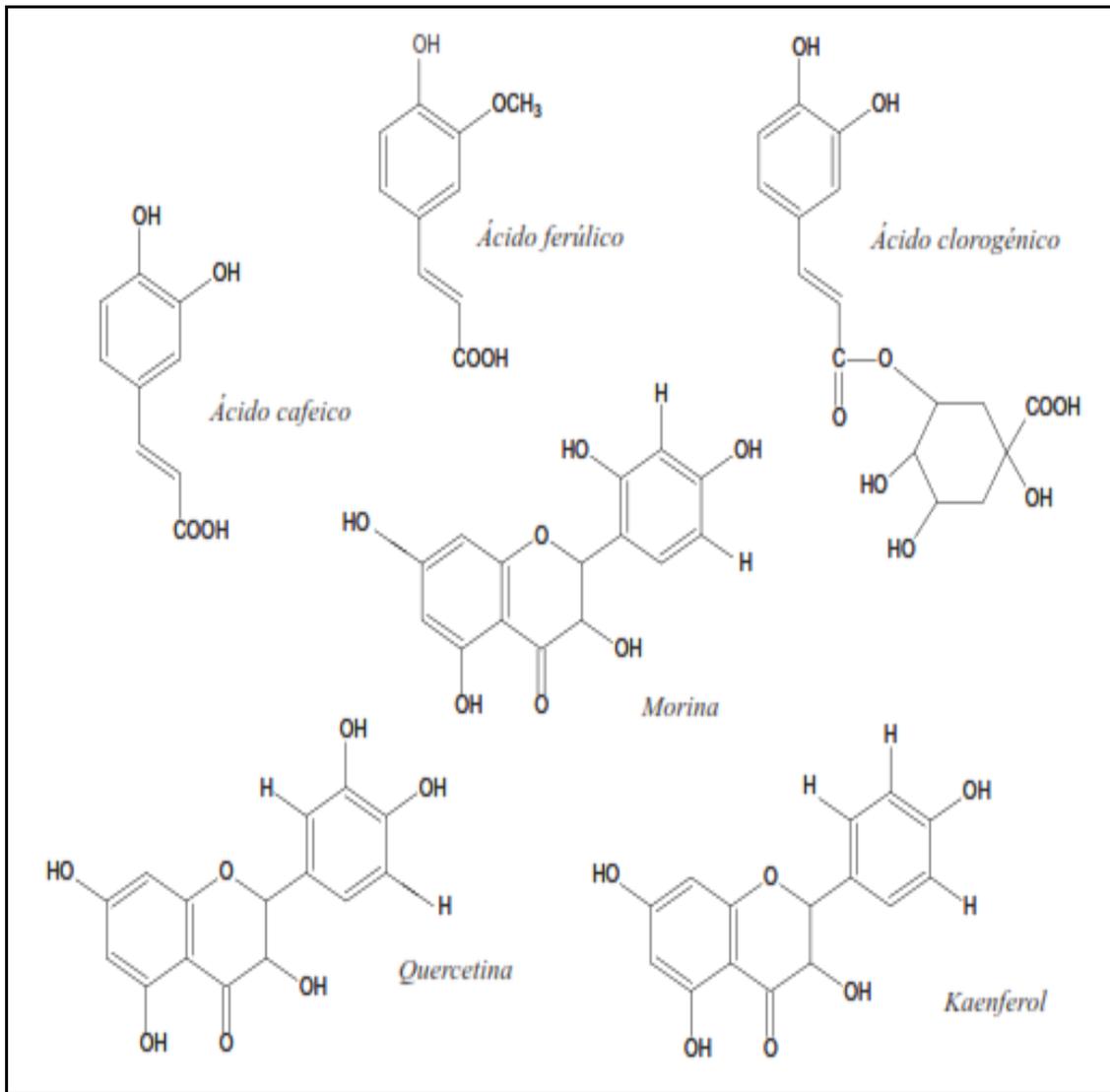


Figura 1: Algunos compuestos fenólicos presentes en alimentos (Fuente: Muñoz *et al.*, 2007)

Los compuestos fenólicos son un gran grupo de antioxidantes naturales; el consumo de fuentes importantes, particularmente de frutas, vegetales y cereales presentan efectos benéficos para la salud (Naczki & Shahidi, 2006). La asociación entre una dieta rica en frutas y vegetales está relacionada a una disminución de riesgo de enfermedades cardiovasculares, y ciertas formas de cáncer, según evidencias epidemiológicas (García-Alonso *et al.*, 2004 ; Arts y Hollman, 2005) . Estos fitoquímicos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que evidencian su rol protector sobre la salud humana (Carratú y Sanzini, 2005). Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tienen que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas (García-Alonso *et al.*, 2004). Estos componentes antioxidantes son capaces de neutralizar radicales libres, y pueden jugar

un rol importante en la modulación de detoxificación enzimática, estimulación del sistema inmune, disminución de la agregación plaquetaria y modulación del metabolismo hormonal (Carratú y Sanzini, 2005 mencionado por Muñoz *et al.*, 2007).

Lafka *et al.* (2011) indicaron que los extractos fenólicos de los residuos molidos del procesamiento del aceite de oliva se pueden utilizar como ingrediente funcional en otros aceites y alimentos constituyendo una alternativa a los antioxidantes sintéticos para aumentar la estabilidad de los alimentos mediante la prevención de la peroxidación lipídica y proteger los sistemas vivos del daño oxidativo por radicales libres o ROS.

#### **2.4.1 PRINCIPALES CLASES DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de moléculas que tienen una estructura de polifenol (es decir, varios grupos hidroxilo sobre anillos aromáticos), pero también moléculas con un anillo fenol, tales como los ácidos fenólicos y alcoholes fenólicos. Los polifenoles se dividen en varias clases según el número de anillos fenol que contienen y a los elementos estructurales que se unen a estos anillos. Los principales grupos de polifenoles (Figura 2) son: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables y condensados), estilbenos y lignanos (D'Archivio *et al.*, 2007 citado por Ignat *et al.*, 2011).

#### **2.5 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

La extracción es un paso muy importante en el aislamiento, identificación y el uso de compuestos fenólicos y no hay un único método estándar de extracción. La extracción por solvente y la extracción con fluido supercrítico (Bleve *et al.*, 2008; Fredj y Francois, 1990; Nahar y Sarker, 2005; Palma y Taylor, 1999) son las técnicas más comunes que se utilizan para el aislamiento de compuestos fenólicos (Ignat *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos se han extraído por trituración, secado o liofilización de frutas, verduras y hierbas o sólo por inmersión de plantas frescas con posterior extracción por solventes (Merken y Minussi *et al.*, 2003; Sánchez-Moreno *et al.*, 1999; Beecher, 2000). Estas metodologías implican la co-extracción de sustancias no fenólicas, tales como azúcares, ácidos

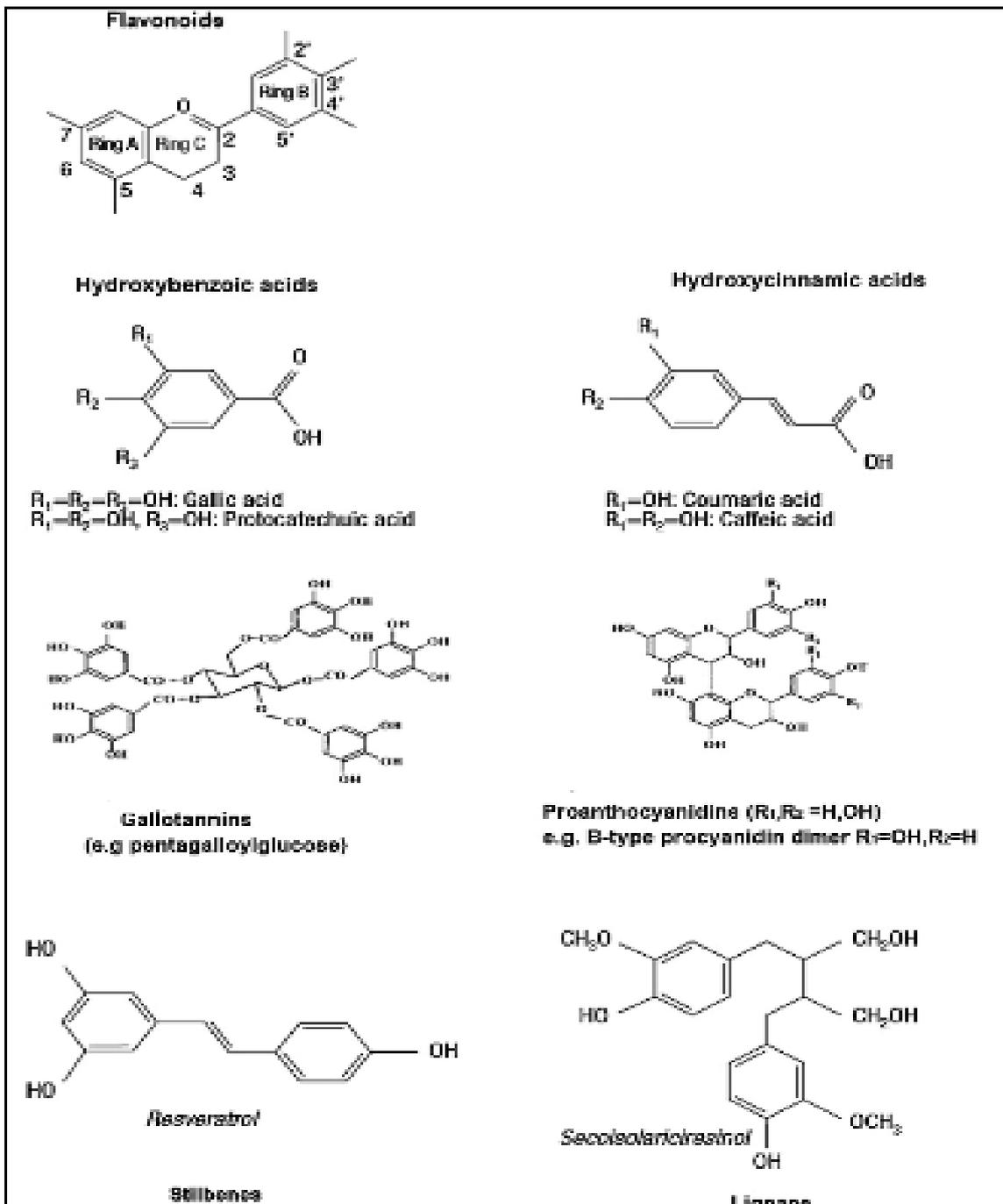


Figura 2. Las estructuras químicas de las principales clases de compuestos fenólicos

(Fuente: Ignat *et al.*, 2011)

orgánicos y proteínas, que requieren procesos posteriores de purificación (por ejemplo extracción en fase sólida, SPE) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). La extracción con solvente puede ser extracción líquido- líquido o extracción sólido-líquido entre otros.

### **2.5.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO**

Es una operación de transferencia de masa en la que una solución líquida (la alimentación) que inicialmente contiene uno o más solutos es mezclada con un líquido inmiscible o casi miscible (disolvente). El disolvente tiene preferencia, por afinidad o selectividad, hacia uno o más de los componentes de la alimentación gracias también a que tiene diferente densidad. Obteniéndose dos fracciones: el extracto, que es la solución de disolvente rico que contiene el soluto extraído deseado, y el refinado, que es la solución de alimentación residual que contiene poco soluto (Müller *et al.*, 2008 citado por Ignat *et al.*, 2011). Para la separación de compuestos fenólicos, por el método de extracción líquido-líquido se utiliza frecuentemente con los líquidos, sub-productos industriales, tales como los resultantes de la industria de las bebidas (Ignat *et al.*, 2011).

### **2.5.2 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO**

Extracción sólido-líquido, o lixiviación se puede definir como un fenómeno de transporte en el que los sólidos contenidos en una matriz sólida migran en un disolvente puesto en contacto con la matriz (Corrales *et al.*, 2009). Se trata de una operación ampliamente utilizada para recuperar muchos componentes importantes de alimentos: sacarosa en la caña o de la remolacha, los lípidos de las semillas oleaginosas, proteínas de semillas oleaginosas, fitoquímicos de plantas, hidrocoloides funcionales de algas y compuestos polifenólicos de plantas, frutas, verduras, etcétera (Ignat *et al.*, 2011).

La eficiencia de extracción depende de las condiciones del proceso. Varios factores afectan la concentración de los componentes deseados en el extracto: temperatura, relación sólido - líquido y tamaño de partícula. Por ejemplo el contenido fenólico, en los extractos de la cascara de la almendra, presentó tres veces más cantidad cuando un lote de extracción sólido-líquido se realizó a 50 ° C en comparación con la de 25°C. El tiempo de contacto y relación sólido - líquido también son considerados variables significativas (Hayouni, Abedrabba, Bouix, y Hamdi, 2007; Pinelo, Rubilar, Sineiro, y Núñez, 2004; Rubilar, Pinelo, Franco, Sineiro, y Núñez, 2003). La extracción es una etapa muy importante si se elige un adecuado disolvente de extracción.

## 2.6 TIPOS DE SOLVENTES USADOS EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El rendimiento de la extracción de compuestos antioxidantes de materiales vegetales se ve influido principalmente por las condiciones en que se lleva a cabo el proceso de extracción sólido - líquido, utilizando un solvente para separar una fracción soluble a partir de un sólido permeable. La elección de un solvente apropiado es uno de los pasos previos más importantes. Características químicas del solvente y la diversa estructura y composición del material natural aseguran que cada sistema materia prima/solvente muestre un comportamiento diferente, que no se puede predecir (Pinelo, Rubilar, Sineiro y Núñez, 2006).

Akter *et al.* (2011), indican que existen diversas investigaciones, cuyos objetivos fueron mejorar el rendimiento en la extracción de compuestos bioactivos, por lo que han experimentado con diversos solventes, tales como: metanol / ácido acético agua (70:30:5 v / v) (Gonçalves *et al.*, 2010); metanol / agua (50:50 v / v) seguido por acetona / agua (70:30 v / v) (Rufino *et al.*, 2010.); 50% de acetona acuosa (Myoda *et al.*, 2010); metanol / ácido fórmico (9:1) (Reynertson *et al.*, 2008), el 80% de metanol acidificado seguido por metanol (0,01% HCl) (Chirinos *et al.*, 2010.); ethanol/1.5 N HCl (85/15 v / v) (Zanatta *et al.*, 2005).

Antolovich *et al.* (2000) citado por Mokrani *et al.* (2016) indicaron que históricamente, la recuperación de los fenoles de frutos por extracción líquido usando disolventes calientes o frías era común. Los disolventes adecuados para este uso son mezclas acuosas con etanol, metanol, acetona y dimetilformamida. Generalmente, la acetona es el mejor disolvente para la extracción de proantocianidinas y taninos; etanol extrae de manera eficiente los flavonoides y sus glucósidos, catecoles y taninos; mientras que los ácidos fenólicos y catequina se extrajeron mejor con metanol. Estos hechos van de acuerdo con la polaridad del disolvente utilizado para la extracción y la solubilidad de los compuestos fenólicos en ellos ya que la polaridad de la acetona, el etanol y el metanol son 0.355, 0.654 y 0.762, respectivamente, Tan *et al.* (2013). Por lo tanto, no hay disolvente único capaz de extraer todas las clases de compuestos fenólicos a partir de una muestra, de forma simultánea.

Según Naczki M (2004) citado por Mokrani *et al.* (2016) indica que la solubilidad de los compuestos fenólicos depende ampliamente de la naturaleza del disolvente (polaridad) usado, su grado de polimerización, así como su interacción con otros componentes de los alimentos y la formación de complejos insolubles.

Lapornik *et al.* (2005), atribuyen valores más altos de polifenoles totales en los extractos de etanol y metanol en comparación con los extractos de agua debido al hecho de que el metanol y etanol son solventes menos polares que el agua. Esto significa que son más eficientes en la degradación de las paredes celulares y semillas, las cuales tienen carácter no polar, y permite que los polifenoles se liberen de las células. Para el uso en la industria alimentaria el etanol es el solvente más adecuado debido a la toxicidad del metanol. Entre el etanol y metanol, una variedad de otros disolventes de extracción se ha observado en la literatura, algunos de ellos se presentan en el Cuadro 3.

Lu y Yeap Foo, 1999; Peng *et al.*, 2001, citados por Pinelo *et al.*, 2006, reportaron que el etanol es un solvente eficaz para la extracción de compuestos fenólicos de la uva. El resultado de la extracción es función de la rapidez con que se disuelve el compuesto y se alcanza el equilibrio en el líquido. Cuatro etapas de transferencia de masa están involucradas en el paso del soluto del sólido al solvente. La etapa que limita la transferencia es la difusión del soluto disuelto dentro del sólido y no la difusión en el disolvente (Gertenbach, 2001 citado por Pinelo *et al.*, 2006) ya que la resistencia externa es insignificante a la transferencia de masa. Por lo tanto, suponiendo que no hay cambio de la difusividad efectiva con la concentración de soluto, la velocidad de difusión de la etapa limitante puede ser descrita por la segunda ley de Fick.

Thoo *et al.* (2010) investigaron sobre el efecto de la concentración del etanol (0 – 100%, v/v) en la extracción de compuestos fenólicos del mengkudu (*Morinda citrifolia*). La concentración de etanol mostró un efecto significativo en el contenido de fenólicos totales. Reportaron que el rendimiento de fenólicos totales se maximiza en etanol a 40%. Este resultado experimental estaba de acuerdo con los informes anteriores que sugieren que un sistema de disolvente binario fue superior a la de un sistema mono-disolvente (agua pura o etanol puro) en la extracción de compuestos fenólicos con respecto a su polaridad relativa, Wang *et al.*, 2007 y Zhang *et al.*, 2007 citados por Thoo *et al.*, 2010. Además, indican que la extracción de compuestos fenólicos a partir de una muestra está directamente relacionada con la compatibilidad de los compuestos con el sistema disolvente de acuerdo con el principio "semejante disuelve a semejante". Estos mismos autores, Thoo *et al.* (2010), concluyeron que como la polaridad del disolvente se incrementó, en consecuencia las extracciones relativas de

**Cuadro 3: Solventes orgánicos usados para la extracción de polifenoles**

<b>Compuestos Polifenolicos</b>	<b>Solventes</b>	<b>Referencias</b>
Phenolic acids, flavonols, antocyanins	Ethyl acetate	Pinelo <i>et al.</i> (2005); Russel <i>et al.</i> (2008)
Anthocyanins, Phenolic acids, catechins, flavanones, flavones, flavonols, procyanidins, ellagic acids, Rutin, chlorogenic acids	Methanol and different aqueous forms (50-90%, v/v)	Bleve <i>et al.</i> (2008); Caridi <i>et al.</i> (2007); Ross <i>et al.</i> (2009); Mattila and Kumpulainen (2002)
Anthocyanins, flavonols, free phenolic acids	Ethanol and different aqueous forms (10-90%, v/v)	Altiok <i>et al.</i> (in press); Balas and Popa (2007); Wang <i>et al.</i> (2009); Bleve <i>et al.</i> (2008). Bucic-Kojic <i>et al.</i> (2006); Corrales <i>et al.</i> (2009); Ross <i>et al.</i> (2009).
Flavonols, free phenolic acids	Chloroform	Sharififar, Dehghn-Nudeh, and Mirtajaldini (2009)
Flavonols, phenolic acids	Dietyl ether	Ross <i>et al.</i> (2009)
Proantocyanidins, phenolic acids	Hot water 80-100°	Diouf, Stevanovic, and Cloutier (2009)
Tannins, bound phenolic acids	NaOH (2N-10N)	Nardine <i>et al.</i> (2002); Popa <i>et al.</i> (2008); Ross <i>et al.</i> (2009)
Phenolic compounds, phenolic acids	Petroleum ether	Zhang <i>et al.</i> (2009)
Flavonols, phenolic acids, hydroxycinamic acids, coumarins, Flavonols xanthenes	Acetone/water 10-90% (v/v)	Altiok <i>et al.</i> (in press); Naczk & Shahidi (2006); Sharififar <i>et al.</i> (2008); Schieber <i>et al.</i> (2003)
Flavonols, phenolic acids, simple phenolics, anthocyanins	n-Hexane, isooctane, ethyl acetate	Alonso Garcia <i>et al.</i> (2004)
Polyphenols from olive leaves, oleuropein and rutin	Acetone, ethanol and their aqueous forms (10-90%, v/v)	Altiok <i>et al.</i> (in press)
Flavonols, quercetin 3,4'-diglucoside and quercetin 4'-monoglucoside	Methanol/water 70% v/v	Caridi <i>et al.</i> (2007)

Fuente: Ignat *et al.*, 2011

fenólicos totales y flavonoides totales cambiaron pero que los rendimientos máximos fueron a diferentes concentraciones de etanol tanto para fenoles totales como para flavonoides totales. Por lo tanto, no hay una sola concentración de etanol capaz de recuperar todos los compuestos fenólicos individuales de una muestra. Por lo que Durling *et al.*, 2007, propusieron que el contenido de fenólicos totales se maximiza a baja concentración de etanol y contiene mayor proporción de compuestos hidrofílicos, mientras que los flavonoides totales se recuperan a alta concentración de etanol que corresponderían a compuestos lipofílicos.

Según Thoo *et al.*(2010) con soluciones de etanol altos (80%), la capacidad antioxidante, medido con el radical DPPH, mostró capacidades bajas. Por lo tanto, se cree que los compuestos fenólicos eficaces en el extracto crudo, a la que se atribuyen las capacidades antioxidantes, eran intermedia polar y su solubilidad era muy sensible a la polaridad del disolvente. Al tener una relación entre la alta extracción de compuestos fenólicos y alta capacidad antioxidante, se seleccionó una concentración de etanol moderada (40%) como el disolvente más apropiado para optimizar los parámetros de extracción subsiguientes.

Cujic *et al.* (2016) estudiaron la influencia del porcentaje de solvente en la eficacia de la extracción de fenoles totales a partir de frutos secos de chokeberry (*Aronia melanocarpa*) por lo que probaron concentraciones de etanol de 50%, 70% y 96%. Los resultados revelaron que el rendimiento de fenoles totales se maximiza en 50% de etanol (18.2mg GAE/g muestra seca) y disminuye de manera significativa con un aumento adicional en la concentración de etanol. Galvan D'Alessandro *et al.*(2012), citado por Cujic *et al.* (2016), informaron que el uso de la concentración media para la mezcla de etanol/agua (50%) resultó en mayor rendimiento de fenólicos totales en comparación con el agua u otras proporciones de la mezcla de etanol/agua.

En estudios previos se informó que el sistema disolvente binario que contiene disolventes hidro-organicos fue superior que el sistema mono-componente de disolvente (agua pura o etanol puro) en la extracción de compuestos fenólicos (Cacace y Mazza, 2003 y Zhang *et al.*, 2007). El agua juega un papel importante en el hinchamiento de material vegetal, mientras que el etanol es el responsable de interrumpir la unión entre los solutos y la matriz de la planta, permitiendo así una mejor transferencia de masa de los compuestos. Por lo tanto, la mezcla de agua y etanol como agente disolvente muestra un efecto sinérgico que facilita la extracción de compuestos fenólicos a partir de frutos secos de chokeberry.

Además, es importante resaltar que el uso de sistemas de solventes benignos para la recuperación de los compuestos de interés se hace inminente. El etanol es un bio-solvente, producido por fermentación de varios materiales que contienen carbohidratos. A diferencia de otros solventes tales como metanol o acetona, el etanol no es tóxico y puede ser reutilizado tras su recuperación después de su eliminación del extracto a través de la destilación, generando así prácticamente cero desechos (Amyrgialaki *et al.*, 2014).

## **2.7 FRUTAS Y VEGETALES COMO FUENTES DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

El reciente interés por los polifenoles de plantas se ha enfocado por su gran potencial en beneficio de la salud humana, con particular referencia a los polifenoles de frutas y vegetales (Dreosti, 2000 mencionado por Villanueva *et al.*, 2010). Diversas investigaciones muestran dichas características de los polifenoles provenientes de frutas y vegetales.

Los flavonoides, especialmente isoflavonas, son los principales compuestos fenolicos encontrados en la soja y sus derivados (Chung, Seo, Ahn, y Kim, 2011 citados por Handa *et al.*, 2016).

Fu *et al.* (2011) evaluaron las capacidades antioxidantes y los contenidos de compuestos fenólicos totales de 62 frutos. Los resultados indicaron que los diversos frutos tenían diferentes capacidades antioxidantes y la variación era muy grande. Siete frutos: jujube (Chinese date), granada, guayaba, chirimoya, kaki japonés (*Diospyros kaki*), Chinese Wampee (*Clausena lansium*) y ciruela (Sanhua), mostraron las actividades antioxidantes más altas.

Suja *et al.* (2004) evaluaron el efecto antioxidante de un extracto metanólico procedente de la torta de sésamo en diversos aceites vegetales (soya y girasol), los resultados mostraron que las concentraciones de estos extractos entre 5 y 100 ppm disminuyeron significativamente los valores de índice de peróxido y dienos conjugados en pruebas de almacenamiento a 60°C. Ueda *et al.*, (2004) encontraron 3 compuestos químicos inhibidores de la Aldosa Reductasa (AR) a partir de extractos metanolicos (80%MeOH) de las hojas de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh. La AR es una enzima implicada en el metabolismo de los polialcoholes. Convierte a los monosacáridos a los correspondientes polialcoholes (por ejemplo, la glucosa es transformada en sorbitol). La hiperglucemia incrementa este metabolismo ocasionando un aumento del sorbitol. También llamada aldehido reductasa o polioldeshidrogenasa.

Reynertson *et al.* (2008) realizaron análisis cuantitativo del contenido fenólico, actividad antioxidante y contenido total de antocianinas a partir de 14 frutas comestibles de la familia Myrtaceae. Chirinos *et al.* (2010) examinaron la capacidad antioxidante del ácido ascórbico y compuestos fenólicos presentes en la fruta de camu-camu durante su maduración. El ácido ascórbico disminuyó, y el contenido de antocianos, flavonoles y flavanoles, y la capacidad antioxidante DPPH aumentó durante la maduración.

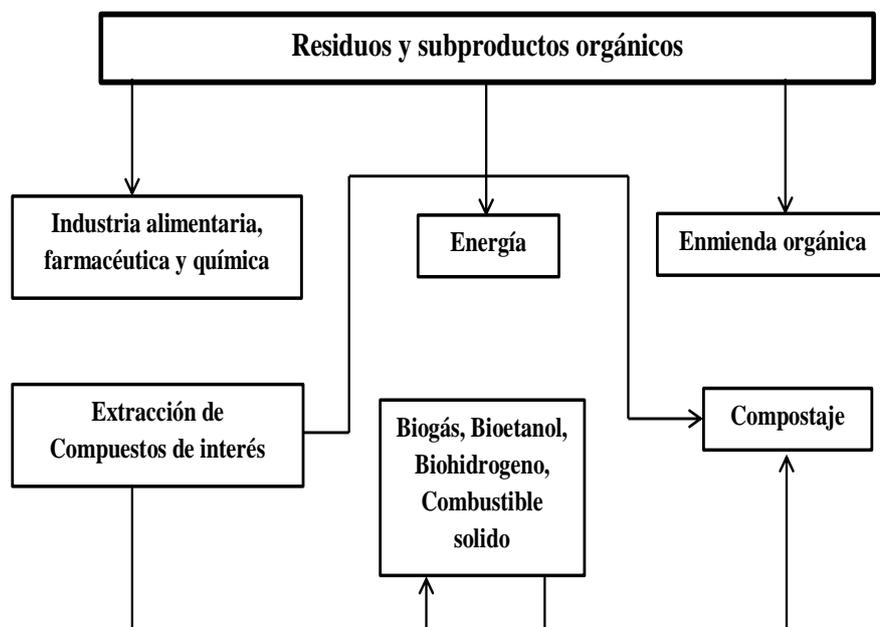
## **2.8 VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

Valorización es un procedimiento que permite el aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos sin poner en peligro la salud humana y sin utilizar métodos que dañen el medio ambiente (Sánchez, 2015). La valorización es un concepto relativamente nuevo en el campo de la gestión de residuos industriales que promueve el principio del desarrollo sostenible. Uno de los objetivos de valorización de subproductos de procesamiento de alimentos, residuos y efluentes es la recuperación de sustancias químicas finas y la producción de metabolitos de carácter funcional a través de procesos químicos y biotecnológicos, Federici *et al.* (2009).

Existen muchos trabajos de investigación que buscan valorizar los residuos agroindustriales con la finalidad de evitar disponerlos en el relleno sanitario, pero sobretodo porque estos residuos contienen aún compuestos de gran valor. Quintero *et al.* (2008) compararon diferentes tipos de residuos agroindustriales (paja de trigo y pulpa de betarraga) que contienen ácido clorogénico (compuesto fenólico) obtenido mediante hidrólisis enzimática para producir ácido cafeico que presenta propiedades antioxidantes. Por otro lado y a partir de semillas de mango se extrajeron nanocristales de celulosa (partículas de refuerzo en la fabricación de películas antimicrobianas, películas transparentes, pantallas flexibles, implantes biomédicos, fibras y textiles, plantillas para componentes electrónicos, entre muchos otros), demostrando un valor añadido de las semillas de mango (Alves *et al.*, 2013). Elain *et al.* (2016) lograron valorizar las aguas de procesamiento de leguminosas y frutas para la obtención de polihidroxialcanoatos (PHA) que son poliésteres microbianos producidos por numerosas bacterias en la naturaleza como reserva intracelular de carbono o energía (Sudesh *et al.*, 2000 citados por Elain *et al.*, 2016). Los PHA son completamente biosintéticos y biodegradables con cero residuos tóxicos y reciclables en residuos orgánicos. Estos materiales tienden a sustituir los plásticos sintéticos.

En el proceso productivo de los alimentos, además del producto deseado, se generan subproductos, residuos y productos fuera de los límites aceptables; cada uno de los cuales pueden servir para consumo humano o animal y aplicación industrial, lo que traería beneficios económicos (Yepes *et al.*,2008). En la Figura 3, se muestra que de acuerdo al tipo de residuos, se puede dirigir hacia diversos tipos de industria como es la industria alimentaria (humana y animal), farmacéutica, química, etc, mediante la obtención de compuestos de interés a partir de los residuos y subproductos (por ejemplo: polifenoles, vitaminas, compuestos aromáticos ...). Algunos de estos son de naturaleza conocida, aunque existen otros muchos que esperan su identificación y posterior explotación por la industria para elaborar productos novedosos y competitivos en el mercado. También se pueden destinar a la industria energética para la obtención de fuentes de energía alternativas como biogás, bioetanol, biohidrogeno....,y a la industria agraria para la obtención de materiales orgánicos estabilizados que puedan utilizarse como enmienda orgánica de suelos o como sustrato de cultivo alternativos a las turbas, con actividades específicas con valor añadido (Ros *et al.*,2012).

En el 2009, el mercado de suplementos con capacidad antioxidante, entre ellos la gama de polifenoles, fue valorado en más de 3.4 billones de dólares para la Vitamina C, 879 millones



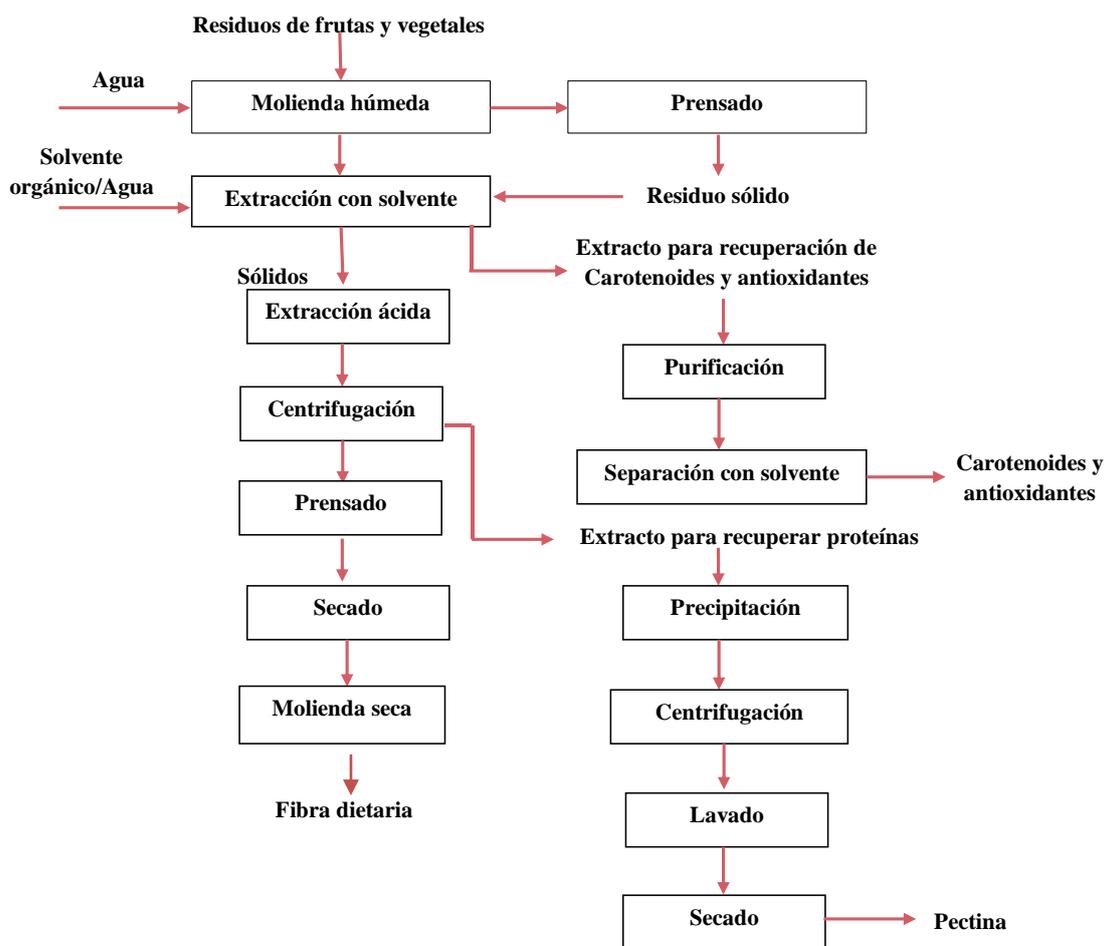
**Figura 3: Tecnologías de valorización de los residuos y subproductos orgánicos.**

Fuente: Ros *et al.* (2012)

de dólares para Coenzima Q<sub>10</sub> y 1.39 billones de dólares para la vitamina E. En el año 2011, las ventas para las bebidas envasadas con declaración de antioxidantes se incrementó en un 12.9% en Estados Unidos, mientras que para los alimentos empaquetados con esta misma declaración (cereales integrales y productos de panificación) se incrementó en un 7.3%. Se predice que en Estados Unidos se presente un incremento anual del 6% durante los últimos 5 años para aquellos productos con capacidad antioxidante, por lo que para el año 2016 el mercado pueda ser evaluado en aproximadamente 86 billones de dólares (Gómez, 2012).

## **2.9 COMPUESTOS FUNCIONALES RECUPERADOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

Cada vez es más evidente que los problemas de eliminación de residuos y agotamiento de recursos se pueden resolver juntos mediante la reutilización de residuos como recurso, utilizando tecnologías verdes y sostenibles (Luque y Clark, 2013; Thi *et al.*, 2016). En ese sentido los conceptos de ecología industrial como la economía circular son considerados los principios rectores de la eco-innovación, con el objetivo de una economía de cero desechos en la que los residuos se utilizan como materia prima para nuevos productos y aplicaciones (Mirabella *et al.*, 2014), muchas investigaciones muestran la forma de añadir valor a los residuos de diversas frutas. Oreopoulou y Tzia (2007) muestran un diagrama de flujo general para la recuperación de varios compuestos funcionales a partir de sub-productos de frutas y vegetales (Figura 4).



**Figura 4: Diagrama de flujo para la utilización de residuos de frutas y vegetales.** Fuente: Oreopoulou y Tzia (2007)

Las semillas de la uva (*Vitis vinífera*) son consideradas como fuente rica de compuestos polifenólicos, principalmente catequina monomérica, epicatequina y ácido gálico (Mongas, Gomez-Cordoves, Bartolome, Laureano, & Ricardo da Silva, 2003). La cascara de la banana (*Musa sapientum*) representa entre el 30 a 40% del peso de la fruta y es rica en hemicelulosa, pectina y minerales (Emaga, Robert, Ronkart, Wathelet, & Paquot, 2008). Gonzalez-Montelongo, Gloria Lobo, and Gonzalez (2010) reportaron que la cascara de la banana contiene grandes cantidades de dopamina y L-dopa, catecolaminas; los cuales son sustancias con capacidad antioxidante.

Peschel *et al.* (2006) trabajaron con once entre frutas, hortalizas y dos subproductos; investigaron el rendimiento de extracción de polifenoles, el contenido de fenoles totales (TPC, Folin-Ciocalteu) y la actividad antioxidante. Los extractos con mayor actividad antioxidante, la justificación económica y el contenido de fenoles se obtuvieron a partir de manzana (TPC

máxima  $48,6 \pm 0,9$  mg de ácido gálico equivalente/ g extracto seco), pera ( $60.7 \pm 0.9$  mg GAE/ g ), tomate ( $61.0 \pm 3.0$  mg GAE/ g ), vara de oro ( $251.4 \pm 7.0$  mg GAE/ g ) y alcachofa ( $514.2 \pm 14.9$  mg GAE/ g ). Este estudio demuestra la posibilidad de recuperar grandes cantidades de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes a partir de residuos de frutas y hortalizas no sólo para la alimentación, sino también para aplicaciones cosméticas.

Se han determinado el contenido de fenólicos totales y capacidad antioxidante de extractos obtenidos de residuos de 6 frutas: cáscara de kinnow, semillas de kinnow, pericarpio y semillas de mandarina (litchi), pepas de uva y cascara de banana. La producción de nutracéuticos usando compuestos bio-activos provenientes de residuos de frutas permitiría a las empresas ser eficientes, a costos bajos y ser responsables en el cuidado del medio ambiente. La opción de uso más efectivo de estos compuestos bio-activos recuperados podría ser en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Además, no solo ayudaría en la parte comercial, por la extracción de compuestos bio-activos, sino que también en las ciudades y/o áreas rurales permitiría la disminución de la contaminación ambiental causados por la mala disposición de estos residuos (Babbar *et al.*, 2011).

Alrededor de un millón de toneladas de desechos orgánicos registrados en la Unión Europea proceden de los vegetales (hojas externas o tallos) y cerca de 3.4 millones de toneladas provienen del sector cervecero. Estos desechos orgánicos se están convirtiendo en los últimos años no sólo en una apuesta clara para la producción de energía alternativa, sino que constituyen también una opción para la industria alimentaria, que puede ver cómo su reutilización da como resultado ingredientes de gran valor. Residuos como los granos gastados de la cebada utilizada para la elaboración de cerveza o las hojas procedentes de los vegetales son ricos en biopolímeros, fitoquímicos y nutrientes que los convierten en grandes promesas para la elaboración de nuevos alimentos (Chavarrías, 2009).

Sotero, *et al.* (2009) investigaron en pulpa, cáscara y semillas del camu-camu concluyendo que la actividad antioxidante es apreciable. La concentración de compuestos fenólicos en la cáscara del fruto de camu-camu es muy superior en cuanto a flavonoides y antocianinas.

Silva de Azevedo *et al.* (2014) investigaron en residuos (frescos, secos con aire caliente y liofilizados) del despulpado del camu-camu; reportando importantes cantidades de compuestos fenólicos, como: antocianinas, proantocianidinas, flavonoides y carotenoides.

También muestran la multifuncionalidad de los residuos de camu-camu debido a que presentan actividades antioxidantes, anti-microbianos y anti-enzimáticos. El tratamiento de los residuos de frutas tiene el potencial de convertirse en un importante segmento de la agroindustria pudiendo considerarse como una estrategia ecológica para reducir al mínimo la contaminación y también una manera de producir productos de mayor valor a partir de residuos sólidos abundantes.

## **2.10 GESTION DE RESIDUOS SÓLIDOS GENERADOS POR LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**

Según la Ley Gestión Integral de Residuos Sólidos - DL N° 1278 (2016), se define como residuo sólido cualquier objeto, material, sustancia o elemento resultante del consumo o uso de un bien o servicio, del cual su poseedor se desprenda o tenga la intención u obligación de desprenderse, para ser manejados priorizando la valorización de los residuos y en último caso, su disposición final. Los residuos sólidos incluyen todo residuo o desecho en fase sólida o semisólida. Una de las finalidades de la gestión integral de los residuos sólidos, respecto de los residuos generados, es la recuperación y la valorización material y energética de los residuos, entre las cuales se cuenta la reutilización, reciclaje, compostaje, coprocesamiento, entre otras alternativas siempre que se garantice la protección de la salud y del medio ambiente. La disposición final de los residuos sólidos en la infraestructura respectiva constituye la última alternativa de manejo.

Diversos autores reportan que los restos orgánicos generados, en la transformación de vegetales, oscilan entre 13% y 65% de materia prima procesada (Ros *et al.*, 2012), así como Federici *et al.* (2009) indican que se encuentran entre 20-60% p / p del peso de la fruta y vegetal procesado. La disposición de estos residuos en espacios abiertos o en contenedores municipales generan un problema de contaminación ambiental.

La mayoría de las empresas agroindustriales no tiene un plan para el manejo de los residuos, debido al alto costo de su reutilización y por el contrario, los ubican junto con la basura en los vertederos o rellenos sanitarios. En otros casos sólo una pequeña porción (<10%) de estos subproductos se utilizan como fuente de combustible, mientras que los restantes se vierten en áreas abiertas o quemados sin una gestión adecuada. En Medellín - Colombia para el año 2006 se registró los residuos generados por 12 empresas del sector de procesamiento de frutas

**Cuadro 4: Relación de los residuos generados por las empresas agroindustriales en Medellín y el sur del valle del Aburrá - Colombia**

<b>Empresa</b>	<b>Fruta</b>	<b>Cantidad total de residuos (ton/mes)*</b>
1	Guayaba, piña	0.10
2	Tomate de árbol, mango, papaya, sandía, durazno, pera, uchuva, melón, manzana, guayaba	30.00
3	Maracuyá, mango, piña, guayaba	240.00
4	Naranja, guayaba	36.99
5	Mango, lulo, guanábana, guayaba, curuba, papaya, piña, tomate de árbol, mandarina	60.00
6	Guayaba	36.00
7	Guanábana, mango, maracuyá, guayaba, tomate de árbol, piña	3.99
8	Guayaba, limón, papaya, piña, sandía	4.50
9	Maracuyá, naranja, mandarina, mango, lulo, guanábana, curuba, tomate de árbol	3.99
10	Varios	6.00
11	Guanábana, mango, lulo, maracuyá, tomate de árbol, piña, uva,	0.81
12	Guanábana, mango, maracuyá, tomate de árbol, piña, mandarina, lulo	2.70
<b>TOTAL</b>		<b>425.08</b>

Fuente: Yepes *et al.*, 2008. (\*): 1mes = 30 días

(Cuadro 4) donde se observa el tipo y la cantidad de residuos que genera cada empresa haciendo un total de 425.08 toneladas/mes. Por otro lado, también en Colombia; la empresa Inter Aseo S.A. (empresa encargada del traslado de residuos a rellenos sanitarios) indica que recoge 163 ton de residuos / día, de un total de 277 empresas del sector agroindustrial (Yepes *et al.*, 2008).

Once empresas trasladan estos residuos al relleno sanitario y solo un pequeño porcentaje se destina para alimento de animales y compostaje. Los costos de traslado se muestran en el Cuadro 5 donde la disposición de estos residuos para las empresas agroindustriales representa un costo económico que varía según el municipio donde se encuentren ubicadas.

En Colombia (Medellin y el sur del Valle de Aburrá) existen empresas del sector de procesamiento de frutas que podrían producir flavonoides, como alternativa de valorización de los residuos, para lo cual cuentan con una cantidad mínima de residuos disponibles de 66 toneladas/mes (Yepes *et al.*, 2008). Olascoaga (2016) reporta que en la empresa Pulposita

S.A.C., empresa dedicada a la producción de pulpas de frutas ubicada en Lima-Perú, genera 58.2 toneladas de residuos/año.

**Cuadro 5: Costo mensual de la disposición de residuos en las empresas agroindustriales de Medellín y el sur del valle de Aburrá – Colombia.**

Empresa	Cantidad total de residuos (ton/mes)	Costo disposición actual (pesos/mes)	Costo disposición actual (dólares/mes)(*)	Costo dólares/ton (*)
1	0.10	6390.00	2.17	21.95
2	30.00	1615276.00	549.19	18.31
3	240.00	11732533.00	3989.06	16.62
4	36.99	2387479.00	811.74	21.94
5	60.00	3344407.00	1137.10	18.95
6	36.00	2006644.00	682.26	18.95
7	3.99	257530.00	87.56	21.94
8	4.50	231807.00	78.81	17.51
9	3.99	257530.00	87.56	21.94
10	6.00	387263.00	131.67	21.94
11	0.81	52280.00	17.78	21.94
12	2.7	174269.00	59.25	21.94
<b>TOTAL</b>	<b>425.08</b>			

Fuente: Yepes *et al.*, 2008. (\*): 1 dólar = 2908.86 pesos

Los principales mercados de exportación para los productos de camu-camu en sus diferentes presentaciones como pulpa, extracto y jugo son Japón, Estados Unidos de América y la Unión Europea (Myoda *et al.*, 2010). El Perú en el 2015 exportó camu-camu como jugo a Estados Unidos y como pulpa congelada a Japón, Australia, Italia, Colombia y Estados Unidos. La cantidad exportada fue de 139.45 toneladas (AGRODATA PERU/SUNAT 2016; MINAGRI, 2015) y en el año 2007 fue de 1229.8 toneladas (SUNAT 2008 citado por Defilippi 2011); considerando un 42.2 por ciento de residuos sólidos generados en el procesamiento de camu-camu, se habrían generado 101.64 y 897.3 toneladas de residuos, respectivamente. Estas fluctuaciones se debieron a la variación de la oferta del camu-camu que se ve afectada por falta de políticas del estado peruano, capacidad del productor, los cambios climáticos y retraso en innovación tecnológica de los procesos de transformación (Defilippi 2011). Si se gestiona adecuadamente, gran parte de estos subproductos industriales se podrían convertir en productos útiles con potencial aplicación en las industrias de alimentos, nutracéuticos y farmacéuticos (Ahmad *et al.*, 2009 y Galanakis 2012 citados por Heng *et al.*, 2015). La

obtención de una adecuada tecnología que permita transformar estos residuos y subproductos orgánicos en productos que generen un beneficio económico y medioambiental, es clave para obtener su máximo potencial, y no simplemente la alimentación animal de forma directa o su gestión final al relleno sanitario (Ros *et al.*, 2012).

### **2.11 OPTIMIZACIÓN POR DISEÑOS EXPERIMENTALES**

Los estudios clásicos de optimización tienen el enfoque que un solo factor, como el tiempo u otro, es variable mientras que todos los demás se mantienen constantes y así hasta terminar de evaluar todos los factores. Este enfoque lleva mucho tiempo y es costoso. Además, los efectos de interacción posibles entre las variables no pueden ser evaluados y conclusiones engañosas se pueden obtener (Silva *et al.*, 2007).

Los investigadores e ingenieros realizan experimentos para descubrir algo acerca de un proceso o sistema particular. Literalmente un experimento es una prueba o serie de pruebas donde se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la función objetivo (Ayala y Pardo, 1995).

La optimización de un proceso por medio de diseños experimentales requiere del uso de una metodología o estrategia adecuada, que nos lleve por el camino seguro y rápido para encontrar los valores óptimos de un proceso bajo estudio (Ayala y Pardo, 1995).

### **2.12 MÉTODO DE SUPERFICIE RESPUESTA (RSM)**

La metodología de superficie respuesta es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta. Esto es, se trata de encontrar los valores óptimos para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta (Montgomery, 2014). Es muy utilizado en la optimización de las variables de proceso. Aspectos teóricos básicos y fundamentales de la RSM ha sido revisado (Fan *et al.*, 2008).

El RSM tiene ciertas ventajas sobre otros procesos como la obtención del mayor porcentaje de rendimiento, reducción de la variabilidad del proceso, obtención de una respuesta de salida nominal para el logro de objetivo y un trato en el menor tiempo y con el mínimo costo (Box y Hunter, 1957 citado por Jain *et al.*, 2011). Principales metodologías de superficie respuesta son: diseño central compuesto, Box Behnken, y Diseño Doehlert (Souza *et al.*, 2005).

De acuerdo a Bas y Boyaci (2007), el RSM define y analiza el efecto de las variables independientes, solas o en combinación, en el proceso. Además de analizar los efectos de las variables independientes, esta metodología experimental genera un modelo matemático. En un lenguaje matemático, se puede decir que el investigador está interesado en la supuesta “relación funcional”:

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

Donde  $\eta$  es la respuesta,  $f$  es la función desconocida de respuesta,  $x_1, x_2, \dots, x_n$  denotan las variables independientes,  $n$  es el número de las variables independientes y finalmente  $\varepsilon$  representa el ruido o error estadístico que representan otras fuentes de variabilidad no cuantificadas por  $f$ . Estas fuentes incluyen efectos tales como la medición del error. (Bas y Boyaci, 2007).

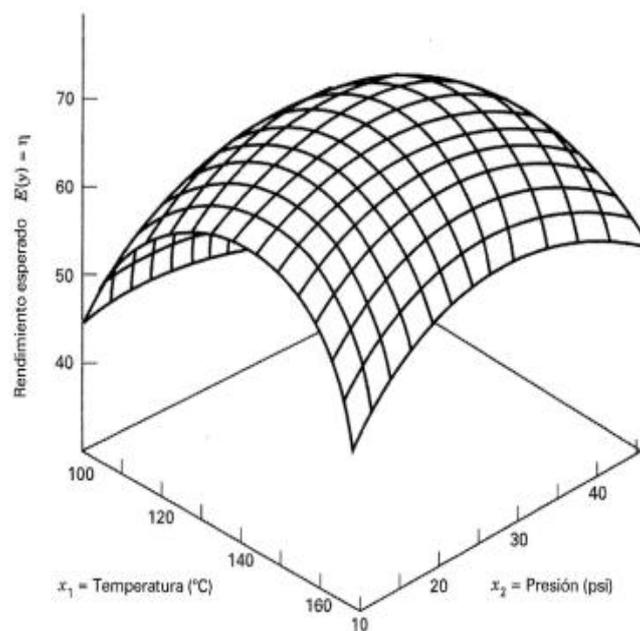
Montgomery (2014) explica que, en la mayoría de los problemas de la RSM, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso de la RSM es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre  $y$  y el conjunto de variables independientes. Por lo general, se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden:

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

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

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

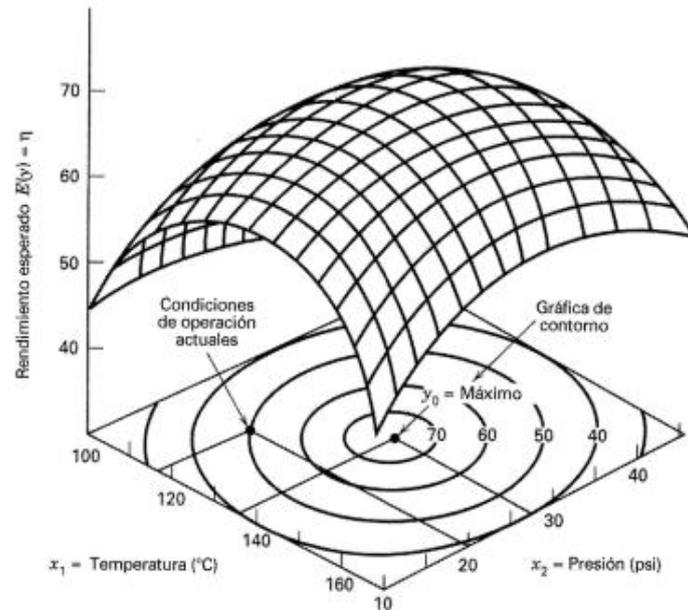
Según Box y Draper (1987) las ecuaciones polinómicas de bajo grado son más fáciles de manejar respecto a las de grados mayores, debido a que contienen pocos términos, lo cual se traduce en el requerimiento de menos valores observados de la respuesta para estimar los parámetros (los  $\beta$ 's) de la ecuación. Montgomery (2014) indica que generalmente la superficie de respuesta se representa gráficamente como en la Figura 5, donde  $\eta$  se grafica contra los niveles de  $x_1$  y  $x_2$ . Para ayudar a visualizar la forma de una superficie de respuesta, con frecuencia se grafican los ploteos de contornos (Figura 6).



**Figura 5: Superficie de respuesta tridimensional donde se indica el rendimiento esperado ( $\eta$ ) como una función de las variables  $x_1$  y  $x_2$ .** Fuente: Montgomery (2014)

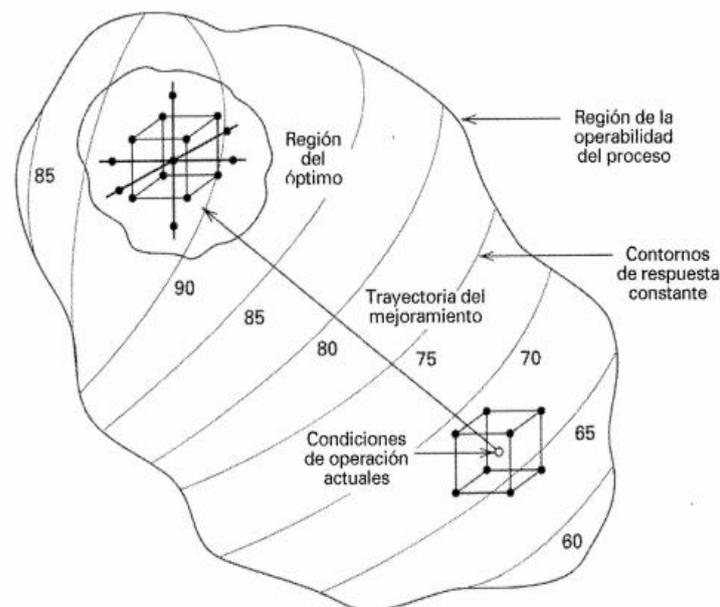
La metodología de superficie respuesta (RSM) es un procedimiento secuencial. Muchas veces cuando se está en un punto de la superficie de respuesta que está apartado del óptimo, como en el caso de las condiciones de operación que se observa en la Figura 7, el sistema presenta una curvatura moderada y el modelo de primer orden será apropiado. El objetivo en este caso es llevar al experimentador de manera rápida y eficiente por la trayectoria del mejoramiento hasta la vecindad general del óptimo. Una vez que se ha encontrado la región del óptimo, puede emplearse un modelo más elaborado, como el de segundo orden, y llevarse a cabo un análisis para localizarse como “el ascenso a una colina”, donde la cima de ésta representa el punto de la respuesta máxima. Si el verdadero óptimo es un punto de respuesta mínima,

entonces la situación puede considerarse como “el descenso a un valle”. El objetivo último de la RSM determinará las condiciones de operación óptimas del sistema o determinará una región del espacio de los factores en la que se satisfagan los requerimientos de las operaciones (Montgomery, 2014).



**Figura 6: Grafica de contornos de una superficie de respuesta**

Fuente: Montgomery (2014)



**Figura 7: El carácter secuencial de la metodología de superficie respuesta (RSM)**

Fuente: Montgomery (2014)

### 2.12.1 EXPERIMENTOS FACTORIALES

Llámense experimentos factoriales aquellos experimentos en los que se estudian simultáneamente dos o más factores, éstos se diferencian de los experimentos simples en los que sólo se estudia un factor. Son útiles en investigaciones exploratorias en los que poco se sabe acerca de muchos factores. En los experimentos exploratorios debe incluirse varios factores, que pueden ser 3 ó más, pero con pocos tratamientos o niveles de cada factor. Permite comparar los tratamientos o niveles de cada factor entre sí, y además, evaluar las interacciones que resultan como consecuencia de las combinaciones de los factores (Calzada, 1970).

Entendiéndose por niveles a los diferentes valores que pueden tomar los factores o variables. Si se considera dos niveles el diseño se denomina diseño factorial a dos niveles, o más apropiadamente diseño factorial  $2^k$  (Ayala y Pardo, 1995).

Por lo tanto, el número total de experimentos a llevarse a cabo viene definido por la relación:

$$N = 2^k$$

Donde: k : numero de variables o factores.

N : numero de experimentos.

Los experimentos factoriales de dos niveles han sido ampliamente estudiados y algunos de los trabajos más notables en la literatura, en los últimos 30 años, contienen trabajos sobre diseños óptimos (Cheng, 1980; Jacroux *et al.*, 1983;. Chadjiconstantinidis *et a.l.*, 1989.; Mukerjee, 1995; Butler, 2006, citados por Butler 2008).

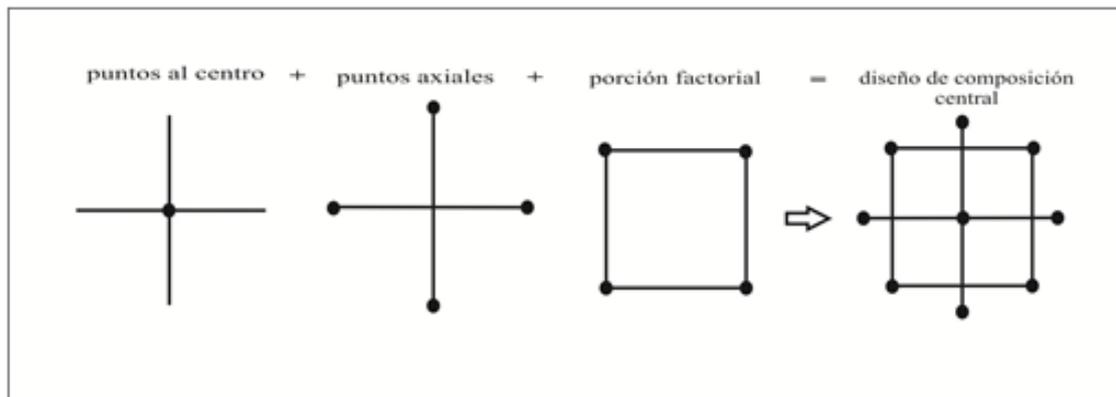
El experimento factorial nunca origina pérdida de información, ni aun cuando no hay interacción, pues esto ya resulta una información. En cambio, si existe interacción, el experimento factorial es de lo más interesante, pues la interpretación de los resultados da lugar a conclusiones más amplias. La limitación de los experimentos factoriales sería el número elevado de unidades experimentales requerido, hecho que aumenta el tamaño del experimento (Calzada, 1970).

### 2.12.2 DISEÑO CENTRAL COMPUESTO ROTABLE

El diseño central compuesto es el más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden debido a su gran flexibilidad: se puede construir a partir de un diseño factorial completo  $2^k$  o fraccionado  $2^{k-p}$  agregando puntos sobre los ejes y al centro, además de otras propiedades deseables (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Este diseño se compone de tres tipos de puntos:

1. Una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado. A esta parte del DCC se le llama porción factorial.
2.  $\eta_0$ : puntos o repeticiones al centro del diseño, con  $\eta_0 \geq 1$ .
3. Dos puntos sobre cada eje a una distancia  $\alpha$  del origen. Estos puntos se llaman porción axial. La manera en que se ensamblan y el DCC resultante, para el caso de dos factores, se muestran en la Figura 8.



**Figura 8: Representación y construcción de los DCC para k=2 factores.** Fuente: Gutiérrez y De La Vara (2008)

Esta técnica estadística permite establecer la influencia de los factores más relevantes como también las posibles interacciones que influyen en la señal, usando un número reducido de ensayos por diseño, sí evalúa la posible interacción que pueden existir entre las variables que se están estudiando (Hashime, *et al.*, 2005 citado por Blanes *et al.*, 2006).

Gutiérrez y De la Vara, 2008 indican que con  $k$  factores el número total de corridas al centro y la distancia de los puntos axiales ( $\alpha$ ) deben escogerse de manera adecuada, dependiendo de las propiedades que se quieren en el DCC. Si se quiere que el diseño sea rotatable se toma  $\alpha$  igual a:

$$\alpha = (F)^{1/4}, \text{ donde } F \text{ es el número de puntos en la parte factorial.}$$

En cuanto al número de corridas, este diseño es sin duda una de las opciones más económicas que se pueden tener para ajustar el modelo de segundo orden, ver Cuadro 6.

El diseño central compuesto es el más flexible y se puede construir de manera que cumpla alguna o varias propiedades deseables. La flexibilidad de éste diseño es en el sentido de que se puede construir a partir de aumentar diseños más simples. Esta propiedad es de suma importancia porque permite optimizar el gasto de los recursos experimentales, es decir, si ya se corrió un factorial completo y con punto central, y se detectó la presencia de curvatura,

**Cuadro 6: Número de puntos en los diseños de segundo orden**

Número de factores	Número de parámetros	Número de corridas		
		Central Compuesto	Factorial Completo $3^k$	Box-Behnken
2	6	13 - 16	9	-
3	10	17 - 23	27	15
4	15	27 - 36	81	27
5	21	29 - 36	243	46
6	28	47 - 59	729	54

Fuente: Gutiérrez y De la Vara (2008)

ahora se corre los puntos axiales para completar el diseño. No hay necesidad de comenzar de cero, sino que se aprovechan las corridas que ya se han hecho. Aquí es clave, al hacer las corridas adicionales, poder reproducir fielmente las condiciones ambientales que se tenían antes, y en cualquier caso se debe vigilar que no aparezca algún efecto de bloque imprevisto (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 LUGAR DE EJECUCION**

La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### **3.2 MATERIA PRIMA**

Se emplearon los residuos sólidos: principalmente cascara y pepa que resultaron de la industrialización del camu-camu; proporcionados por el Instituto de Desarrollo Agroindustrial (INDDA) Lima – Perú. Estos residuos sólidos se generaron de acuerdo a las operaciones unitarias que se muestra en la Figura 9.

### **3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

#### **3.3.1 MATERIALES**

- Micropipetas de 5-50  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  y 500-5000  $\mu\text{L}$ .
- Materiales de vidrio requeridos para los diferentes métodos: fioles, placas petri, erlenmeyers, kitsatos, probetas, pipetas, embudos, tubos de ensayo, etc.
- Termómetro, etc.

#### **3.3.2 EQUIPOS**

- Agitador magnético Modelo Ceramag Midi Jkika® Works (USA).
- Balanza analítica Modelo Adventurer™ Ohaus® Corporation (USA).
- Baño María Modelo 1083 GLF® (Alemania).
- Bomba de vacío (Vacubrand Modelo ME2C, Alemania).
- Centrifuga Modelo Rotofix 32 Hettich Zentrifugen (Alemania).
- Congeladora (electrolux, modelo H300, Brasil).

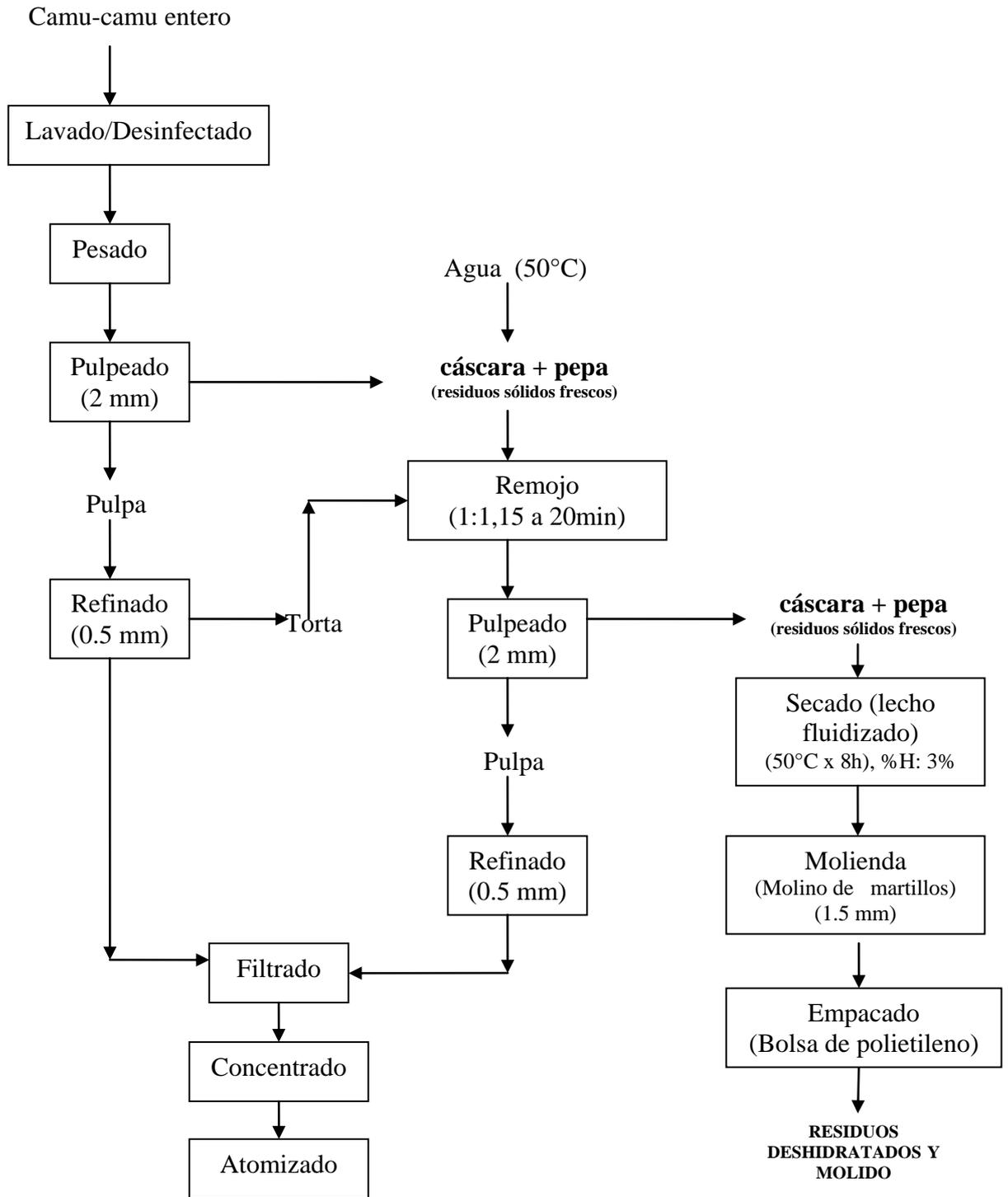


Figura 9: Esquema de proceso para la obtención de pulpa de camu-camu atomizada

- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC). Marca Waters (Modelo 2695) con detector de arreglo de foto diodos (PDA).
- Estufa con recirculación de aire Memert (Western Germany).
- Estufa al vacío (VWR, 1400E-2 , USA).
- Molino de cuchillos Fitz mill, Modelo Comminutor Código DAS06. Serie 8293 (USA).
- Refrigeradora (LG, modelo GR-482BEF, Corea).
- Rotavapor Modelo Laborota 4000 Heidolph (Alemania).
- Secador de Lecho Fluidizado.
- Tamices Serie Tyler (Nº: 10, 20, 30 y 40). USA Standard Test Sieve. ASTM E-11.
- Tanque de Nitrógeno de 6 m<sup>3</sup> AGA (Perú).
- Vortex mixer Modelo Wizzard Velp® Científica - Microtiter (Europa).
- Zaranda Vibratoria (RO – TAB). Marca Jel. Serie : BE 4838.

### 3.3.3 REACTIVOS

- Acetonitrilo (grado HPLC J.T. Baker, USA).
- Acido clorhídrico fumante (Merck).
- ABTS+ (2, 2' Azino-bis 3 ethylbenzthializone-6-sulfonic acid diamonium salt 98%) (Sigma Aldrich).
- Carbonato de sodio (Mallinckrodt Baker Inc.).
- Etanol 96% grado alimentario (Montana).
- Etanol 99.5% grado reactivo.
- Folin Ciocalteau 2N (Merck).
- Metanol 99.99% grado reactivo.
- Persulfato de Potasio (Sigma Aldrich).

## 3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

**3.4.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA.** Se empleó el método recomendado por la AOAC, (1990), en el cual un peso determinado de muestra es secado en estufa al vacío a 70°C hasta obtener un peso constante. El contenido de humedad se calcula por la diferencia de pesos y la materia seca se calcula por diferencia del porcentaje de humedad respecto a 100%.

**3.4.2 ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO.** Se pesó 100g de muestra que se colocaron sobre el conjunto de 5 tamices apilados. El conjunto se activó y se mantuvo por 5 minutos. Se pesaron las porciones retenidas en cada tamiz, y los resultados se expresaron en porcentaje. (Método 204.1 de la Norma MIL-STD-650, 1962).

**3.4.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.** Los compuestos fenólicos totales se determinaron con el reactivo de Folin – Ciocalteu por el método de Singleton y Rossi (1965), citado por Chirinos *et al.* (2008), usando ácido gálico como estándar. Se pesó 1 a 2 g de muestra deshidratada de los residuos sólidos del camu-camu, se añadió 25 ml de metanol al 80% (v/v), se dejó reposar en refrigeración a 4°C por 24 horas, luego se centrifugó a 4000 rpm (2558g) por 20 min, se midió el volumen del sobrenadante. En un tubo de ensayo se adicionó 0.25 ml del reactivo de Folin – Ciocalteu (1N), posteriormente se adicionó 1.25 ml de carbonato de sodio (1.2 N) y 10 µl del extracto. Los tubos fueron tapados, mezclados y finalmente se dejaron reposar por 30 min en oscuridad. La absorbancia fue medida a 755 nm y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalentes (GEA)/100 g materia seca. El blanco se preparó con agua destilada y fue utilizado para calibrar el espectrofotómetro antes de realizar las lecturas de las muestras. Los cálculos se realizaron mediante una curva estándar de ácido gálico.

**3.4.4 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) CON DETECTOR DE ARREGLO DE FOTO DIODOS (PDA).**

**a. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

El extracto de compuestos fenólicos se inyectó en un cartucho C<sub>18</sub> Sep-Pak (10 g, 35 ml; Waters, Milford, MA) (Chirinos *et al.*, 2008, Zheng y Wang, 2003), el cual fue previamente lavado con metanol y agua acidificada (0.01% de HCl). Los compuestos fenólicos fueron retenidos en el cartucho, mientras que los azúcares, ácidos y otros compuestos polares se eluyeron con agua acidificada (0.01% de HCl) a ésta fracción se le denominó F-I. Posteriormente; los compuestos fenólicos se eluyeron con metanol acidificado (0.01% de HCl). A esta fracción se le denominó F-II que correspondió a un extracto parcialmente purificado de compuestos fenólicos.

## **b. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC-PDA**

El perfil de compuestos fenólicos se determinó de acuerdo con el procedimiento propuesto por Chirinos *et al.*, (2008). Una alícuota de la fracción F-II se re-suspendió con metanol de grado HPLC. La separación se realizó en una columna de HPLC de fase reversa en un módulo de separación Waters 2695, equipado con un autoinyector y un detector de arreglo de foto diodos (PDA). Los datos espectrales se registraron a 280 y 360 nm durante toda la corrida. La columna (Waters) X-terra RP<sub>18</sub> (5µm, 250 x 4.6 mm) y una pre columna de 4.6 x 2.0 mm se usaron para la separación de los fenólicos a 30°C. La fase móvil estuvo compuesta por dos solventes, el solvente (A) conformado por agua: ácido acético (94:6, v / v, pH 2.27) y el solvente (B) acetonitrilo (100%) . El gradiente empleado en la separación fue el siguiente: 0% a 15% de B en 40 min, 15% a 45% de B en 45 min, y 45% a 100% de B en 10 min bajo un flujo de 0.5 ml / min. Se inyectó 20µl de muestra. La muestra y la fase móvil fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.22µm, tipo GV (Millipore, Bedford, MA). Los compuestos fenólicos se identificaron y cuantificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención y espectros UV-visible con datos conocidos de estándares previamente inyectados.

Los estándares corridos bajo las condiciones antes indicados fueron los siguientes: catequina, ácido elágico, rutina y eriodictiol.

## **3.5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **3.5.1 DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS A PARTIR DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL CAMU-CAMU**

La cantidad generada de residuos sólidos fue expresada en porcentaje (%) y se obtuvo de la división del peso final de los residuos sólidos después del procesamiento entre el peso inicial del fruto del camu-camu y fue multiplicado por 100.

### **3.5.2 ACONDICIONAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL CAMU-CAMU**

Los residuos sólidos mezclados, se secaron en un secador de lecho fluidizado, a 50°C por 8 horas hasta una humedad de 3%, luego molidos en un molino de martillos Fitz Mill (serie

N° 8293) con luz de malla de 1.5 mm. A continuación, fueron empacados en bolsas de polietileno y finalmente almacenados a -20°C hasta su uso en el laboratorio.

### **3.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS DEL CAMU-CAMU**

Se realizó la determinación de humedad y materia seca, análisis granulométrico y compuestos fenólicos totales en el camu-camu deshidratado y molido.

### **3.5.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CF)**

La extracción de los CF de los residuos sólidos deshidratados y molidos del camu-camu fue evaluada haciendo uso del proceso de extracción sólido-líquido, en un sistema batch bajo agitación constante. El proceso de extracción de los CF fue evaluado a diferentes temperaturas de extracción (25 – 50°C), tiempos (30 - 90 min) y relaciones materia prima/solvente (1/20 - 1/60 g/ml), el solvente utilizado fue una solución de etanol al 50% que fue constante en todo el trabajo experimental. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm (2558g) por 20 minutos luego el sobrenadante fue colectado en un frasco oscuro para purgarlo con nitrógeno por 3 min, finalmente se congeló a -20°C hasta su uso para las evaluaciones respectivas. El extracto resultante se denomina extracto crudo (CE).

Mediante la aplicación de diseños estadísticos, tal como se indica en el ítem 3.6, se seleccionaron las mejores condiciones de extracción en función al rendimiento de los compuestos fenólicos totales.

Determinadas las condiciones óptimas de extracción, se procedió a la obtención de un extracto que fue evaluado en rendimiento de fenólicos para verificar los resultados de la optimización.

## **3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **3.6.1 SCREENING**

Al inicio de una investigación, generalmente cuando no se tiene un buen conocimiento del proceso, la lista de factores o variables independientes que podrían influir en la respuesta de un proceso (criterios de optimización) pueden ser de un número considerable. El

objetivo de esta etapa fue identificar aquellos factores que son significativas para el proceso.

Se empleó el diseño experimental factorial  $2^3$ , con sus niveles mínimos y máximos como se muestra en el Cuadro 7, llevándose a cabo 8 tratamientos, como se muestra en el Cuadro 8, cada tratamiento fue evaluado por triplicado. La variable respuesta fue la cantidad de compuestos fenólicos totales expresados en mg ác. gálico / 100g materia seca.

**Cuadro 7: Factores y niveles ensayados para el screening**

Factor	Nomenclatura	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	(A)	25	50
Tiempo (min)	(B)	30	90
Relación: Materia Prima/Solvente(g/ml)	(C)	1/20	1/60

A partir de los resultados del screening se seleccionaron los factores significativos, en tanto que los no significativos se mantuvieron constantes.

En el Cuadro 8 se muestra la matriz del screening empleando el diseño factorial para los factores y niveles referidos en el Cuadro 7.

**Cuadro 8: Matriz del screening**

Tratamiento	Temperatura (°C) (A)	Tiempo (min) (B)	Relación: Mat prima/Solvente(g/ml) (C)
F <sub>1</sub>	25	30	1/20
F <sub>2</sub>	50	30	1/20
F <sub>3</sub>	25	90	1/20
F <sub>4</sub>	50	90	1/20
F <sub>5</sub>	25	30	1/60
F <sub>6</sub>	50	30	1/60
F <sub>7</sub>	25	90	1/60
F <sub>8</sub>	50	90	1/60

F: Factorial (1,2, .....8).

### 3.6.2 DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

Una vez seleccionados los factores significativos se realizó la optimización empleando el diseño central compuesto rotatable con 5 réplicas en el punto central. En el Cuadro 9 se muestran los factores (temperatura y relación materia prima/solvente) considerados en la extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos del procesamiento del camu-camu, el tiempo de extracción fue constante (30 min). La variable respuesta fue la cantidad de compuestos fenólicos totales expresados en mg ac. gálico equivalente / 100g de materia seca.

**Cuadro 9: Factores, códigos de niveles y sus valores ensayados para diseño central compuesto rotatable**

Factor	Nomenclatura	Códigos de niveles		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	(X <sub>1</sub> )	25	37.5	50
Relación: Materia prima /solvente (g/ml)	(X <sub>2</sub> )	1/20	1/40	1/60

X<sub>1</sub>: Temperatura, X<sub>2</sub>: Relación materia prima/solvente.

Para la obtención de los coeficientes de regresión, los datos experimentales se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden:

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

Donde  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión para las intersecciones, lineal, cuadrática y términos de interacción, respectivamente; y  $X_i$  y  $X_j$  son las variables independientes.

Los efectos de la variabilidad en la respuesta observada, debido a variables extrañas, fueron minimizados aleatorizando el orden de los experimentos.

En el presente trabajo se tuvieron 4 puntos experimentales, de acuerdo a la etapa del screening, 4 puntos axiales (iniciales o estrella) y 5 repeticiones en el centro. El valor de  $\alpha$

fue 1.41. En el Cuadro 10 se muestran los 13 tratamientos (ver Cuadro 6) que resultan de emplear el diseño central compuesto rotatable.

**Cuadro 10: Matriz del diseño central compuesto rotatable**

<b>Tratamiento</b>	<b>Temperatura(°C) (X<sub>1</sub>)</b>	<b>Relación: Mat prima/Solvente (g/ml) (X<sub>2</sub>)</b>
V <sub>1</sub>	37.5	1/40
DCC <sub>1</sub>	25	1/20
DCC <sub>2</sub>	50	1/20
V <sub>2</sub>	37.5	1/40
DCC <sub>3</sub>	25	1/60
DCC <sub>4</sub>	50	1/60
V <sub>3</sub>	37.5	1/40
DCC <sub>5</sub>	19.8	1/40
DCC <sub>6</sub>	55.2	1/40
V <sub>4</sub>	37.5	1/40
DCC <sub>7</sub>	37.5	1/11.7
DCC <sub>8</sub>	37.5	1/68.3
V <sub>5</sub>	37.5	1/40

DCC (1,2,3,4): Tratamiento punto experimental.

DCC (5,6,7,8): Tratamiento axial

V(1,2,3,4,5): Tratamiento punto central (5 réplicas)

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los análisis, se utilizaron tres réplicas. Los resultados se procesaron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos. El diseño experimental y el análisis estadístico se realizaron utilizando el programa Statgraphics Plus®.

### **3.9 METODOLOGÍA PARA LA ESTIMACIÓN DEL BENEFICIO AMBIENTAL Y ECONÓMICO PARA LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESIDUOS SÓLIDOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL CAMU-CAMU**

La estimación del servicio ambiental se basó en la comparación económica de tres alternativas consideradas para el mismo.

Las cuales fueron:

- a. Empleo de los residuos como alimento para animales.
- b. Disposición de los residuos en el relleno sanitario.
- c. Extracción de compuestos fenólicos.

La data para tal comparación se ha extraído de fuentes diversas entre ellas datos de bibliografía, datos directos del mercado y empresas prestadoras del servicio de disposición de residuos, procurando su actualización dado que se observa variaciones importantes en el mercado desde la época de auge del producto a la situación actual.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el presente estudio se empleó los residuos sólidos: principalmente cascara, pepa y algo de pulpa que resultaron del procesamiento de camu-camu. Estos residuos fueron sometidos a factores del proceso de extracción, considerando la influencia de dichos factores en el contenido de compuestos fenólicos.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos y su respectiva discusión considerando primero la cantidad de residuos sólidos generada a partir de la industrialización del camu-camu, seguido de la cuantificación de compuestos fenólicos por tipo de residuo sólido generado, luego la determinación de humedad y materia seca y finalmente la granulometría de la muestra. En relación al estudio de la extracción de compuestos fenólicos por el método de superficie respuesta se consideraron los siguientes factores temperatura, relación materia prima/solvente y tiempo de extracción, para la etapa del *screening*, donde se realiza una discusión acerca de la influencia del tiempo en la extracción de compuestos fenólicos. Luego en la etapa de optimización se discuten la influencia de la temperatura y relación materia prima/solvente en la extracción de compuestos fenólicos. También se identificó por HPLC-PDA el perfil de compuestos fenólicos presentes en el extracto purificado. Finalmente se plantean 3 alternativas de valorización de los residuos sólidos (en el marco de la gestión integral de residuos) que comparadas económicamente permite decidir por una de las alternativas.

### **4.10 GENERACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS A PARTIR DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL CAMU-CAMU**

Los pesos y porcentajes de pulpa y residuos (cascara y pepa) de la obtención de pulpa de camu-camu atomizada se muestran en el Cuadro 11. Los residuos de cascara y pepa representan el 42.2% del camu-camu entero, este resultado es similar al reportado por

Sotomayor (2000) quien señaló una generación de 45.2%; como también es cercano al reportado por Kalra *et al.* (1989) que indicaron que al procesar la mandarina híbrida de la India, Kinnow mandarins (*Citrus reticulata*), se obtiene un valor mayor al 50% respecto del peso total de la fruta fresca entre cascara, bagazo y semillas.

**Cuadro 11: Residuos generados en el procesamiento del camu-camu**

	<b>Peso (kg)</b>	<b>%</b>
<b>Camu-camu entero</b>	778.00	100.00
<b>Pulpa</b>	450.00	57.84
<b>Residuos (cáscara y pepa)*</b>	328.00	42.16

\*: Principalmente cascara y pepa con algo de pulpa.

#### **4.2 CONTRIBUCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR TIPO DE RESIDUO SÓLIDO GENERADO DEL PROCESAMIENTO DE CAMU-CAMU**

Deng *et al.* (2012) investigaron en residuos de 50 frutas (cascara y semillas) el contenido de compuestos fenólicos, reportando en cascara de mango, chirimoya y olivo chino las cantidades de 22.95, 17.77 y 13.16 mg ac. gálico/100g de cascara fresca, respectivamente. El contenido de fenólicos para las semillas de uva, limón y jujube fueron 22.95, 13.58 y 9 mg ac. gálico/100g de semilla fresca, respectivamente. Los residuos (cascara y semilla) de uva y mango fueron los que presentaron la mayor cantidad de fenólicos con 31.10 y 30.49 mg ac gálico/100 g residuo fresco, respectivamente. Estos valores demuestran que la mayor cantidad de fenólicos se encuentran en los tejidos dérmicos (cascara) de los frutos debido a su papel de protección contra las radiaciones ultravioletas y como productos químicos de defensa contra patógenos y depredadores. Los valores reportados en el presente trabajo (Cuadro 12), se observa que la cascara concentra la mayor cantidad de compuestos fenólicos

**Cuadro 12: Contenido de compuestos fenólicos por tipo de residuo sólido generado en el procesamiento de camu-camu**

<b>Tipo de residuo</b>	<b>Compuestos fenólicos totales<sup>1</sup></b>
Cascara	6897.73
Pepa	5302.40

<sup>1</sup> mg ácido gálico/100 g materia seca

totales que la pepa del camu-camu, corroborando que los tejidos dérmicos presentan mayor cantidad de fenólicos, aunque la cantidad de fenólicos en la pepa no dista mucho por lo que podríamos decir que la contribución de compuestos fenólicos por ambos tipos de residuos es casi por igual.

Ribeiro da Silva *et al.* (2014), evaluaron el contenido de fenólicos totales en sub productos de frutas tropicales de Brazil (los subproductos se obtuvieron después del proceso de producción de pulpa de las respectivas frutas) donde los valores más altos se mostraron en cereza (restos de pulpa), acerola (semillas), marañón (cascara y algo de pulpa), piña (cascara y algo de pulpa) y guayaba (cascara, algo de pulpa y semillas) con valores de 12696.03, 7265.29, 6588.41, 2787.09 y 1987.19 mg de ácido gálico equivalente/100g de materia seca, respectivamente. Babbar *et al.* (2011) reportaron fenólicos totales en semillas de uva, cascara de litchi, semillas de litchi y cascara de mandarina cuyos valores fueron 3740, 2460, 1790 y 1750 mg ac. gálico equivalente/100g materia seca respectivamente. Estos valores indican una considerable diversidad en la cantidad de fenoles entre los residuos de frutas.

Babbar *et al.* (2011) indican que el contenido de fenoles totales podría estar influenciado por el origen geográfico, cultivar, cosecha y almacenamiento, así como secado y métodos de extracción. Es importante considerar esta afirmación porque Silva de Azevedo *et al.* (2014) reportaron, para sub productos (cascara y semillas sin ningún tratamiento posterior) del camu- camu, la cantidad de 3738 mg de ácido gálico/100g materia seca debido a que la extracción se realizó mediante una extracción secuencial en 3 etapas (usando como solvente agua) además de restar el contenido de ácido ascórbico presente en el camu-camu. Sotero *et al.*, (2009) estudiaron el fruto del camu-camu y reportaron para pulpa (23168 mg ac. gálico/100g materia seca), cascara (17905.50 mg ac. gálico/100g materia seca) y pepa (2969.20 mg ac. gálico/100g materia seca) donde la extracción se llevó a cabo con 3 volúmenes de etanol, pero es necesario precisar que a estos valores no se restaron el contenido del ácido ascórbico propio de estos frutos lo que justificaría los altos valores reportados. Fracassetti *et al.* (2013) evaluaron los residuos del procesamiento del camu-camu : cascara y semillas con algo de pulpa, secados de 45° a 55°C de temperatura y posteriormente molidos, aplicando una extracción en metanol (50%), reportando una cantidad de 672.49 mg ácido gálico/100 g de materia seca por lo que podríamos decir que

el secado generó pérdida de compuestos fenólicos pero también señalar que la cuantificación fue realizada por HPLC que es una técnica más exacta.

Es necesario indicar que los valores aquí reportados (Cuadro 12) son el resultado de la evaluación de residuos sólidos frescos (cáscara y pepa con algo de pulpa) del procesamiento del camu-camu y que posteriormente no sufrieron ningún tratamiento por lo que podría justificarse los altos valores.

#### 4.3 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

La humedad promedio de la muestra de residuos sólidos deshidratado y molido fue de  $3.1\% \pm 0.13$ . El bajo contenido de humedad garantiza la estabilidad de la muestra.

#### 4.4 ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

Esta evaluación se realizó con el objetivo de conocer la distribución de tamaño de partícula de la muestra (residuos sólidos: cáscara, pepa y algo de pulpa) deshidratada y molida. Se realizó dos repeticiones (Anexo 1). Los resultados promedio se reportan en el Cuadro 13.

**Cuadro 13: Análisis granulométrico de residuos sólidos (cáscara y pepa) deshidratados y molido del procesamiento del camu-camu**

Numero de malla (ASTM E-11)	Luz Malla (mm)	Peso (g)	Rechazo (%)	Rechazo Acumulado (%)	Cernido Acumulado (%)
10	2.00	0.30	0.30	0.30	99.70
20	0.85	6.20	6.20	6.50	93.50
30	0.60	16.57	16.57	23.07	76.93
40	0.42	20.70	20.70	43.77	56.23
Plato		56.23	56.23	100.00	0.00
TOTAL		100.00	100.00		

Se observa que el mayor porcentaje de partículas tienen un tamaño que pasa la malla de 0.42 mm, constituyendo la mayor cantidad de partículas (56.23%) en los residuos de camu-camu deshidratados y molidos; así mismo que solo el 0.30 % de las partículas son mayores a una luz de malla de 2.00 mm, es decir se puede concluir que las partículas sometidas a la extracción de compuestos fenólicos en un 93.50% tienen tamaños menores a 0.85 mm. Este tamaño de partícula obtenido concuerda con lo reportado por Durling *et al.* (2007), quienes trabajaron tamaños de partícula entre 1 a 3mm para salvia (*Salvia officinalis*)

deshidratada en la extracción de compuestos fenólicos. Concluyendo que mientras el tamaño de partícula aumenta, la cantidad extraída de compuestos bioactivos disminuye ya que la difusión del solvente hidroalcohólico dentro de la partícula y la difusión del solvente-soluto que sale al exterior de la partícula se veía disminuido cuanto más grande era la partícula por lo que consideran al tamaño de partícula como un parámetro que limita la extracción de compuestos fenólicos reportando finalmente como tamaño óptimo de partícula de 1mm para la extracción de compuestos bioactivos. Cujic *et al.* (2016) observaron que la extracción de compuestos fenólicos a partir de frutos secos de chokeberry (*Aronia melanocarpa*) mostró una mejora cuando el tamaño de partícula disminuyó. Los rendimientos obtenidos con tamaños de partículas 1 y 0.75 mm fueron mayores (14.9 y 15.4 mg GAE / g materia seca, respectivamente) que los obtenidos con tamaños de partícula más grandes de 2, 3 y 6 mm (11.8, 11.4 y 10,5 mg G.E / g materia seca, respectivamente). Obteniendo el mayor rendimiento con tamaño de partícula de 0.75mm.

Herodez *et al.* (2003) trabajaron con hojas de bálsamo (*Melissa officinalis* L.) secas y molidas obteniendo los mejores rendimientos en la extracción de antioxidantes con tamaño de partícula entre 0.20 a 0.25mm.

Pinelo *et al.* (2006) investigaron con subproductos de uva y reportaron que el menor tamaño de partícula (0.5mm) promueve un aumento de la superficie de contacto entre el sólido y el solvente de extracción. Meyer (2002), mencionado por Pinelo *et al.* (2006), reportó que aumenta la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos del procesamiento de la uva como el orujo de uva, reduciendo el tamaño de partícula de la matriz sólida.

En todos los casos, a menor tamaño de partícula mayor es el rendimiento de compuestos fenólicos. Tamaño de partícula más pequeño reduce la distancia de difusión del soluto dentro del sólido, lo que aumenta la tasa de extracción. El soluto toma un tiempo más corto en llegar a la superficie (Pinelo *et al.*, 2006).

#### 4.5 SCREENING, EMPLEANDO UN DISEÑO FACTORIAL

El objetivo de esta etapa es identificar aquellas variables que son significativas para el proceso; es decir, identificar aquellas variables, que al hacerlas variar de un nivel bajo a un nivel alto, afectan sensiblemente las respuestas de un proceso. Eliminando de esa manera aquellas variables que resulten poco significativas (Ayala *et al.*, 1995).

El Cuadro 14 muestra los valores promedios del contenido de compuestos fenólicos totales, expresados en mg de ácido gálico equivalente (GEA)/100 g materia seca obtenidos en todos los tratamientos llevados a cabo en la prueba de screening. Las repeticiones se reportan en el Anexo 2.

**Cuadro 14: Contenido de compuestos fenólicos totales empleando el diseño factorial**

TRATAMIENTO	Compuestos fenólicos totales (mg ac. galico/100g m.s.)
F <sub>1</sub>	4123.55 ± 967.93
F <sub>2</sub>	4596.96 ± 133.91
F <sub>3</sub>	3532.17 ± 524.61
F <sub>4</sub>	4737.00 ± 89.09
F <sub>5</sub>	5171.50 ± 514.60
F <sub>6</sub>	6594.61 ± 400.22
F <sub>7</sub>	4521.81 ± 306.48
F <sub>8</sub>	6562.01 ± 181.35

F: Factorial (1,2, .....,8).

La relevancia o significancia de los efectos se verificaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), diagrama de Pareto y diagrama de interacciones.

El análisis de varianza (Anexo 2) muestra que existen 2 efectos significativos con p-valor menores a 0.05 lo cual indica que dichos factores: temperatura (A) y relación materia prima/solvente (C) tienen una influencia significativa sobre la respuesta ( $p < 0.05$ ). El estadístico de Durbin – Watson fue superior a 1.4, con lo cual se pudo probar, que no existe auto correlación o correlación serial significativa. Además, el factor tiempo (B), así como las interacciones no tiene un efecto significativo en el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos.

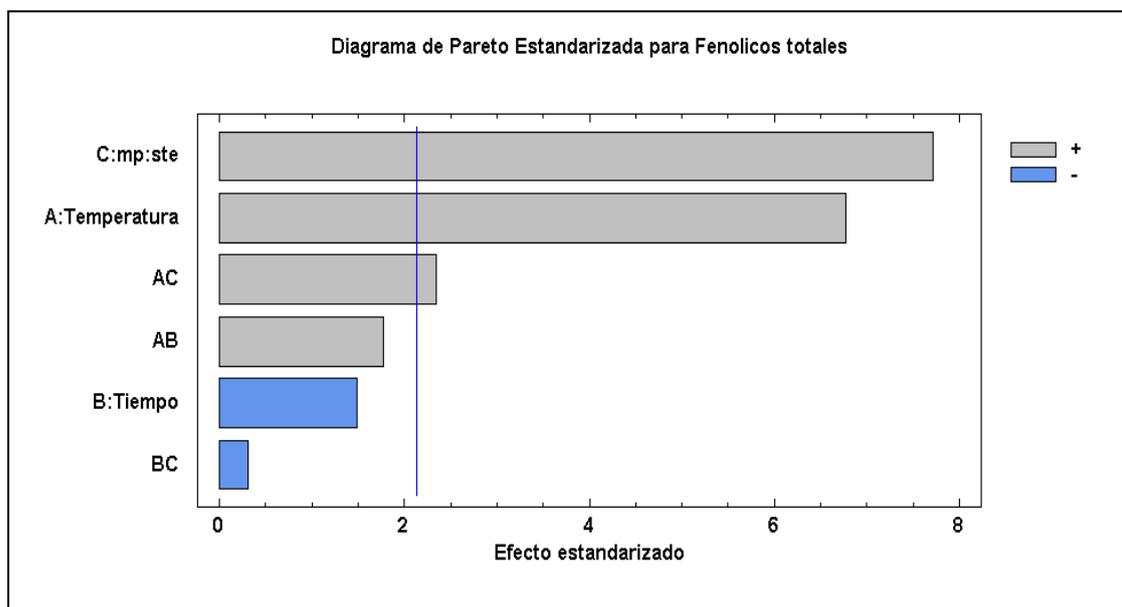
La bondad del modelo se puede comprobar por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El valor ajustado de  $R^2$  (0.827) indica una buena relación entre el grupo experimental y predicciones de los valores de la respuesta.

El efecto estandarizado de las variables independientes y su interacción sobre la variable dependiente fue determinado por el diagrama de Pareto (Figura 10) donde se observa que mientras las variables A y C muestran un aumento del efecto al incrementar sus niveles, la variable B influye en forma negativa, disminuyendo el efecto en el rendimiento al aumentar su nivel; corroborando lo expuesto por Martendal *et al.*, 2007 citado por Khajeh, 2011 que señala que un valor positivo para el efecto estimado indica un aumento en el rendimiento de la extracción si la variable aumenta a su mayor valor o nivel. Un valor negativo indica que se obtendría un mejor rendimiento en la extracción a niveles inferiores de las variables. Corroborando que el tiempo (B) no tiene un efecto significativo en el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos ya que a menores tiempos de extracción se obtendría mayor rendimiento de compuestos fenólicos extraídos.

El tiempo de extracción es crucial en la extracción con disolventes para los compuestos fenólicos donde pueden ser gobernadas por las concentraciones de equilibrio de compuestos fenólicos alcanzados antes de su correspondiente reducción aparente, Spigno *et al.* (2007) citado por Thoo *et al.* (2010). Por lo tanto, el exceso de tiempo de extracción de hecho reduce el rendimiento de compuestos fenólicos.

Thoo *et al.* (2010) experimentaron con tiempos de extracción, a partir de mengkudu (*Morinda citrifolia*), entre 20 a 120 min y hallaron una correlación negativa significativamente sustancial entre el contenido de compuestos fenólicos totales y DPPH (-0,938) para  $p < 0.05$ . Esta fuerte relación negativa indicaría que podrían tener un comportamiento diferente cuando se aumenta el tiempo de extracción. Este fenómeno es consistente con lo reportado por Liyana-Pathirana y Shahidi (2005), mencionados por Thoo *et al.* (2010), donde el tiempo de extracción prolongada puede conducir a la descomposición de los compuestos bioactivos. Los compuestos fenólicos totales de bajo peso molecular, son más susceptibles a la descomposición debido a la exposición prolongada a la temperatura, la luz y el oxígeno, conduciendo entonces a la disminución de la capacidad antioxidante. Al tomar en consideración los aspectos prácticos y económicos, así como la optimización de la recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad

antioxidante, eligieron 80 min como el mejor tiempo para la extracción de compuestos fenólicos.

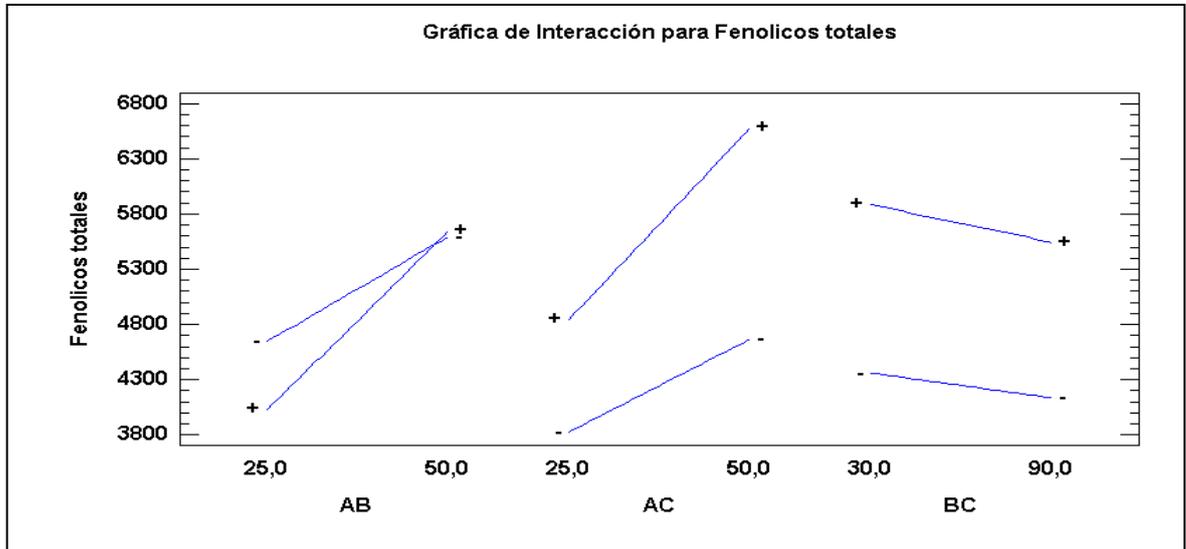


**Figura. 10: Diagrama de Pareto de los efectos principales obtenidos del diseño factorial  $2^3$ . La línea vertical define el 95% de los intervalos de confianza (A = Temperatura, B =Tiempo y C = Relación Materia prima/Solvente)**

La interpretación del diagrama de Pareto (Figura 10) demuestra que los factores relación materia prima/solvente y temperatura son altamente significativos. Un aumento en ellos aumenta el rendimiento de fenólicos en el extracto. El factor tiempo tiene un efecto insignificante lo que se corrobora con lo hallado por Khajeh (2011) que indica que el factor tiempo es insignificante en el rendimiento de extracción de aceite esencial de *Satureja hortensis*.

Cujic *et al.* (2016) estudiaron la influencia del tiempo de extracción en el contenido de compuestos fenólicos a partir de frutos secos de chokeberry (*Aronia melanocarpa*), experimentaron con tiempos de 60 min y 90 min encontrando que no existía diferencia significativa entre los tiempos estudiados por lo que eligieron 60 min como tiempo de extracción. Estos investigadores realizaron una optimización con un diseño factorial  $2^4$  donde el tiempo de extracción resultó ser el factor menos importante para la obtención de altos rendimientos de compuestos fenólicos, por lo tanto éste factor fue excluido de la etapa de optimización y el tiempo óptimo de extracción se fijó en 60min. El tiempo de extracción es esencial para economizar energía y el costo del proceso de extracción.

En relación al efecto de interacción de las variables, no hay interacción pues Gutiérrez y de la Vara (2008) indican que si no hay interacción las líneas tienen pendientes similares y son aproximadamente paralelas como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11: Grafica de interacción para fenólicos totales obtenidos del diseño factorial  $2^3$ .**

En el presente trabajo de investigación se demuestra que la interacción doble (de dos factores) no tiene un efecto estadísticamente importante sobre la respuesta y más bien los efectos principales si tienen un efecto significativo por lo que los efectos principales terminan dominando el proceso como lo mencionan Gutiérrez y de la Vara (2008).

En la presente investigación se determinó como tiempo de extracción 30 minutos por razones económicas y el análisis de varianza lo determina como un factor sin significancia en el rendimiento de fenólicos totales.

Los resultados del diseño factorial demostraron que las variables (relación materia prima/solvente y temperatura) en los tratamientos investigados requirieron una optimización.

#### 4.6 OPTIMIZACIÓN, EMPLEANDO UN DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

En base a los resultados del *screening*, se determinó que los factores que condicionan el proceso de extracción de los compuestos fenólicos totales de los residuos del procesamiento del camu-camu fueron los siguientes: temperatura (A) y relación materia prima/solvente (B). Los que fueron seleccionados para maximizar el proceso de extracción mediante la RSM con el diseño central compuesto rotatable con 5 réplicas en el punto central. El tiempo de extracción (30 min) y solvente (etanol al 50%) se mantuvieron constantes en la ejecución de los ensayos.

La matriz del diseño experimental está en el Cuadro 10 con lo que se obtuvo los valores promedios del contenido de compuestos fenólicos totales ejecutados en el diseño central compuesto rotatable (Cuadro 15). Las repeticiones se encuentran en el anexo 3.

**Cuadro 15: Contenido de compuestos fenólicos totales empleando el diseño central compuesto**

Tratamiento	Compuestos fenólicos totales (mg ác. gálico /100g m.s.)
DCC1	4334.48±74.46
DCC2	5230.19±221.61
DCC3	4854.93±45.55
DCC4	5245.58±133.93
DCC5	4167.83±241.85
DCC6	5939.05±36.93
DCC7	4454.99±12.61
DCC8	5204.64±49.61
V	5055.78 ± 171.76

DCC (1,2,...,8): Diseño Central Compuesto.

V (1,2,..., 5): tratamiento punto central (5 réplicas)

Los factores y su forma codificada (Cuadro 9) permiten una interpretación directa de los efectos (lineal, cuadrático e interacciones) de los factores independientes, mientras que la superficie y el ploteo de contornos facilitan la visualización de los factores estadísticamente derivados del análisis estadístico (Montgomery, 2014). El modelo fue adecuado para explicar la mayor variabilidad para los compuestos fenólicos totales. Para el modelo ajustado, el software genera coeficientes del modelo, valores de  $R^2$ , valores de F y probabilidades significativas; y permite justificar la significancia de cada variable experimental (Montgomery, 2014). La respuesta máxima predicha para los fenólicos totales fue obtenida basada en un total de 13 experimentos realizados para determinar los 6

coeficientes de regresión del modelo. Una alta proporción de variabilidad fue explicada por el modelo de fenólicos totales como indica el valor de  $R^2$ . El modelo de regresión fue altamente significativo ( $p < 0.05$ ) y fue satisfactoria con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) 0.87 (Cuadro 16). La ecuación de regresión de segundo orden del modelo ajustado a los datos se observa en el anexo 3.

**Cuadro 16: Coeficientes de regresión del modelo predictivo de segundo orden para las respuestas de compuestos fenólicos totales**

Coeficientes de Regresión	Valor estimado del coeficiente
$\beta_0$	1931.15
<b>Lineal</b>	
Temperatura( $\beta_1$ )	61.7471 <sup>a</sup>
Materia prima /Solvente( $\beta_2$ )	52.8502 <sup>a</sup>
<b>Cuadrático</b>	
Temperatura ( $\beta_{11}$ )	-0.04803 <sup>NS</sup>
Materia prima /Solvente( $\beta_{22}$ )	-0.29891 <sup>NS</sup>
<b>Interacción</b>	
Temperatura x Materia prima/Solvente	-0.50606 <sup>NS</sup>
$R^2$	0.87

Estadísticamente significativo: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; NS: no significativo

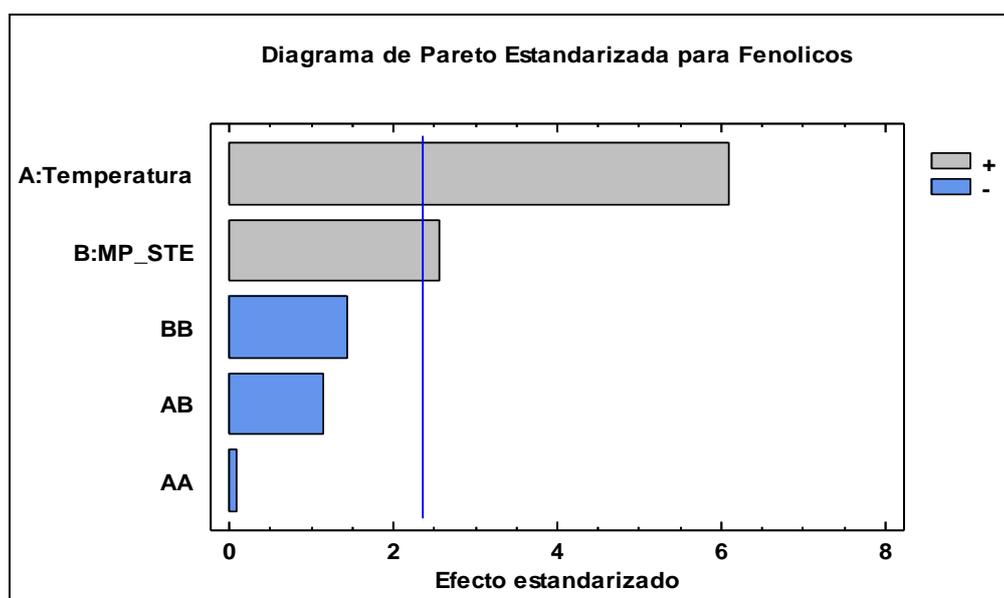
Para los factores temperatura materia prima/solvente se verificaron efectos lineales positivos por ser estadísticamente significativo para fenólicos totales tal como lo indica el valor de  $p$  en el Cuadro 16. Estos factores presentaron altos valores estimados de coeficientes, corroborando el impacto de dichos factores en la respuesta estimada. Lo que se corrobora con los resultados del ANOVA (Anexo 3) donde se muestra que existen 2 efectos con  $p$  - valor menores a 0.05 lo que indica que dichas variables (temperatura, relación materia prima/solvente) tienen una significativa influencia sobre la respuesta (95%).

Efectos cuadráticos negativos, para temperatura y materia prima/solvente, se obtuvo para fenólicos totales lo que indica que los fenólicos disminuyen con el aumento de dichos factores pero como estadísticamente resultaron no significativos su impacto es nulo.

Se observa una interacción negativa (efecto cruzado) entre los factores: temperatura ( $x_1$ ) y materia prima/solvente ( $x_2$ ) para fenólicos totales lo que indica que la interacción entre ambos factores hace que la cantidad de fenólicos disminuya. Además, es estadísticamente no significativo.

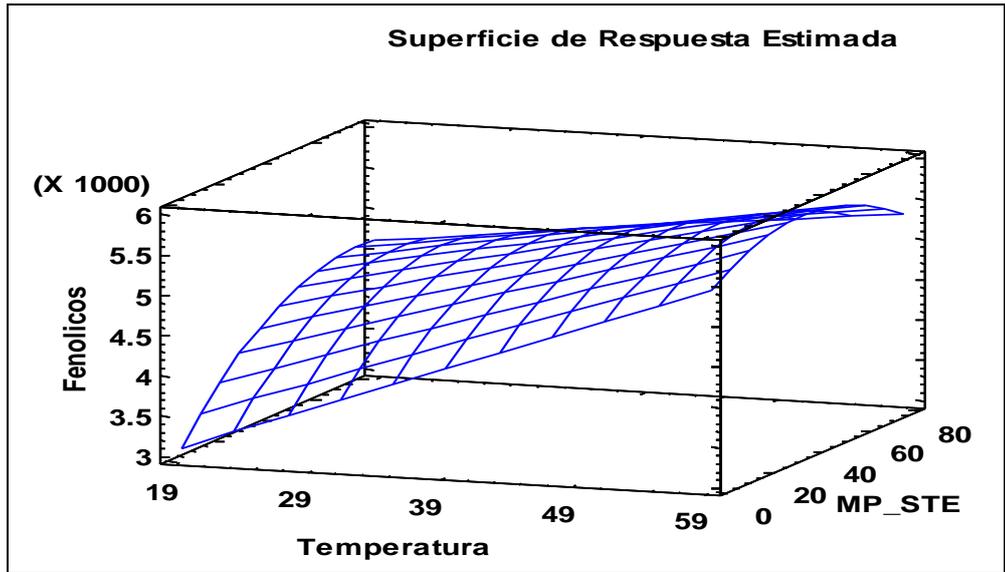
El estadístico de Durbin – Watson fue superior a 1.4, con lo cual se pudo probar, que no existe auto correlación o correlación serial significativa (Anexo 3).

El diagrama de Pareto (Figura 12) muestra que las variables: temperatura (A) y relación materia prima/solvente (B) inciden significativamente en la cantidad de compuestos fenólicos que se han obtenido en el extracto por encontrarse por encima del límite de significancia. Esto se corrobora con el ANOVA (Anexo 3) donde ambas variables tienen un  $p < 0.05$ , lo que indica que son variables significativas.

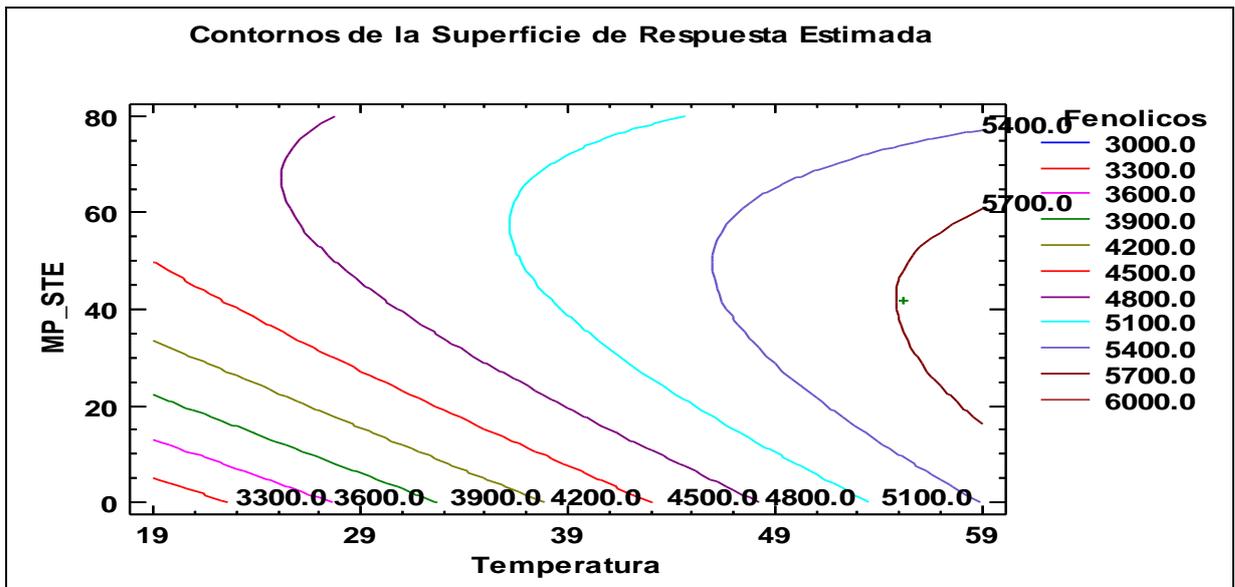


**Figura 12: Diagrama de Pareto de los efectos principales obtenidos del diseño Central Compuesto Rotable. La línea vertical define el 95% de los intervalos de confianza (A = Temperatura, B = Relación Materia prima/Solvente)**

En la Figura 13 se observa la superficie de respuesta estimada con una ligera curvatura y de acuerdo a ello se ha llegado a maximizar la extracción de compuestos fenólicos, pues si bien se puede incrementar la temperatura conllevaría al deterioro de los compuestos fenólicos disminuyendo la cantidad.



**Figura 13: Superficie de respuesta estimada para la extracción de compuestos fenoles totales de los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu respecto a la temperatura de extracción y relación materia prima / solvente.**



**Figura 14: Líneas de contornos de la respuesta estimada para la extracción de compuestos fenólicos totales de los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu respecto a la temperatura de extracción y relación materia prima / solvente.**

Las líneas de contornos (Figura 14), muestra que el punto central está por encima de 50°C y la relación materia prima/solvente es de 40 a 42, corroborando los valores para los parámetros que optimizan la extracción de compuestos fenólicos.

Se concluye que el experimento ha finalizado y se deben tomar los valores de estas variables (Cuadro 17) para maximizar la cantidad de compuestos fenólicos que se obtienen en los extractos obtenidos bajo estas condiciones de extracción.

**Cuadro 17: Factores, niveles óptimos y respuesta maximizada**

<b>FACTOR</b>	<b>INFERIOR</b>	<b>MAYOR</b>	<b>OPTIMO</b>
Temperatura (°C)	19.82	55.18	55.18
Relación mat. prima/solvente (g/ml)	11.72	68.28	41.70
Respuesta maximizada (Valor máximo)	5711.67 mg ácido gálico /100g materia seca		

Thoo *et al.* (2010) investigaron la influencia de la temperatura de extracción en la cantidad de compuestos fenólicos extraídos a partir mengkudu (*Morinda citrifolia*) en el rango de 25 a 65°C, encontrando una relación lineal entre la temperatura de extracción y la recuperación de compuestos fenólicos. El calor mejora la recuperación de compuestos fenólicos como describen Durling *et al.* (2007) y Silva *et al.* (2007). El Aumento de la temperatura favorece la extracción debido a que mejora tanto los coeficientes de difusión como la solubilidad de los compuestos fenólicos (Al-Farsi & Lee, 2008). El aumento de solubilidad de los compuestos fenólicos también fue reportado por Wang *et al.*,(2007) mencionado por Thoo *et al.* (2010), quien encontró que el aumento de la temperatura favorece la liberación de compuestos fenólicos de una muestra originando que se produzca el desglose de los componentes celulares de las células vegetales que conduce a una mayor permeabilidad de la membrana celular.

Varios estudios informaron que el calor mejoró la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos Benmeziane *et al.*, 2014; Dorta *et al.*, (2012), Ruenroengklin (2008) y Vatai (2009) citados por Mokrani *et al.*, (2016). Esto era probablemente debido a la mayor solubilidad fenólica, velocidad de difusión más rápida, una mejor transferencia de masa generando un mayor rendimiento de extracción por la reducción de la viscosidad del disolvente y de la tensión superficial.

Además, se cree que la liberación de estos compuestos fenólicos podría reducir aún más las posibilidades de que coagulen con la lipoproteína aumentando la solubilidad y difusión

de los compuestos fenólicos mejorando el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos (Al-Farsi y Lee, 2008 y Zhang *et al.*, 2007 mencionados por Thoo *et al.*, 2010).

En relación con el principio de equilibrio de un sistema, al cambiar la temperatura (perturbación) del sistema, generará que el sistema alcance una nueva posición de equilibrio, por lo que la temperatura elevada podría aumentar la tasa de extracción y reducir así el tiempo de extracción para alcanzar la máxima recuperación de contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, la temperatura elevada puede no ser adecuado para todo tipo de compuestos. Liyana-Pathirana y Shahidi (2005) mencionado por Thoo *et al.*, (2010) informaron que la tasa de extracción de antioxidantes térmicamente estables a temperatura elevada es mayor que la velocidad de descomposición de antioxidantes menos solubles. Por lo tanto, sólo las muestras con una mayor proporción de compuestos fenólicos térmicamente estables son más apropiadas para extraer compuestos fenólicos a condiciones de temperatura elevada, tal como *M. Citrifolia* del que se obtuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos al aumentar la temperatura de extracción, seleccionando la temperatura de 65°C como la mejor temperatura de extracción.

La temperatura de 65°C es cercana a 55.18 ° C, valor que se obtuvo en la presente investigación como la temperatura que maximiza la cantidad de compuestos fenólicos a partir de residuos sólidos del camu-camu deshidratado y molido. Por lo tanto los residuos sólidos del camu-camu son fuente de compuestos fenólicos térmicamente estables lo que favorecería los requerimientos industriales de procesamiento (alta temperatura de extracción durante un tiempo corto).

Cujic *et al.* (2016) investigaron la influencia de la relación materia prima/solvente en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de frutos secos de chokeberry (*Aronia melanocarpa*) observando que el rendimiento aumentó gradualmente de 1/10 y alcanzó el valor más alto en la relación 1/20 (27.82mg GAE/g muestra seca) para un tamaño de partícula de 0.75mm y 50% de solución de etanol. Este resultado está de acuerdo con los hallazgos anteriores donde una mayor relación de materia prima/solvente conduce al mayor rendimiento de compuestos fenólicos (Galvan D'Alessandro *et al.*, 2012, citados por Cujic *et al.*, 2016). Se debe considerar que una mayor relación materia prima/solvente genera una disminución en el consumo de material vegetal y disminución

en el costo de extracción. Cujic *et al.* (2016) concluyeron que la relación materia prima: solvente era un factor importante en la extracción de compuestos fenólicos.

Pinelo *et al.* (2006) investigaron el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos de la uva en una extracción continua; reportando que con el empleo de cantidades de muestras menores favorece la obtención de extractos con altos rendimientos de compuestos fenólicos. Esto puede explicarse por la forma de empacado o lecho que se genera, donde de hecho, las cantidades altas de sólidos podría generar canales de flujo preferenciales en el lecho, lo que llevaría a una disminución de la superficie de contacto entre el sólido y el solvente. Como consecuencia de ello, se observó una disminución de la transferencia de masa. El mismo efecto fue reportado por Sineiro, *et al.* (1996), citados por Pinelo *et al.* (2006), en la extracción de compuestos fenólicos a partir de la torta prensado de girasol en una extracción por inmersión.

Belwal *et al.*, 2016, evaluaron el efecto de las variables de extracción en el contenido de fenoles totales en los frutos de Berberis (o agracejo) asiática. Las variables evaluadas fueron: relación materia prima/solvente, temperatura de extracción, concentración del solvente. Encontrando que como la relación materia prima/solvente aumenta de 1/10 a 1/50 el contenido de compuestos fenólicos aumenta considerablemente, este resultado se basa en los principios de transferencia de masa cuando se estima que la fuerza motriz para la transferencia de masa es el gradiente de concentración entre el sólido y el solvente. En la presente investigación la relación materia prima/solvente de 1/41.7 fue la relación que maximiza la cantidad de compuestos fenólicos corroborando lo reportado por los autores ya mencionados.

#### **4.7 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO OBTENIDO EN CONDICIONES ÓPTIMAS**

Fueron  $5939.05 \pm 36.93$  mg ácido gálico /100 g materia seca (tratamiento DCC<sub>6</sub>) los que se obtuvieron con los parámetros mostrados en el Cuadro 17, siendo este valor muy cercano al valor de 5711.67 mg ácido gálico /100 g materia seca, reportado como respuesta maximizada. Esta cantidad representa el 6.12% de rendimiento en compuestos fenólicos respecto al peso de la muestra seca tomada.

Reynertson *et al.* (2008) encontraron que los frutos en polvo del camu-camu tienen un contenido mucho más alto de compuestos fenólicos totales (  $101.00 \pm 0.25$  mg ácido gálico / g muestra seca) que la de otros frutos de la *Myrciaria vexator* (  $44.10 \pm 1.21$  mg ácido gálico /g muestra seca ) y que de la *Myrciaria cauliflora*. (  $31.60 \pm 0.39$  mg ácido gálico / g muestra seca).

Según Rufino *et al.* (2010) el contenido de compuestos fenólicos totales fue mayor en frutos de camu-camu en comparación con la acerola. Chirinos *et al.* (2010) reportaron que el contenido de compuestos fenólicos totales en frutos del camu-camu depende del estado de madurez. El contenido de fenoles totales en el camu- camu aumentó del estado verde al pintón y luego disminuyó en el maduro (fase roja). En plena madurez (fase roja) el camu-camu mostro un contenido de fenoles totales de 1320 mg GAE/100 g en peso fresco, pero el que presentó mayor cantidad de fenoles totales fue el estado de madurez pintón con  $1420.00 \pm 193$  mg GAE/100 g en peso fresco. Corroborando que es un valor muy alto en comparación con los contenidos reportados para las cerezas, ciruelas, fresas (339, 366 y 368 mg GAE/100 FW g, respectivamente) (Wu *et al.*, 2004).

Fracassetti *et al.*, 2013 determinaron el contenido de polifenoles de la pulpa atomizada (temperatura de entrada  $185^{\circ}\text{C}$  y temperatura de salida  $95^{\circ}\text{C}$ ) de camu-camu y de la harina seca (aire caliente de  $45^{\circ}$  a  $55^{\circ}\text{C}$ ) obtenida a partir de la cascara y semillas que quedan después del procesamiento de pulpa de camu-camu (*Myrciaria Dudia*). El contenido fenólico de la harina de camu-camu fue mayor que la de la pulpa atomizada (4007.95 mg / 100 g peso seco vs. 48.54 mg / 100 g peso seco), cabe indicar que estos resultados no están expresados en mg ácido gálico sino que resultan de la suma de la cuantificación de los espectros obtenidos para cada compuesto fenólico identificado en el HPLC. También evidencia que temperaturas elevadas generan disminución en el contenido final de compuestos fenólicos.

Silva de Azevedo *et al.* (2014) trabajaron con residuos del despulpado de camu-camu. Los residuos fueron fresco y seco (aire caliente a  $50^{\circ}\text{C}$ ) encontrando una cantidad de compuesto fenólicos totales de 3738.0 y 1843.6 mg GAE / 100 g DW, respectivamente.

Doroteo *et al.*; (2012) reportaron valores de  $11.7 \pm 0,05$  mg acido gálico/g extracto hidroalcoholico para frutos maduros de camu-camu, utilizando como solvente una mezcla

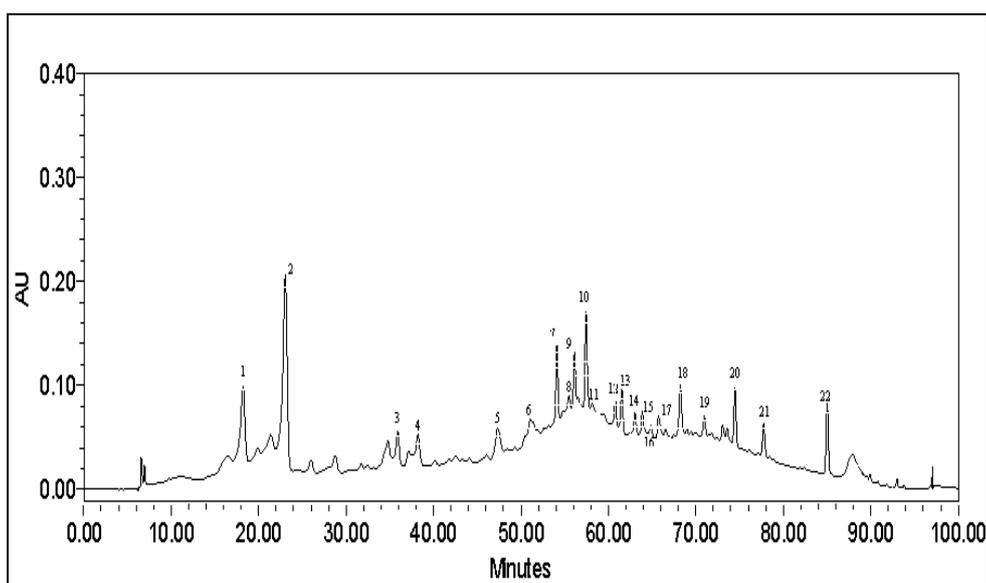
etanol y agua en una proporción de 7:3 por 4 días a temperatura ambiente; probablemente estas condiciones de extracción generaron un valor bajo de compuestos fenólicos.

#### 4.8 IDENTIFICACIÓN POR HPLC-PDA DEL PERFIL FENÓLICO DEL EXTRACTO PURIFICADO OBTENIDO A PARTIR DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL CAMU-CAMU

La identificación se realizó en la fracción F-II a 280 y 360 nm, permitiendo la identificación de las diferentes familias de compuestos fenólicos presentes en los residuos del camu-camu (en estado pintón). El perfil cromatográfico evaluado a 280nm (Figura 15) reveló un total de 22 picos principales.

La fracción F-II presentó diferentes compuestos fenólicos, tales como: derivados del ácido elágico, derivados del flavan - 3 - ol (o derivados del flavanol) y derivados de las flavanonas (cuadro 18). Solo se identificó al ácido elágico (pico 10). La identificación se realizó por comparación de sus espectros UV-vis y tiempos de retención con los de patrones auténticos. Los otros picos no identificados mostraron características UV-vis espectrales similares a los derivados del flavanol del tipo catequina (picos: 1-4, 6, 8, 12, 13 y 17), derivados del ácido elágico (picos: 5, 7, 9, 14-16, 18-20), las flavanonas del tipo eriodictiol (picos: 21 y 22) todos cuantificados a 280nm.

El pico 11 fue cuantificado a 360nm como derivado de rutina perteneciente a la familia de los flavonoles.



**Figura 15: Perfil de compuestos fenólicos por HPLC – PDA a partir de la fracción F – II del tratamiento óptimo (DCC<sub>6</sub>) de los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu corridos a 280nm**

El ácido elágico y derivados, han sido detectados en las hojas de *M. dubia* (HBK) McVaugh (Ueda *et al.*, 2004). El ácido elágico también ha sido detectado en frutos de camu-camu en tres estados de madurez (Chirinos *et al.*, 2010). Reynertson *et al.* (2005) destacaron la presencia de catequina, epicatequina, epigalocatequina 3-*O*-galato de epicatequina y 3-*O*-galato, taninos y glucósidos de flavonoles en los frutos de la familia Myrtaceae. Lo que corrobora esta identificación.

Reynertson *et al.* (2008) encontraron al ácido elágico, quercetina (otro flavonol) y a la rutina en el fruto de *M. dubia*. La presencia de la familia de las flavanonas se produjo a través de la identificación de derivados del eriodictiol.

Las cantidades de los grupos de ácido elágico, flavan-3 ol (derivados del flavanol) , flavonoles y flavanonas cuantificados por HPLC-PDA, mostrados en el Cuadro 16, fueron 0.97, 3.48, 0.04 y 0.06 mg/g materia seca, respectivamente. En orden de importancia de las familias de compuestos fenólicos, respecto al número de compuestos presentes, se mostraron de la siguiente manera: grupo de ácido elágico > flavan -3-ol > flavanona > flavonoles para los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu en estado pintón.

Así, el ácido elágico y los grupos flavan-3-ol representan los principales compuestos fenólicos en el camu-camu (80.96%). Esta característica también ha sido reportada por Chirinos *et al.* (2010).

Los flavanoles también son conocidos como flavan-3-ols, flavanos o catequinas. Estos compuestos existen en la forma monomérica, tanto como en forma de oligómeros y polímeros, ambos referidos tanto a taninos condensados o protoantocianidinas. Los principales flavanoles son catequinas y se encuentran en muchos tipos de frutas (por ejemplo albaricoques, manzanas), así como en té verde, vino tinto y chocolate (Yang *et al.*, 2001). Catequinas y epicatequinas son los principales flavanoles en frutas. Los flavan-3-oles (flavanol monomérico) como: catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina se encuentran en frutas, generalmente en forma libre antes que en las

formas glicosiladas (Robards *et al.*, 1999; Manach *et al.*, 2004). Como el camu-camu es una fruta, presenta estos compuestos que están cuantificados como catequina (Cuadro 18).

Fracassetti *et al.*, 2013 reportaron cincuenta y tres compuestos fenólicos diferentes que fueron identificados por HPLC-DAD-ESI-MS-MS y UPLC-HR-QTOF-MS-MS a partir de la pulpa atomizada de camu-camu y de la harina seca (aire caliente de 45° a 55°C) obtenida de la cascara y semillas que queda después del procesamiento de pulpa de camu-camu. En ambos productos la miricetina y conjugados de flavonoles, ácido elágico y conjugados y elagitaninos fueron detectados. Cianidina 3-glucósido, y la quercetina y sus glicósidos sólo se encontraron en la pulpa atomizada, mientras que las proantocianidinas sólo estaban presentes en la harina seca (3.5g / 100 g peso seco), estas identificaciones se realizaron a longitudes de onda entre 240 a 374nm y con cromatógrafos acoplados con espectrómetros de masas por ello la diferencia en cuanto al número y fenoles detectados.

Silva de Azevedo *et al.* (2014) trabajaron con residuos secos del despulpado de camu-camu identificando flavonoides y ácido elágico por HPLC a 280nm. Los flavonoides importantes que identificaron fueron: quercetina (0.8±0.1 mg / 100 g DW), miricetina (0.7±0.4 mg / 100 g DW), y catequina (1.1±0.4 mg / 100 g DW), además de alta cantidad de ácido elágico (5.8 mg / 100 g DW), y por primera vez en la literatura, la presencia de ácido sirínigico (3.1 mg / 100 g DW) en el residuo de camu-camu. La catequina y el ácido elágico también fueron identificados en el presente trabajo.

Belwal *et al.*, 2016 realizaron la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de los frutos de Berberis asiática en condiciones optimizadas utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con las siguientes longitudes de onda: 254, 280 y 320nm. El orden de los compuestos fenólicos identificados fueron: ácido clorogénico > rutina > ácido vanillico > ácido 3-hydroxybenzoico > ácido cafeico > ácido p-coumarico. En el presente trabajo se identificó al derivado del flavonol (a 360nm) que fue cuantificado como rutina (Cuadro 18). Los flavonoles pueden variar en el número y la distribución de grupos hidroxilos, así como en su grado de alquilación o glicosilación. La formación de glucósidos de flavonol

**Cuadro 18: Cromatograma de compuestos fenólicos detectados a 280nm en residuos sólidos de la industrialización del camu-camu por HPLC – PDA**

Pico N°	Tiempo de retención (min)	Compuesto Fenólico Asignado	mg/g ms
1	18.215	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.6302
2	23.049	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	1.6975
3	35.908	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.1735
4	38.213	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.2988
5	47.325	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.1154
6	51.078	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.1659
7	54.101	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.1500
8	55.494	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.0807
9	56.11	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.0941
10	57.424	Ácido elagico	0.2133
11	58.111	Derivado del Flavonol <sup>(c)</sup>	0.0408
12	60.771	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.1135
13	61.53	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.1856
14	63.025	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.0434
15	63.863	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.0384
16	64.825	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.0175
17	65.723	Derivado del flavanol <sup>(a)</sup>	0.1394
18	68.223	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.1297
19	70.954	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.0447
20	74.466	Derivado del ácido elágico <sup>(b)</sup>	0.1314
21	77.751	Derivado de flavanona <sup>(d)</sup>	0.0204
22	85.009	Derivado de flavanona <sup>(d)</sup>	0.0440

(a): cuantificado como catequina a 280nm.

(b): cuantificado como ácido elagico a 280nm.

(c): cuantificado como rutina a 360nm.

(d): cuantificado como eriodictiol a 280nm.

depende de la acción de la luz; por tanto, se encuentran principalmente en hojas y pieles de frutas. Los flavonoles están presentes principalmente como mono-, di- y triglicósidos. Los monoglicósidos se dan principalmente como 3-*O*-glicósidos. Los 3-*O*-diglicósidos y 3,7-di-*O*-glicósidos son también frecuentes. La rutina, que presenta una molécula rutinosa (6-*O*- $\alpha$ -ramnosil-D-glucopiranososa) en su estructura, es un ejemplo de diglicósido de quercetina (Shahidi y Nackz, 2004). El presente trabajo se realizó con cascara y pepa del camu-camu lo que justifica la presencia de flavonol (ver Cuadro 18).

#### **4.9 ESTIMACIÓN DEL BENEFICIO AMBIENTAL Y ECONÓMICO PARA LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESIDUOS SÓLIDOS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DEL CAMU-CAMU**

En esta sección se presenta una estimación del beneficio ambiental y económico de las alternativas de aprovechamiento de residuos considerando que la valorización de residuos es ampliamente reconocida como una solución de mayor aceptación dentro de la gestión integral de residuos porque permite la reducción de la carga contaminante del material vertido y proporciona oportunidades para el desarrollo de productos nuevos y naturales (Amyrgialaki *et al.*, 2014). En ese sentido se comprobó (ítem 4.1) que los residuos sólidos del camu-camu, provenientes del proceso de industrialización, consisten principalmente de cascara y pepa, y como la generación es alta (42.2%) se justificaría optar por alternativas de aprovechamiento y/o disposición.

Es importante resaltar que, en países como Dinamarca, Alemania, Suecia, Italia, Austria y Francia, los residuos se emplean para la producción de biogás (mezcla de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) ya que dichos residuos tienen un potencial energético muy interesante y con unas características de composición adecuadas para la co-digestión anaerobia, y generados en cantidades que hacen viable la aplicación de esta tecnología para la valorización de residuos (Ros *et al.*, 2012). El hecho es que éste biogás tiene en su composición metano y dióxido de carbono que tienen un efecto invernadero y en ese sentido no sería una buena alternativa por lo que se descarta.

En la agroindustria peruana los residuos generados en la industrialización del camu-camu se destinan al relleno sanitario o para alimentación animal o peor aún son vertidos al aire libre generando una contaminación ambiental directa. Por lo que se plantea dar un valor añadido a los desechos de frutas ya que se cuenta con un recurso barato y fácilmente disponible por lo que es altamente rentable además de reducir al mínimo el impacto ambiental. Una de las alternativas más beneficiosas es la recuperación de constituyentes bioactivos, especialmente los compuestos fenólicos, los que se pueden usar en la industria alimentaria, farmacéutica, así como la industria cosmética. Por lo tanto, la utilización de los residuos de frutas como fuente de compuestos bioactivos tiene beneficios económicos considerables y es cada vez más atractivo pero ligados a la recuperación eficiente de dichos compuestos (Deng *et al.*, 2012; Amyrgialaki *et al.*, 2014).

En el Cuadro 19 se presentan las alternativas de aprovechamiento y/o disposición de residuos sólidos generados en la industrialización del camu-camu.

**Alternativa a:** Destinar los residuos para alimentación animal, sería mediante un acopiador, que tiene interés en adquirir los residuos. El acopio es diario y cuando termina el proceso productivo así por ejemplo la Granja de Cuyes de Cieneguilla – UNALM (2017) acopia residuos de brócoli (ver anexo 4) donde el costo es de S/. 224 por tonelada de residuos. Es necesario indicar que según la información se toma residuos de brócoli como referencia ya que para residuos de camu-camu, propiamente dicho, no hay información. Entonces mediante esta alternativa la empresa procesadora no incurre en ningún gasto por lo que no se vería perjudicada, pero pierde la oportunidad de tener mayor rentabilidad que en la tercera alternativa se expone.

**Cuadro 19 Alternativas de aprovechamiento y/o disposición de residuos sólidos generados en la industrialización del camu-camu**

<b>Alternativa</b>	<b>Característica</b>	<b>Costo (S./Ton)</b>	<b>Precio de Venta (S./Ton)</b>
a. Alimentación animal	Recojo de residuos mediante un acopiador	00.00	224.00 <sup>(1)</sup>
b. Disposición en relleno sanitario	Tomar los servicios de una empresa que se encarga del traslado de residuos hacia el relleno sanitario	227.70 <sup>(2)</sup>	00.00
c. Extracción de compuestos fenólicos.	Obtención de compuestos fenólicos con solución hidroalcohólica a partir de residuos sólidos de la industrialización del camu-camu	20 000.00 <sup>(3)</sup>	92 200.00 <sup>(4)</sup>

(1): Granja cuyes Cieneguilla (2017); (2): ECOGLOBO S.A.C. (2017);  
 (3): Quintana y Rubio (2012); (4): Vergamini et al., 2015.

**Alternativa b:** Disposición de los residuos orgánicos en el relleno sanitario donde la empresa agroindustrial procesadora de camu-camu tendría que tomar los servicios de una empresa que se encarga del traslado de residuos hacia el relleno sanitario, por ejemplo, la empresa ECOGLOBO S.A.C. (EPS-RS-DIGESA), 2017, cobraría 227.7 soles por tonelada de residuos (ver anexo 5), el servicio está articulado en transporte del residuo y la disposición final en el relleno de Petramas (Relleno de Huaycoloro). Es necesario señalar que los servicios de éste tipo de empresas varían según el municipio donde se

encuentren ubicadas y por la cantidad de residuos a trasladar dado que si la cantidad de residuos es grande se disminuyen los costos operativos de traslado (Yepes *et al.*, 2008). Mediante ésta alternativa la empresa procesadora incurre en gastos al hacerse responsable de la gestión de los residuos que genera.

**Alternativa c:** Si los residuos se destinaran para la obtención de compuestos fenólicos, implicaría que el procesador se interese en la recuperación de estos compuestos y en base a que el costo de producción sería de 20 soles / kg; (valor basado en la información de Quintana y Rubio, 2012, quienes reportan que el costo de producción de pulpa congelada de camu-camu para mercado japonés es 17.77 soles / kg, ver anexo 6). Considerando, además que los extractos de polifenoles tienen un precio aproximado de €23 / kg (Vergamini *et al.*, 2015) que es equivalente a 92.2 soles / kg constituyendo una fuente sustancial de ingresos para el procesador y que según lo que se detalló en los ítems 2.8 y 2.9, estos residuos son una fuente importante para la recuperación de compuestos fenólicos, con lo que se daría valor a estos residuos. Esta valorización se reforzaría aún más con que la cáscara y semilla de los residuos de jugo de camu-camu contienen significativamente más abundantes fenoles, que otras frutas tropicales (Myoda *et al.*, 2010 citado por Arellano-Acuña *et al.*, 2016). Mostrando una ventaja más que reforzaría el objetivo de este trabajo de investigación. Esto justificaría tomar la tercera alternativa para valorizar los residuos procedentes de la industrialización del camu-camu. Es importante resaltar que los residuos sólidos no tendrían un costo para el procesador ya que sería un sub producto de la línea principal del proceso y que los residuos y subproductos orgánicos serían utilizados en la recuperación de compuestos fenólicos; es valioso indicar que los compuestos fenólicos serían obtenidos con soluciones hidroalcohólicas, amigables con el medio ambiente (Cujic *et al.*, 2016), y que son de uso permitido en la industria alimentaria y no causarían efectos perjudiciales a la salud de las personas ni al medio ambiente (Zuorro *et al.*, 2015).

## V. CONCLUSIONES

1. Por la industrialización del camu-camu se generaron 42.2% de residuos sólidos respecto al peso inicial del fruto.
2. Las variables que maximizan la extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos sólidos generados en la industrialización del camu-camu son: temperatura, relación materia prima/solvente.
3. Las condiciones que maximizan la cantidad de compuestos fenólicos fueron: 55°C para temperatura y 1/42 para relación materia prima/solvente conjuntamente con tiempo de extracción 30 minutos obteniéndose un valor de 5939.1 mg de ácido gálico equivalente (GEA)/100 g materia seca.
4. El valor de 59.39mg de ácido gálico equivalente / g, en el perfil cromatógrafo a 280 nm, reveló un total de 22 picos principales los que estuvieron agrupados en: derivados del ácido elágico, derivados del flavan-3-ol (o derivados del flavanoles) y derivados de las flavanonas, además se identificó el ácido elágico tal cual. A 360 nm se identificó rutina.
5. El ácido elágico y los derivados de flavan-3-ol representan los principales compuestos fenólicos en los residuos de camu-camu (80.96%).
6. De los residuos sólidos de la industrialización del camu-camu aún se pueden recuperar compuestos fenólicos y que el beneficio de dicha recuperación sería una oportunidad de ingresos monetarios adicional para el procesador de frutas lográndose valorizar los residuos y se plantea una solución dentro de la gestión integral de residuos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Estudiar la influencia de otras variables que afectan al proceso de extracción que repercutirán en la cuantificación e identificación por HPLC de compuestos fenólicos.
- Realizar las pruebas a mayor escala y observar cómo se ve afectado el rendimiento en la extracción debido a que no es lo mismo trabajar a nivel de laboratorio. Esto permitirá evaluar los costos operativos, así como los costos energéticos.
- Evaluar las propiedades funcionales de los compuestos fenólicos extraídos probando su capacidad antioxidante en una aplicación directa.
- Estudiar con residuos sólidos provenientes de la industrialización de otros alimentos nativos con el fin de valorarlo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRODATA Perú/ Superintendencia Nacional de Aduanas y de Administración Tributaria, Perú (SUNAT). 2016. Camu-camu pulpa Perú exportación Set 2016 (08 Octubre 2016). Lima, Perú. Consultado 28 enero 2018. Disponible en: <https://www.agrodataperu.com/2016/10/camu-camu-pulpa-peru-exportacion-2016-septiembre.html>
2. Akter S.M., Oh S., Jong-Bang E., Ahmed M. 2011. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. Food Research International 44: 1728-1732.
3. Al-Farsi, M. A., & Lee, C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food Chemistry, 108: 977–985.
4. Alves, H. M, Alves S. H., Flauzino N.W.P., Pasquini, D. 2013. Valorization of an agro - industrial waste, mango seed, by the extraction and characterization of its cellulose nanocrystals. Journal of environmental management, 121: 202-209.
5. Amyrgialaki E., Makris D.P., Mauromoustakos A., Kefalas P. 2014. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. Industrial Crops and Products 59: 216–222.
6. A.O.A.C.1990 Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. Vol. 2. Chapter 32. 15th edition. Edited by Kenneth Helrich. Arlington, Virginia 22201, U.S.A. p. 777.

7. Arellano-Acuña E., Rojas-Zavaleta I., Paucar-Menacho L. 2016. Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Fruta tropical de excelentes propiedades funcionales que ayudan a mejorar la calidad de vida. *Scientia Agropecuaria* 7 (4): 433 – 443.
8. Ayala M. J., Pardo M. R. 1995. Optimización por Diseños Experimentales con Aplicaciones en Ingeniería. Editorial A&B S.A. Lima-Perú.
9. Babbar N.; Singh O. H.; Singh U. D.; Tumadu P.R. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, Volume 44, Issue 1, January 2011, Pages 391-396.
10. Bas D, Boyaci I. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78(3):836-845
11. Belwal T, Dhyani P, Bhatt I, Singh R, Pande V. 2016. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry* 207:115–124.
12. Blanes P. S., Garro O.A., Giménez M.C., Hunzicker G.A. 2006. Aplicación de un Diseño Central Compuesto para la determinación de especies orgánicas e inorgánicas de arsénico en agua por HPLC.HG-AAS. Universidad Nacional del Nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Argentina. Resumen: E-051.
13. Box, G; Draper, N. 1987. *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. John Wiley & Sons. Inc. New York – U.S.A.
14. Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317 - 333.
15. Butler N. 2008. Defining equations for two-level factorial designs. *Journal of Statistical Planning and Inference* 138: 3157–3163
16. Cabral de Oliveira A., Barros I., Alexandre C., Henriques E., Paes M., Marinho C., Oliveira M. 2011. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry* 115:469–475

17. Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59,379–389.
18. Calzada J. 1970. *Métodos Estadísticos para la Investigación*. 3ra edición. Editorial Jurídica S.A. Lima – Perú. 286-287p.
19. Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández D., Páez-Hernández A., Rodríguez Galán-Vidal J & Galán-Vidal, C (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859–871.
20. Chavarías, M. 2009. Alimentos procedentes de residuos orgánicos. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2009/06/17/185999.php>. Visitado: 15 enero 2016.
21. Chirinos R., Campos D., Costa N., Arbizu C., Pedreschi R., Larondelle Y. 2008. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry* 106. 1285 – 1298.
22. Chirinos R., Galarza J., Betalleluz I., Pedreschi R., Campos D.2010. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry* (120) 1019 – 1024.
23. Čujić N., Šavikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry* (194) 135 – 142.
24. D'archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348–361.
25. Defilippi Enzo. 2011. La cadena de valor del camu-camu en la región Loreto análisis y lineamientos estratégicos para su desarrollo. Proyecto Perú Biodiverso – PBD, Cooperación Suiza – SECO, Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ)-GmbH, Programa Desarrollo rural sostenible (PDRS), Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (MINCETUR), Comisión de Promoción del Perú para la

Exportación y el Turismo(PROMPERÚ), Ministerio del Ambiente (MINAM). Lima Perú.

26. Deng Gui-Fang, Shen Chen, Xiang-Rong Xu, Ru-Dan Kuang, Ya-Jun Guo, Li-Shan Zeng, Li-Li Gao, Xi Lin, Jie-Feng Xie, En-Qin Xia, Sha Li, Shan Wu, Feng Chen, Wen-Hua Ling, Hua-Bin Li. 2012. Potential of Fruit Wastes as Natural Resources of Bioactive Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8308-8323.
27. Durling N.E., Catchpole O.J., Grey J.B., Webby R.F., Mitchell K.A., Foo L.Y., Perry N.B. 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol – water mixtures. *Food Chemistry* 101. 1417 – 1424.
28. ECOGLOBO S.A.C. EPS RS – DIGESA – Empresa de Residuos Sólidos Cotización N° 1s71911. Servicio de traslado de residuos orgánicos al relleno sanitario de Petramas (Huaycoloro). 18.12.17. Lima-Perú.
29. Elain A; Le Grand A; Corre YM; Le Fellic M; Hachet N; Le Tilly, V; Lourlergue P; Audic JL; Bruzard, S. 2016. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops and Products* 80: 1-5.
30. Fan G., Han Y., Gu Z., Chen D. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT* 41. 155–160.
31. Federici, F; Fava, F; Kalogerakis, N; Mantzavinos, D. 2009. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill waste waters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(6): 895-900.
32. Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomas-Barberan F. 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry* 139 (2013) 578–588.

33. Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Gan R.Y., Zang Y., Xian E.Q., Li H.B. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 129:345–350.
34. Galvan D'alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47.
35. Gómez R.E. 2012. El consumo de antioxidantes en la industria. *Revista Énfasis Alimentación*. 08/06/2012. <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/64237-el-consumo-antioxidantes-en-la-industria>. Visitado: 07.01.2018
36. Granja Cuyes de Cieneguilla – UNALM (2017). Costo de compra de residuos de brócoli para alimentación de animales menores. Comunicación personal.
37. Gutierrez P. H., De la Vara S. R. 2008. *Análisis y Diseño de Experimentos*. Editorial Mc Graw Hill. 2da Edición. México. págs.: 416 - 417.
38. Handa C. L, Sanches de Lima F., Geton M. F. G., Georgetti S.R., Ida E.I.2016. Multi-response optimization of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chemistry* 197: 175–184.
39. Heng H. W., Xiong L.W, Nagasundara R. R., Hong T. L. , Weng K.K, Galanakis M.Ch., Sun J., Nagendra P. K. 2015. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. *Industrial Crops and Products* 63:238–248.
40. Herodez S.S., Hadolin M., Skerget M., Knez Z. 2003.Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry* 80. 275 – 282.
41. Ignat I., Volf I., Popa V. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126 (2011) 1821–1835.

42. Jain M., Garg V., Kadirvelu K. 2011. Investigation of Cr (VI) adsorption onto chemically treated *Helianthus annuus*: Optimization using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* 102. 600–605.
43. Kalra, K. L., Grewal, H. S., & Kahlon, S. S. (1989). Bioconversion of kinnow-mandarin waste into single-cell protein. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 5, 321–326.
44. Khajel M. 2011. Optimization of process variables for essential oil components from *Satureja hortensis* by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental desing. *The Journal of Supercritical Fluids* 55. 944 – 948.
45. Klejdus, B., Vacek, J., Benešová, L., Kopecky , J., Lapc Ík, O., & Kubán, V. 2007. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 2277–2285.
46. Lafka T-I., Lazou A., Sinanoglou V., Lazos E. 2011. Phenolic and antioxidant potential of olive mil wastes. *Food Chemistry* 125. 92 – 98.
47. Lapornik B, Mirko Pros ˇEK, Alenka Golc W.2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71. 214–222.
48. Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1), 47–56.
49. Luque, R. and. Clark, J.H (2013). Valorisation of food residues: waste to wealth using green chemical technologies, *Sustainable Chemical Processes*, 1:10
50. Luthria, D. L., & Pastor-Corrales, M. A. 2006. Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211.

51. Maeda N. R., Andrade S. J. 2003. Aproveitamento do Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) para Produção de Bebida Alcoólica Fermentada. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia – INPA/CPTA. BRASIL. ACTA AMAZONICA 33(3): 489 – 498.
52. Maeda N. R., Pantoja L., Yuyama L., Chaar J. 2006. Determinação da Formulação e caracterização do Néctar de Camu-Camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). Ciencia Tecnologia Alimentaria. Campinas, 26(1): 70 -74.
53. Mahan B. M., Rollie J. M. 2006. *Química, curso universitario* University of California, Berkeley. Addison-Wesley ed. Iberoamericana. [http://html.rincondelvago.com/oxidacion\\_reacciones-redox.html](http://html.rincondelvago.com/oxidacion_reacciones-redox.html).
54. Mattila, P., & Kumpulainen, J. J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3660–3667.
55. Mc Cabe W., Smith J., Harriott P. 2007. Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. Universidad Iberoamericana, Ciudad de Mexico. Séptima Edición. Editorial Mc Graw Hill. Pag 553.
56. Military Estándar 650. 1962. Método 204.1 Granulation (Dry) de la Norma MIL-STD-650. On line: <http://www.everyspec.com/MIL-STD/MIL-STD-0500-0699/download.php> o <http://www.matematicasyoesia.com.es/metodos/melweb07.htm#objeto> . Visitado: 29.10.2015.
57. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). 2015. Comercio Exterior para el agro/ Exportaciones del camu-camu, aranceles y países de destino. Disponible en: <http://sistemas.minagri.gob.pe/siscex/exportaciones/rankingIN/>. Visitado: 12.01.18
58. Ministerio del Ambiente. 2016 Ley Gestión Integral de Residuos Sólidos - DL N° 1278. Lima-Perú. 23 Diciembre del 2016. Normas Legales “El Peruano”.

59. Mokrani, A. & Madani, K. 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L) fruit. *Separation and purification Technology* 162 (2016) 68-76.
60. Montgomery D. 2014. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Editorial Limusa, SA de C.V. Grupo Noriega Editores. Segunda Edición. México D.F., México. 686 pg.
61. Muñoz J. A., Ramos - Escudero D.F., Alvarado-Ortiz U.C., Castañeda C.B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista Sociedad Química Perú*. 73, N° 3: 142 – 149.
62. Myoda, T.; Fujimura, S.; Park, B.; Nagashima, T.; Nakagawa, J.; Nishikawa, M. 2010. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8(2): 304-307.
63. Naczki M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41. 1523–1542.
64. Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.
65. Olascoaga O.R.M. 2016. Propuesta de un plan de manejo de residuos sólidos en una empresa procesadora de pulpas de frutas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Tesis Ingeniero en Industrias Alimentarias. Lima-Perú.
66. Oreopoulou, V; Russ, W. 2007. Utilization of Plants By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants and Colorants. *In: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Editado por Vasso Oreopoulou Winfried Russ, Editorial Springer, New York. p. 209-232.
67. Peng, Z., Hayasaka, Y., Iland, P., Sefton, M., Hoj, P., & Waters, E. J.(2001). Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 26–31.

68. Peschel W., Sanchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzia I., Jiménez D., Lamuela-Raventos R., Buxaderas S., Codina C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97. 137–150.
69. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85, 267–273.
70. Pinelo, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2006). Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering* 77 (2006) 57–63.
71. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. 2005. *Antioxidantes de los Alimentos*. 1ra Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. págs.: 43 - 44,110.
72. Popa, V. I., Dumitru, M., Volf, I., & Anghel, N. 2008. Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial Crops and Products*, 27, 144–149.
73. Quintana Z.R. y Rubio A.J. 2012. Estudio de Pre-factibilidad para la exportación de pulpa congelada de camu-camu para el mercado japonés. Tesis Economista. UNALM. Lima- Perú.
74. Quintero A., Blanco A., Romero E., Gassos L., Estrada M. 2008. Producción de ácido cafeíco como antioxidante natural a partir de la hidrólisis enzimática sobre residuos agroindustriales. VII Congreso Internacional. Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, ITSON, Cd. Obregón, 85000, Sonora, México.
75. Ramos LL. E., Castañeda C. B, Ibañez V. L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e Introducidas. *Revista Académica Perú Salud* 15(1): 42-46.
76. Reynertson K., Yang H., Jiang B., Basile M., Kennelly E. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* 109. 883 – 890.

77. Ribeiro Da Silva, L., Teixeira De Figueiredo EA, Silva Ricardo NMP, Pinto Vieira IG, DE FIGUEIREDO RW, Montenegro Brasil I, GOMES CL. 2014. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 143 (2014) 398–404.
78. Ros M., Pascual J., Ayuso M, Morales A., Miralles J., Solera C., 2012. Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortalizas: proyecto Life+ Agrowaste. *Residuos* 130: 2-9.
79. Rufino M., Alves R., Brito E., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., & Mancinifilho J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–10002.
80. Russell W. R., Scobbie L., Labat, A., Duncan, G. J. Duthie, G. G., 2008. Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry*. 10.1016/j.foodchem.2008.11.086.
81. Sánchez M. R. 2015. *Gestión de la Calidad y gestión ambiental en la Industria Alimentaria*. Editorial Síntesis, S.A. Madrid – España. 119p.
82. Silva De Azevado J, Fujita A, De Oliveira E, Genovese M, Pinto R. 2014. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. *Food Research International* 62 (2014) 934–940
83. Silva E., Rogez H., Larondelle Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 55. 381–387.
84. Sotero S. V., Silva D.L., García de Sotero D., Imán C. S. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu-camu (H.B.K.). *Revista Sociedad Química del Perú*. 75 (3).

85. Sotomayor, P. 2000. Influencia de los encapsulantes y las temperaturas de secado en la calidad del camu-camu (*Myrciaria dubia*) Liofilizado. Tesis Ing Industrias Alimentarias. Lima Perú. UNALM. 66 p.
86. Suja, K.P., Abraham, J.T., Tamiz, S.N., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. (2004). Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry* 84, 393-400.
87. Tan, M. C., Tan, C. P., & Ho, C. W. (2013). Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal*, 20, 3117–3123.
88. Thi, N.B.D., Lin, C.Y., Kumar, G. (2016) Waste-to-wealth for valorization of food waste to hydrogen and methane towards creating a sustainable ideal source of bioenergy, *Journal of Cleaner Production*, 122: 29-41.
89. Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, CH. W. & Tan CH. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120, 290 – 295.
90. Ueda H., Kuroiwa E., Tachibana Y., Kawanishi K., Ayala M. 2004. Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia* (H. B. & K.) McVaugh. *Phytomedicine* 11 (2004) 652–656.
91. Vergamini D., Cuminng D., Viaggi D. 2015. The Integrated Management of Food Processing Waste: The Use of the Full Cost Method for Planning and Pricing Mediterranean Citrus By-Products. *International Food and Agribusiness Management Review Volume 18 Issue 2*.
92. Villachica, H. 1996. El cultivo de camu-camu (*Myrciaria dubia*) en la Amazonia peruana. TCA. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro Tempore. Lima – Peru.

93. Villanueva, J. 2010. Antocianinas, Acido ascórbico, polifenoles totales y Actividad Antioxidante en la cascara de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh). Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campiñas, 30 (Supl.1). páginas:151 – 160.
94. Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026–4037.
95. Yepes S.M.; Montoya N. L.J.; Orozco S.F. 2008. Valorización de Residuos agroindustriales-Frutas- en Medellín y el sur del Valle de Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Ciencias Universidad Nacional de Colombia*.61 (1): 4422-4431.
96. Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczki, M. 2009. Phenolic acid profiles mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112, 685–689.
97. Zheng W., Dai Q., Custer, L.J., Shu, X., Wen WQ., Jin F Y Franke AA.1999: Urinary Excretion of Isoflavonoids and the Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* Vol. 8, 35-40.  
<http://www.iqb.es/ginecologia/menopausia/genisteina.htm>. Visitado 05.10.2015
98. Zuorro A., Maffei G., Lavecchia R. 2015. Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production* xxx : 1-6.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

**Cuadro 1: Análisis Granulométrico de residuos sólidos (cáscara y pepa) deshidratada y molida del camu-camu**

**Repetición 1**

Numero de malla	Luz Malla (mm)	Masa pdto retenido (g)	% Rechazo	% Rechazo Acumulado	% Cernido Acumulado
10	2.00	0.31	0.31	0.31	99.69
20	0.85	6.17	6.17	6.48	93.52
30	0.60	16.61	16.61	23.09	76.91
40	0.42	20.11	20.11	43.2	56.80
Plato		56.80	56.8	100	0.00
TOTAL		100.00	100		

**Repetición 2**

Numero de malla	Luz Malla (mm)	Masa pdto retenido (g)	% Rechazo	% Rechazo Acumulado	% Cernido Acumulado
10	2.00	0.28	0.28	0.28	99.72
20	0.85	6.23	6.23	6.51	93.49
30	0.60	16.53	16.53	23.04	76.96
40	0.42	21.29	21.29	44.33	55.67
Plato		55.67	55.67	100.00	0.00
TOTAL		100.00	100.00		

### ANEXO 2: Etapa del Screening

**Cuadro 2: Resultados de Contenidos de Compuestos Fenólicos totales en la etapa del Screening**

TRAT	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	mg ac. galico /100g m.s.
F <sub>1</sub>	5238.04	3639.18	3493.41	4123.55 ± 967.93
F <sub>2</sub>	4532.34	4507.61	4750.92	4596.96 ± 133.91
F <sub>3</sub>	3428.07	4101.02	3067.40	3532.17 ± 524.61
F <sub>4</sub>	4839.10	4675.09	4696.80	4737.00 ± 89.09
F <sub>5</sub>	5736.71	4730.08	5047.70	5171.50 ± 514.60
F <sub>6</sub>	6158.77	6679.46	6945.59	6594.61 ± 400.22
F <sub>7</sub>	4650.21	4172.02	4743.21	4521.81 ± 306.48
F <sub>8</sub>	6598.98	6722.03	6365.02	6562.01 ± 181.35

F: Factorial (1,2, .....,16).

R: Repetición (1,2,3).

**Cuadro 3: Análisis de varianza del contenido de Compuestos Fenólicos en la Etapa del Screening**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Temperatura	9.91339E6	1	9,91339E6	45,82	0.0000
B: Tiempo	481899.00	1	481899.00	2.23	0.1563
C: mp:ste	1.28786E7	1	1,28786E7	59,52	0.0000
AB	681913.00	1	681913.00	3.15	0.0961
AC	1.1949E6	1	1.1949E6	5.52	0.0329
BC	20002.3	1	20002.3	0.09	0.7653
bloques	338834.00	2	169417.00	0.78	0.4748
Error total	3.24555E6	15	216370.		
Total (corr.)	2.87551E7	23			

R-cuadrada = 88.7131 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 82.6934 porciento

Error estándar del est. = 465.156

Error absoluto medio = 290.157

Estadístico Durbin-Watson = 2.17793 (P=0.4745)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.23344

### ANEXO 3: Etapa de optimización

**Cuadro 4 : Resultados de Contenido de Compuestos Fenólicos totales mediante el diseño central compuesto rotatable**

TRAT	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	mg ac. galico /100g m.s.
DCC1	4370.14	4248.9	4384.41			4334.48±74.46
DCC2	4974.36	5363.21	5352.99			5230.19±221.61
DCC3	4829.35	4907.52	4827.91			4854.93±45.55
DCC4	5349.68	5093.78	5290.27			5245.58±133.93
DCC5	4228.12	3901.54	4373.84			4167.83±241.85
DCC6	5913.47	5922.29	5981.38			5939.05±36.93
DCC7	4450.23	4469.29	4445.46			4454.99±12.61
DCC8	5149.58	5210.45	5247.88			5204.64±49.61
V	5034.64	5287.91	5103.16	5045.03	4808.17	5055.78 ± 171.76

DCC (1,2,.....,8): Tratamiento diseño central compuesto

V(1,2,.....,5): Tratamiento punto central (5 réplicas).

**Cuadro 5: Análisis de varianza del contenido de compuestos fenólicos mediante el diseño central compuesto rotatable**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	1.79574E6	1	1.79574E6	37.03	0.0005
B:MP_STE	317447.00	1	317447.00	6.55	0.0376
AA	391.804	1	391.804	0.01	0.9309
AB	64024.2	1	64024.2	1.32	0.2883
BB	99448.5	1	99448.5	2.05	0.1953
Error total	339502.00	7	48500.3		
Total (corr.)	2.61663E6	12			

$$R^2 = 87.0252 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustada por g.l.)} = 77.7575 \%$$

$$\text{Error estándar del est.} = 220.228$$

$$\text{Error absoluto medio} = 137.321$$

$$\text{Estadístico Durbin-Watson} = 2.13444 \text{ (P=0.4807)}$$

$$\text{Autocorrelación residual de Lag 1} = -0.0899615$$

**Coefficientes de la regresión para compuestos fenólicos totales**

Constante	1931.15
A: Temperatura	61.7471
B: Materia prima/solvente	52.8502
AA	-0.04803
AB	-0.50606
BB	-0.29891

**La ecuación del modelo ajustado es:**

$$\text{Fenolicos totales} = 1931,18 + 61,7457*\text{Temperatura} + 52,8496*\text{mp:ste} - 0,0480185*\text{Temperatura}^2 - 0,50604*\text{Temperatura}*\text{mp:ste} - 0,298913*\text{mp:ste}^2$$

**Respuesta optimizada (objetivo: maximizar fenólicos)**

$$\text{Valor óptimo} = 5711,67$$

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Temperatura	19,8223	55,1777	55,1777
mp:ste	11,7157	68,2843	41,6958

## ANEXO 4

### Precio de venta de forrajes para alimentación animal

Los residuos del procesamiento del brócoli (hojas y tallo):

Precio de venta residuos: 10m<sup>3</sup> de residuos: 640.00 soles.

$\rho = 286.41 \text{ kg/m}^3$  (Olascoaga, 2016)

Masa =  $\rho \times \text{Volumen} = 286.41 \text{ kg/m}^3 \times 10\text{m}^3 = 2864.10 \text{ kg}$

#### Precio de venta residuos:

S/. 640.00/2864.10kg = S/. 0.224/kg

1 kg -----S/. 0.224

1000kg = 1 Tonelada-----X = S/. 224.00

Entonces el precio de venta de residuos: S/. 224/Ton de residuos de broccoli.

## ANEXO 5

### Costo de traslado de residuos sólidos orgánicos al relleno sanitario



2. COSTOS

CANT	DESCRIPCION DEL SERVICIO	COSTO
1	<b>Servicio de Transporte ( NO PELIGROSOS , )</b> ✓ Carga de punto de acopio ( lima ) ✓ Servicio de Transporte Según Ley 27314. Con VOLQUETE ✓ Seguro de Responsabilidad Civil con Terceros ✓ Personal con SCTR – Salud y Pensiones. ✓ Incluye Carga y descarga de residuos. ✓ ECOGLOBO SAC – SJL recojo , transporte y disposición	<b>S/. 750 + IGV X VIAJE</b> <b>TRANSPORTE</b> <b>( Aprox a recoger 5TN )</b> con un volquete de 15 M3 + <b>S/. 200 + IGV X 2 HORA de</b> mini cargador ( mínimo 2 horas al día )
2	<b>Servicio de Disposición Final</b> Costo por derecho de relleno de PETRAMAS (Relleno Huaycoloro), de residuos	<b>S/.115.00+ IGV X 5TN</b> <b>S/ 23.00 X TN</b> <b>( disposición final RESIDUOS )</b>
	<b>DOCUMENTOS A ENTREGAR AL CLIENTE</b> ✓ Certificado de disposición ✓ Certificado de EPS de transporte ✓ Ticket original de disposición final ✓ SCTR del personal ✓ Informe técnico del servicio ( con fotos ) ✓ Acta de conformidad	<b>INCLUYE EL CERTIFICADO y todo los</b> <b>documentos de acuerdo a ley</b>  DISPONIBILIDAD DE LUNES A DOMINGO Horario : las 24 horas
	<b>COSTO A PAGAR</b>	<b>S/ 965.00. + IGV</b>



**ANEXO 6**

**Análisis económico- Flujo de caja económico para la producción de pulpa congelada de camu-camu para exportación al mercado japonés.**

Detalle	2012	2013	2014	2015	2016
<b>Costo de producción (USD*)</b>	45938.73	65921.14	89929.67	110371.8	138274.25
<b>Cantidad producida (kg)</b>	8325.18	11885.78	15919.59	20318.12	26489.46
<b>Costo de producción (USD*/kg)</b>	5.52	5.55	5.65	5.43	5.22
<b>Costo promedio de producción (USD*/kg)</b>					<b>5.47</b>

Fuente: Quintana y Rubio, 2012. (\*):1USD = 3.249 soles.