

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE UVA (*Vitis vinífera*)
OBTENIDO CON Y SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO”**

Presentada por:

KATHERYN SHARON LEZAMA GUERRA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO
EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima-Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE UVA (*Vitis vinífera*) OBTENIDO CON Y SIN
TRATAMIENTO ENZIMÁTICO”**

Presentado por:

KATHERYN SHARON LEZAMA GUERRA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. David Campos Gutiérrez
PRESIDENTE

Dr. Marcial Silva Jaimes
MIEMBRO

Mg. Sc. Beatriz Hatta Sakoda
MIEMBRO

Mg.Sc. Gloria Jesús Pascual Chagman
ASESOR(A)

Mg. Sc. Christian Encina Zelada
CO-ASESOR

Lima-Perú

2017

DEDICATORIA

A Dios por ser mi gran soporte y demarrar sus infinitas bendiciones.

A mis padres por su apoyo infinito y ser mis grandes pilares durante mi desarrollo personal y profesional.

AGRADECIMIENTO

- A la Mg. Sc. Gloria Pascual Chagman por su valiosa asesoría y apoyo.
- Al Mg. Sc. Christian Encina Zelada por su asesoría y apoyo en los análisis estadísticos e investigación desarrollada.
- Agradecimientos al CONCYTEC por el financiamiento brindado y apoyo a la investigación.
- A los miembros del jurado por sus grandes aportes para el desarrollo de esta investigación.
- A la técnica Karina Ccapa Ramírez y a todo el personal técnico de los laboratorios de la Facultad de Industrias Alimentarias por su gran apoyo, aportes y cooperación en la realización de los análisis de esta investigación.
- A los técnicos de la Facultad de Industrias Alimentarias: Max Zúñiga, Juan Mayhuire y Sarita Prudencio.
- A mis padres por su paciencia y apoyo incondicional: Miguelina Guerra de Lezama y Florentino Alcibíades Lezama Ruiz.
- A mis mejores amigos, considerados como mis hermanos, quienes me guiaron, orientaron y apoyaron en el desarrollo de mi investigación y preparación en la sustentación de mi investigación: Hermelinda Alvarez Chancasanampa y Ronald Talavera Apaza.

INDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. LA VID.....	2
2.1.1. TAXONOMÍA.....	2
2.1.2. LA UVA.....	3
2.2. ACEITE DE SEMILLA DE UVA	3
2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS	6
2.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	11
2.3.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS.	19
2.3.3. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	21
2.4. ANTIOXIDANTES.....	23
2.4.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	24
2.4.2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE..	25
2.5. APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES.....	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	37
3.2. MATERIA PRIMA.....	37
3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	37
3.3.1. MATERIALES.....	37
3.3.2. EQUIPOS.....	38

3.3.3. REACTIVOS.....	39
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	40
3.4.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.....	40
3.4.2. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	40
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	42
3.5.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA POR PRENSADO HIDRÁULICO SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	42
3.5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	47
3.5.3. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS ACEITES DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	47
3.5.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS ACEITES DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	47
3.5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA CON TRATAMIENTO Y SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	50
4.1.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	50
4.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	52
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	54
4.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	54
4.2.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	58

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	66
4.4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE RESPECTO AL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	73
V. CONCLUSIONES.....	79
VI. RECOMENDACIONES.....	80
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
VIII. ANEXOS.....	94

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de uva.....	4
Cuadro 2: Ácidos fenólicos y flavonoides presentes en el aceite virgen de semilla de uva.....	5
Cuadro 3: Capacidad Antioxidante del aceite de semilla de diez variedades de uva.	5
Cuadro 4: Tocoferoles, tocotrienoles y pigmentos presentes en el aceite virgen de semillas de uva (mg/kg)	6
Cuadro 5: Clasificación de los compuestos fenólicos.....	12
Cuadro 6: Métodos cromatográficos para la determinación de compuestos fenólicos.....	22
Cuadro 7: Principales métodos de la determinación de captura de radicales libres.....	28
Cuadro 8: Parámetros tomados para el proceso de extracción de los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.....	45
Cuadro 9: Valores de cantidad rendimiento y eficiencia de la extracción del aceite de semilla de uva obtenido sin y con tratamiento enzimático enzimático(Celulasa) por prensado hidráulico	51
Cuadro 10: Características físico químicas del aceite crudo de semilla de uva extraído con y sin tratamiento enzimático	52
Cuadro 11: Contenido de compuestos fenólicos totales en los aceites de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático.....	56
Cuadro 12: Contenido de compuestos fenólicos presentes en el aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático expresados en µg/g muestra.....	59
Cuadro 13: Capacidad antioxidante de las muestras de aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático evaluadas mediante los métodos ABTS y DPPH.....	66
Cuadro 14: Capacidad antioxidante respecto al índice de peróxidos evaluado en las muestras de aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos.....	7
Figura 2: Estructura química de los ácidos ferúlico y cafeico.....	10
Figura 3: Estructura química de fenoles simples.....	14
Figura 4: Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.....	14
Figura 5: Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos.....	14
Figura 6: Estructura de los estilbenos.....	15
Figura 7: Estructuras mayoritarias de flavonoides.....	17
Figura 8: Estructura general de los flavonoles.....	17
Figura 9: Estructura de la procianidina B1.....	18
Figura 10: Estructura general de las flavonas	18
Figura 11: Ejemplo de estructura representativa de taninos hidrolizables.....	18
Figura 12: Estructura del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).....	31
Figura 13: Estructura química de la reacción entre ABTS y persulfato potásico.....	32
Figura 14: Esquema de la reacción producida en el método ABTS.....	32
Figura 15: Estructura del DPPH.....	33
Figura 16: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	34
Figura 17: Esquema de la reacción producida en el ensayo DPPH.....	34
Figura 18: Diagrama de flujo para la extracción de aceite de semilla de uva sin tratamiento enzimático por prensado hidráulico.....	43
Figura 19: Diagrama de flujo para la extracción de aceite de semilla de uva con tratamiento enzimático por prensado hidráulico.....	44
Figura 20: Esquema del diseño experimental para la determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del aceite de semilla de uva obtenido con tratamiento y sin tratamiento enzimático.....	49
Figura 21: Compuestos fenólicos totales (mg AGE/ Kg aceite) en las muestras de aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático.....	57
Figura 22: Compuestos fenólicos presentes en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.....	60
Figura 23: Contenido del ácido cafeico presente en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.....	62

Figura 24: Contenido de ácido cinámico presente en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.....	63
Figura 25: Contenido de hesperitina presente en el aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.....	65
Figura 26: Capacidad antioxidante (mmoles TE/Kg de aceite) en el aceite de semilla de uva obtenido sin tratamiento y con tratamiento enzimático según el método ABTS (fase lipofílica).....	68
Figura 27: Capacidad antioxidante (mmoles TE/Kg de aceite) en el aceite de semilla de uva obtenido sin tratamiento y con tratamiento enzimático según el método DPPH hidrofílico.....	70
Figura 28: Correlación entre rendimiento (%) de extracción y el contenido de compuestos fenólicos en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.....	74
Figura 29: Correlación entre rendimiento (%) de extracción y los valores de capacidad antioxidante por el método ABTS en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.....	75
Figura 30: Correlación entre rendimiento (%) de extracción y los valores de capacidad antioxidante por el método DPPH en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.....	76

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVAS ESTÁNDAR Y CROMATOGRAMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	94
ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	104
ANEXO 3: METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	120

RESUMEN

La presente investigación consistió en determinar los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del aceite de semilla de uva (*Vitis vinifera*) variedad “Borgoña”, extraído por prensado hidráulico sin y con tratamiento enzimático. A partir de los aceites obtenidos se realizó el análisis de compuestos fenólicos totales por el método Folin & Ciocalteu, donde los aceites con tratamiento enzimático obtuvieron los valores más altos (148,47-279,19 mg AGE/Kg de aceite) respecto al aceite que no obtuvo este tratamiento (127,53 mg AGE/Kg de aceite); mientras que para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, se analizó el aceite por tratamiento enzimático de mayor contenido en fenoles totales (279,19 mg AGE/Kg), siendo además, el que tuvo el mayor contenido e identificación de estos compuestos como: ácido cafeico (0,13 $\mu\text{g/g}$ aceite), ácido cinámico (0,17 $\mu\text{g/g}$ aceite) y hesperitina (0,03 $\mu\text{g/g}$ aceite); frente al aceite sin dicho tratamiento que solo presentó al ácido cafeico (0,12 $\mu\text{g/g}$ aceite) y ácido cinámico (0,11 $\mu\text{g/g}$ aceite). En lo que respecta a la determinación de capacidad antioxidante, fueron los aceites obtenidos con enzimas, los que lograron los valores más altos entre: 1,71-1,81 mmoles TE/Kg por el método ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) y 0,09-0,13 mmoles TE/Kg de aceite por el método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) frente a los aceites obtenidos sin asistencia enzimática con 1,59 y 0,05 mmoles TE/Kg de aceite, por los métodos ABTS y DPPH, respectivamente. De estos resultados se evidencia la acción positiva del tratamiento enzimático, donde el aumento del rendimiento de extracción del aceite por la acción enzimática está relacionado al aumento de compuestos fenólicos antioxidantes, dándole, por lo tanto, un valor agregado nutracéutico al producto final.

Palabras clave: Aceite de semilla de uva, tratamiento enzimático, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

SUMMARY

The present research consisted in determining the phenolic compounds and antioxidant capacity of grape seed oil (*Vitis vinifera*) variety "Borgoña", extracted by hydraulic pressing without and with enzymatic treatment. From the oils obtained, the analysis of total phenolic compounds was performed by the Folin & Ciocalteu method, where oils with enzymatic treatment obtained the highest values (148,47–279,19 mg AGE/Kg of oil) Which did not obtain this treatment (127,53 mg AGE/Kg of oil); while for the identification and quantification of phenolic compounds, the oil was analyzed by enzymatic treatment with the highest content in total phenols (279,19 mg AGE/Kg), and it was the one with the highest content and identification of these compounds as: Caffeic acid (0,13 µg/g oil), cinnamic acid (0,17 µg/g oil) and hesperitin (0,03 µg/g oil); against the oil without said treatment that only presents to the acid caffeic (0,12 µg/g oil) and cinnamic acid (0,11 µg/g oil). As regards the antioxidant capacity, it was the oils obtained with enzymes, which achieved the highest values between:1,71-1,81 mmol TE/Kg by the ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) method and 0,09-0,13 mmol TE/Kg of oil by the DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method against oils obtained without enzymatic assistance with 1,59 and 0,05 mmol TE/Kg of oil, by the ABTS and DPPH methods, respectively. From these results the positive action of the enzymatic treatment is evidenced, where the increase of the yield of the extraction of the oil by the enzymatic action is related to the increase of phenolic antioxidant compounds, giving, therefore, a nutraceutical added value to the final product.

Keywords: Grape seed oil, enzymatic treatment, phenolic compounds, antioxidant capacity.

I. INTRODUCCIÓN

La uva (*Vitis Vinífera*) es la materia prima principal en la industria vitivinícola, la cual en el mercado peruano ha experimentado un aumento del 40 por ciento acumulado en los últimos años (ICEX 2012), siendo las mayores zonas productoras Ica, La Libertad, Lima, Tacna entre otros; y sus semillas, residuos de la industria vitivinícola, han alcanzado una gran importancia debido a su utilización en suplementos vitamínicos y contenido en lípidos de 13,0 y 18,4 por ciento de lípidos/semilla (Padley 2014), para la extracción de aceites vegetales.

El aceite de semilla de uva presenta propiedades nutraceuticas importantes, debido a su alto porcentaje de ácidos grasos polinsaturados, siendo los más abundantes el ácido oleico y el ácido linoleico, con 22 por ciento y 67 por ciento respectivamente (Padley 1994) ; de los cuales el ácido oleico u omega 6 tiene la capacidad de elevar el colesterol “bueno” HDL (*High Density Lipo-protein*) y bajar el colesterol “malo” LDL (*Low Density Lipoprotein*), además de normalizar las lesiones causadas por la diabetes y la obesidad, entre otros. Por otro lado la presencia de compuestos fenólicos antioxidantes, derivados de los polímeros de catequina y epicatequina, denominados procianidinas (Guerra y Zuñiga 2003) y otros presentes en las semillas de uva, hacen que este producto tenga valor farmacéutico (Bombardelli *et al.*1995) y sea un nuevo camino para que actuales y futuras empresas aceiteras pongan atención en este residuo vitivinícola para su uso potencial.

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Determinar los compuestos fenólicos totales presentes en el aceite de semilla de uva (*Vitis vinífera*) extraídos con tratamiento y sin tratamiento enzimático.
- Identificar y cuantificar determinados compuestos fenólicos presentes en el aceite de semilla de uva (*Vitis vinífera*) obtenidos con tratamiento y sin tratamiento enzimático.
- Determinar la capacidad antioxidante del aceite de semilla de uva (*Vitis vinífera*) con y sin tratamiento enzimático por los métodos DPPH hidrofílico y ABTS lipofílico.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA VID

La vid (*Vitis vinífera*) parra o parrón es una planta perenne de un periodo vegetativo con cosechas anuales, cuya reproducción es por vía sexual (semillas) o a-sexual (estacas, acodos e injertos) según Agrobanco (2008).

Esta planta incluye unas 600 especies de arbustos, por lo general trepadores y que producen frutos en baya, propios de países cálidos y tropicales (AMPEX 2008). Esta es una planta naturalmente frondosa, de mucho follaje, mucha madera y de frutos pequeños; donde el exceso de alimento en el suelo puede hacerla vegetar de acuerdo con su tendencia natural y dar malos frutos, aunque fuera frondosa, por lo cual es conveniente que los suelos sean de fertilidad media o escasa, aunque, naturalmente no áridos (Larrea 1978).

2.1.1 TAXONOMÍA

Según CEDEP (2007), la vid dentro del reino vegetal está clasificada en la siguiente forma:

- **Tipo** : Fanerogamas
- **Subtipo** : Angiosperma
- **Clase** : Dicotiledóneas
- **Grupo** : Dialipétalas
- **Orden** : Ramnales
- **Familia** : Vitácea
- **Género** : Vitis

Mientras que la variedad de vid, Borgoña negra, según Hidalgo (1993), la botánica sistemática la sitúa en la más importante agrupación del reino vegetal, perteneciendo está a la especie *Labrusca*.

2.1.2. LA UVA

La uva o grano de uva es el nombre que recibe su fruto, el cual crece formando racimos (AMPEX 2008) es comestible y usada como materia prima para la fabricación de vino y otras bebidas alcohólicas (CEDEP 2007). El racimo está compuesto de 0 a 5 por ciento de semillas, 5 a 12 por ciento de hollejo y 80 a 90 por ciento de jugo y 19,8 por ciento de residuos de uvas. Este residuo consiste en un 15,1 por ciento de tallo 41,6 por ciento de hollejo, 22 por ciento de semillas y 21 por ciento de pulpa. Siendo su composición media: humedad del 7 al 9 por ciento; grasa del 14 al 20 por ciento; pentosas del 12 por ciento, tanino del 4 al 4,5 por ciento, celulosa bruta del 30 al 33 por ciento, sustancia nitrogenada del 9 al 10 por ciento y cenizas del 2,5 al 4 por ciento (Bernardini 1981).

Las semillas de uva constituyen un residuo de la industria vinícola que ha alcanzado una gran importancia por su utilización como materia prima en la elaboración de suplementos nutricionales por sus componentes con actividades antioxidantes, entre los que destacan la vitamina E, carotenoides, polifenoles etc., además de presentar propiedades anticarcinogénicas, antimutagénicas y antivirales (Ashraf-Khorassani 2004). Matthäus (2008) señala que los polifenoles presentes en las semillas de uva exhiben propiedades antioxidantes al ser capaces de inactivar los radicales libres responsables de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

2.2. ACEITE DE SEMILLA DE UVA

El aceite de la semilla tiene numerosos beneficios para la salud asociados con su composición, principalmente en lo que se refiere a la vitamina E y ácidos grasos esenciales, en particular el ácido linoleico. Este ácido graso se conoce en la literatura como un protector de las enfermedades cardiovasculares (Wijendran y Hayes 2004), mientras que la vitamina E tiene propiedades neuroprotectoras y antitumorales, además de ser capaz de reducir los niveles de colesterol y tener actividad antioxidante (Choi y Lee 2009). El aceite de semilla de uva se compone aproximadamente de un 90 por ciento de ácidos grasos poli y mono insaturados, que son responsables de su valor nutritivo como aceite comestible, sobre todo el ácido linoleico (58-78 por ciento, 18:2 n-6), seguido por el ácido oleico (3-15 por ciento, 18:01 n-9) y cantidades menores de ácidos grasos saturados (10 por ciento). Los aceites sin refinar contienen compuestos bioactivos incluyendo tocoferoles (5-52 mg/100 g) y numerosos componentes fenólicos, que pueden contribuir a los efectos beneficiosos de este aceite vegetal (Bockisch 1993; Firestone 1999; Morin 1996). Además un alto punto de humo inusual (aproximadamente 190-230 °C) ha sido reportado sobre el

aceite de semilla de uva, por lo que es adecuado para la cocción a altas temperaturas (Morin 1996). En el Cuadro 1 se presenta la composición de ácidos grasos para el aceite de semilla de uva, donde el ácido oleico a diferencia de lo mencionado anteriormente posee porcentajes mayores en su composición, mientras que en los Cuadros 2, 3 y 4 se muestran los ácidos fenólicos y flavonoides, capacidad antioxidante y tocoferoles, tocotrienoles y pigmentos presentes en dicho aceite.

Cuadro 1: Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de uva

ÁCIDOS GRASOS	MÍNIMO	MÁXIMO
Ácido mirístico C14:0	ND	0,3
Ácido palmítico C16:0	5,5	11,0
Ácido palmitoleico C16:1	ND	1,2
Ácido margárico 17:0	ND	0,2
Ácido maragroleico C17:1	ND	0,1
Ácido esteárico C18:0	3,0	6,5
Ácido oleico C18:1	12	28
Ácido linoleico C18:2	58	78
Ácido linolénico C18:3	ND	1,0
Ácido araquídico C20:0	ND	1,0
Ácido gadoléico C20:1	ND	0,3
Ácido behénico C22:0	ND	0,5
Ácido erúxico C22:1	ND	0,3
Ácido lignocérico C24:0	ND	0,4

ND=No detectable, definido como 0,05 por ciento.

FUENTE: Tomado de Codex Stan 210, 2005.

Cuadro 2: Ácidos fenólicos y flavonoides presentes en el aceite virgen de semilla de uva

ACEITE VIRGEN	NOMBRE DEL COMPUESTO	CONCENTRACIÓN*
Uva	Tirosol	391,0±0,6
	Cafeico	556,1±0,8
	Vainillina	223,9±1,1
	Ac. Cinámico	94,2±0,5
	Luteolina	1135,4±1,0
	Hesperetina	1506,7±1,3

*Ácidos fenólicos expresados como equivalentes de tirosol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) flavonoides en función a las curvas de calibración de cada compuesto ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

FUENTE: Tomado de Navas 2010.

Cuadro 3: Capacidad Antioxidante del aceite de semilla de diez variedades de uva

VARIEDAD	ABTS ($\mu\text{mol trolox/mL aceite}$)	DPPH (%)
Tinto cão	0,477±0,001	65,39±0,14
Aragonês	0,489±0,000	59,41±0,54
Touriga Francesa	0,486±0,001	50,74±0,52
Marufo	0,482±0,000	67,83±0,15
Touriga Nacional	0,391±0,001	56,20±0,52
Tinta Carvalha	0,480±0,000	51,49±0,09
Cornifesto	0,489±0,000	69,89±0,74
Trincadeira preta	0,489±0,000	38,68±0,09
Periquita	0,483±0,000	50,65±0,17
Tinta barroca	0,334±0,000	53,38±0,09

FUENTE: Tomado de Fernández *et al.* 2013.

Cuadro 4: Tocoferoles, tocotrienoles y pigmentos presentes en el aceite virgen de semillas de uva (mg/kg).

COMPUESTO	SYRAH	TINTOREA	SYRAH- TEMPRANILLO- MERLOT
α tocoferol	47,3 \pm 0,3 ^a	50,1 \pm 0,3 ^b	55,8 \pm 0,2 ^c
α tocotrienol	215,7 \pm 1,3 ^a	230,8 \pm 1,0 ^b	278,5 \pm 1,1 ^c
β tocoferol	48,4 \pm 0,5 ^c	40,5 \pm 0,4 ^b	38,2 \pm 0,3 ^a
γ tocotrienol	16,8 \pm 0,5 ^a	21,5 \pm 0,5 ^b	29,2 \pm 0,5 ^c
γ ticotrienol	482,5 \pm 2,1 ^a	498,3 \pm 1,9 ^b	556,1 \pm 2,4 ^c
δ tocoferol	Nd	Nd	2,5 \pm 0,1
δ tocotrienol	16,8 \pm 0,9 ^a	12,6 \pm 0,6 ^a	14,9 \pm 0,5 ^a
Total	827,7 ^a	853,8 ^a	997,7 ^b
Pigmentos			
Carotenoides totales	26,7 \pm 0,3 ^a	26,5 \pm 0,2 ^a	26,5 \pm 0,3 ^a
Clorofilas	91,1 \pm 1,5 ^a	90,8 \pm 1,2 ^a	90,6 \pm 0,8 ^a

Promedios con la misma letra en cada fila no difieren significativamente ($p < 0,05$).

ND:No detectable (< 0,1 %)

FUENTE: Tomado de Navas 2010.

2.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

El término compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles (Sánchez 2010). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes

estructurales, la alelopatía y de defensa ante los factores adversos del ambiente (Paladino 2008).

Según Paladino (2008) el término compuestos fenólicos comprende aproximadamente ocho mil compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (ver Figura 1).

Los fenoles son en muchas formas similares a los alcoholes de estructuras alifáticas donde el grupo hidroxilo está adherido a la cadena de carbonos. Sin embargo, el grupo hidroxilo fenólico está influenciado por la presencia del anillo aromático. Debido al anillo aromático, el hidrógeno del hidroxilo fenólico es lábil, lo que hace que los fenoles sean ácidos débiles. Los compuestos fenólicos se encuentran usualmente bajo la forma de ésteres o glicósidos en lugar de presentarse como compuestos libres, lo cual es una característica importante a tomar en cuenta al momento de realizar la extracción de dichos compuestos (Grotewold 2005).

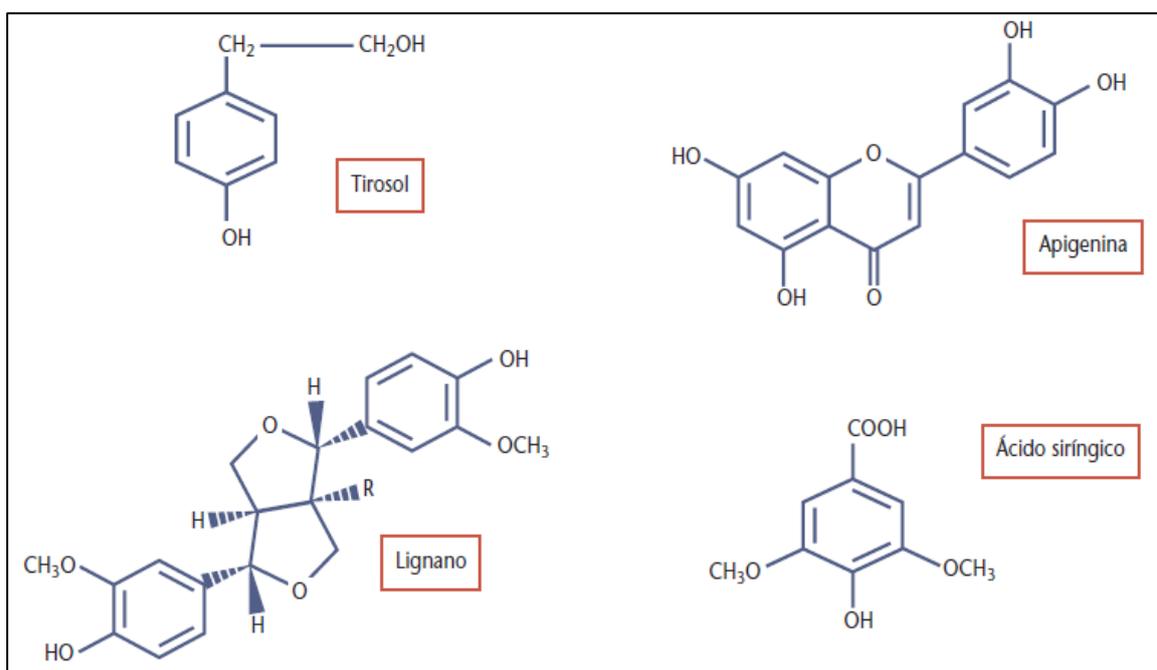


Figura 1: Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos

FUENTE: Tomado de Gimeno, C.E. 2004.

Según Muñoz *et al.* (2007) los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones ultra violeta (UV), entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (flavonoles, chalconas, flavonas, flavononas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc). Los compuestos fenólicos poseen una estructura ideal para eliminar radicales libres, estudios *in vitro* han demostrado que los fenoles son antioxidantes más efectivos que tocoferol y el ácido ascórbico (Blokhina, citado por Curotto 2006).

Funcionan como antioxidantes a bajas concentraciones, sin embargo cuando están en altas concentraciones pueden funcionar como pro-oxidantes, ya que ellos mismos son susceptibles a la oxidación singulete, la quelación de metales, o actúan como sustratos para el ataque del anión superóxido (Robards, citado por Curotto 2006).

Los compuestos fenólicos están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. Sus características antioxidantes se deben a la reactividad del grupo fenol (Kähkönen *et al.*, citado por Sánchez 2010).

Existe una gran variedad de fenoles ácidos distribuidos en productos de origen vegetal con efectos beneficiosos a la salud. Ellos pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y desarrollo de tumores y cáncer (Arts & Hollman 2005). Los fenoles ácidos como los ácidos: cumárico, cafeico y ferúlico, inhiben la actividad de agentes mutágenos, estimulan la actividad de la enzima fenolsulfotransferas implicada en la detoxificación de compuestos metabólicos y poseen actividad bactericida (Milner; Krizkova *et al.*; Puupponen-Pimiä *et al.* 2001).

Existen muchas familias de polifenoles presentes en los aceites vírgenes, dentro de los más citados se encuentran los ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferulico, ácido cumárico y ácido galico (Slavin *et al.* 2009; Haiyan *et al.* 2007; Kanu *et al.* 2007, Milner 2004), catequinas y procianidinas o hidroxitirosol y sus derivados presentes en el aceite de oliva virgen. En cuanto a los fenólicos complejos, las cantidades más importantes corresponden a las formas dialdehídicas del ácido enólico unido al

hidroxitirosol o al tirosol (3,4 DHPEA_EDA y p-HPEA_EDA), oleuropeína, ligstrósido, el pinorresinol y el acetoxipinorresinol, presente en los aceites de oliva (Owen *et al.* 2000).

Los biofenoles presentes en los aceite vírgenes son los co-responsables de la reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares, asociado a la composición y efecto antioxidante del perfil lipídico, lo que constituye una fuente de protección contra el daño oxidativo. El daño por el estrés oxidativo es el desequilibrio entre los compuestos oxidantes y antioxidantes en el organismo. Los compuestos oxidantes, llamados “radicales libres” se compensan con los antioxidantes, y por eso tienen un papel fundamental aquellos que nos proporciona la dieta. Los polifenoles son sustancias de origen vegetal que están presentes en el aceite virgen de oliva y otras fuentes de semillas. Su estructura química les confiere extraordinarias características antioxidantes atrapando a los radicales libres. Estos radicales libres son sustancias que tienen un electrón no apareado que busca el equilibrio atrapando el electrón que le falta de otras sustancias y así oxidándolas. Si hay más compuestos oxidantes que antioxidantes (estrés oxidativo) estos contribuyen al desarrollo de enfermedades como el cáncer, la arteriosclerosis, envejecimiento y proceso neurodegenerativos como la enfermedad del alzheimer (Valente *et al.* 2009). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o llamado popularmente colesterol malo, es por ejemplo un primer paso en el desarrollo de arterosclerosis y enfermedades coronarias (Codoceo y Muñoz 1999).

Según Navas (2010) existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales que se incorporan en la dieta. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarla por hidroxilación de fenilalanina.

La enzima fenilalanina amonio lipasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos transcinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico (ver Figura 2) cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Navas 2010).

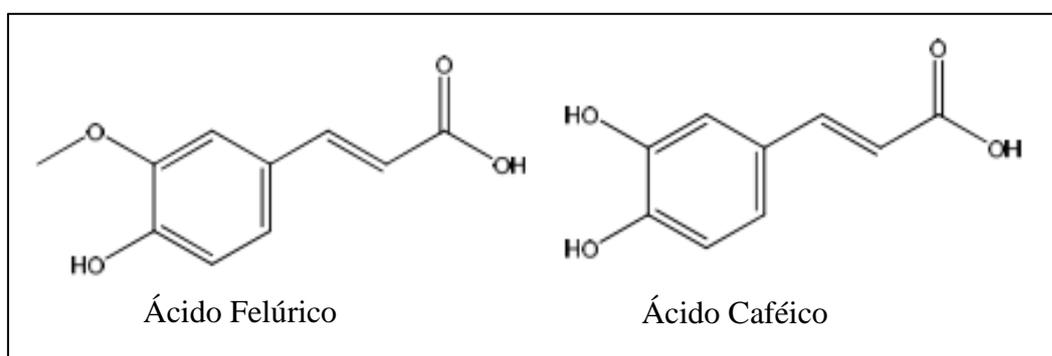


Figura 2: Estructura química de los ácidos ferúlico y caféico.

FUENTE: Tomado de Navas 2010.

Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides por contener un anillo de benceno (C₆) y una cadena lateral de tres carbonos (C₃). Las cumarinas son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación (Navas 2010).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los derivados del ácido benzoico que tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral. Ejemplos de estos derivados son la vainillina y el ácido salicílico que actúa como regulador del crecimiento vegetal implicado en la resistencia de la planta frente a patógenos (Navas 2010).

2.3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La naturaleza de los compuestos fenólicos varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta los compuestos altamente polimerizados (Martínez-Valderde *et al.* citado por Sánchez 2010). Así los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Cada una de las familias agrupa un número de compuestos fenólicos más o menos variado, siendo la familia de los flavonoides, con cerca de 4000 estructuras diferentes una de las más estudiadas (Sanchez y Paniagua 2008).

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de diferentes formas. Harbone y Simmonds (1964) citados por Grotewold (2005) los clasificaron según el número de carbono en sus moléculas (ver Cuadro 5).

Como consecuencia de la gran variedad de compuestos fenólicos presentes en la naturaleza, las propiedades y aplicaciones de los fenoles varían, existiendo algunos con efectos tóxicos sobre los organismos vivos y otros con efectos beneficiosos para la salud (Sánchez 2008). A continuación se realizará un estudio más detallado de cada grupo.

a. Fenoles simples: Según Sánchez y Paniagua (2008) este grupo de compuestos se caracteriza por poseer en su estructura química un anillo aromático y grupos hidroxílicos (C_6) (ver Figura 3). A pesar de su simplicidad estructural, los analitos resultantes se han citado en muchas ocasiones en estudios centrados en la taxonomía de plantas, reflejando estrechamente el grado y la naturaleza de las estructuras presentes con propiedades dadas de la planta (Piñeiro 2005).

Cuadro 5: Clasificación de los compuestos fenólicos

ESTRUCTURA	CLASE
C ₆	Fenólicos simples
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
C ₆ -C ₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	Ácido cinámico, cinamil aldehído, alcoholes cinamílicos
C ₆ -C ₃	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C ₁₅	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C ₁₅	Flavanos
C ₁₅	Flavonas
C ₁₅	Flavononas
C ₁₅	Flavonoles
C ₁₅	Antocianidinas
C ₁₅	Antocianinas
C ₃₀	Biflavonilas
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinonas
C ₁₈	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	Dímeros o oligómeros
Lignina	Polímeros
Taninos	Oligómeros o polímeros
Flobáfenos	Polímeros

FUENTE: Tomado de Grotewold 2005.

b. Los ácidos fenólicos: Éste grupo comprende en general a fenólicos que poseen un grupo carbonilo funcional. Los ácidos fenólicos son subdivididos en derivados de los ácidos hidroxinámicos e hidroxibenzoicos (ver las Figuras 4 y 5, respectivamente), sobre la base de sus esqueletos carbonados C₃-C₆ y C₁-C₆, respectivamente (Cheynier 2005). Los ácidos hidroxicinámicos presentan hidroxilaciones y metilaciones en su estructura, estos compuestos poseen un anillo fenil (de seis carbonos) y una cadena lateral de tres carbonos y son colectivamente llamadas fenilpropanoides (Shahidi y Nackz 2004). Entre ellos hay cuatro estructuras básicas que existen en su estado natural libre y se corresponden con los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Al igual que otros compuestos polifenólicos, la mayoría de estas estructuras se encuentran en el reino vegetal químicamente asociados a otros tipos de compuestos. Un ejemplo claro de importancia universal lo constituye la esterificación del ácido caféico con el ácido quínico para formar una estructura ampliamente distribuida en comestibles, el ácido clorogénico. Existen isómeros cis y trans de estos ácidos, aunque en la naturaleza la más frecuente es la trans (Piñerio 2005).

Los ácidos hidroxibenzoicos son caracterizados por la presencia de un grupo carboxyl sustituido en un fenol. A menudo se encuentra enlazado a otras estructuras de los alimentos y forman parte de componentes de estructuras complejas como las ligninas y los taninos hidrolizables. Ejemplo de este grupo incluyen a los ácidos p-hidroxibenzoico, gálico, protocatéquico, vanílico entre otros (Grotewold 2005).

c. Estilbenos: Familia de compuestos constituida por dos ciclos benceno (ver Figura 6), generalmente enlazados por una cadena etano o etileno (C₆-C₂-C₆). Entre los isómeros *trans* de estos compuestos, destaca el resveratrol, o 3,5; 4-trihidroxiestilbeno, por sus propiedades beneficiosas para la salud, y que parece generarse en la uva como respuesta a una infección fúngica a situaciones de estrés (Piñerio 2005). Este compuesto se localiza en los hollejos y se extrae fundamentalmente durante la fermentación de vinos tintos, aunque también se encuentra, en niveles más bajos, en vinos blancos. Sus concentraciones son del orden de 1-3 mg/l, aunque varían según las variedades, siendo al parecer la Pinot Noir especialmente rica en este fenol (Piñerio 2005). Además del resveratrol, se han identificado distintos oligómeros de estilbenos en viñas (Palma y Taylor 1999); mientras que Van Babel *et al.* (1999) y Burns *et al.* (2000) detectaron la presencia de un glucósido del resveratrol denominado piceido.

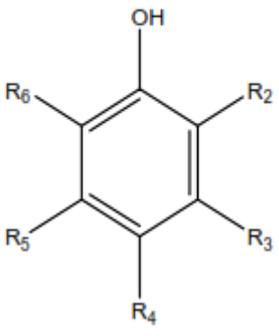
Fenoles simples; C ₆	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
	H	H	H	H	H	Fenol
	H	Cl	H	H	H	3-clorofenol
	H	H	Cl	H	H	4-clorofenol
	H	CH ₃	H	H	H	m-cresol
	H	H	CH ₃	H	H	p-cresol
	Cl	H	Cl	H	H	2,4-diclorofenol
	NH ₂	H	H	H	H	2-nitrofenol
	H	H	NH ₂	H	H	4-nitrofenol

Figura 3: Estructura química de fenoles simples

FUENTE: Tomado de Sánchez y Paniagua 2008.

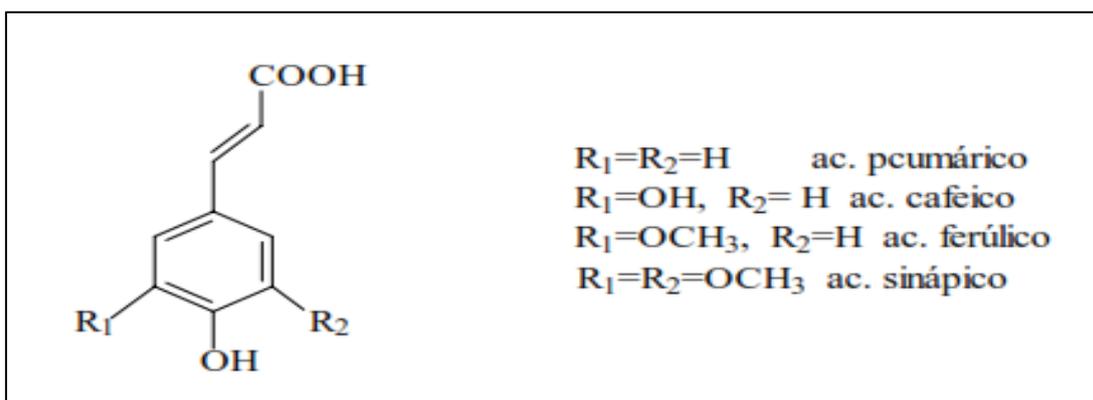


Figura 4: Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

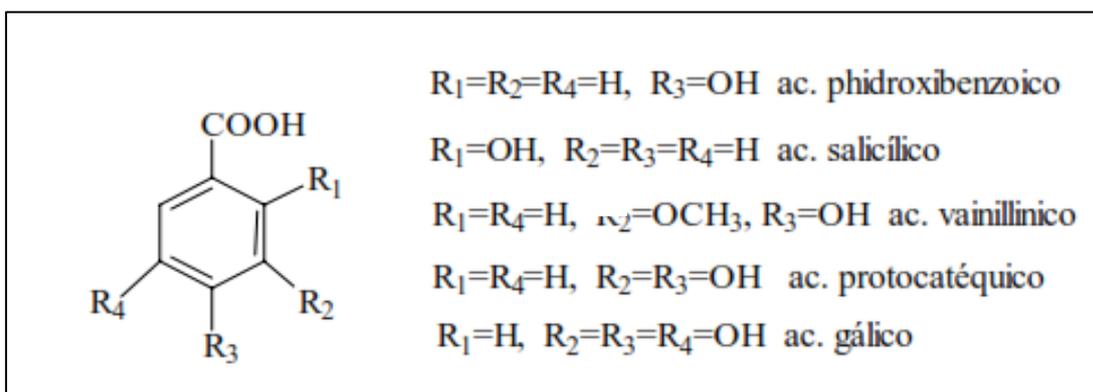


Figura 5: Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

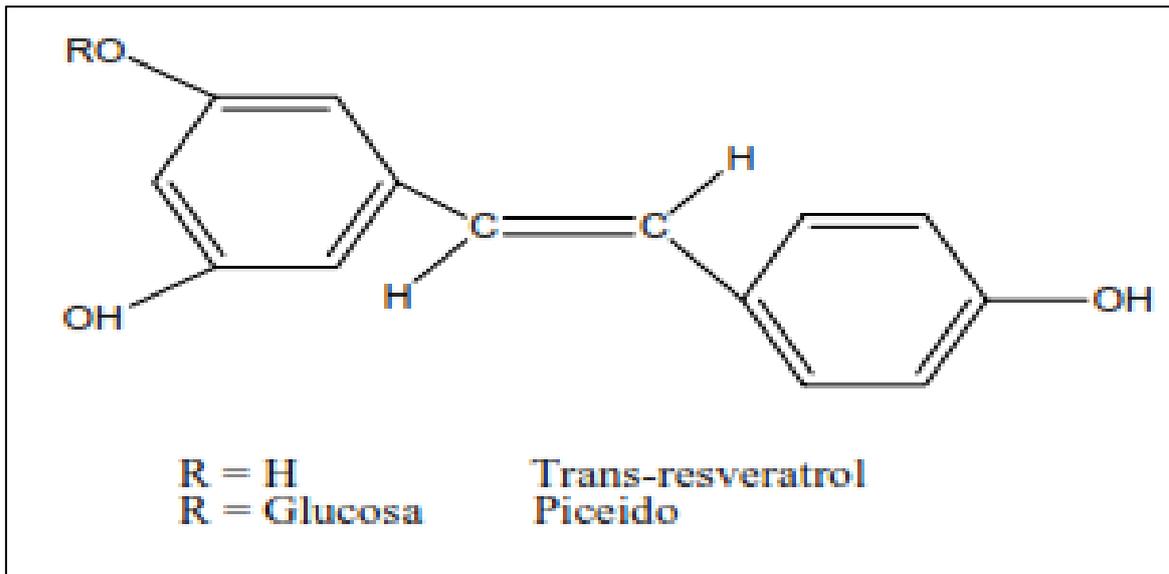


Figura 6: Estructura de los estilbenos

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

d. Flavonoides: Estos compuestos están presentes mayormente en el té verde, semilla de uva, sustancias leñosas como la madera entre otras y tienen un rol importante en la formación de taninos condensados, ya que estos últimos son formados por la asociación de unidades monoméricas de flavonoides (Grotewold 2005).

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, un anillo B y tres átomos que unen los 2 anillos (C₆-C₃-C₆). La estructura puede conformar un heterociclo (pirona) que son los más abundantes (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas) o una cadena abierta (chalconas) (ver Figura 7). Poseen varios grupos hidroxilo unidos a su estructura de anillo y se encuentran normalmente como glicósidos, siendo la glucosa el residuo de glicosilación más frecuente. Los taninos condensados o proantocianidinas se forman por condensación de flavanoles (Sánchez y Paniagua 2008).

- **Flavonoles:** Este tipo de estructuras flavonoideas (ver Figura 8) está ampliamente distribuido en el reino vegetal, formando parte integral de nuestra dieta diaria. Por este motivo, y porque recientemente se han descrito propiedades beneficiosas para la salud, son numerosos los estudios llevados a cabo sobre su presencia en frutos (Popp *et al.* 1996 y Inakuma *et al.* 1998). Según Piñerio (2005) las estructuras glicosiladas de quercetina y kempferol son las más abundantes en el reino vegetal.

La quercetina-3-rutinósido y el kempferol-3-rutinósido constituyen las estructuras más representativas de este tipo de compuestos (ver Figura 8).

- **Flavanoles (flavan-3-oles):** Constituyen uno de las familias flavonoideas más comúnmente distribuidas en la naturaleza (Keinanen *et al.* 1996; Hubert *et al.* 2000). Dentro de su marco estructural es conveniente distinguir entre las unidades monoméricas correspondientes a las estructuras (+) catequina y (-) epicatequina y estructuras oligoméricas de las mismas, conocidas como procianidinas (Piñerio 2005). Las estructuras más relevantes corresponden a las denominadas B₁, B₂, B₃ y B₄ procianidinas (ver Figura 9) constituidas por asociaciones diméricas de (+) catequina y (-) epicatequina. La estructura polimérica previamente mencionada también constituye la base de los taninos denominados condensados (Piñerio 2005).
- **Flavonas e isoflavonoides:** Constituyen el grupo polifenólico menos representativo en alimentos. Las agliconas más ampliamente distribuidas son la apigenina y la luteolina (ver Figura 10). Como los flavonoides, las flavonas pueden aparecer como estructuras glicosiladas. Con respecto a los isoflavonoides, es necesario indicar que constituyen un grupo polifenólico minoritario en alimentos en términos similares a las flavanonas y flavonas (Piñerio 2005). Los isoflavonoides son característicos de las plantas leguminosas y se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos derivados (Field *et al.* 1998; Mülle *et al.* 2001). Como la inmensa mayoría de este tipo de compuestos polifenólicos, estas estructuras isoflavonoideas también aparecen glicosiladas, habiéndose descrito, asimismo, su presencia en forma de acetyl y malonilderivados (Piñerio 2005).
- **Taninos:** En general, el término tanino se refiere a una fracción de compuestos polifenólicos especialmente astringentes, cuya característica fundamental es su alto peso molecular. Estas estructuras poseen una alta capacidad de asociación con otros polímeros biológicos esenciales como las proteínas y los hidratos de carbono (ver Figura 11) (Piñerio 2005).

En el reino vegetal los taninos se encuentran usualmente en dos amplias modalidades metabólicas: los taninos hidrolizables y los taninos condensados. Los taninos hidrolizables son estructuras más simples constituidas por unidades de

ácido gálico libre o esterificado, también conocidos como galotaninos (Piñerio 2005).

Los taninos condensados, comúnmente denominados proantocianidinas son polímeros naturales compuestos de unidades de flavan-3-oles o 3-flavonoles (de tres a una cadena). Dentro de las proantocianidinas más comunes se tienen a las que reciben el nombre de proantocianidinas que derivan de los monómeros de (+) catequina y (-) epicatequina y que en hidrólisis ácida generan moléculas de cianidinas y a las prodelfinidinas aquéllas derivadas de la galocatequina y epigalocatequina, que al hidrolizarse producen delfinidinas en medio ácido (Romero 2008).

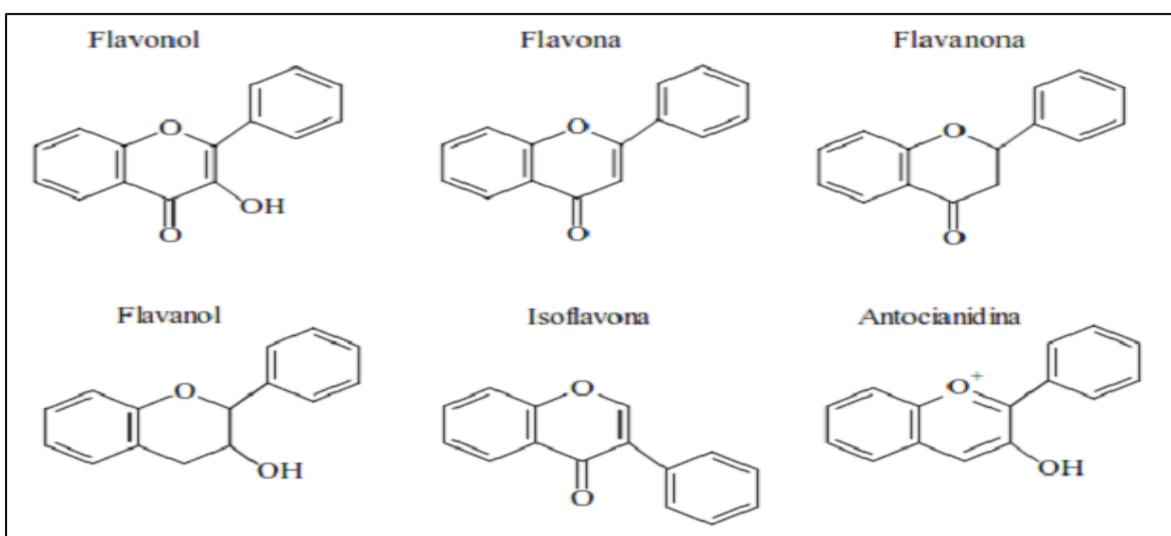


Figura 7: Estructuras mayoritarias de flavonoides

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

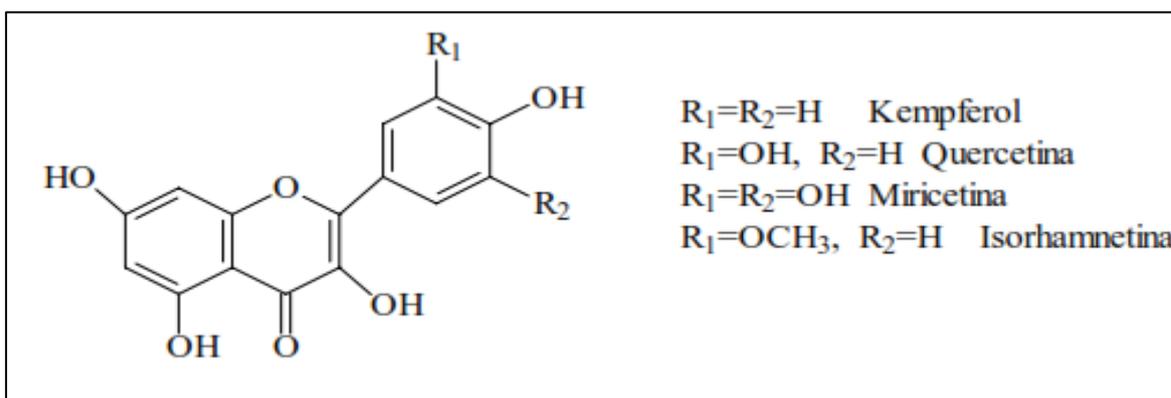


Figura 8: Estructura general de los flavonoles

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

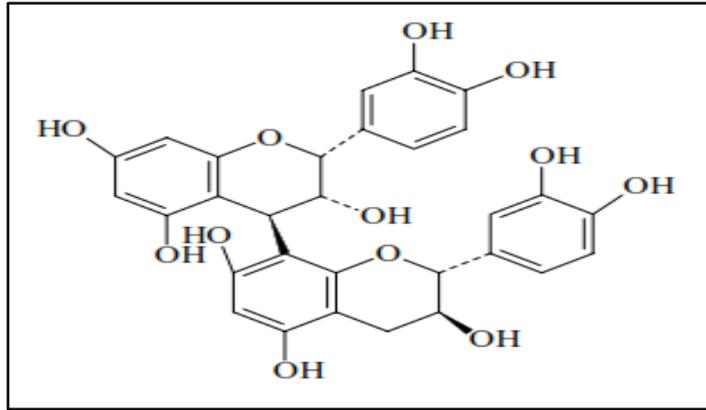


Figura 9: Estructura de la procianidina B₁

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

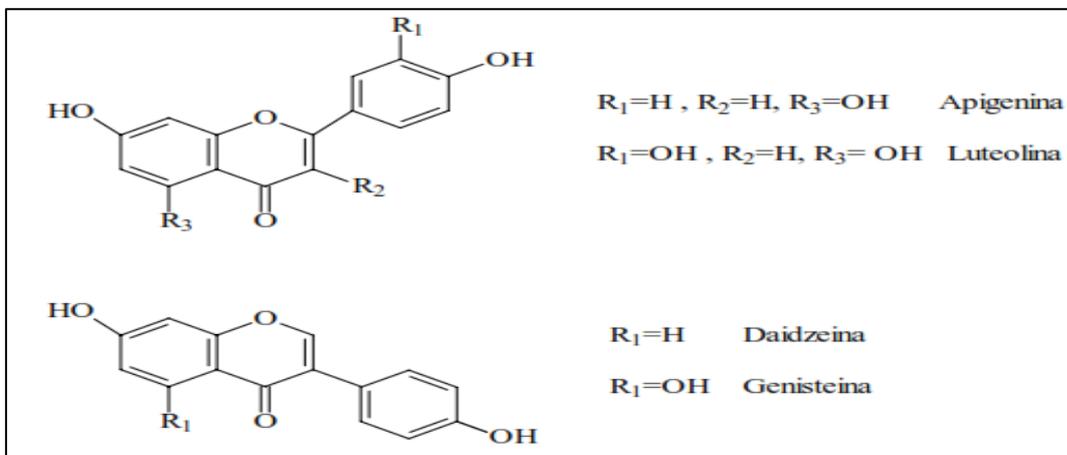


Figura 10: Estructura general de las flavonas

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

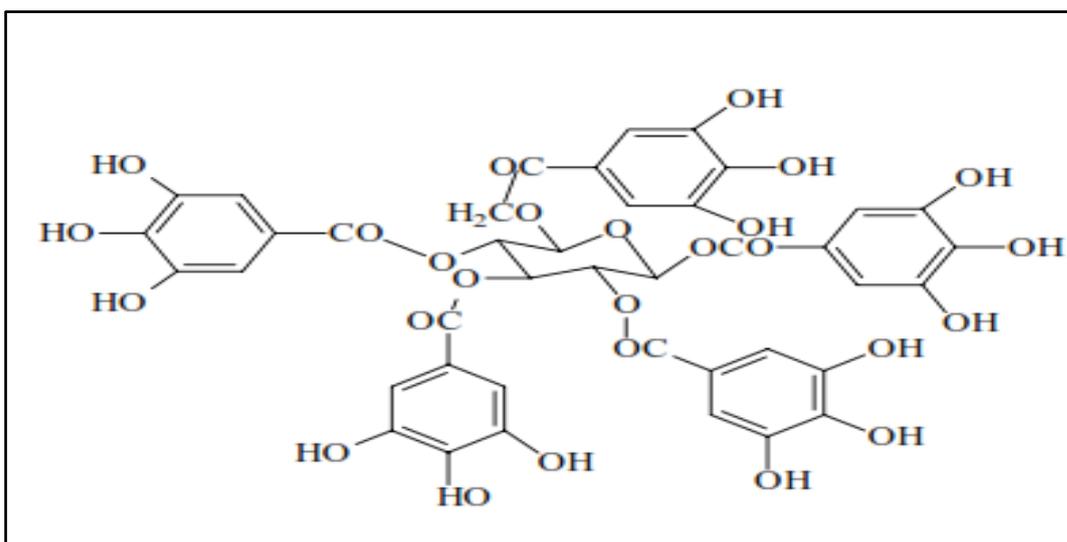


Figura 11: Ejemplo de estructura representativa de taninos hidrolizables

FUENTE: Tomado de Piñerio 2005.

2.3.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles presentan una gran importancia por su acción de prevención contra las enfermedades, por lo cual definir sobre aquellos factores que influyen en su distribución y contenido en los productos vegetales y alimentos derivados de ellos, es esencial.

Entre uno de estos factores están los intrínsecos, es decir propios al vegetal, que lleva a que su composición no sólo sea diferente entre distintos géneros o especies, sino incluso entre variedades de un mismo producto. Un ejemplo de ello lo podemos encontrar dentro del grupo de las hortalizas, específicamente el de la lechuga, en cuyas variedades Romana e Iceberg existe un pobre contenido en sustancias fenólicas antioxidantes (flavonoles y derivados de ácido cafeico), al contrario de lo que ocurre en variedades como hoja de roble y, sobre todo, del Lollo Rosto (Tómas-Barberán 2003). En el grupo de las frutas podemos mencionar a las manzanas, cuyo contenido en sustancias fenólicas (antocianinas, flavonoles y procianidinas) varía considerablemente dependiendo de la variedad. Esta diferencia puede incrementarse aún más en función de los contenidos y actividad de la enzimas oxidativas presentes en distintas variedades que pueden actuar sobre las sustancias fenólicas y en muchos casos ser responsables de la pérdida de calidad organoléptica y nutricional de alimentos y derivados (Tómas-Barberán 2003).

A la hora de introducir cambios que afectan a la composición química del vegetal hay, sin embargo, que tener en cuenta que un aumento excesivo en el contenido de alguna de estas sustancias no siempre es deseable, ya que al tratarse de sustancias bioactivas, podría llevar a producir efectos tóxicos. De sobra son conocidos los diferentes efectos tóxicos de determinadas sustancias fitoquímicas, como los que puede plantear el consumo excesivo de flavonoides como quercitina, que presenta actividad mutagénica, prooxidante al generar radicales libres, e inhibidora de enzimas claves del metabolismo hormonal (Tomás-Barberán 2003). También la composición en polifenoles va a estar influida por factores extrínsecos al vegetal, ligados a las circunstancias de su cultivo (factores agroambientales) y a las condiciones de conservación tras la recolección. Así se ha demostrado, que la presencia o ausencia de determinados nutrientes en el suelo y el exceso o déficit de riego pueden afectar a la composición fitoquímica de las frutas y hortalizas, tanto cualitativamente como cuantitativamente. Se sabe que el calcio, el boro y el contenido en sustancias fenólicas antioxidantes puede influir sobre su degradación por enzimas

oxidativas (polifenoloxidasas) durante su posterior manipulación, conservación o procesado (Tomas-Barberán 2003).

El grado de madurez de las diferentes frutas y hortalizas es otro factor que también influye de forma relevante sobre la composición de los fitoquímicos, sin que exista un patrón de comportamiento general para todos los productos. Igualmente, el grado de iluminación e irradiación de las plantas y la temperatura de cultivo ejercen también una influencia importante sobre el contenido en estas sustancias. Por ejemplo, se ha visto que la concentración de antocianinas en las manzanas, granadas y la mayoría de las frutas pigmentadas con estas sustancias fenólicas es notablemente superior en aquellos frutos que han crecido en zonas con temperaturas nocturnas más bajas, igualmente una mayor tasa de insolación favorece la acumulación de antocianinas en el producto. El grado de irradiación con luz ultra violeta (UV) puede también afectar el contenido de resveratrol en las uvas y de cumarinas en los frutos cítricos (Tómas-Barberán 2003).

Además de estos factores de tipo agronómico, se pueden producir cambios considerables en estos constituyentes durante la conservación tras la recolección. La conservación se lleva a cabo generalmente a bajas temperaturas, a las cuales suelen inducirse las enzimas responsables de la biosíntesis de algunas sustancias fitoquímicas, sobre todo las de naturaleza fenólica. Por esta razón, durante la conservación de determinadas frutas y hortalizas, se puede producir en algunos casos un aumento en los cambios de determinados constituyentes de interés para la salud. A veces, la conservación se lleva a cabo en condiciones específicas para disminuir la respiración y consecuentemente la actividad fisiológica del vegetal, lo que permite retrasar su maduración y su deterioro (Tomas-Barberan 2003).

Finalmente, los compuestos fenólicos a menudo se encuentran coloreados debido a su facilidad de oxidarse, lo cual depende de su grado de exposición a la luz, al aire y a la presencia de impurezas metálicas, siendo esta compleja y determinada por su propia estructura. La mayoría de ellos dan lugar a derivados del tipo difenilo o a quinonas que son los responsables del color (Camacho citado por Necochea 2012).

2.3.3. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Según Sánchez y Paniagua (2008) se han desarrollado un gran número de técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. Tradicionalmente se han determinado mediante métodos colorimétricos ya que estos compuestos son capaces de sufrir una gran variedad de reacciones que se pueden utilizar para su detección espectrofotométrica.

Las reacciones más comunes son las de copulación o condensación que generan especies intensamente coloreadas que son fácilmente analizables por espectrofotometría, siendo uno de los métodos más empleados el desarrollado por Folin y Ciocalteu, para la determinación de fenoles totales, el cual se fundamenta en su carácter reductor. En este método se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}); y la absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm .

Sin embargo los fenoles con sustituyentes en la posición para-, no se pueden determinar por estos métodos, por tener desactivada la posición más activa tanto para las reacciones de condensación como de copulación. Por otra parte, se trata de una técnica con baja especificidad, ya que la reacción de color tiene lugar con cualquier grupo hidroxilo oxidable y además se determina la cantidad total de fenoles sin distinguir entre ellos (Sánchez y Paniagua 2008). La necesidad de identificación individual de los compuestos fenólicos en distintas muestras requiere el uso de las técnicas tradicionales de separación, como cromatografía de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) y electroforesis capilar (EC). HPLC es la técnica analítica más utilizada para la caracterización de compuestos fenólicos. Los sistemas de detección más empleados en HPLC son espectrofotometría UV-visible con fotodiodos en serie, espectrometría de masas y detección electroquímica (Sánchez y Paniagua 2008).

En el Cuadro 6 se describen algunas de las publicaciones de los últimos 3 años en el campo de la determinación de compuestos fenólicos en distintas matrices, indicándose en cada caso el pre-tratamiento utilizado, los compuestos determinados y las muestras analizadas.

Cuadro 6: Métodos cromatográficos para la determinación de compuestos fenólicos

MÉTODO	DETECTOR	PRETRATAMIENTO	COMPUESTOS/M UESTRAS	LÍMITE DE DETECCIÓN	REF.
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción con ultrasonido	Ácidos fenólicos en fresas	2 µg/mL	Herrera y Luque, 2005
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción en membrana líquida sobre fibra hueca	Nitrofenoles en agua	6-8 mg/L	Berhanu y col., 2006
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	-----	Ácidos fenólicos en aceite de oliva	52-160 mg/g	Jiménez y col., 2007
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción de disolvente	Ácidos fenólicos y flavonoides en zumo de fruta	5-30 mg/mL	Abad-García y col., 2007
HPLC	Espectrometría de masas	Extracción en fase sólida	Ácidos fenólicos en lipoproteínas de baja densidad	0,32-0,89 mg/mL	Torre-Carbot y col., 2007
HPLC	Espectrometría de masas	Extracción en fase sólida	Fenoles simples y benzofenonas en leche materna	1 mg/mL	Ye y col., 2006

FUENTE: Tomado de Sánchez y Paniagua 2008.

2.4. ANTIOXIDANTES

Se dice que los alimentos tienen propiedades antioxidantes cuando son capaces de neutralizar la acción oxidante de una entidad molecular inestable, los radicales libres, sin perder su propia estabilidad electroquímica. Los radicales libres son productos naturales intermediarios del metabolismo que dentro de la homeostasis metabólica normal son regulados por la acción de una serie de enzimas y vitaminas como la SOD-superóxido dismutasa y la GPX glutatión peroxidasa, aparte del efecto de algunas vitaminas (C y E) y oligoelementos, como el zinc y el selenio. Al radical libre producto de estrés de diferentes tipos, condiciones anormales de radiación, etc., se les atribuye ser causantes de los procesos de envejecimiento y de varias otras enfermedades. (Starke y Reed 2003). Los antioxidantes, por lo tanto, son un grupo amplio de compuestos: vitaminas, compuestos fenólicos, minerales, colorantes naturales y enzimas.

Según Díaz (2007) un antioxidante (AO), se define como cualquier sustancia ya sea de origen natural o sintético, que cuando está en baja concentración en relación con un sustrato oxidable, inhibe o previene la oxidación de este sustrato.

Según Velioglu *et al.*, citado por Sánchez (2010) los antioxidantes son compuestos que inhibe o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación; y estos pueden clasificarse en naturales o sintéticos, estando estos últimos en desuso debido a estudios que les atribuyen efectos carcinógenos. Este hecho ha despertado un creciente interés en el estudio de los antioxidantes naturales entre los que se encuentran distintos compuestos fenólicos.

Los antioxidantes de origen natural son aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y aquellos que se forman durante el cocinado o el procesado de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal (Pokorny 2001).

Se ha acumulado información sobre la capacidad de algunos componentes de alimentos (frutas) para disminuir o prevenir los procesos de oxidación celular como: guanábana, uva, chirimoya, guayaba, semilla del marañón, carambola, plátano verde, noni, ciruela, granadilla, mango, papaya, mamey, naranja, limón, maracuyá, zapote, níspero, jagua, entre otros (Castañeda *et al.* citado por Sánchez 2010).

Según Pratt (1992) para que un compuesto sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas: la primera es que cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar o prevenir la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores.

Entre los antioxidantes por excelencia encontramos al β -caroteno, la vitamina C, la vitamina E, y el selenio (Starke y Reed 2003). Siendo la vitamina E un antioxidante importante en el organismo que actúa en la fase lipídica de las membranas en todas las células.

La capacidad antioxidante varía en función del grupo de compuestos estudiados y su solubilidad en fase acuosa o lipídica está fuertemente condicionada por el sistema usado como sustrato, las condiciones de catálisis de la oxidación, las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Porkony, citado por Sánchez 2010).

2.4.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La función antioxidante que presentan estos compuestos en los alimentos ha atraído la atención gracias al papel que juegan en la dieta en cuanto a la prevención de enfermedades; los antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, etc. En muchos estudios sobre especies se ha aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos, lo cual los coloca en la categoría de los antioxidantes más interesantes y promisorios, ejemplo: los flavonoides. Son sustancias importantes en el área de la farmacología, principalmente, por su capacidad de contrarrestar la formación de radicales, cuya influencia se ve reflejada en las propiedades antialérgicas, antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias, etc. que poseen (Díaz 2007).

Según Decker, citado por Sánchez (2010) los compuestos fenólicos son capaces de actuar como antioxidantes, ya que son capaces de suprimir la formación de inicio de las especies radicales por inhibición de las enzimas o quelante de iones metálicos (hierro y cobre) que participan en el inicio del libre radical en el proceso de producción.

Existe una correlación entre el contenido de fenólicos totales y la capacidad de captura de radicales libres. Los polifenoles son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides (Paladino, citado por Sánchez 2010). Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilo y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el des-apareamiento de electrones por desplazamiento de electrones del sistema de electrones- π (Kuskoski *et al.*, citado por Sánchez 2010).

La capacidad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular (Velioglu *et al.*, citado por Sánchez 2010).

Según Sánchez (2010) el comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar también relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también puede promover reacciones de oxidación *in vitro*.

Entre los compuestos fenólicos con una reconocida capacidad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (principalmente hidroxicinámico, hidroxibenzoico, caféico, clorogénico), taninos (elligataninos), calconas y cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos (Pratt 1992).

2.4.2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los métodos para evaluar la capacidad antioxidante (CAOX) pueden ser *in vitro* o *in vivo* (Kuskoski *et al.*, citado por Sánchez 2010). Se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante en alimentos. Se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un compuesto antioxidante. La inhibición es proporcional a la actividad antioxidante de dicho compuesto. Otros ensayos se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo (Morel *et al.* 1993; Pineda *et al.*, citado por Marfil 2008).

Kuskoski *et al.* (2005) citado por Sánchez (2010) menciona que una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la capacidad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; donde la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración.

Lo ideal sería medir la capacidad antioxidante de cada componente de la muestra a analizar, sin embargo, es difícil determinar su número y concentración. Los métodos propuestos determinan la actividad global o total de todos los compuestos antioxidantes (conocidos o no) presentes en la muestra (Ivekovic *et al.* 2005).

Básicamente, existen dos tipos de reacciones en las que se basan los principales métodos *in vitro* propuestos para la determinación de la capacidad antioxidante, como son la transferencia de átomos de hidrógeno, métodos ORAC (Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno) y TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) y la transferencia individual de electrón, métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)} y FRAP (Capacidad de Reducción Férrica del Plasma). Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción (Frankel y Meyer; Pérez *et al.*; Schwarz *et al.*; Wang *et al.*, citado por Marfil 2008). La mayoría de estos métodos no emplean especies radicales con significado biológico. Son radicales ajenos al organismo, como el DPPH• o el ABTS⁺. El empleo de radicales peroxilo en ensayos como TRAP le añade un mayor significado biológico, ya que estas ERO son las importantes a nivel fisiológico (Antolovich *et al.* 2002).

La mayor parte de los métodos de medida de la actividad antioxidante miden solamente compuestos solubles en agua debido a la naturaleza hidrofílica de las especies reactivas y de los sustratos oxidables que emplean. Algunos ensayos pueden adaptarse para medir antioxidantes lipofílicos: ORAC (Aldini *et al.* 2001; Prior *et al.* 2003), ABTS (Alcolea *et al.* 2002) y el ensayo TRAP (Gorinstein *et al.*, citado por Marfil 2008).

Los resultados obtenidos se expresan en forma de índices o valores equivalentes. Así, en el caso de los métodos ABTS, DPPH y FRAP, se suele emplear el valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox), que en aceites vegetales comestibles se expresa usualmente en mmol Trolox/Kg de aceite (Pellegrini *et al.* 2001). El Trolox es un análogo

hidrosoluble de la vitamina E, que se utiliza como estándar antioxidante y es ampliamente usado por ser soluble en fases acuosas y lipídicas. Los métodos de determinación de actividad antioxidante basados en la captura de radicales libres son muy variados por pueden ser clasificados de acuerdo a la estrategia de detección y cuantificación empleada (Villano, citado por Marfil 2008) (ver Cuadro 7).

Entre los métodos más aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante están el ABTS y DPPH (Arnao citado por Sánchez 2010). A continuación se describen estos principales métodos aplicados para medir la capacidad antioxidante en aceites vegetales comestibles.

Cuadro 7: Principales métodos de la determinación de captura de radicales libres

	MÉTODO	FUNDAMENTO	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
Captura de radicales superóxido	Ensayo de Hipoxantina/Xantina Oxidasa	El superóxido generado enzimáticamente reacciona con el azul de tetrazolio, se absorbe a 560nm	Inhibición de la formación de azul de formación y de A ₅₆₀
Captura de radicales peroxilo	TRAP	Producción de peroxilos por descomposición térmica de AAPH, con consumo de oxígeno.	Medida de la fase de retardo en el consumo de oxígeno
	Modificaciones del TRAP ORAC	Los radicales peroxilo oxidan a una proteína produciendo fluorescencia. Los radicales peroxilo oxidan a la ficoeritrina o fluoresceína y disminuye su fluorescencia.	Medida de la fase de retardo en la aparición de la fluorescencia. Mantenimiento de la fluorescencia (AUC)
Captura de radicales hidroxilo	Ensayo de la Desoxirribosa	Generación de OH por la reacción de Fenton, que ataca a la desoxirribosa. Determinación de los productos por el ensayo TBARS	Inhibición de la oxidación de la desoxirribosa.
Captura de radicales peroxinitrito	Método de la Dihidrorrodamina	Los peroxinitritos oxidan la dihidrorrodamina 123 y pierde su fluorescencia	Mantenimiento de la fluorescencia.
Poder reductor	FRAD ⁷	Formación de un complejo Fe ³⁺ - TPTZ	Reducción del complejo Fe ³⁺ a Fe ²⁺ y aumento de la absorbancia a 593 nm.
Captura de radicales sintéticos	Método ABTS Método DPPH Método DMPD	Radicales coloreados con máximo de absorbancia a 414, 515, 505nm	Disminución de la absorbancia.

Fuente: Tomado de Marfil 2008.

a. Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)}

El fundamento de este método consiste en generar el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ver Figura 12) y comprobar cómo los antioxidantes son capaces de atrapar este radical (Miller *et al.* 1993). El radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es un compuesto de color verde-azulado, con espectro de absorción en el intervalo de ultravioleta-visible, que presenta máximos a 414, 645, 734 y 815 nm. Se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable, al añadir la muestra la concentración del radical disminuye y el color de la reacción desciende a medida que lo hace la concentración del radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$, midiéndose entonces el descenso de absorbancia producido (Marfil 2008).

Según Marfil (2008) existen diversas formas de generar el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$:

- Enzimáticamente (mioglobina, peroxidasa de rábano).
- Químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).
- Electroquímicamente.

En un principio, se utilizó el sistema peroxidasa/mioglobina/ H_2O_2 como sustrato de oxidación para estudiar la capacidad antioxidante total del plasma y fluidos biológicos (Rice-Evans *et al.*; Frankel *et al.*, citado por Marfil 2008); posteriormente, este método ha sido ampliamente aplicado en vinos, té, zumo (Gil *et al.* 2000), tomate (Martínez-Valverde *et al.*, citado por Marfil 2008) y en aceite de oliva (Gorinstein *et al.* 2003). Presenta varios inconvenientes, como son la necesidad de un estricto control de la temperatura de reacción entre el radical y antioxidante (37 °C), interferencias con sustancias con actividad peroxidasa y posible sobreestimación de los resultados (Marfil 2008).

También el radical catiónico se puede generar enzimáticamente empleando el sistema $\text{ABTS}/\text{H}_2\text{O}_2$ /peroxidasa de rábano, el cual es un método fácil y rápido que no presenta los inconvenientes del método anterior (Villaño *et al.*, citado por Marfil 2008).

Con el dióxido de manganeso el radical se forma haciendo pasar el ABTS a través de un filtro de dióxido de manganeso formándose el radical instantáneamente, pero el proceso es muy inestable a temperatura ambiente (Benavente-García *et al.*, citado por Marfil 2008).

En la oxidación con radicales peroxilo el sustrato se incubaba con un compuesto con estructura “azo”. Es un método muy inestable y requiere elevadas temperaturas para la generación del radical (Kim *et al.*, citado por Marfil 2008).

La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante un tiempo comprendido entre 12 y 16 horas. El ABTS y el persulfato reaccionan estequiométricamente en una relación 1:0,5 por lo que el ABTS no es oxidado completamente. Una vez generado el radical, la medida se realiza como un ensayo de post-adición y se determina la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical (decoloración). Se ha aplicado por ejemplo, en la determinación de la capacidad antioxidante en té, frutas y verduras (Van-Nederkassel *et al.*; Proteggente *et al.*, citado por Marfil 2008) y aceite de oliva virgen (Samaniego *et al.* 2007). Las Figuras 13 y 14 esquematizan el fundamento del método ABTS generando el radical con persulfato potásico.

En el método electroquímico el radical se genera tras oxidación del ABTS con una corriente eléctrica. Presenta ciertas ventajas como es de ser proceso fácil y rápido de realizar y que no requiere otros reactivos ni control de la temperatura, por ejemplo se ha aplicado a vinos tintos y blancos y en té (Alonso *et al.*; Ivekovic *et al.*, citado por Marfil 2008).

El método más utilizado es con persulfato potásico (Proteggente *et al.* 2002; Prior *et al.* 2005; Van-Nederkassel *et al.* 2005; Samaniego *et al.* 2007, citado por Marfil 2008) donde el método ABTS.+ además de su elevada reproducibilidad, presente las siguientes ventajas:

- El radical ABTS^{•+} que es generado químicamente, presenta bastante estabilidad y es una alternativa mucho más viable económicamente.
- El radical reacciona rápidamente con los compuestos antioxidantes presentes en la muestra problema, normalmente en unos 30 minutos.

- Puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso.
- Se puede usar en un amplio rango de pH y puede emplearse para estudiar el efecto del pH sobre el mecanismo de acción de los distintos compuestos antioxidantes.

Presenta sin embargo, una serie de inconvenientes:

- El ABTS.+ es un radical artificial que no se encuentra en nuestro organismo.
- Termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el ABTS (0,68 V), como ocurre con algunos compuestos fenólicos.
- El punto final de la reacción varía en función de la sustancia antioxidante.

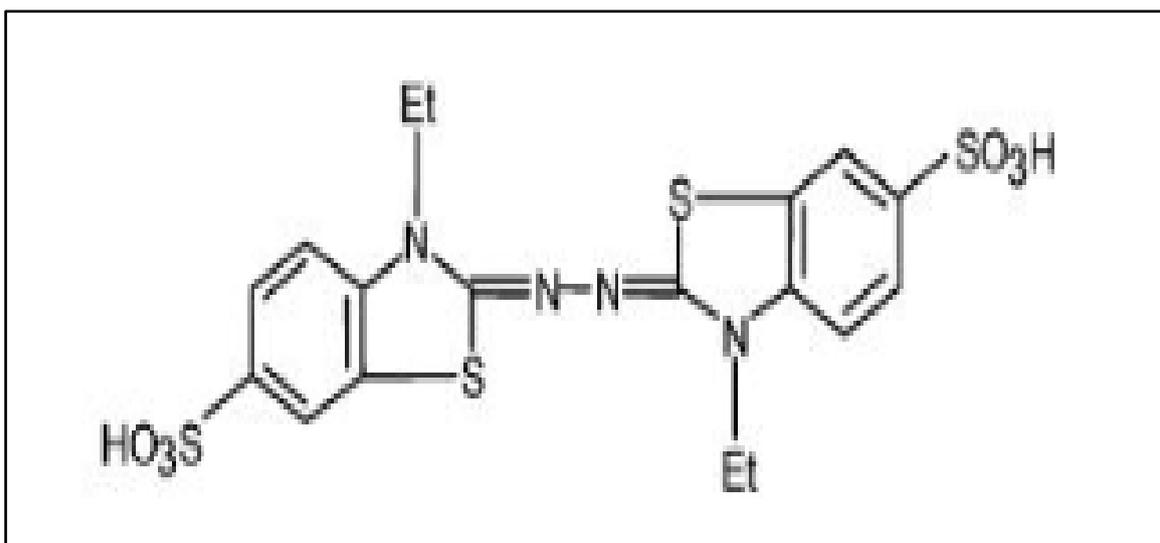


Figura 12. Estructura del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).

FUENTE: Tomado de Prior *et al.* 2005.

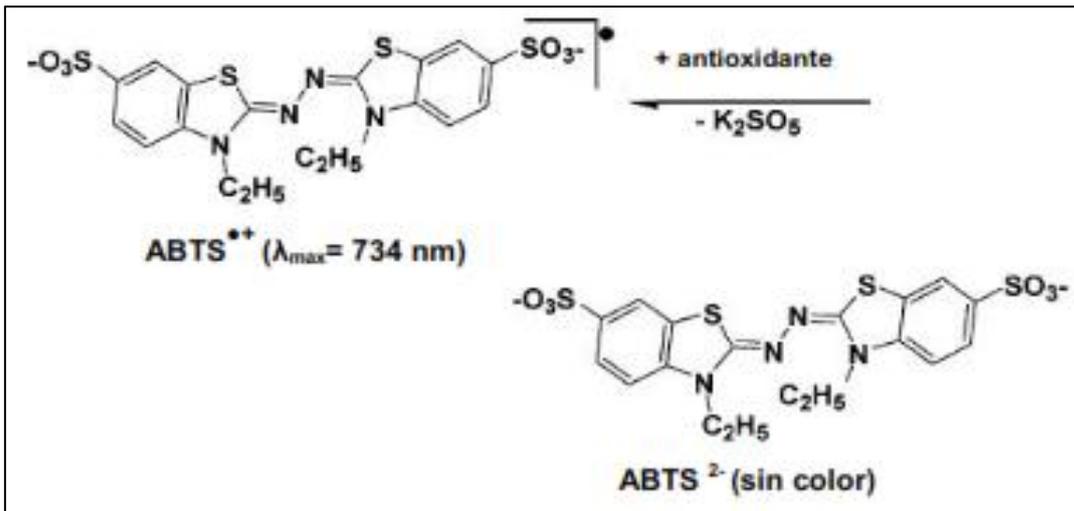


Figura 13. Estructura química de la reacción entre ABTS y persulfato potásico
FUENTE: Tomado de Marfil 2008.

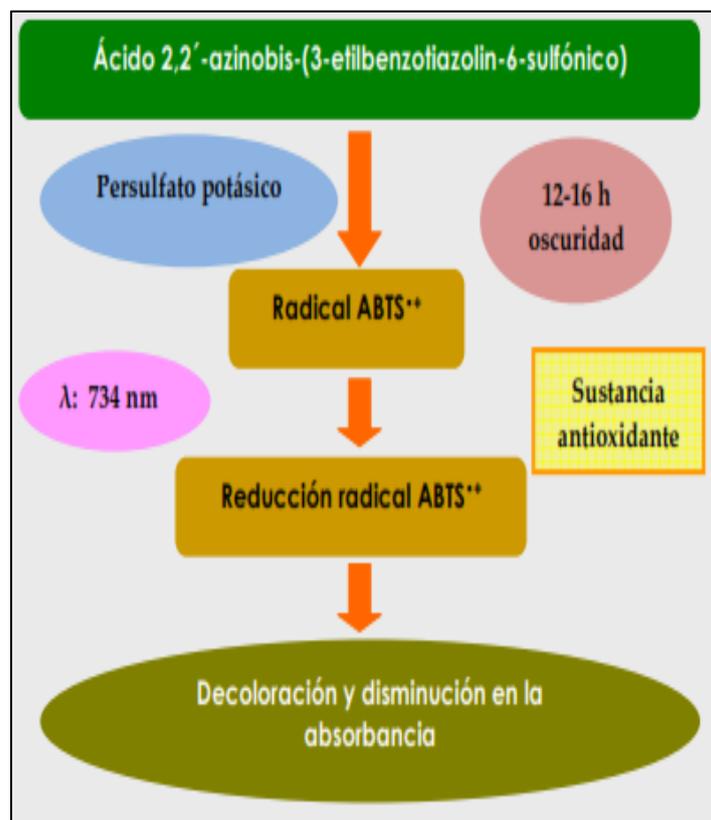


Figura 14: Esquema de la reacción producida en el método ABTS.
FUENTE: Tomado de Marfil 2008.

b. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El fundamento de este método consiste en determinar la capacidad de los antioxidantes de la muestra para capturar el radical libre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y reducirlo (ver Figuras 15 y 16). El radical, que muestra un intenso color púrpura, es estable y está disponible comercialmente, lo que reduce el tiempo de análisis al no tener que ser generado antes del ensayo como ocurre con el método ABTS, evitando paralelamente cierta variabilidad en los resultados obtenidos. La decoloración del radical se determina a 520 nm y la cuantificación se realiza empleando disoluciones patrón de ácido ascórbico o de Trolox (ver Figura 17) (Brand-Williams *et al.* 1995). En algunos casos, la interpretación resulta complicada, ya que ciertos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH, por ejemplo los carotenoides (Prior *et al.* 2005) por lo que este ensayo tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran (Tobar 2013):

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH• es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH•.
- La reacción de DPPH• con eugenol fue reversible (Vondet *et al.* 1997), lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

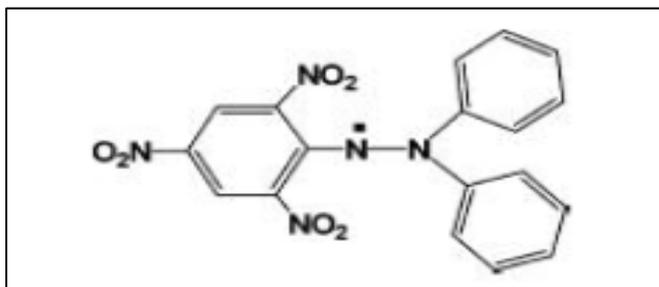


Figura 15: Estructura del DPPH

FUENTE: Tomado de Prior *et al.* 2005.

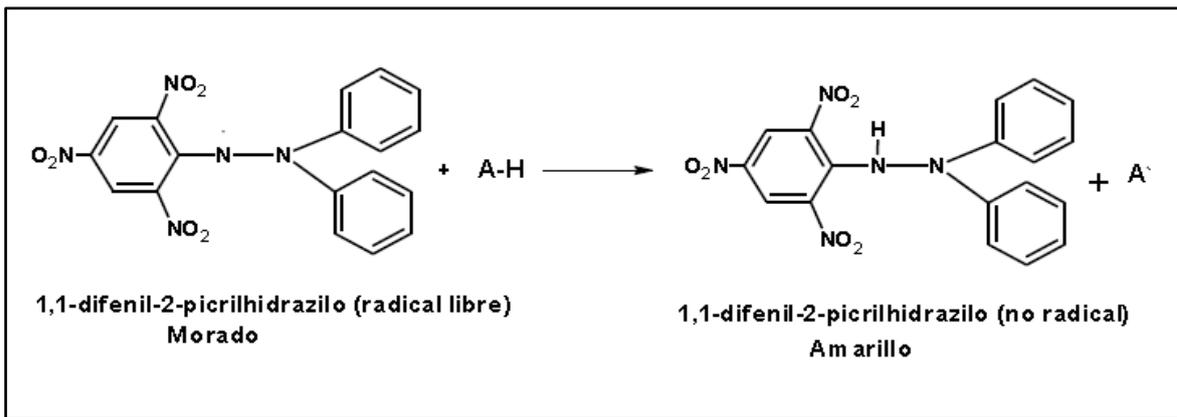


Figura 16: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

FUENTE: Tomado de Tobar 2013.

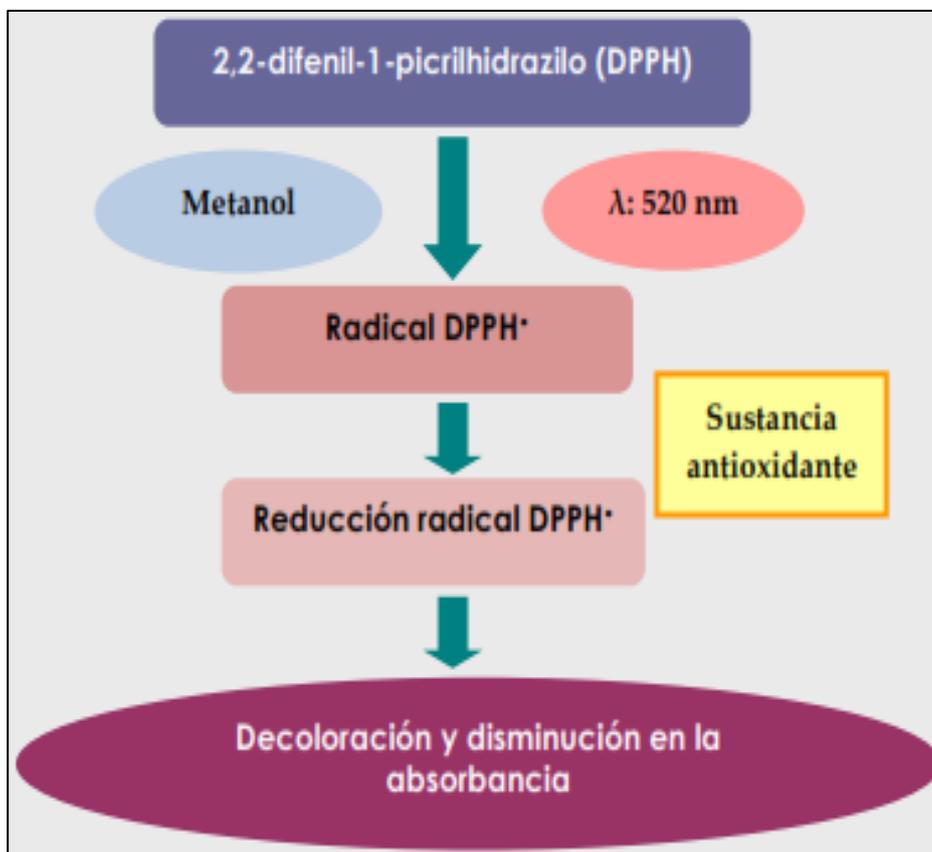


Figura 17: Esquema de la reacción producida en el ensayo DPPH

FUENTE: Tomado de Marfil 2008.

2.5. APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES

Las técnicas más utilizadas a nivel industrial de extracción de aceites de semillas son las que aplican solventes orgánicos, principalmente hexano, y el prensado. El primero es el más eficiente, sin embargo, los solventes orgánicos utilizados son tóxicos e inflamables, es de alto costo energético y la desolventización daña la calidad de la harina residual. Para preservar la calidad de los principios bioactivos del aceite y la harina residual, tales como ácidos grasos polinsaturados y antioxidantes, es conveniente una técnica de extracción suave como el prensado en frío, sin embargo este último presenta bajos rendimientos (Norris 1982; Hoffmann 1989).

Según Collao *et al.* (2007) el tratamiento con enzimas que hidroliza los envoltorios celulares de la semilla causaría menor resistencia al prensado, facilitándose la liberación del aceite desde las vacuolas intracelulares, esto ha sido demostrado en procesos de extracción por prensado en frío de aceite de: avellana chilena (Santamaría *et al.* 2003; Zúñiga *et al.* 2003), rosa mosqueta (Chamy *et al.* 2001; Concha *et al.* 2003), semilla de uva (Guerra *et al.* 2003) y borraja (Soto *et al.* 2004) mejorándose en todos estos casos el aceite extraído. En estos estudios, los autores concuerdan que el éxito de la aplicación de enzimas, en el proceso extractivo, depende de cada materia prima (Soto *et al.* 2004; Zúñiga *et al.* 2003).

A parte de obtener mejoras en el rendimiento, el tratamiento enzimático ha demostrado mejorar la calidad de los aceites, siendo citado por Sineiro *et al.* (1998) quién también menciona un aumento del contenido de polifenoles en el aceite de oliva tratado enzimáticamente. Resultados parecidos fueron obtenidos por Iconomou *et al.* (2010) que tras la adición de enzimas a la pasta de aceituna durante el proceso, incremento en el aceite de oliva, el contenido total de fenoles y orto-difenoles, así como algunos compuestos fenólicos sencillos (3,4-DHPEA, p-HPEA) y derivados secoiridoides (3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA) y además mejoró su actividad oxidativa ; y por Chacón y Waliszewski (2005), mencionando que el efecto positivo de los preparados enzimáticos es atribuido a la capacidad de las enzimas en degradar los componentes de la pared celular del olivo, facilitando y mejorando la extracción de los compuestos fenólicos. Por otro lado Anwar *et al.* (2013), también encontró una mayor actividad antioxidante, fenoles totales y contenido de ácidos fenólicos individuales en el aceite de linaza obtenido por prensado en frío y

tratado enzimáticamente, al igual que Farah *et al.* (2013), que obtuvo un aumento de polifenoles totales en el aceite de cebolla extraídos por asistencia enzimática debido probablemente a la degradación hidrolítica de los polisacáridos de la pared celular, los cuales retienen a los fenoles en la red de lignina por uniones hidrófilas o hidrófobas al polisacárido; por lo que de acuerdo a estas investigaciones el tratamiento enzimático no solo ayuda a aumentar el rendimiento en la extracción del aceite , sino que también podría verse un aumento de los polifenoles con capacidad antioxidante en los aceites de frutos y semillas oleaginosas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en las siguientes instalaciones:

- Planta Piloto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Laboratorio de Análisis Químico de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Laboratorio de Investigación y Desarrollo- Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.2. MATERIA PRIMA

Se emplearon los aceites crudos de las semillas de uva variedad “Borgoña” (*Vitis vinífera*) procedentes del proyecto de investigación “*Aprovechamiento de residuos del procesamiento de frutas: uva (Vitis vinífera) y maracuyá (Passiflora edulis)*” obtenido por prensado hidráulico sin tratamiento y con tratamiento enzimático usando la enzima Celulasa derivado del *Aspergillus Niger* de Sigma®.

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. MATERIALES

- Baguetas
- Beakers de 10, 50, y 100 mL.
- Capsula de porcelana
- Cubetas de cuarzo y de plástico de 10 mm de espesor para espectrofotómetro.
- Desecador.
- Etiquetas.
- Fiolas de 5, 10, 25, 50 , 100, 250, 500 mL

- Jeringa desechable con aguja RYMCO®.
- Gradillas.
- Matraces 50, 100, 250 y 500 mL.
- Micropipeta *transferpette*- 100-1000 uL, tipo digital con tips.
- Micropipeta *transferpette*- 20-200 uL, tipo digital con tips.
- Membrana de PVDF (filtro para jeringa) 0,45 µm.
- Papel tissue.
- Pera de decantación de 100 mL
- Pipetas de 1, 5, y 10 mL.
- Piceta
- Probetas de 10, 50, 100 mL
- Pomos de vidrio ámbar de 5 y 20 mL.
- Termómetro.
- Tubos falcon de 15 mL.
- Tubos de ensayo
- Soporte universal
- Viales de HPLC.

3.3.2. EQUIPOS

- Agitador de tubos Vortex- marca Mixer Wizard & Classic Velp Scientifica®.
- Agitador magnético marca- Ceramic midi Polimax 2010 Ika®.
- Balanza analítica marca AND FR – 300 MK II®. Capacidad de 310g, 110 v.
- Balanza Analítica- marca Sartorius CP124S®.
- Balanza electrónica de precisión- marca Ohaus Scout II®.
- Campana de extracción de humos.
- Centrifuga –marca Labo Fuge 400R Heraeus®. Velocidad Max. 4000 rpm. 220 v y 70 watt.
- Centrifuga- marca CHRISSU 500 – 145. Velocidad Max. 4000 rpm 220v, y 70 watt.
- Computadora.
- Cromatógrafo de líquidos de alta performance- marca Hitachi-Elite Lachrom® con detector de arreglo de diodos L-2455.

- Estufa - marca BRE – M ELECTRIC SATABIL – TERM®.
- Espectrofotómetro marca PERKIN –ELMER MODEL 3®. OA/100%T, 110V.
- Refrigerador /Congelador -marca General Electric®.

3.3.3. REACTIVOS

- Alcohol etílico 95 por ciento.
- ABTS 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) *diammonium salt* 98 por ciento, marca Sigma®.
- Ácido acético (C₂H₄O₂), marca *JT Barker*®.
- Ácido gálico estándar, marca *JT Barker*®.
- Acetonitrilo, marca *Merck*®.
- Agua Destilada.
- Agua Milli-Q.
- Carbonato de Sodio (Na₂CO₃) anhídrido, marca *JT Baker*.
- Cloroformo, marca *Merck*®.
- DPPH 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. marca Sigma®.
- Etanol al 80 por ciento, marca *Merck*®.
- Fenoltaleína.
- Folin Ciocalteu 2N, marca *Merck*®.
- Hidroxido de Sodio (NaOH) 0.1N, marca *Merck*®.
- Persulfato de potasio (K₂S₂O₈), marca *Sigma*®.
- Metanol, marca *Merck*®.
- n-Hexano, marca *Merck*®.
- Solución de almidón al 1 por ciento.
- Tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) 0.1 N.
- Trolox (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid), marca *Sigma*®.
- Yoduro de potasio (KI).
- Ácidos hidroxicinámicos: Ácido cafeico (3,4-dihidrocínámico) y ácido cinámico, marca *Sigma Aldrich*®.
- Ácidos hidroxibenzoicos: Ácido gálicos, marca *Sigma Aldrich*®.
- Flavonoides: Luteolina y Hesperidina, marca *Sigma Aldrich*®.

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Para los análisis de los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático se utilizaron los siguientes análisis evaluándose por triplicado:

- Humedad y materia volátil: Se empleó AOAC -2007, parte 926.12.
- Porcentaje de acidez: Se empleó el método AOAC -2007, parte 940.28.
- Índice de peróxido: Se empleó el método AOAC -2007, parte 965.33.

3.4.2 ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

a. Perfil de compuestos fenólicos libres y flavonoides por cromatografía HPLC y detección en la región ultravioleta.

Se usó la metodología empleada por Navas (2010) con algunas modificaciones. Para la preparación del extracto a analizar se pesó 2 gramos de aceite con precisión de 0.1g en tubos de centrifuga con tapa. Posteriormente se añadió 5 mL de una mezcla metanol-agua (80:20 v/v) y se agitó durante 1 minuto. La mezcla se llevó a ultrasonidos por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 5000 rpm durante 25 minutos, finalmente se tomó una alícuota del sobrenadante y se filtró con una jeringa de plástico de 5 mL usando una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0,45 µm, el cual fue almacenado en viales ámbar de vidrio bajo refrigeración (-4°C) para su posterior análisis.

En la cuantificación de los biofenoles se utilizó la técnica cromatográfica líquida de alta performance (HPLC), empleando un Cromatógrafo líquido de alta performance Hitachi-Elite con detector ultravioleta-visible de diodos (L-2310). La columna empleada en la separación es una de fase inversa C 18 Purospher RP-18 (250mm x 4,6mm d.i x 0,25 µm). La fase móvil binaria estuvo compuesta de agua al 0,1 por ciento ácido acético (A) y acetotritrilo al 0,1 por ciento ácido acético (B). El gradiente de elusión empleado empieza en 5 por ciento de B y aumenta a 30 por ciento de B por 5 minutos, luego a 50 por ciento de B en 20 minutos, por último termina en 100 por ciento manteniéndose por 8 minutos. El volumen de la muestra inyectada fue de 20 µL y el flujo de 1 mL/min a

una temperatura de 30 °C. Los estándares empleados en este análisis fueron: ácido gálico, ácido cinámico, ácido caféico, luteolina y hesperitina, los cuales fueron disueltos en metanol-agua (80:20 v/v) y se inyectaron directamente, para la determinación de las curvas estándar y su identificación y cuantificación en los aceites analizados. Los espectros de absorción se evaluaron entre 250 y 280 nm durante las corridas cromatográficas, siendo a 280 nm donde se dio la detección y cuantificación de los datos encontrados. La identificación de los compuestos fue hecha por medio de los tiempos de retención relativos con respecto a patrones conocidos y la cuantificación por medio de las ecuaciones de regresión de las respectivas rectas de calibrado (ver Anexo 1). Los resultados de cuantificación fueron expresados en μg del compuestos fenólico estándar /g de muestra.

b. Determinación de los compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó según el método propuesto por Vázquez *et al.* (1973) aplicado en el aceite de oliva virgen y adaptado para la respectiva investigación. La absorbancia se midió a 725 nm, el cual es proporcional a la concentración total de polifenoles y cuyo valor obtenido se reemplazó en una curva estándar (ver Anexo1) considerando al ácido gálico como equivalente químico. Los resultados se expresaron como mg de ac.gálico equivalente (AGE)/Kilogramo de muestra (Kg). El procedimiento para su determinación es detallado en el Anexo 3.

c. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.

Se empleó el método espectro fotométrico basado en el uso del reactivo ABTS, descrito por Samaniego *et al.* (2007) para la determinación de la capacidad antioxidante en el aceite de oliva virgen con algunas modificaciones para esta investigación. La absorbancia se midió a 734 nm, la cual fue reemplazada en una curva estándar (ver Anexo1) considerando al trolox como equivalente químico. Los resultados fueron expresados en mmoles de trolox equivalente (TE) por Kg de muestra. El procedimiento de éste método es detallado en el Anexo 3.

d. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Se siguió como referencia el método descrito por Morales y Jiménez-Pérez (2001), con algunas modificaciones por Delgado-Andrade *et al.* (2005), para la determinación de la capacidad antioxidante en el aceite de argán, el cual es descrito en el Anexo 3. La absorbancia se midió a 520 nm, la cual fue reemplazada en una curva estándar (ver Anexo1) considerando al trolox como equivalente químico. Los resultados fueron expresados como mmoles de trolox equivalente (TE) por kilogramo de muestra (Kg).

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El presente estudio se desarrolló siguiendo las etapas que se describen a continuación:

3.5.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA POR PENSADO HIDRÁULICO SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

Se muestra en las Figuras 18 y 19 el flujo de procesamiento aplicado para la obtención de las muestras de aceite de semilla de uva por extracción convencional (sin enzimas) y por tratamiento enzimático, procedentes del proyecto de investigación “*Aprovechamiento de residuos del procesamiento de frutas: uva (Vitis vinífera) y maracuyá (Passiflora edulis)*” empleados en la determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la presente investigación. Mientras que en el Cuadro 8 se mencionan los parámetros aplicados en el proceso de extracción de los respectivos aceites.

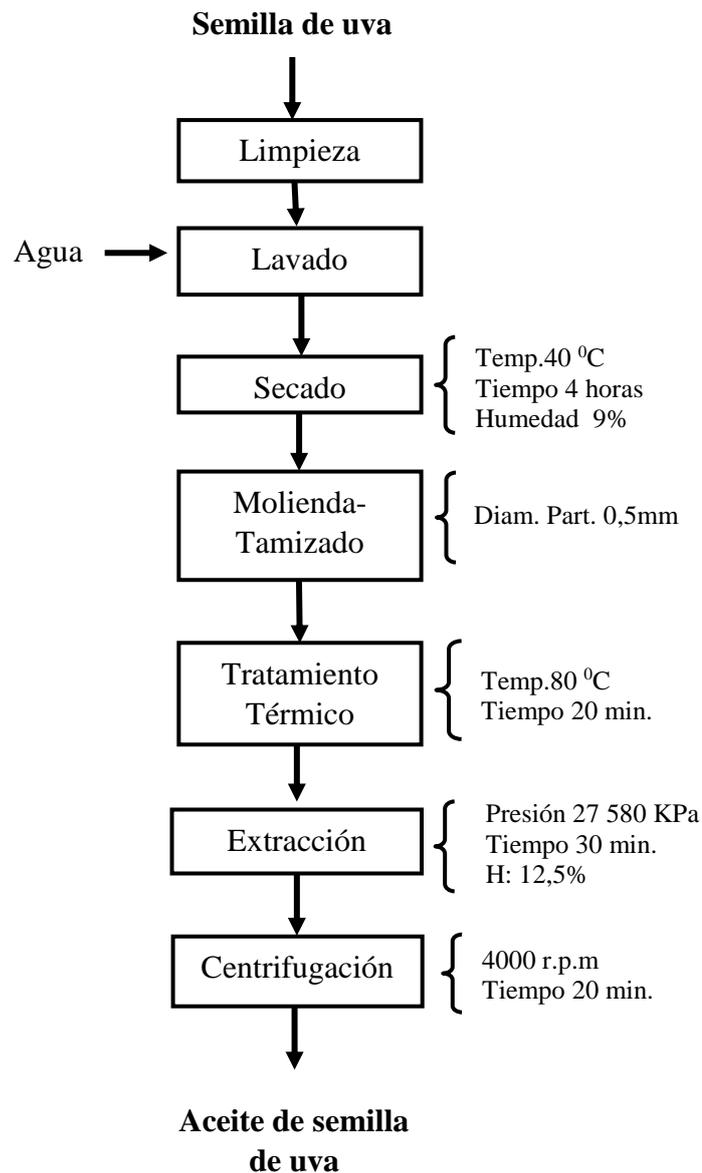


FIGURA 18: Diagrama de flujo para la extracción de aceite de semilla de uva sin tratamiento enzimático por prensado hidráulico.

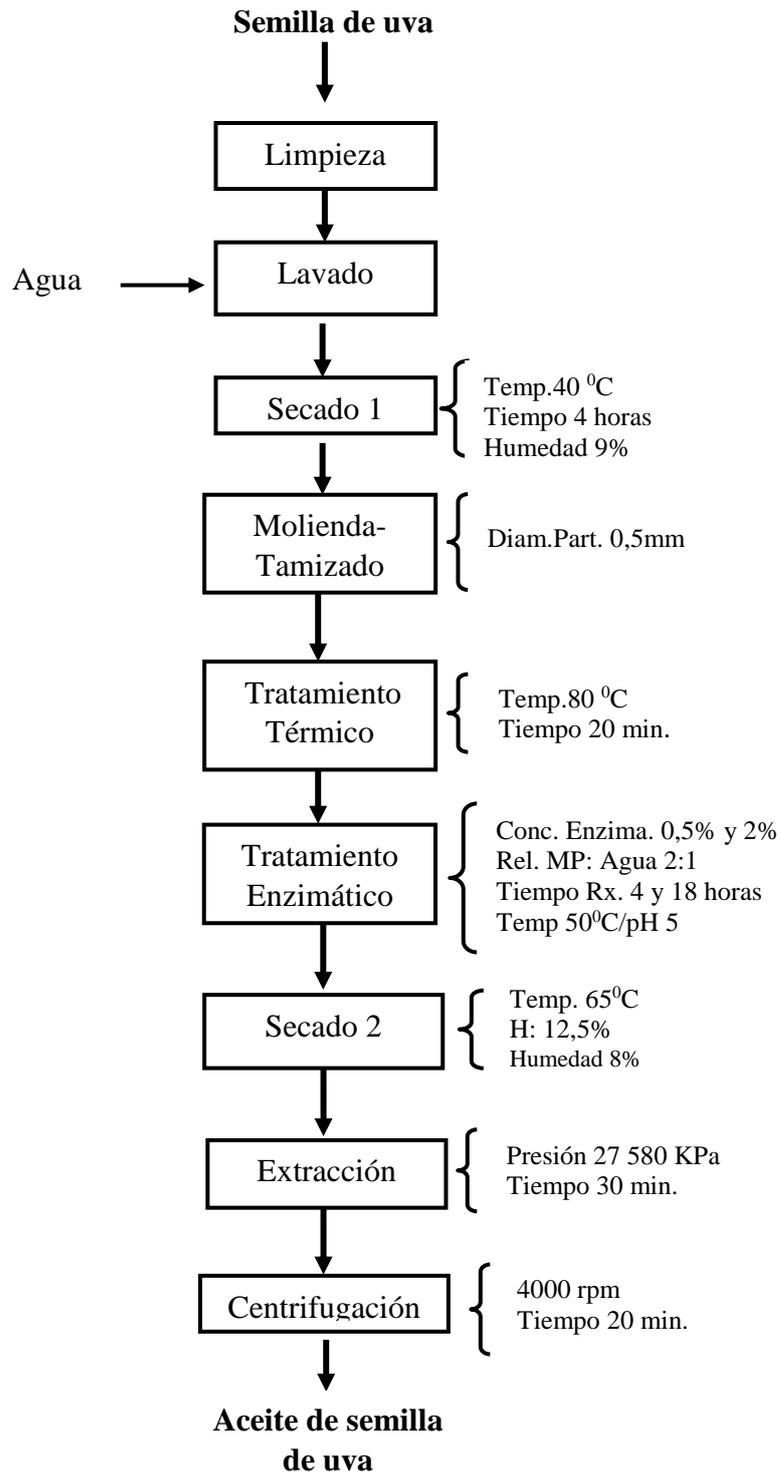


FIGURA 19: Diagrama de flujo para la extracción de aceite de semilla de uva con tratamiento enzimático por prensado hidráulico.

Cuadro 8. Parámetros tomados para el proceso de extracción de los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático

TIPO DE ACEITE	TRATAMIENTO ENZIMÁTICO			EXTRACCIÓN POR PENSADO HIDRÁULICO		
	Concentración enzimática (E/S %)	Relación: Materia Prima/Agua (MP:H ₂ O)	Tiempo de incubación (hr)	Humedad materia prima (%)	Presión (Kpa)	Tiempo de extracción (min)
(A ₀)	0	0	0	12,5	27580	30
(A ₁)	0,5	2/1	4	12,5	27580	30
(A ₂)	0,5	2/1	18	12,5	27580	30
(A ₃)	2	2/1	4	12,5	27580	30
(A ₄)	2	2/1	18	12,5	27580	30

a. Extracción del aceite de semilla de uva sin tratamiento enzimático

Se inicia con el acondicionamiento de la materia prima, mediante la limpieza de las semillas con el fin de eliminar las impurezas de menor y mayor tamaño, luego el lavado con agua potable para la eliminación de residuos de azúcar impregnados al formar parte del orujo; y secado en un secador de bandeja a una temperatura de 40 °C y velocidad de 5^{m/s} hasta conseguir una humedad del 9 por ciento para evitar así su deterioro. Después las semillas son molidas por una moladora manual de maíz de acero suave y tamizadas por medio de tamices marca “Tyler” a un número de luz de malla que obtenga un tamaño de partícula de 0,5 mm, la cual es ideal para un proceso de extracción según Guerra y Zúñiga (2003) quienes recomiendan tamaños de partícula menores a 0,6 mm

Antes de realizarse la extracción por prensado, se efectuó un tratamiento térmico el cual es recomendado por Guerra y Zúñiga (2003) para la inactivación de las enzimas presentes en la semilla, así como coagular las proteínas, aglomerar el aceite en gotas grandes y disminuir la afinidad del aceite a la superficie de los sólidos (Shahidi 2005); este tratamiento se realizó a una temperatura de 80 °C por 20 minutos. El prensado se hizo por triplicado con 350g de semilla de uva molida en una prensa hidráulica manual por un tiempo de 30 minutos a una presión de 27580 KPa y a una humedad de muestra a prensar de 12,5 por ciento, los cuales fueron seleccionados mediante pruebas preliminares, debido a que alcanzaron la mayor extracción de aceite dentro del rango de aplicación del equipo. Obtenido el aceite este se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos para obtener un aceite limpio libre impurezas para el análisis.

b. Extracción de aceite de semilla de uva con tratamiento enzimático

Al procedimiento antes mencionado (sin aplicación de enzimas), se le incorporó un tratamiento enzimático previo al prensado. Luego de la inactivación térmica, las semillas se sometieron a un tratamiento enzimático con las siguientes condiciones: enzima “*Cellulase from Aspergillus niger*” a una concentración de 0,5 y 2 por ciento, materia prima: agua de 2:1 y tiempo de incubación de 4 y 18 horas en una cámara climática. Previo al prensado, las semillas se secaron en una estufa a 65 °C hasta alcanzar una humedad 12,5 por ciento, la cual se seleccionó como la mejor para la operación de prensado en la extracción del aceite de semilla de uva, así como la temperatura de secado para la inactivación de las enzimas adicionales en la etapa anterior. Finalmente los procesos de prensado y centrifugado se realizaron con los

mismos parámetros empleados para la extracción de aceite sin aplicación enzimática, citados con anterioridad.

3.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

Se realizó la caracterización físico-química a los aceites de uva empleados en el presente estudio con el fin de poder evaluar en base a indicadores principales como: humedad, porcentaje de acidez, índice de acidez y peróxidos reportados según la AOAC (2007) descritos en el punto 3.4.1, su calidad respecto a los métodos de extracción empleados.

3.5.3 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS ACEITES DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

A los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático estudiados, se les determinó primeramente el contenido de compuestos fenólicos totales (ver Anexo 3) de los cuales se tomó la muestra de aceite con aplicación enzimática de mayor contenido en fenoles totales y la muestra de aceite sin tratamiento enzimático para la determinación e identificación de compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos libres) por HPLC descrito en el punto 3.4.2.

3.5.4 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTOXIDANTE EN LOS ACEITES CRUDOS DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

La capacidad antioxidante, fue determinada para todas las muestras de aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático utilizando dos métodos de análisis (ABTS lipofílico, DPPH hidrofílico), cuyas metodologías son descritas en el Anexo 3.

3.5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

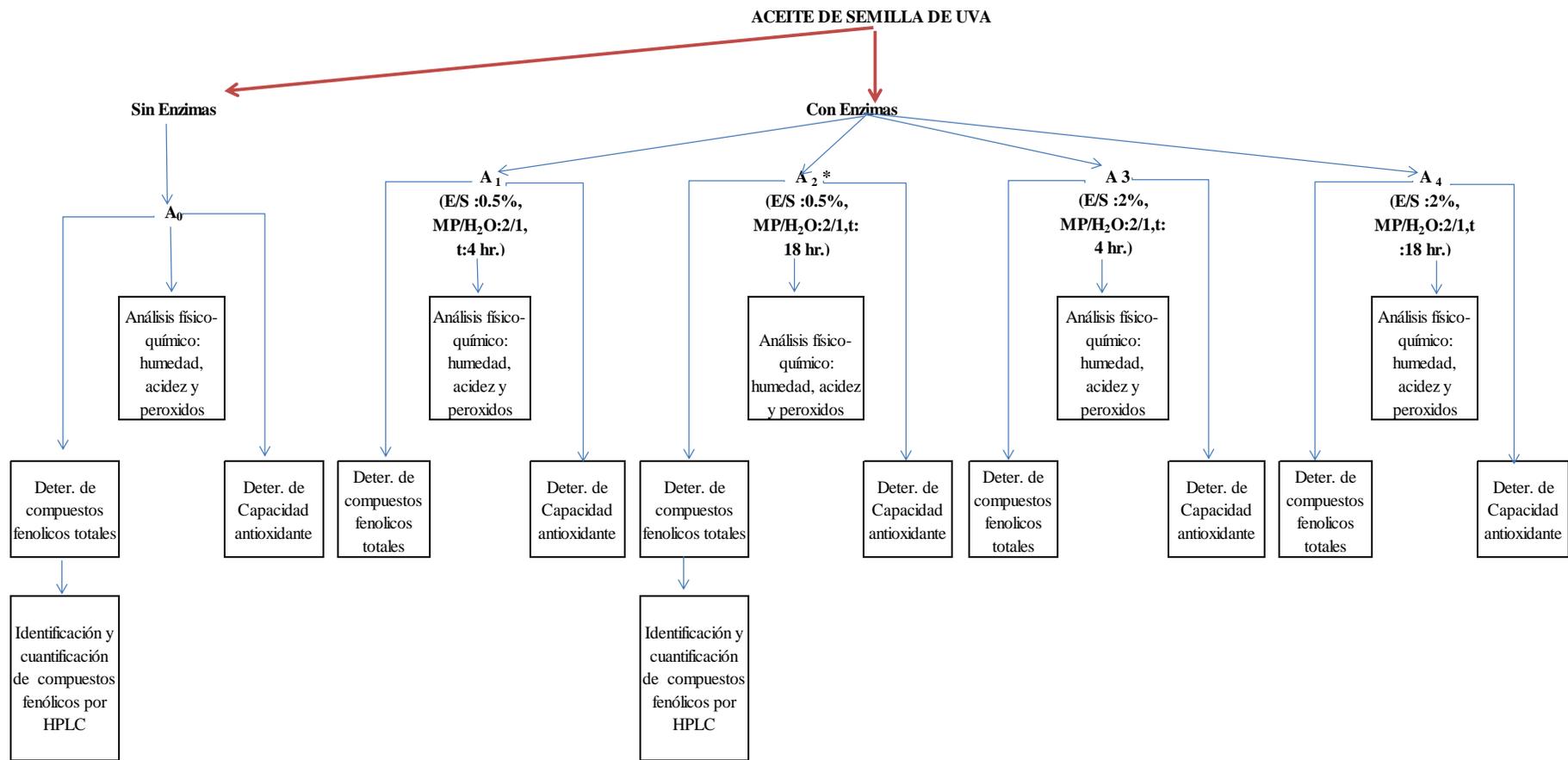
Los ensayos se realizaron por triplicado, donde los resultados sobre la determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en el aceite de semilla de uva (sin tratamiento y con tratamiento enzimático) se presentan considerando la media y sus respectivas desviaciones estándar.

El diseño experimental empleado en la presente investigación se muestra en la Figura 20, donde se planteó cinco tratamientos para comparar el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en los aceites de semilla de uva provenientes de un mismo tipo de extracción con tratamientos diferentes (sin aplicación y con aplicación enzimática), donde las muestras fueron analizadas utilizando un Diseño Completamente al Azar (DCA) y la prueba de comparación Duncan entre los tratamientos con diferencias significativas.

Mientras que para la comparación en contenido de compuestos fenólicos por HPLC identificados (ver Figura 20), se emplearon las muestras de aceite de semilla de uva con tratamiento enzimático de mayor contenido de fenoles totales y sin aplicación de dicho tratamiento, donde las muestras también fueron analizadas mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) y la prueba de comparación Tukey.

Por otro lado, para analizar la relación rendimiento de extracción respecto al contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante se usó el coeficiente de Pearson (r).

La evaluación estadística se realizó con el paquete estadístico Statgraphics centurión XVI[®] para Windows 2013 considerando un nivel de significancia del $p < 0,05$, y con el paquete estadístico de Microsoft Excel 2010, para la evaluación del coeficiente de Pearson.



*Muestra de aceite con extracción enzimática empleada en el análisis de compuestos fenólicos totales por HPLC.

Figura 20: Esquema del diseño experimental para la determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del aceite de semilla de uva obtenido con tratamiento y sin tratamiento enzimático*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA CON TRATAMIENTO Y SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

4.1.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

En el Cuadro 9 se reportan los resultados del proceso de extracción del aceite de semilla de uva sin tratamiento y tratamiento enzimático, usados como material de análisis para la presente investigación; donde los aceites con aplicación enzimática muestran mayores valores en cantidad, rendimiento y eficiencia respecto al aceite extraído sin este tratamiento; siendo estos resultados similares a los citados por Guerra y Zuñiga (2003) quienes trabajaron con la enzima Ultrazim 100G a una concentración enzimática del 2 por ciento (P/p), humedad 15 por ciento y tiempo de incubación de 4 horas, obteniendo un rendimiento de extracción del 72 por ciento con un incremento del 26 por ciento al compararlo con la muestra control sin enzima; así mismo, Tobar *et al.* (2005) obtuvieron un rendimiento en extracción del 54,9 por ciento con tratamiento enzimático a base de las enzimas Ultrazym – Celluclast en razón 3 :1, concentración enzimática del 2 por ciento (p/p), humedad 2 por ciento y tiempo de incubación de 9 horas; respecto al 30 por ciento, de la muestra control (sin enzimas).

Cuadro 9: Valores de cantidad, rendimiento y eficiencia de la extracción del aceite de semilla de uva obtenido sin y con tratamiento enzimático (Celulasa) por prensado hidráulico*

ACEITE DE SEMILLA DE UVA	CANTIDAD (g) ($\bar{x} \pm s$)	RENDIMIENTO (% bh) ($\bar{x} \pm s$)	RENDIMIENTO (% bs) ($\bar{x} \pm s$)	EFICIENCIA (%)
A ₀	19,4±1,02	5,53±0,29	6,07±0,31	58,21
A ₁	27,47±2,75	7,85±0,79	8,59±0,86	82,63
A ₂	31,6±2,14	9,03±0,61	9,89±0,67	95,05
A ₃	31,4±2,77	8,97±0,47	9,83±0,52	94,42
A ₄	30,63±0,15	8,75±0,04	9,59±0,05	92,11

* Los aceites fueron obtenidos para 350 g de semilla molina con un tamaño de partícula de 0,5 mm, humedad 9 por ciento (humedad de almacenamiento) y porcentaje en grasa de 10,41 por ciento.

* Los valores \pm representan la desviación estándar para un promedio de tres repeticiones (n=3)

Otras investigaciones realizadas en la extracción de aceites vegetales de semillas oleaginosas que aumentaron sus rendimientos por intervención enzimática están la de Anwar *et al.* (2013) quienes por medio del tratamiento enzimático a base de la mezcla de enzimas: Viscozyme L, Kemzyme y Feedzyme, a una concentración E/s del 2 por ciento, humedad del 50 por ciento y tiempo de incubación de 18 horas, obtuvieron rendimientos superiores entre 35,2-38,0 por ciento respecto al 32,5 por ciento de la muestra control (sin enzima) para el aceite de semillas de lino; Zúñiga *et al.* (2007) en la extracción de aceite de semilla de Onagra, lograron un aumento del 12 por ciento de su rendimiento sobre la semilla tratada con una mezcla enzimática formulada a base de Ultrazym 100G y Cellubrix en razón 1:1, concentración E/s del 2 por ciento p/p , durante 15 horas de incubación y 40 por ciento de humedad; Ghazali *et al.* (2005) para el aceite de semilla de moringa, con un aumento en el rendimiento del 70 por ciento por tratamiento enzimático frente al 67,9 por ciento sin aplicar dicho tratamiento; y Freccero *et al.* (2006) para las semillas de girasol y su híbrido por medio de la enzima pectinasa a una concentración E/s del 2 por ciento, obteniendo un aumento del 13,6 y 1,6 por ciento en el aceite de semilla de girasol y su híbrido, respectivamente.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

En el Cuadro 10 se muestra los análisis físico-químicos realizados a los aceites crudos de semilla de uva extraídos por prensado hidráulico sin aplicación y con aplicación del tratamiento enzimático.

Cuadro 10. Características físico químicas del aceite crudo de semilla de uva extraído con y sin tratamiento enzimático

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO (A ₀) $\bar{x} \pm s$	ACEITE DE SEMILLA DE UVA CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO $\bar{x} \pm s$			
		A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Humedad (% bh)	0,47±0,27	0,48 ± 0,25	0,48±0,27	0,48±0,25	0,48±0,27
Ácidos grasos libres (% bh)	1,05±0,05	1,59±0,04	1,26±0,03	1,30±0,03	1,45±0,03
Índice de acides (mg KOH/g de grasa)	2,20 ±0,02	2,89±0,60	2,50 ± 0,03	2,64±0,05	2,78±0,04
Índice de peróxido (meq.O ₂ /Kg).	7,24±0,06	11,96 ±0,60	9,93 ± 0,14	10,90±0,51	11,24±0,60

Los valores \pm representan la desviación estándar para un promedio de tres repeticiones(n=3)

Los porcentajes de acidez e índices de acidez reportados en el Cuadro 10, muestran que los aceites tratados enzimáticamente presentaron valores superiores en porcentajes de acidez de 1,26 a 1,59 por ciento e índice de acidez de 2,50 a 2,89 mg KOH/g a los extraídos sin dicho tratamiento con 1,05 por ciento y 2,20 mg KOH/g de porcentaje de acidez e índices de acidez respectivamente ; siendo estos valores inferiores al citado por Navas (2010) en porcentaje de acidez de 2,16 por ciento en ácido oleico para el aceite de semilla de uva de la variedad “*Tempranillo Merlot*” y al de Molero *et al.* (1995) con

índices de acidez de 3,4 y 3,8 mg de KOH/g de grasa en el aceite de semilla de uva extraído con dióxido de carbono y hexano respectivamente.

Dichos valores mencionados tanto para las muestras analizadas en el presente estudio como la de los autores anteriormente citados presentan valores de índice de acidez dentro de lo indicado por el CODEX- STAN (1999) que es de no más de 4,0 mg KOH/g de aceite, lo cual nos indica que hubo un correcto proceso de extracción en los aceites de semillas de uva sin y con tratamiento enzimático, pues este proceso es un factor importante en la oxidación de los aceites dando origen a una mayor cantidad de ácidos grasos libres responsables de la oxidación de lípidos en el aceite contribuyendo a la rancidez y aun menor tiempo de vida del mismo; así también están las condiciones de almacenamiento que facilita la disminución de la calidad de las semillas y la producción de semillas con aceite de acidez relativamente alta (Toro y Suárez 2012).

Mientras que para el índice de peróxido, los aceites con tratamiento enzimático también presentaron valores mayores de 9,93 a 11,96 meq.O₂/Kg frente al obtenido sin dicho tratamiento con 7,24 meq.O₂/Kg, siendo estos valores iguales, superiores e inferiores al reportado por Navas (2010) con 9,93 meq O₂ /Kg de aceite para la semilla de uva de la variedad “*Tempranillo Merlot*”, respectivamente; además dichos resultados reportados para el presente estudio y por el autor citado se encuentran dentro de los valores indicados por el CODEX-STAN (1999), cuyos valores son menores al máximo permitido de 15 meq O₂/Kg de aceite.

Como se pudo observar en los resultados de porcentaje de acidez, índice de acidez y peróxido mencionados anteriormente, las muestras con tratamiento enzimático presentaron valores mayores respecto a las muestras sin enzimas; y esto es debido a que la extracción enzimática favorece la descomposición de las cadenas de triglicéridos debido al calor, oxígeno y tiempo de exposición durante la hidrólisis enzimática, lo cual da origen a una mayor cantidad de ácidos grasos libres los cuales son los responsables de la oxidación de lípidos en el aceite y por lo tanto favorecen la rancidez del mismo (Crews *et al.* 2006); sin embargo estos aceites al presentar valores dentro de lo establecido por el CODEX STAN (1999) son considerados aceites vírgenes de baja oxidación.

En cuanto al porcentaje de humedad, los aceites con y sin tratamiento enzimático presentaron valores cercanos de 0,47 a 0,48 por ciento para ambos tipos de aceites analizados, los cuales comparados con los obtenidos por Rubio *et al.* (2008) con 7,30 por ciento para el aceite de semilla de uva de la variedad “Cencibel” o “Tempranillo”, son menores a las reportadas por el autor lo cual lo hace un aceite menos propenso a la inestabilidad por la oxidación en el transcurso de su almacenamiento, ya que la hidrólisis de las grasas con el agua acelerada al incrementarse la cantidad de agua contenida en los aceites (Lawson 1999) y por ende su rápida oxidación.

Por otro lado, el aceite por extracción enzimática A₂ (0,5 por ciento de celulasa y con 18 horas de incubación) obtuvo los menores valores para los tres primeros análisis mencionados, a diferencia del porcentaje de humedad donde obtuvo valores cercanos.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

4.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

En el Cuadro 11 y Figura 21 se observa el contenido de compuestos fenólicos totales de los aceites crudos de semilla de uva analizados, donde los aceites con tratamiento enzimático presentan valores mayores (148,47-279,19 mg AGE/Kg) respecto al aceite sin dicho tratamiento (127,53 mg AGE/Kg), lo cual es evidenciable según pruebas estadísticas utilizadas a un nivel de significación $p < 0,05\%$ (Anexo 2) que existen diferencias significativas en ambos tipos de extracción en cuanto al contenido de compuestos fenólicos totales en los aceites analizados ; siendo la muestra con enzimas de concentración (^E/s) 0,5 por ciento y a 18 horas de incubación la que obtuvo el mayor valor de compuestos fenólicos totales (279,19 mg AGE/Kg) de todas las muestras analizadas.

Resultados similares también fueron reportados Leone *et al.* (1977) citado por Sineiro *et al.* (1998) quienes encontraron un aumento del contenido de polifenoles en el aceite de oliva con tratamiento enzimático (25,3 mg/100g de aceite) respecto al aceite obtenido sin aplicación enzimática (25,1 mg /100g de aceite); también para Anwar *et al.* (2013) en el aceite de semilla de linaza, donde observó que las muestras tratadas con los complejos enzimáticos *Viscozyme L*, *Freedzyme* y *Kemzyme* obtuvieron valores mayores de

polifenoles totales 10,50; 9,70; 8,61 mg AGE/100 g respectivamente , en comparación al 6,21 mg AGE/100g de su muestra control o sin aplicación enzimática; y Farah *et al.* (2013) que también mostró resultados similares en el aceite de cebolla, donde obtuvo un alto contenido de compuestos fenólicos totales de 5,90 mg/mL en la muestra extraída con enzima *Celulasa* frente al 3,20 mg/mL de la muestra sin esta enzima. Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio y a los reportados por los autores citados, la aplicación de enzimas tiende a aumentar el contenido de compuestos fenólicos en los aceites vegetales, lo cual es sustentado por Meyer *et al.* (1998) quienes afirman que las enzimas hidrolíticas actúan sobre las paredes celulares de la semilla pudiendo provocar una mejora en la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, así también Farah *et al.* (2013) mencionan que probablemente la enzima media la extracción de los polifenoles antioxidantes de la matriz vegetal por vía hidrolítica degradando los polisacáridos de la pared celular que los retiene en la red de lignina por uniones de hidrógeno o por unión hidrofóbica u otro mecanismo que puede ser de manera directa , donde la enzima cataliza rompiendo las uniones éter o éster entre los polifenoles y los polímeros de la pared celular de la planta (Pinelo *et al.*, citado por Laroze *et al.* 2010).

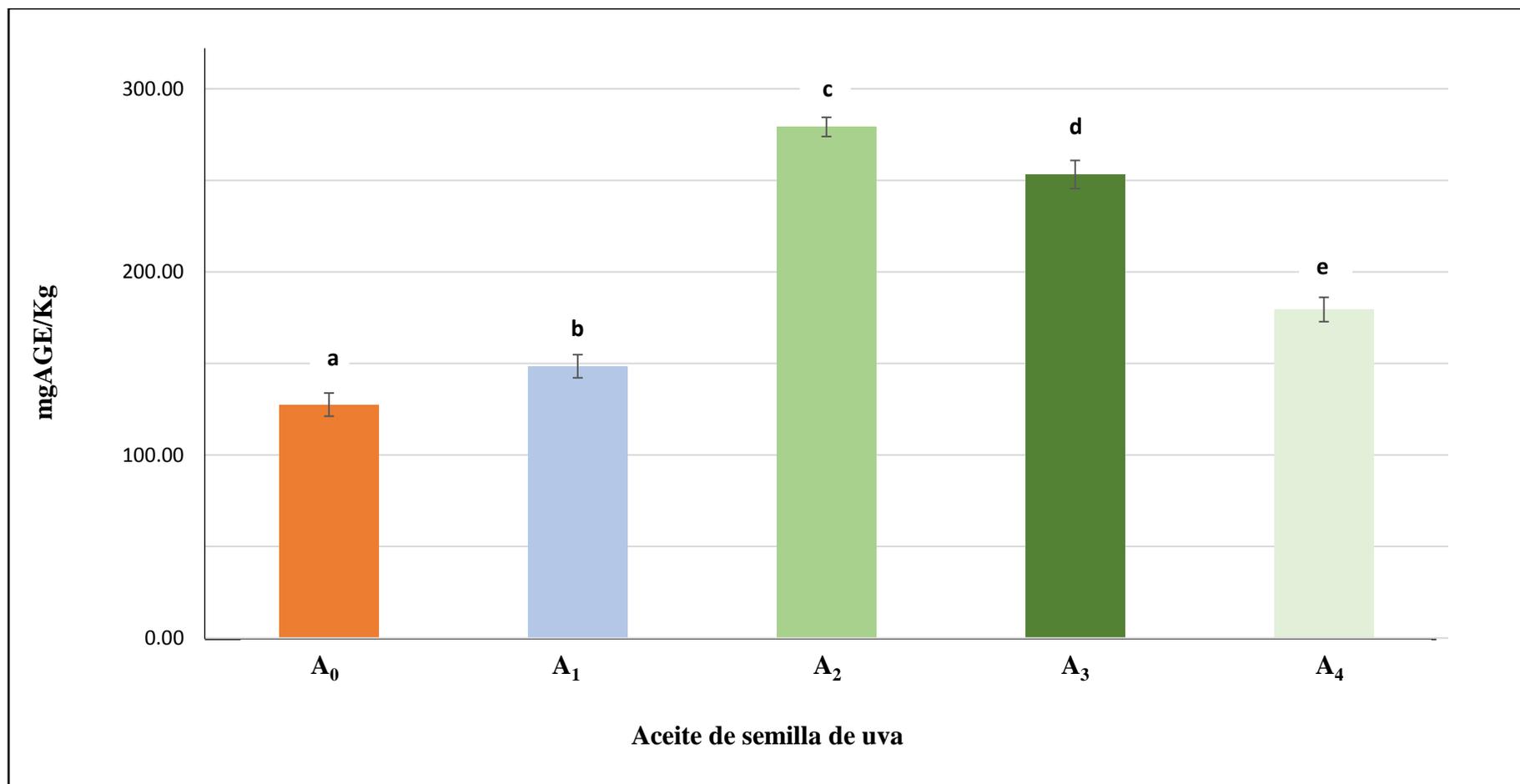
En cuanto al contenido de compuestos fenólicos totales encontrados en los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático estudiados con respecto al de otros autores, estos fueron superiores (127,53–279,19 mg AGE/Kg de aceite) a los reportados por: Bail *et al.* (2008) con aceites obtenidos por prensado en frío para las variedades de uva negra “*Zweigelt*” (69,5 mg AGE/Kg de aceite) , “*Cabernet-Sauvignon*” (115,5 mg AGE/Kg de aceite), “*Merlot*” (108 mg AGE/Kg de aceite) y “*Zweigelt*” (103,5 mg AGE/Kg de aceite) ; Rombaut *et al.* (2015) con valores entre 48 - 153 mg AGE / kg para una variedad de semilla de uva proveniente de *Distillerie Jean Goyard* (Francia); Göktürk *et al.*(2007) con un valor promedio de 160,95 mg AGE/Kg de aceite para las semillas cultivadas en diferentes zonas geográficas de Turquía, y Poudel *et al.*(2008) con un valor de 212,4 mg AGE/Kg de aceite en semillas de uva cultivadas en varias regiones del Japón ; sin embargo el aceite de semilla de uva de la variedad “*Tempranillo*” obtuvo valores superiores en fenoles totales de 341,16 mg AGE/Kg (Berradre *et al.* 2014) respecto a las muestras de este estudio y al de los demás autores citados.

Cuadro 11: Contenido de compuestos fenólicos totales en los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático*

EXTRACCIÓN POR PRENSADO HIDRÁULICO	ACEITE DE SEMILLA DE UVA	COMPUESTOS FENÓLICOS mg AGE/kg de aceite (b.h) ($\bar{x} \pm s$)
Sin tratamiento enzimático (S.T.E)	A ₀	127,53 ± 6,33
Con tratamiento enzimático (C.T.E)	A ₁	148,47 ± 6,33
	A ₂	279,19 ± 5,23
	A ₃	253,21 ± 7,68
	A ₄	179,48 ± 6,65

*AGE: Ácido Gálico Equivalente

* Los valores ± representan la desviación estándar para un promedio de tres repeticiones (n=3)



*Donde a, b, c, d y e indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

Figura 21: Compuestos fenólicos totales (mg AGE/ Kg aceite) en las muestras de aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.

Estas diferencias antes mencionadas pueden ser atribuidas al contenido y la proporción de compuestos polifenólicos presentes en el aceite extraído, lo cual está relacionado con diferentes factores como lo son: la variedad de uva, los factores ambientales, las técnicas agrarias aplicadas durante la cosecha, entre otros (Fernández-Pachón *et al.* 2006) y al método de extracción, ya que la pérdida de compuestos fenólicos en la matriz sólida de la semilla de uva durante el prensado podría atribuirse tanto al impacto térmico y a una transferencia parcial en el aceite Maier *et al.* (2009).

Por otro lado, comparando los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático de esta investigación con otros aceite vegetales, los valores reportados por las muestras de aceite analizados son superiores a los mencionados por F. Anwar *et al.* (2013) para el aceite de semilla de linaza (80,61-100,50 mg AGE/Kg) obtenidos por tratamiento enzimático; Siger *et al.* (2008) para los aceites de soya (14,8mg/Kg), girasol (10,20 mg /Kg), maíz (12,6mg/Kg), semilla de colza (13,10 mg/Kg) y salvado de arroz (14,4 mg/Kg) extraídos por prensado en frío; Gonzales *et al.* (2010) en el aceite de semilla de chía (59,20 mg/Kg); mientras que presentan valores cercanos al del aceite de oliva virgen extra con valores entre 73-265 mg AGE/Kg, según Pellegrini *et al.* (2001). Sin embargo los rendimientos de compuestos polifenólicos son bajos para los aceites de semilla de uva analizados, ya que estos permanecen en su mayoría en la torta de las semillas (5 - 11 g AGE / 100 g torta de semillas) y en las multas (1-4 g AGE / 100 g multa) además de poder atribuirse a la naturaleza hidrófila de los polifenoles responsables de su baja solubilidad en el aceite (Rombauta *et al.* 2015).

4.2.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

En el Cuadro 12 y Figura 22 se muestra la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos libres (ácido cafeico, ácido cinámico y ácido gálico) y flavonoides (luteolina y hesperitina), compuestos fenólicos evaluados en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático; siendo este último obtenido de la muestra de aceite A₂, que obtuvo el mayor valor de compuestos fenólicos totales del análisis anterior, en el cuál además se pudo identificar y cuantificar un mayor contenido de compuestos fenólicos respecto al aceite sin aplicación del tratamiento enzimático, donde el ácido cinámico

(0,17 µg/g aceite) y ácido cafeico (0,12 µg/g aceite) fueron los más representativos en los aceites con y sin enzimas respectivamente, mientras que el ácido gálico y la luteolina fueron no identificados en ambos tipos de aceites.

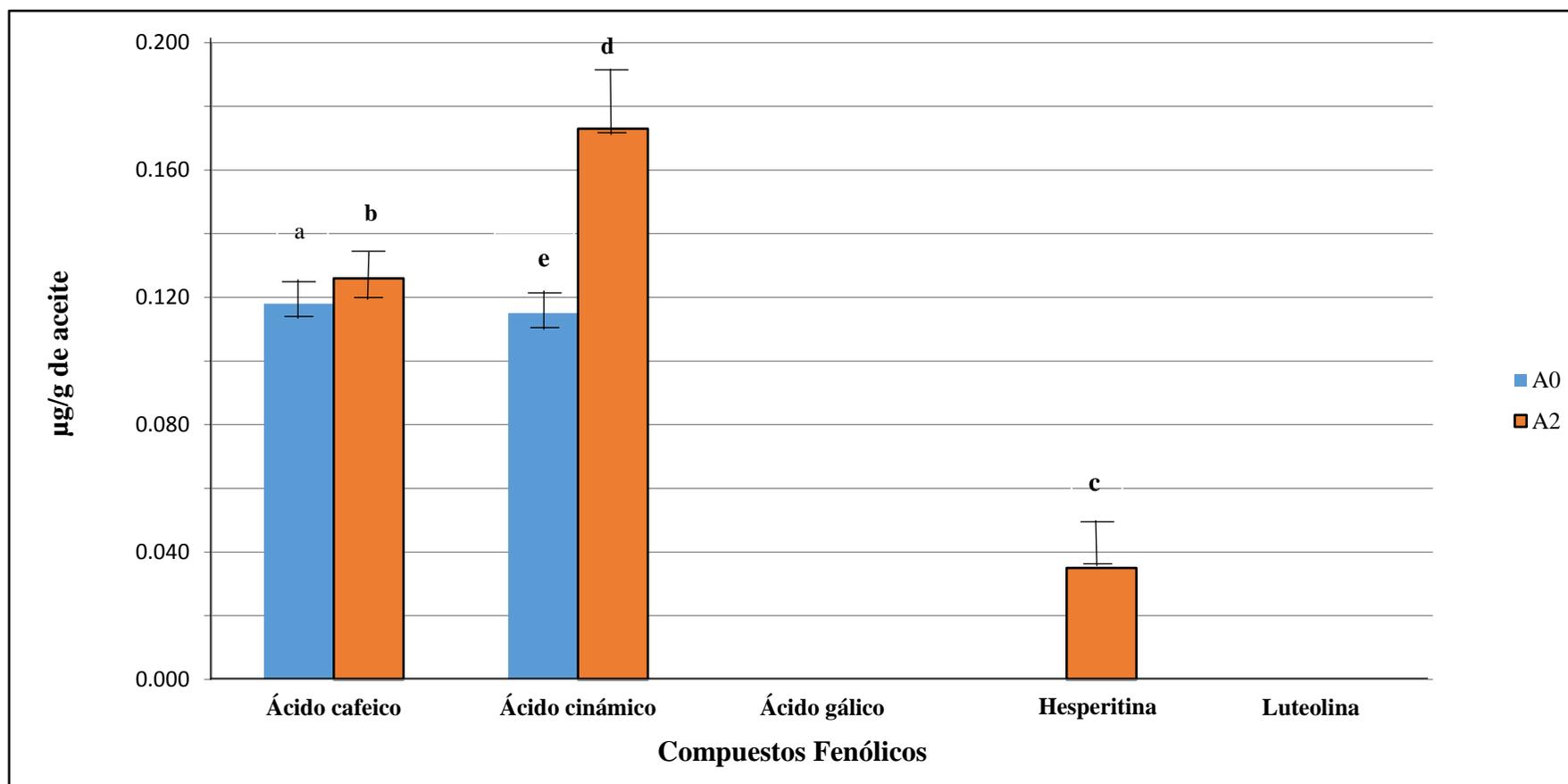
Resultados similares en cuanto a identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en aceites extraídos mediante un tratamiento enzimático, está el obtenido por Anwar *et al.* (2013) para el aceite de semilla de linaza, donde el contenido de compuestos fenólicos identificados (ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico y ácido felúrico) fueron mayores en los aceites extraídos con asistencia enzimática frente a los aceites obtenidos por extracción por solventes y prensado hidráulico convencional (sin tratamiento enzimático).

Cuadro 12: Contenido de compuestos fenólicos presentes en el aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático expresados en µg/g muestra

COMPUESTO	CONTENIDO EN ACEITE DE SEMILLA DE UVA (µg/g aceite) ($\bar{x} \pm s$)	
	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO A ₀	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO A ₂
Ácido cafeico	0,12±0,001 LD= 0,117	0,13 ±0,002 LD=0,11
Ácido cinámico	0,11±0,004 LD=0,076	0,17±0,001 LD=0,08
Ácido gálico	<0,12 LD=0,12	<0,11 LD=0,11
Hesperitina	<0,020 LD=0,02	0,03±0,003 LD=0,020
Luteolina	<0,25 LD=0,25	<0,24 LD=0,24

*LD: Límite de detección

*Los valores ± representan la desviación estándar para un promedio de tres repeticiones (n=3)



*A₀: Sin tratamiento enzimático, A₂: Con tratamiento enzimático (concentración enzimática: 0,5 por ciento, Tiempo de incubación: 18 horas)

*Donde a, b, c, d y e indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

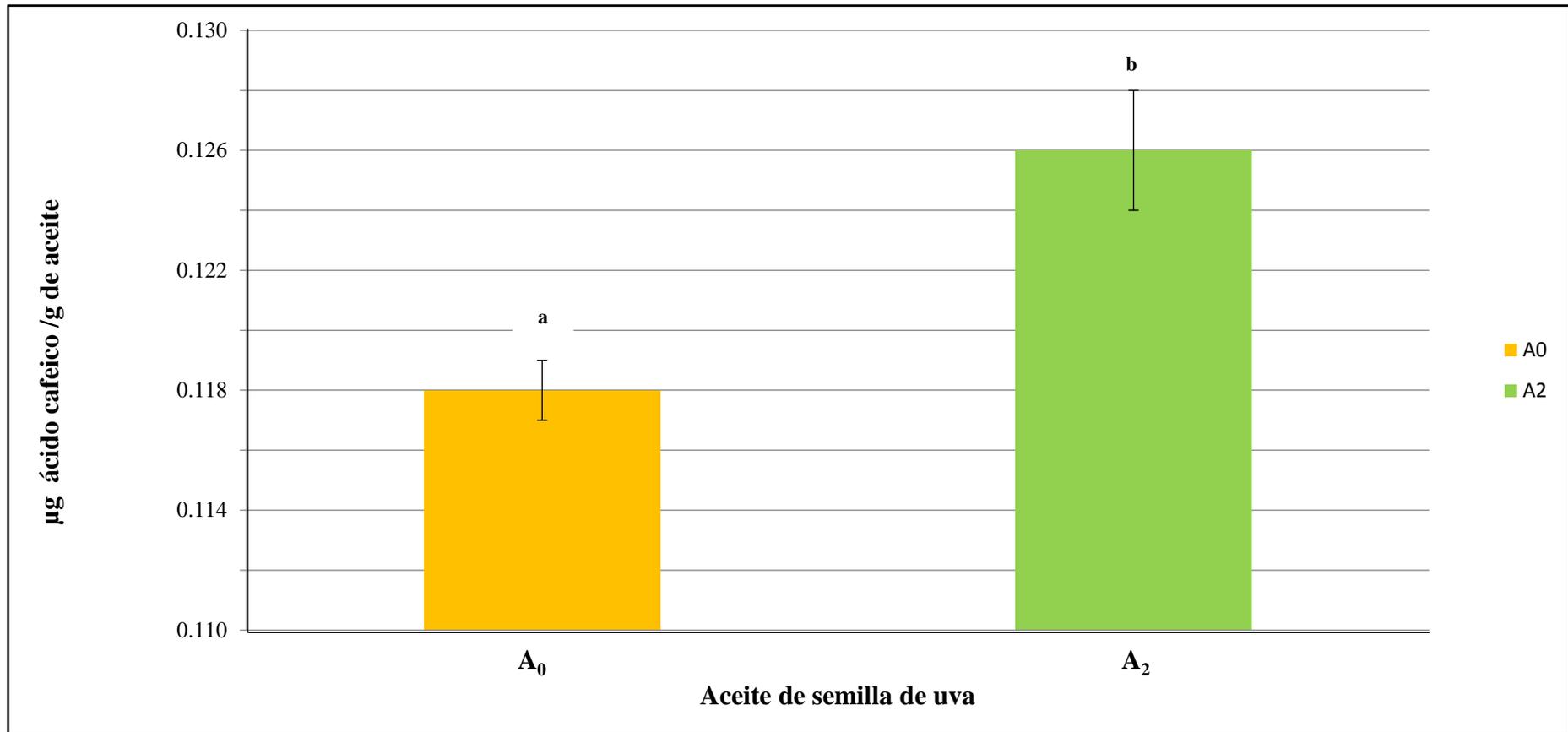
Figura 22: Compuestos fenólicos presentes en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.

Con respecto al ácido cafeico según la Figura 23, se observa que el aceite con tratamiento enzimático presenta una mayor concentración de este compuesto fenólico (0,13 µg/g de aceite) respecto al aceite sin dicho tratamiento (0,12 µg/g de aceite), lo cual es evidenciable estadísticamente a un nivel de significación $p < 0,05\%$ (Anexo 2) que existe diferencias significativas en ambos aceites.

La presencia de este ácido fenólico en el aceite de semilla de uva también fue reportada por Navas (2010) para la variedad “*Tempranillo Merlot*” pero en concentraciones mayores (0,56 µg/g de aceite) a las reportadas en esta investigación. Por otro lado, en comparación con otros aceites de semillas oleaginosas, el aceite de semilla de nabina citado por Navas (2010) presenta una mayor concentración (0,17 µg/g de aceite), mientras que el de semilla de calabaza reportado por Rezig *et al.* (2012) posee pequeñas concentraciones (0,0039 µg/100 g de aceite) respecto a los aceites del presente estudio.

En el caso del ácido cinámico, al igual que el ácido cafeico, el aceite obtenido por tratamiento enzimático mostró una mayor concentración de este ácido fenólico frente al aceite extraído sin dicho tratamiento (Figura 24) en concentraciones de 0,17 y 0,11 µg/g de aceite respectivamente, lo que revela según pruebas estadísticas a un nivel de significación $p < 0,05\%$ (Anexo 2) diferencias significativas en ambos aceites sobre la presencia de este ácido fenólico.

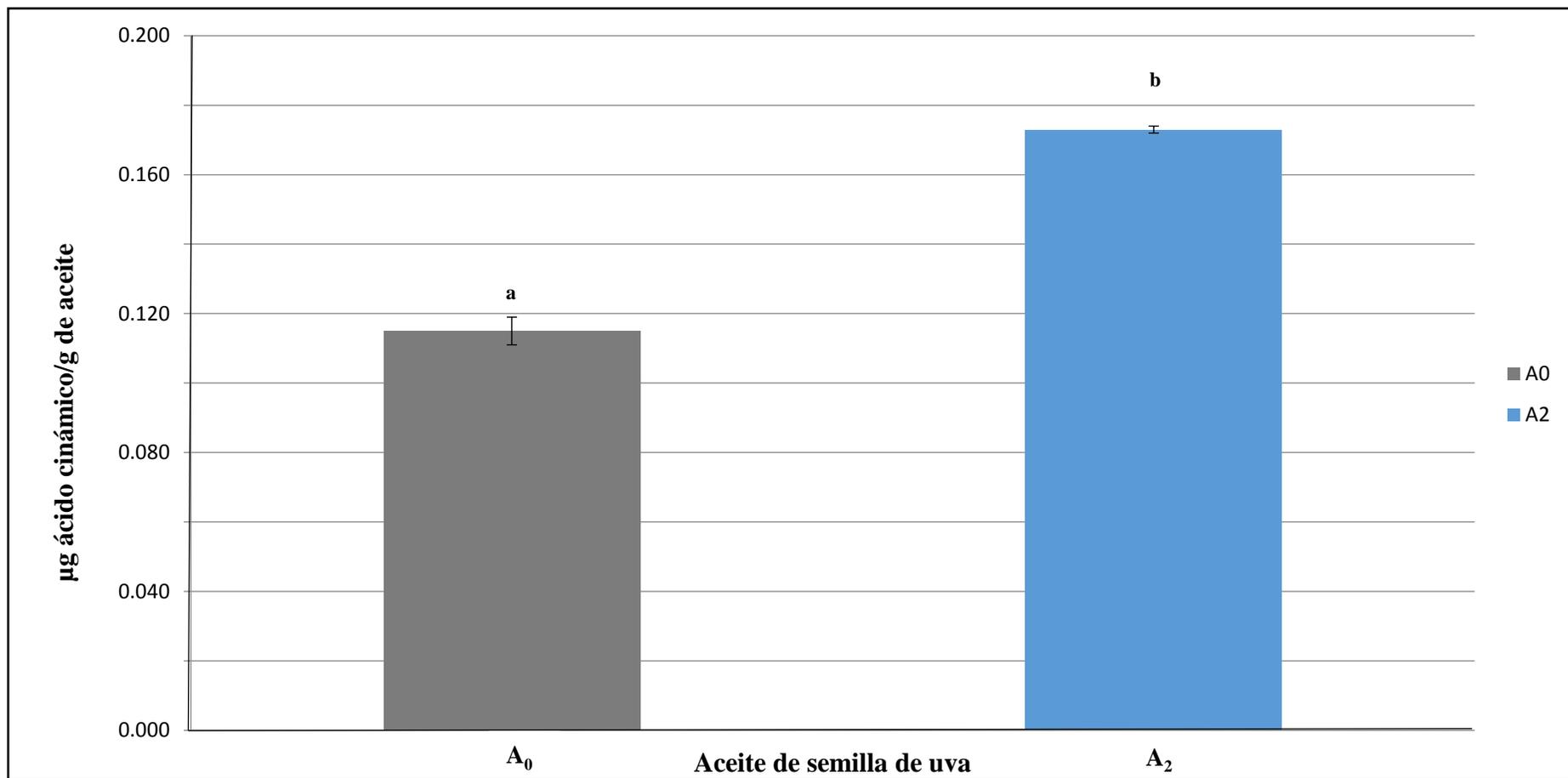
Este compuesto fenólicos también fue reportado por Navas (2010) en el aceite de semilla de uva de la variedad *Tempranillo-Merlot* en concentraciones menores de 0,09 µg/g de aceite, respecto a los aceites sin tratamiento y con tratamiento enzimático analizados, mientras que Tuberoso *et al.* (2007) no encontró presencia alguna de éste ácido fenólico para el aceite de semilla de uva analizado en su investigación.



*A₀: Sin tratamiento enzimático, A₂: Con tratamiento enzimático (concentración enzimática: 0,5 por ciento, tiempo de incubación: 18 horas)

*Donde a y b indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

Figura 23: Contenido de ácido cafeico presente en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.



*A₀: Sin tratamiento enzimático, A₂: Con tratamiento enzimático (concentración enzimática: 0,5 por ciento, Tiempo de incubación: 18 horas)

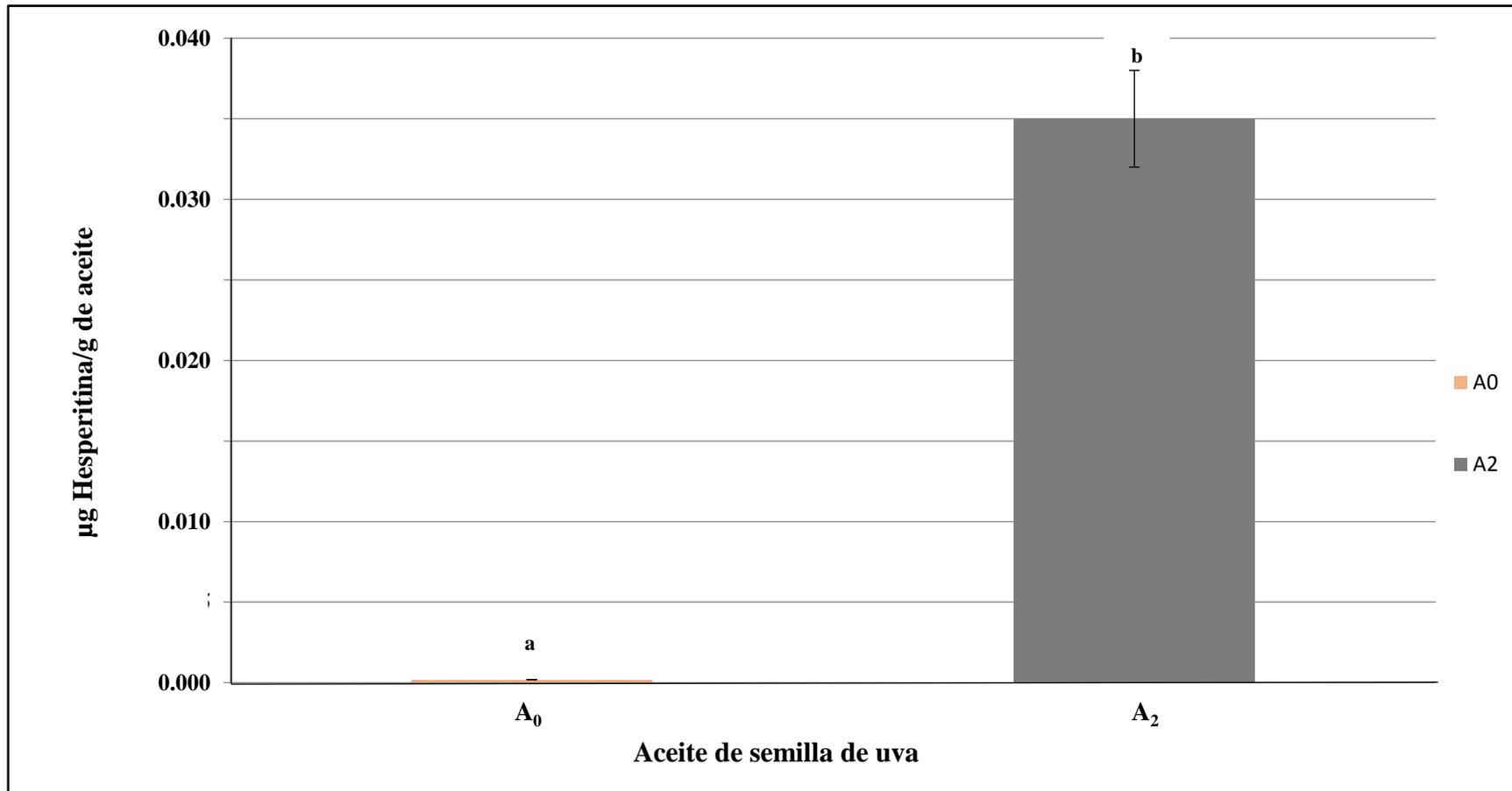
*Donde a y b indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

Figura 24: Contenido de ácido cinámico presente en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.

Por otra parte, en cuanto al contenido del ácido cinámico en aceites de otras semillas oleaginosas en comparación al encontrado en los aceites de semilla de uva analizados, como el aceite de girasol (0,14 $\mu\text{g/g}$ de aceite) y de linaza (0,07 $\mu\text{g/g}$ de aceite) estudiados por Navas (2010) presentan concentraciones menores a los reportados en esta investigación , sin embargo los aceites de maíz (0,90 $\mu\text{g/g}$ de aceite) y calabaza (1,00 $\mu\text{g/g}$ de aceite) citados por Tuberoso *et al.* (2007) muestran una mayor concentración de éste ácido fenólico.

Para la hesperitina, como se muestra en la Figura 25, según las pruebas estadísticas utilizadas a un nivel de significación $p < 0,05\%$ (Anexo 2), existen diferencias significativas en ambos aceites, siendo el aceite obtenido por tratamiento enzimático en el cuál se identificó a este flavonoide en una concentración de 0,03 $\mu\text{g/g}$ de aceite a diferencia de la muestra sin tratamiento enzimático en la cual no fue detectado ; así mismo la presencia de este flavonoide en el aceite de semilla de uva para la variedad Tempranillo-Merlot fue identificada por Navas (2010) en concentraciones de 1,51 $\mu\text{g/g}$, lo cual difiere de la cantidad cuantificada en el aceite con tratamiento enzimático siendo esta menor a la citada por el autor.

En cuanto al ácido gálico y la luteolina, ambos compuestos fenólicos tuvieron una presencia imperceptible para las muestras de aceite analizadas en el presente estudio, sin embargo para el caso de la luteolina, Navas (2010) la encontró en el aceite de semilla de uva de la variedad *Tempranillo-Merlo* a una concentración de 1,14 $\mu\text{g/g}$ de aceite, mientras que Tuberoso *et al.* (2007) no detectó la presencia de este flavonoide para el aceite de semilla de uva analizado en su investigación, siendo este resultado similar al encontrado en el presente estudio.



*A₀: Sin tratamiento enzimático, A₂: Con tratamiento enzimático (concentración enzimática: 0.5 por ciento, Tiempo de incubación: 18 horas)

*Donde a y b indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

Figura 25: Contenido de hesperitina presente en el aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático identificados por HPLC.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

Para la determinación de la capacidad antioxidante (CAOX) en las muestras de aceite de semilla de uva analizadas, se empleó dos métodos de ensayo: ABTS (fase lipofílica) y DPPH (fase hidrofílica), cuyos resultados son reportados en el Cuadro 13 y Figuras 26 y 27 expresados como mmoles Trolox Equivalente (TE)/Kg de aceite, con la finalidad de evaluar la capacidad de los antioxidantes presentes en los aceites evaluados en estabilizar una reacción oxidativa.

Cuadro 13: Capacidad antioxidante de las muestras de aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático evaluadas mediante los métodos ABTS y DPPH.

EXTRACCIÓN POR PRENSADO HIDRÁULICO	ACEITE DE SEMILLA DE UVA	ABTS LIPOFILICO mmoles TE/kg de aceite (b.h) ($\bar{x} \pm S$)	DPPH HIDROFILICO mmoles TE/kg de aceite (b.h) ($\bar{x} \pm S$)
Sin tratamiento enzimático (S.T.E)	A ₀	1,59 ± 0,13	0,05 ± 0,30
Con tratamiento enzimático (C.T.E)	A ₁	1,71 ± 0,20	0,09 ± 0,10
	A ₂	1,81 ± 0,40	0,13 ± 0,20
	A ₃	1,78 ± 0,40	0,11 ± 0,10
	A ₄	1,72 ± 0,20	0,10 ± 0,30

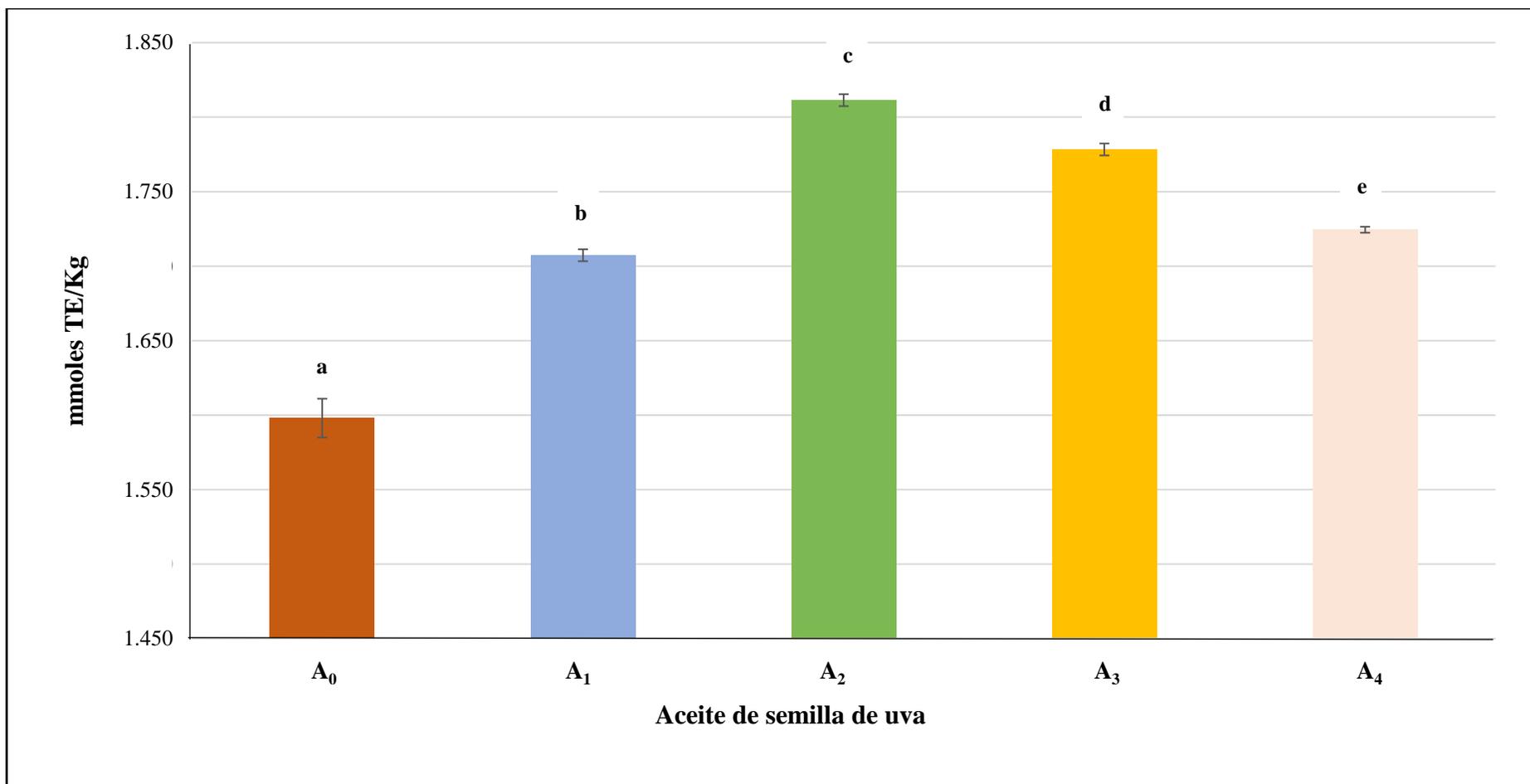
*TE: Trolox Equivalente

* Los valores ± son el promedio de la desviación estándar (n=3)

En la medida de la capacidad antioxidante (CAOX) por la técnica ABTS (fase lipofílica) en los aceites de semilla de uva analizados, las muestras de aceite con tratamiento enzimático presentaron mayores valores (1,71-1,81 mmoles TE/Kg de aceite) frente a la muestra obtenida sin dicho tratamiento (1,59 mmoles TE/Kg de aceite), lo que revela según pruebas estadísticas a un nivel de significación $p < 0.05\%$ (ver Anexo 2) que existen

diferencias significativas en las muestras de aceite analizadas en función a la aplicación del tratamiento enzimático en el proceso de extracción del aceite.

En cuanto a los valores reportados de las muestras de aceites analizadas por este método comparado al de otros autores como: Bail, *et al.* (2008), para los aceites de semilla de uva de las variedades Schilder (1,72 mmol TE/Kg de aceite), Carbernet Sauvignon (4,64 mmol TE/Kg de aceite), Merlot (3,48 mmolTE /Kg de aceite) y Zweigelt (2,88 mmol TE/Kg de aceite) extraído por prensado en frío, Berradre *et al.* (2014) para la variedad Tempranillo (36,8 mmol TE/Kg de aceite), presentaron valores mayores a los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático analizados, a excepción de la variedad Schilder (Bail *et al.* 2008) que presentó un valor menor a los aceites extraídos con asistencia enzimática. Sin embargo los valores reportados por Fernandes *et al.* (2013) que determinaron la capacidad antioxidante del aceite de semilla de uva de las variedades Tinto Cao, Aragones, Touriga Nacional, Tinta Carnalha, Cornifesto, Periquita y Tinta Barroca procedentes de Portugal con valores de 0,518; 0,532; 0,528; 0,524; 0,425; 0,522; 0,532; 0,525 y 0,363 mmoles TE/Kg de aceite respectivamente, fueron menores a las muestras de aceite de semilla de uva sin tratamiento (1,59 mmol TE/Kg de aceite) y con tratamiento enzimático (1,71-1,81mmol TE/Kg de aceite) analizados del presente estudio. Esta diferencia de valores encontradas puede deberse a factores tales como: variedad de uva, el área de producción, la climatología, técnicas agrícolas que tienen un efecto sobre el contenido de fenoles totales y a su vez sobre la actividad antioxidante (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).



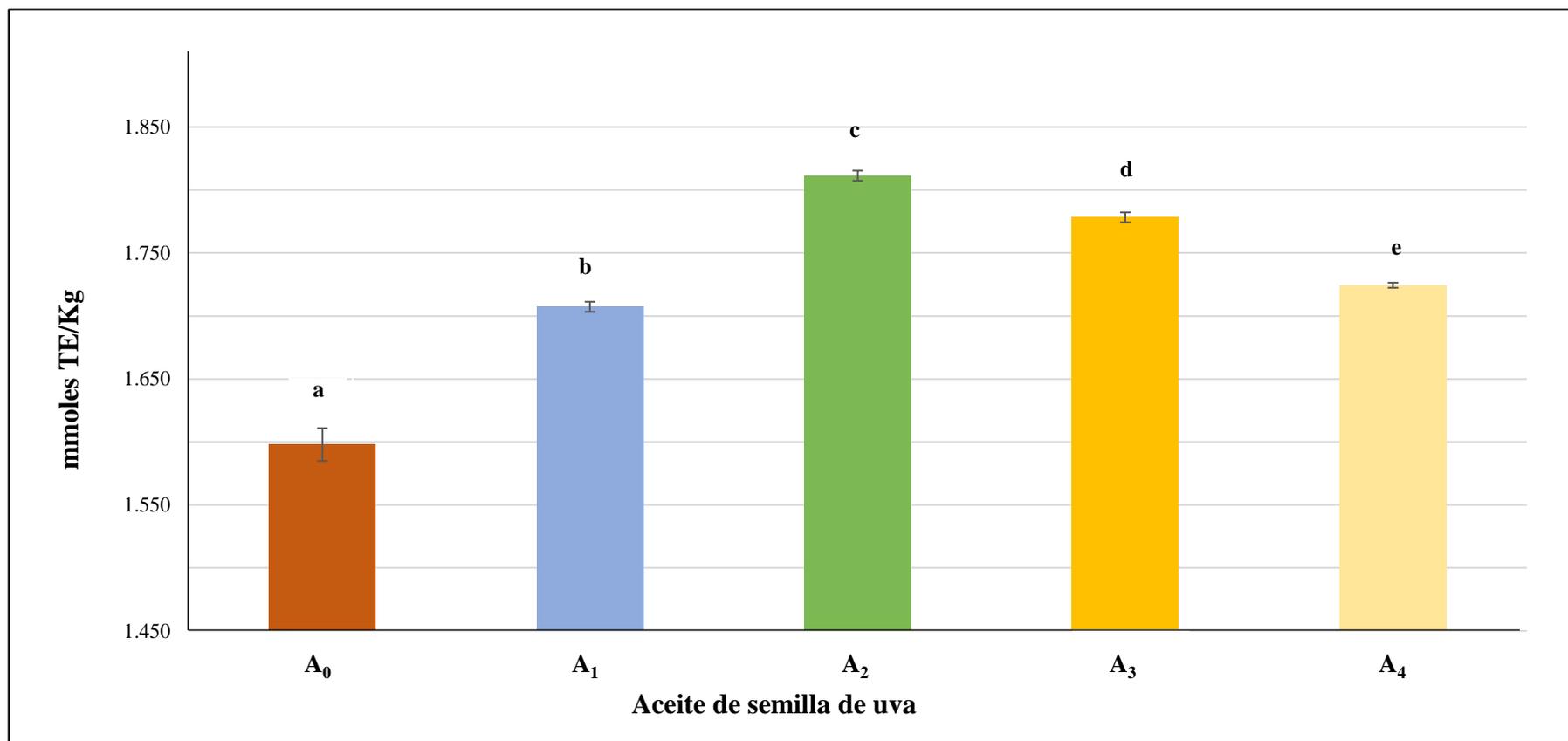
*Donde a, b, c, d y e indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

Figura 26: Capacidad antioxidante (mmoles TE/Kg de aceite) en el aceite de semilla de uva obtenido sin tratamiento y con tratamiento enzimático según el método ABTS (fase lipofílica).

Con respecto a los valores del aceite de semilla de uva analizados en comparación con otros aceites vegetales utilizando este método, están los obtenidos por Pellegrini *et al.* (2001) en el aceite de oliva virgen (1,53 mmol TE/Kg de aceites) y en el aceite de oliva virgen extra (1,79 mmol TE/Kg de aceite), los cuales son cercanos a los aceites de semilla de uva extraídos sin y con aplicación enzimática analizados.

En lo referente a la medida de la capacidad antioxidante (CAOX) por la técnica DPPH (fase hidrofílica) en los aceites de semilla de uva analizados, las muestras de aceite con tratamiento enzimático presentaron mayores valores (0,09-0,13 mmoles TE/Kg de aceite) respecto al aceite obtenido sin la aplicación enzimática (0,05 mmoles TE/Kg de aceite), lo que indica según pruebas estadísticas a un nivel de significación $p < 0.05\%$ (ver Anexo 2) que existen diferencias significativas en las muestras de aceite analizadas en función a la aplicación del tratamiento enzimático en el proceso de extracción del aceite.

Respecto a los valores CAOX determinados por el método DPPH a los aceites de semilla de uva analizados, en comparación al reportado por otras investigaciones como Tuberoso *et al.* (2007) presentó un valor mayor de 0,26 mmol TE/Kg de aceite, frente a los obtenidos por los aceites de semilla de uva sin tratamiento (0,05 mmol TE/Kg de aceite) y con tratamiento enzimático (0,09-0,13 mmol TE/Kg) evaluados. Y en comparación con otros aceites vegetales, como el aceite de cacahuete de 0,08 mmol TE/Kg (Tuberoso *et al.*, 2007) y el aceite de argán extraído semi-industrialmente de 0,19 mmol TE/Kg (Marfil 2008), los aceites de semilla de uva estudiados con asistencia enzimática presentan valores superiores a los reportados por los autores antes citados para estos aceites vegetales.



*Donde a, b, c, d y e indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de extracción.

Figura 27: Capacidad antioxidante (mmoles TE/Kg de aceite) en el aceite de semilla de uva obtenido sin tratamiento y con tratamiento enzimático según el método DPPH hidrofílico.

Al igual que los valores obtenidos para el análisis de compuestos fenólicos como el de capacidad antioxidante evaluadas por los métodos ABTS y DPPH, los valores reportados por ambos análisis demuestran que la aplicación del tratamiento enzimático tiende a un aumento de la capacidad antioxidante en los aceites de ambas semillas respecto a su extracción convencional, lo cual según Meyer *et al.* (1998), hace atribución a que la acción enzimática mejora la extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, por lo que el empleo de enzimas en la extracción de aceites vegetales tiene un efecto positivo en el aumento de la capacidad antioxidante y por ende también en la de sus compuestos fenólicos.

Los valores de la capacidad antioxidante total obtenidos en los aceites de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático, tras aplicar el método ABTS muestran un mayor valor respecto a los obtenidos por el método DPPH, donde para el método ABTS se analiza la parte del aceite directamente diluido en hexano, mientras que para el DPPH es el extracto metanólico o fase hidrofílica, el cual es utilizado por muchos autores para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes alimentos (Marfil 2008), obtenida de un tratamiento previo con solventes al aceite.

Según Marfil (2008) el n-hexano efectúa una dilución del aceite y no un proceso de extracción, caso del metanol. Pellegrini *et al.* (2003) citado por Marfil (2008) indica que al diluir el aceite en n-hexano se valora la contribución de todos los antioxidantes presentes (compuestos fenólicos, tocoferoles y carotenoides), además de la distinta reactividad de los compuestos antioxidantes en los dos medios utilizados, metanol y n-hexano, por lo que los valores reportados en mediante el método ABTS son mayores a los obtenidos por el método DPPH.

Por otro lado, Frankel y Meyer (2000) mencionan que la CAOX de los alimentos depende de muchos factores, incluyendo las características de los sustratos involucrados en la reacción oxidante, las condiciones y etapas de la oxidación del tipo de antioxidante, además de que la CAOX medida en una muestra también depende de la tecnología empleada y del generador de radicales libres u oxidantes empleados en la medición y la velocidad de reacción de los antioxidantes para estabilizar una reacción oxidativa (Rice-Evans *et al.*; Huamán, citado por Necochea 2012). Complementariamente Huang *et al.* (2005) citado por Necochea (2012) indican que los valores numéricos de la CAOX están

sujetos al mecanismo de reacción química involucrado en el ensayo, por lo tanto las diferencias numéricas entre los dos métodos de ensayo de CAOX pudieron verse afectados por los cualquiera de los factores antes mencionados.

La capacidad antioxidante también se relaciona con las características de calidad del aceite, donde a existencia de un “*mayor índice de peróxidos menor será la capacidad antioxidante de un aceite*” (HANNA 2016), lo cual se puede observar que la muestra A₂ (ver Cuadro 14) con respecto a las demás muestras de aceite con tratamiento enzimático presenta el menor valor de índice de peróxidos , pero un valor mayor en capacidad antioxidante; lo cual, si bien el tratamiento enzimático aumenta este índices de calidad en las muestras de aceite , estas se encuentran dentro de los parámetros dados por el CODEX-STAN (1999) y por la presencia una alta capacidad antioxidante tienen la “*capacidad de inhibir la peroxidación lipídica*” (Fito 2003).

Cuadro 14: Capacidad antioxidante respecto al índice de peróxidos evaluado en las muestras de aceite de semilla de uva sin y con tratamiento enzimático.

ACEITES DE SEMILLA DE UVA	CARACTERÍSTICA DE CALIDAD	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (mmoles TE/Kg de aceite)	
	ÍNDICE DE PERÓXIDOS (m.e.q O ₂ /Kg de aceite)	ABTS	DPPH
A ₀	7,24±0,06	1,59±0,13	0,05±0,30
A ₁	11,90±0,60	1,71±0,20	0,09±0,10
A ₂	9,93 ±0,14	1,81±0,40	0,13±0,20
A ₃	10,90±0,51	1,78±0,40	0,11±0,10
A ₄	11,24±0,60	1,72±0,20	0,10±0,30

4.4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE RESPECTO AL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN EL ACEITE DE SEMILLA DE UVA SIN Y CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

En las Figuras 28, 29 y 30 se muestra los rendimientos de extracción del aceite de semilla de uva por extracción convencional (sin enzimas) y con tratamiento enzimático, respecto a los valores de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante obtenidos de las muestras de aceite analizadas, observándose que el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante aumenta con respecto al rendimiento de extracción dado, siendo esto corroborado por el coeficiente de correlación Pearson, donde sus coeficientes de correlación (r) son mayores a cero ($r > 0$), existiendo por lo tanto una correlación positiva entre los valores evaluados. Por otro lado, se muestra la acción positiva del tratamiento enzimático, sobre el rendimiento y el aumento de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante respecto a un prensado hidráulico convencional, siendo la muestra de aceite con 0,5 por ciento de concentración enzimática, relación materia prima: agua (2:1) y tiempo de incubación de 18 horas (A₂), el que obtuvo el mejor valor de las muestras analizadas.

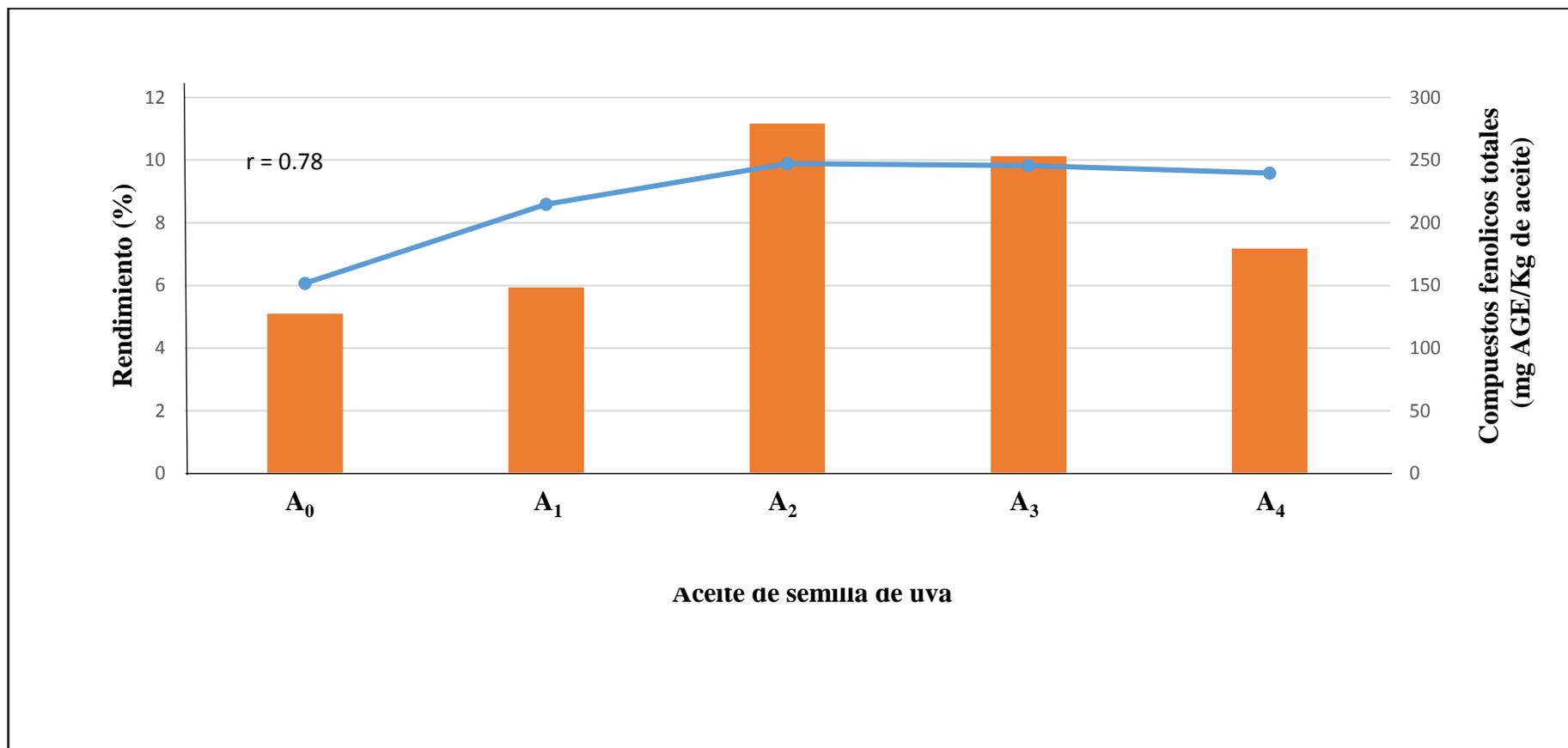


Figura 28: Correlación entre el rendimiento (%) de extracción y el contenido de compuestos fenólicos en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.

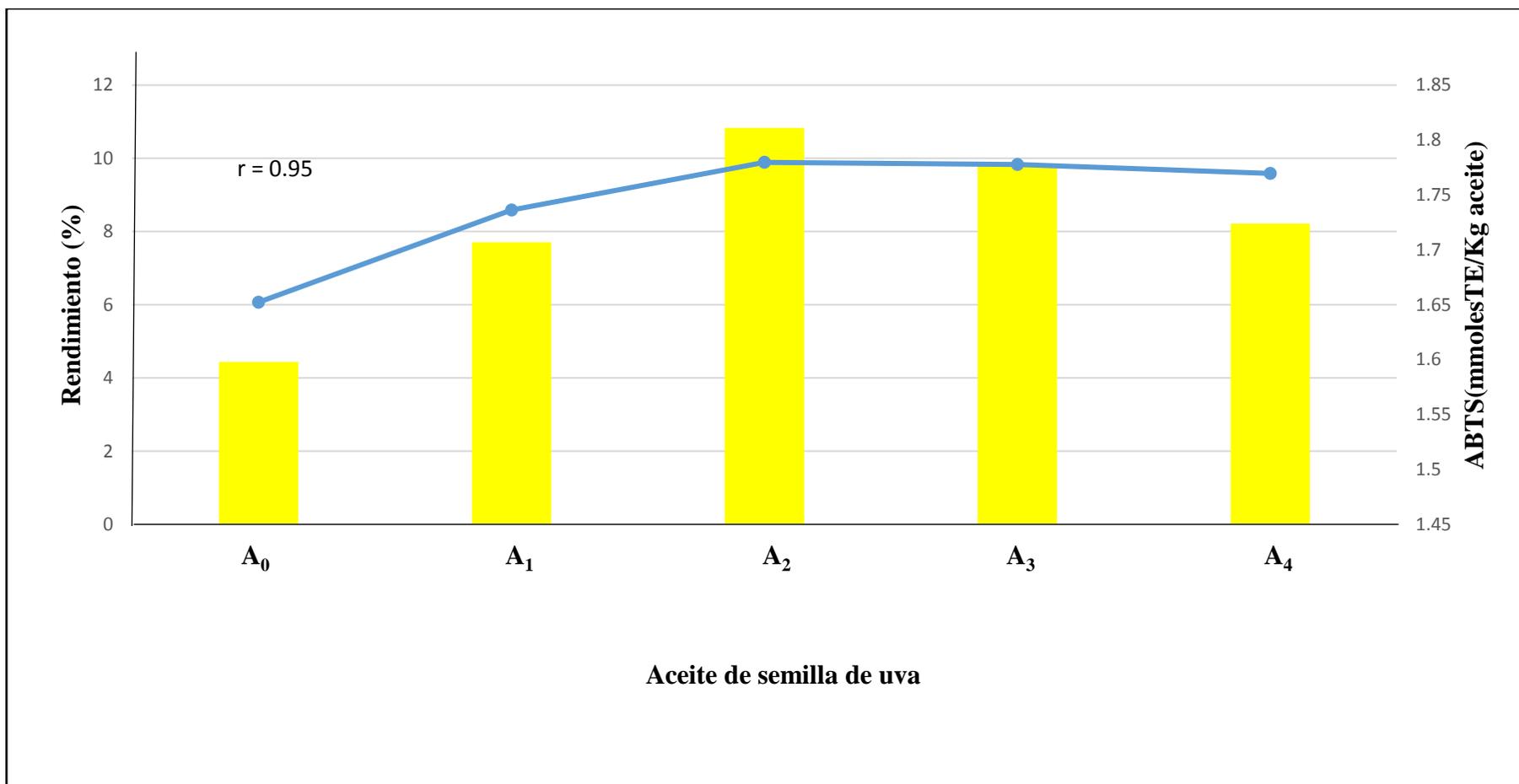


Figura 29: Correlación entre el rendimiento (%) de extracción y los valores de capacidad antioxidante por el método ABTS en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.

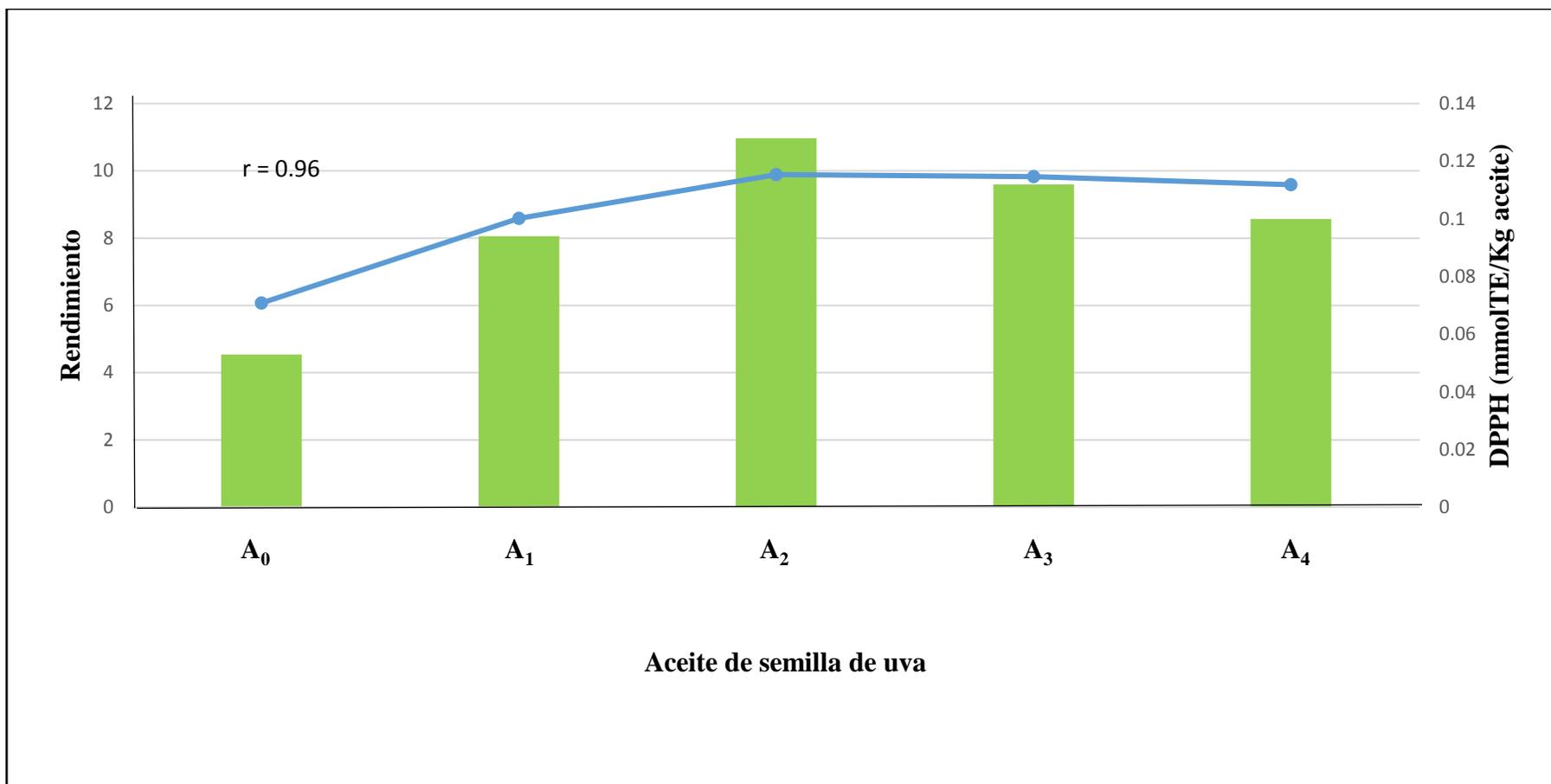


Figura 30: Correlación entre el rendimiento (%) de extracción y los valores de capacidad antioxidante por el método DPPH en el aceite de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático.

La actividad enzimática de la celulasa observada en los aceites analizados, es explicado por Chacón y Waliszewski (2005), quienes mencionan que el uso de algunos preparados celulósicos en el proceso de extracción ha tenido un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción del aceite, y a su vez durante la extracción puede liberarse compuestos antioxidantes a través de la membrana semipermeable, los cuales impiden la oxidación del aceite; así también Garrido *et al.*, citado por Chacón y Waliszewski (2005), menciona el efecto positivo de los preparados enzimáticos para la extracción del aceite de oliva, donde atribuye la capacidad de las enzimas de degradar los componentes de la pared celular del olivo, lo cual facilitó y mejoró la extracción de los compuestos fenólicos en el aceite.

En cuanto a las variables de tiempo y temperatura de incubación del tratamiento enzimático, se observa en las figuras antes presentadas, que a una concentración E/S del 2 por ciento y tiempo de 18 horas, el rendimiento y por ende el contenido de fenoles y capacidad antioxidante disminuyen respecto a las demás muestras de aceite con tratamiento enzimático analizados. Este efecto fue estudiado por Farah *et al.* (2013) en el aceite de cebolla tratado enzimáticamente, respecto al contenido de fenoles a diferentes enzimas, temperatura y tiempo de incubación; del cual resultó que para la mezcla amilasa y celulasa (2 por ciento) con temperaturas de incubación 35 °C y 50 °C para 8 y 16 horas (por cada temperatura) obtuvieron mejores valores en fenoles totales con 5,90 mg/mL para 35 °C y 8 horas y 5,50 mg /mL con 50 °C y 16 horas ; sin embargo a un tiempo mayor a 24 horas y a temperaturas de 35 °C, 50 °C y 65 °C para adelante disminuye el rendimiento y por ende el contenido de fenoles en el aceite; por lo que al aumentar el aumentar el tiempo de incubación o extracción por encima de 16 horas podría bajar la actividad enzimática, dependiendo de las condiciones dadas.

En cuanto a la concentración y tipo de enzima empleada, es importante recalcar que los tipos de enzimas que se emplean también tienen mucha influencia en la extracción y compuestos fenólicos, ya que si bien pueden tener un buen rendimiento en extracción , su contenido de fenoles extraído puede ser menor , como es el caso para el aceite de linaza citado por (F. Anwar *et al.* 2013), donde se aplicó tres enzimas diferentes a concentraciones del 2 por ciento, a 40 °C por un tiempo de 6 horas al 50 por ciento de humedad, de las cuales los valores en rendimiento por cantidad de aceite extraído fueron 38 por ciento (Viscozyme L), 35,20 por ciento (Feedzyme) y 36,50 por ciento (Kemzyme) , sin embargo el contenido de fenoles totales (mg AGE/100 g) y actividad antioxidante (%)

DPPH) en el aceite son: 10,50 mg AGE/100 g, 50,03 por ciento (Viscozyme L); 9,70 mg AGE/100 g, 45,30 por ciento (Feedzyme) y 8,61 mg AGE/100 g, 43,01 por ciento (Kemzyme), donde la enzima Kemzyme a pesar de tener un mayor rendimiento en extracción del aceite , presenta el menor valor de fenoles totales y actividad antioxidante del grupo; por lo que el tipo de enzima así como la concentración empleada puede tener un comportamiento inverso o directo respecto al contenido de fenoles antioxidantes, lo cual para el presente estudio no fue el caso; haciendo hincapié a lo citado anteriormente por Chacon y Waliszewski (2005) , donde mencionan que la actividad enzimática depende de las condiciones de predisgestión (contenido de humedad de la semilla, concentración de enzima e hidrólisis enzimática) que se le dé a la respectiva materia prima oleaginosa antes de su extracción.

V. CONCLUSIONES

- El mayor contenido de compuestos fenólicos totales en los aceites de semilla de uva fueron los tratados enzimáticamente, siendo la muestra de aceite A₂ la que obtuvo el mayor valor con 279,19 mg AGE/Kg frente a las demás muestras analizadas.
- Se logró identificar y cuantificar la mayor presencia de compuestos fenólicos en el aceite de semilla de uva por tratamiento enzimático como: ácido caféico (0,13 µg/g aceite), ácido cinámico (0,17 µg/g aceite) y hesperitina (0,03 µg/g aceite), frente al aceite sin enzimas con valores menores de 0,12 y 0,11 µg/g aceite para los ácidos cafeico y cinámico, respectivamente.
- La mayor capacidad antioxidante determinado en el aceite de semilla de uva por el método ABTS (fase lipofílica) fueron en el tratamiento enzimático, donde la muestra de aceite A₂ fue la que obtuvo el mayor valor (1,81 mmoles TE/Kg) respecto a las demás muestras analizadas.
- La mayor capacidad antioxidante por el método DPPH (fase hidrofílica) fue en los aceites de semilla de uva con tratamiento enzimático, donde la muestra de aceite A₂ fue la que presentó el mayor valor (0,13 mmoles TE/Kg) respecto a las demás muestras de aceite evaluadas.
- Los valores de capacidad antioxidante reportados por el método ABTS fueron mayores a los del método DPPH, debido a la fase y condiciones de análisis evaluadas por ambas técnicas.
- El rendimiento de extracción presentó una relación directa respecto al contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, donde los aceites con mayor rendimiento en extracción fueron los que tuvieron valores mayores en los análisis antes mencionados.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio más profundo para identificar y cuantificar la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales presentes en el aceite de semilla de uva por la metodología HPLC o Espectro-Masa.
- Evaluar la capacidad antioxidante mediante otros métodos: ORAC, FRAP; así como también mediante técnicas *in vivo*; con el fin de tener un estudio más detallado de esta capacidad en el aceite de semilla de uva.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrobanco. 2008. Cultivo de la uva (en línea). Consultado 20 oct. 2013. Disponible en http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/4_cultivo_de_la_uva.
- Alarcón, Mi; Romero-González, R.; Garrido, A; Martínez, JL. 2012. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 134:2465-2472.
- Alcolea, JF; Cano, A; Acosta, M. 2002. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes. *Nahrung* 46:353-356.
- Alfaro, MM. 2009. Estudio de reactividad de luteolina en su estado libre y formando complejos de inclusión con ciclodextrinas. Tesis Lic. Santiago, Chile, Universidad de Chile.
- Antolovich, M; Prenzler, Pd; Patsalides, E; Mcdonald, S; Robars K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127:183-98.
- Anwar, F; Zreen, Z; Sultana B; Jamil, A. 2013. Enzyme-aided cold pressing of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.): enhancement in yield, quality and phenolics of the oil. *Grasas y Aceites* 64(5):0017-3495.
- AMPEX (Asociación Macro regional de productores para la exportación, Perú). 2008. Perfil de producto uva. Consultado 10 jul. 2013. Disponible en <http://www.ampex.com.pe>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry, EUA.). 1995. Official methods of analysis.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry, EUA.). 1998. Official methods of analysis.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry, EUA.). 2007. Official methods of analysis.

- Ashraf-Khorassani M; Taylor L. 2004. Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols and procyanidins via a single system employing CO₂ based fluids. *J. Agric Food Chem* 52: 2440-2444.
- Arango, AG. 2010. Introducción al metabolismo secundario: compuestos derivados del ácido shikimico. Medellín, Colombia, Universidad de Antioquia.
- Arts, I; Hollman, P. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American J. Clin Nutr* 81:3175-3255.
- Bagchi, D; Garg A.; Krohn, R. L.; Bagchi, M.; Tran, M X; Tohs, SJ. 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Patholarmacol* 95: 89–179.
- Bail, S; Stuebiger, G; Krist, S; Unterweger, H; Buchbauer, G. 2008. Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 108: 1122-1132.
- Bernardini, E. 1981. Tecnología de aceites y grasas. 1 ed. Madrid, España, Alambra.
- Berradre, M; Arias, N; Ojeda De RG; Sulbarán, B; Fernández, V; Peña, J. 2014. Actividad antioxidante del aceite de semillas de uva (*Vitis vinífera*) de la variedad Tempranillo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 31: 393-406.
- Bockisch, M. 1993. Nahrungsfette und Ole. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- Bombardelli, E y Morazzoni, P. 1995. *Vitis vinífera*: a review. *Fitoterapia* 66 (4): 291-317.
- Brand-Williams, W; Cuvelier ME; Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technol* 28: 25 - 30.
- Budavari, S. 1996. The Merck Index, 12th Ed., Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., pp. 520: 1643–1644.
- Burns J.; Gardner, PT; Oneil, J; Crawford, S.2000. “Relationship among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity, and Phenolic Content of Red Wines”, *J Agric Food Chem* 48-220.
- CEDEP. 2007. Manual de la vid Quebranta. Proyecto: “Competitividad y desarrollo de liderazgo con equidad de género de los pequeños (as) productores (as) agrícolas del distrito de Ocucaje en la Región de Ica”. En convenio con la Unión Europea y APROLAB.

- Chamy, R; Domínguez, H; Franco, D; Lema, JM; López, MA; Moure, A; Núñez, MJ; Santamaría, RI; Sineiro, J; Soto, C; Zúñiga, Me. 2001. Enzyme-aided alternative processes for the extraction of oil from *Rosa rubiginosa*. *J Am Oil Chem Soc* 8: 437-439.
- Chacon, O; Waliszewsk.2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Universidad y Ciencia* 21 (42): 111-120.
- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 223S–229S.
- Choi, Y & Lee, J. 2009. Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction. *Food Chemistry* 114: 1386–1390.
- CODEX STAN 19-1981 (Rev. 2-1999). Norma del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales P 1-5.
- CODEX-STAN 210. Enmendado 2003, 2005. Norma del CODEX para aceites vegetales especificados.
- Codoceo, R; Muñoz, RA. 1999. Vitaminas liposolubles: vitaminas A, E y K, en Hernández M., Sastre A. (Ed.) *Tratado de Nutrición*, 177-202. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España.
- Collao, CA; Curotto, E; Zúñiga, ME.2007. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* 58(1): 0017-3495.
- Concha, J; Soto, C; Chamy, R; Zúñiga, ME.2004. Effect of Enzymatic Pretreatment on Rose Hip Oil Extraction: Hydrolysis and Pressing Conditions. *J Am Oil Chem Soc* 81(6): 550-552.
- Crews, Colin; Hough, Patrick; Godward, John; Brereton, Paul; Lees, Michelle; Guiet, Sebastien; Winkelmann, Wilfried. 2006. Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin Central Science Laboratory, United Kingdom, Eurofins Scientific. *J Agric Food Chem* 54: 6261-6265.
- Curotto, M. 2006. Estudio de la influencia de la cocción y el secado de algunos compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de tres variedades de arracacha. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Decker, E.1995. The role of phenolic, conjugated linoleic acid, carnosine and pyrroloquinoline as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews* 53: 49-48.
- Díaz, FO. 2007. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de “*Aloysia triphylla (L’Her) Britton*”, cultivada en tres regiones de Colombia. Bucaramanga, Colombia, Universidad de Santander.
- Domínguez, H.; Nuñez, Mj; Lema, Jm. 1994. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: A review. *Food Chem* 49: 271-286.
- Farah Salina H; Rinani Shima AR; Masniza M.; Nor Faeizah H.2013. Enzyme assisted aqueous extraction and phenolic antioxidants of onion oil. *International Journal of Science: Environment and Technology* 2(5): 949-955.
- Farías, CA ; Matos, CA. 2009. Influencia de la Temperatura y Tamaño de Partícula en el Proceso de Extracción de Aceite de Semilla de uva (*Vitis vinífera*). Universidad Peruana Unión. *Revista de Investigación Universitaria* 1(1).
- Fernandes, L; Casal, S; Cruz, R; Pereira, J; Ramalhosa, E.2013. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50:161-166.
- Fernández-Pachón, SD; Villaño, A. Troncoso, Y M; García-Parrilla. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *ALAN* 5:1-26.
- Field, JA; Monohan, K; Reed, R.1998.Coupling supercritical CO₂ and subcritical (hot) water for the determination of Dacthal and its acid metabolites in soil. *Anal Chem* 70: 1956.
- Firestone, D.1999. Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes. Champain: AOCS Press.
- Fitó, CM. 2003. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. Tesis Doc. España, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Frankel, N; Meyer, AS.2000. Review the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 80: 1925-4.

- Freccero, E; Pérez, E; Nolasco, S; Crapiste, G. 2006. Acción de las enzimas en la extracción de aceite por solvente. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires UNCPBA. Consultado 20 nov. 2015. Disponible: http://www.asagir.org.ar/asagir2008/pdf_congreso_4/calidad_usos.pdf.
- Gil, MI; Tomás-Barberán, FA; Hess-Pierce, B; Holcroft, DM; Kader, AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric.Food Chem* 48: 4581 - 4589.
- Gimeno, CE. 2004. Compuestos Fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM* 23(6).
- Ghazali, HM; Abdulkarim, SM; Muhammad, SKS; Lai, OM.; Long, K.2005. Use of enzymes to enhance oil recovery during aqueous extraction of moringa oleifera seed oil. *Malasia, University Putra Malaysia*.
- Göktürk, NB; Gülcan, YB; Sema.2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites* 58:29-33.
- González, JF.2010. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía "*Salvia hispanica* l", mediante electroforesis capilar. Tesis Mg Sc. México, Instituto Politécnico Nacional.
- Gorinstein, S; Martin-Belloso, O; Katrich, E; Lojek, A; Ciz, M; Gligelmo-Miguel N; Haruenkit, R; Park, YS; Jung, ST; Trakhtenberg, S.2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J Nutr Biochem* 14: 154 - 9.
- Govea, S; Zugasti, C; Silva, B; Valdivia, U; Rodríguez, H.; Aguilar, G; Morlett, C.2013. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 5 (9).
- Grotewold, E.2005. *The Science of Flavonoids*, Springer, Nueva York, Estados Unidos.
- Guerra, EG; Zúñiga, ME. 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pepa de uva, *Vitis vinifera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* 54: 53-57.
- Haiyan, Z; Bedgood, DR; Bishop, A; Prenzler, P and Robards, K. 2007. Endogenous biophenols, fatty acids and volatile profiles of selected oils. *Food Chemistry* 100:1544 – 1551.

- HANNA instruments. Determinación del índice de peróxidos. Consultado 01 nov. 2016. Disponible en: <http://www.hannainst.es/blog/determinacion-del-indice-de-peroxidos/>.
- Harrison, HF; Peterson, JK; Snook, ME; Bohac, JR; Jackson, DM .2003. Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato (*Ipomea batatas (L.) Lam.*) storage root periderm. J Agric Food Chem 51: 2943-2948.
- Hoffmann, G. 1989. The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products. Food Science and Technology: a series of monographs. p. 29-137
- Hubert, A; Wenzel, K-D; Manz, M; Weissflog, L.2000. High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction. Anal Chem 72: 1294.
- ICEX.2012. El Mercado de Vino en el Perú. Consultado 19 ago. 2013. Disponible en: <http://www.oficinascomerciales.es>.
- Iconomou, D; Arapoglou, D; Israilides, C.2010. Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. Grasas y Aceites 61: 303-311.
- Inakuma, T; Yasumoto M.; Koguchi, M; Kobayashi, T.1998. Effect of drying methods on extraction of lycopene in tomato skin with supercritical carbon dioxide. J Jap Soc Food Sci & Technol 45:740.
- Ivekovic, D; Milardovic, S; Roboz, M; Grabaric, BS. 2005. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. Analyst 130: 708-14.
- Kanu, PH; Zhu, K; Kanu, JB; Zhou, H; Quian, H; Zhu, K .2007. Biologically active components and nutraceuticals in sesame and related products: a review and prospect. Food Science & Technology 1-10 p.
- Kashif, Ghafoor; Fahad, Al-Juhaimi; Yong, Heechoi. .2011. Effects of grape (*Vitislabrusca B*). Peel and seed extracts on phenolics, antioxidants and anthocyanins in grape juice. King Saud University. Pak J Bot 43(3): 1581-1586.
- Krizkova, L; Nagy, M; Polonyi, J; Dobias, J; Belicova, A; Grancai, D; Krajcovic, J. 2000.Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. Mutation Research 469(1): 101-104.

- Keinanen, M; Julkuentiitto, R.1996. Effect of sample preparation method on Birch (*Betula pendula Roth*) leaf phenolics. J Agric Food Chem 44: 2724.
- Larrea, A. 1978. De la Vid al Vino. Editorial Aedos. Barcelona, España.
- Laroze, L; Zúñiga, M.E; Soto, C. 2010. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by enzymes. Electronic Journal of Biotechnology. DOI: 10.2225/(3)-issue6-fulltext-12.
- Lawson, H. 1999. Aceites y grasas alimentarias: Tecnología utilización y nutrición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Li, Z; Zhang, L; Tian, J; Zhou, W. 2008. Studies on chemical constituents from leaves of *Vaccinium bracteatum*. China Journal Of Chinese Materia Medica (Zhongguo Zhong Yao Za Zhi) 33(18):2087-2089.
- Lúquez, C; Formento, J. 2002. Flor y Fruto de Vid (*Vitis vinífera L*).Micrografía aplicada a Viticultura y Enología. Rev. FCA UNCUYO 24(1).
- Maier, T; Schieber, A; Kammere, D; Carle, R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera L*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. Food Chem. (112):551-559.
- Matthäus, B. 2008. Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight. Eur. J Lipid Sci. Technol.
- Marfil, R. 2008. Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*). Tesis Doc. España, Universidad de Granada.
- Martínez-Flórez, S; González-Gallego, J; M. Culebras J; Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp 7 (6) 271-278.
- Meyer, Justin and R, Hernandez .1970. Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. Am. Journal of Enology and Viticulture. 21(4) 184-188.
- Meyer, AS; Jepsen, SM; Sorensen, NS. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. J Agric Food Chem 46: 2439–2446.
- Milner, JA. 2004. Molecular targets for bioactive food components. Journal of Nutrition. 13(9): 2492S-2498SS.
- Miller, NJ; Diplock, AT; Rice-Evans, C; Davies, MJ; Gopinathan, V; Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 84: 407-412.

- Molero, GA; Pereyra, LC; Martinez De La Ossa E. 1995. Optimización del proceso de extracción del aceite de semilla de uva con dióxido de carbono líquido y supercrítico. *Alimentación. Equipos y Tecnología* (12): 35–40.
- Morin, O. 1996. Corn and grape seed oil. In A. Karleskind (Ed.); *Oil and fats manual*. Hampshire, Andover. 143–146 pp.
- Muñoz, A; Ramos-Escudero, D; Álvaro Ortiz C; Castañeda, B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista Sociedad Química Del Perú* 73(3): 142-149.
- Muñoz, JA; Escudero, RF; Ortiz, UC; Castañeda, CB; Mendoza, Be; Farfán, YI; Asencio, Cd. 2010. Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en semilla de sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*). *Rev Soc Quím Perú* 76 (3): 234-241.
- Müller, A; Björklund, E; Van Holst, C. 2001. On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 925: 197.
- Navas, P. 2009. Composición química de aceites virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades de uva (*Vitis vinífera L.*) con énfasis en los componentes minoritarios. *Archivos Latinoamericanos de nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* 50(2).
- Navas, HP. 2010. Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. Tesis Doc. Ciudad Real, España, Universidad de Castilla La Mancha.
- Necochea, VO. 2012. Caracterización de los compuestos fenólicos de la cáscara y torta del grano de sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Tesis Lic. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Norris, FA. 1982. Extraction of fats and oils. In: Swern, D. (ed.) *Bailey's industrial oil and fat products*. 2, 178253, John Wiley and Sons Inc. Canadá.
- Owen, R; Mier, W; Giacosa, A; Hull, We; Spiegelhalder, B, Bartsch, H. 2000. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry* 46(7): 976-988.

- Padley, FB; Gunstone, FD; Harwood, JI.1994. Occurrence and characteristics of oils and fats. In: The Lipid Handbook. 2nd edition, Gunstone, F., D., Harwood, J., L., Padley, F., B (Eds). Chapman & Hall, London.88-113p.
- Paladino, SC. 2008. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinífera L*).Tesis Mg. Mendoza, Argentina, Universidad Nacional de Cuyo.
- Palma, M; Taylor, Lt.1999. "Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide". J Chromatogr A 849:117.
- Pellegrini, N; Visioli, F; Buratti, S; Brighenti, F. 2001. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. J Agric Food Chem 49: 2532-2538.
- Pérez, DD; Leighton, F; Aspee, A; Aliaga, C; Lissi, E. 2000. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. Biol Res 33(2):71-7.
- Piñeiro, MZ. 2005. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. Tesis Doc. Puerto Real, España. Universidad de Cádiz.
- Pokorny.2001. Antioxidantes de los Alimentos. Editorial Acribia. S.A. España.
- Popp, M; Lied, W; Meyer, Aj; Richter, A.1996. "Sample preservation for determination of organic compounds: Microwave versus freeze-drying", J. Experim. Botany 47: 1469.
- Poquet, L; Clifford, M.N; Williamson, G.2010. Bioavailability Of Flavonols And Phenolic Acids. En: Fraga C. Editor. Plants phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Wiley, Hobokenn.
- Poudel, PH; Tamura, I; Kataoka, YR; Mochioka. 2008. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. J Food Compos Anal 21:622–625.
- Pratt, D. 1992. Natural antioxidant from plant material. In. Huang, M.T., Ho, C.T. and Li, C.Y. Eds. ACS Symposium Series 507. Phenolic compounds in food and their effect on Heat II.
- Prior, RL; Wu, X; Schainch, K.2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53:4290 - 4292.

- Puupponen-Pimiä, R; Nohynek, L; Meier, C; Kähjönen, M; Heinomen, M; Hopia, A; Oksman-Caldentey, K. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90(4): 494-507.
- Rapport, L; Pharm, B; Pharm, M; Lockwood, B. 2001. Proanthocyanidins and grape seed extract. *The pharmaceutical journal* 266: 581-584.
- Repo De Carrasco, R; Encina, RC. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Rev Soc Quím* 74(2).
- Rezig, L; Chouaibi, M; Msaada, K and Hamdi, S. 2012. Chemical composition and profile characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products* 37: 82–87.
- Romero, Ci. 2008. Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino y papel de las enzimas de maceración. Tesis doc.España.Universidad de Murcia.
- Rombauta,N; Savoiera, R; Thomasset, B; Castello, J; Van Hecke E; Lanoisellé, L. 2015. Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grapeseed cold screw pressing. *Industrial Crops and Products* 63: 26-33.
- Rodríguez, Mps; Silva, Ras; Carrillo Inungaray, MI. 2011. Caracterización fisicoquímica del aceite de nuez de Macadamia (*Macadamia integrifolia*). *CyTA: journal of food* 9 (1): 58-64.
- Roohbakhsh, A; Parhiz, H; Soltani, F; Rezaee, R; Iranshahi, M. 2014. "Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin — A mini-review". *Life Sciences* 113 (1–2): 1–6. doi:10.1016/j.lfs.
- Rubio, M; Pardo, Je. Álvarez-Orti, M; Alvarruiz, A; Fernández, E.2008. Determinación de la humedad y del rendimiento de extracción del aceite de granilla de la variedad “Cencibel” recogida a lo largo del desarrollo de la uva. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA). Universidad de Castilla la Mancha. España.
- Salim, ML; Zommará, M; Imaizumi, K. 2005. Dietary supplementation with *Cyperus esculentus* L (Tiger nut) tubers attenuated atherosclerotic lesion in apolipoprotein E knockout mouse associated with inhibition of inflammatory cell responses. *American Journal of Immunology* 1 (1): 60-67.

- Slavin, Mz; Cheng, M; Luther, W; Kenworthy, Lyu.2009. Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Marylandgrown soybean lines with altered fatty acid profiles. *Food Chem* 114: 20-27.
- Samaniego, S. 2006. Estudio y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Aceites de Oliva Virgen Extra. Implicación en la Salud. Tesis Doc. Granada, España, Universidad de Granada.
- Samaniego, C; Troncoso, Am; García-Parrilla, MC; Quesada, JJ; López, H; López, MC. 2007. Different radical scavenging test in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta* 593:103-107.
- Sánchez, MH. 2010.Evaluación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y actividad antimutagénica de los extractos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) y yacón (*Smallanthus sonchifolius*). Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Sánchez, S; Paniagua, L. 2008. Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. Tesis Doc. España. Universidad Complutense de Madrid.
- Santamaría, RI; Soto, C; Zúñiga, ME; Chamy, R; López Munguía, A.2003. Enzymatic extraction of oil from gevuina avellana, the Chilean hazelnut. *J Am Oil Chem Soc* 80 (1): 33-36.
- Santiago, R; Malvar, R; Baamonde, M; Revilla, P; Souto, X.2005. Free phenols in maize pith and their relationship with resistance to *Sesamia nonagrioides* (*Lepidoptera: Noctuidae*) attack. *J Econ Entomol* 98(4):1349-1356.
- Santos, S; Moraes, ML; Rezende MO. 2007. Allelopathic potential and systematic evaluation of secondary compounds in extracts from roots of *Canavalia ensiformis* by capillary electrophoresis. *Ecl Quím* 32(4): 13-18.
- Schwartz, K; Bertelsen, G; Nissen, Lr; Gardner, Pt; Heinonen, Mi; Hopia, A; Huynh-Bat; Lambelet, P; Mcpail, D; Skibsted, Lh; Tijburg. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol* 212(3): 319-28.
- Shahidi, F; Nackz, M.2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Pres. Washington DC; EEUU. 483-490 pp.

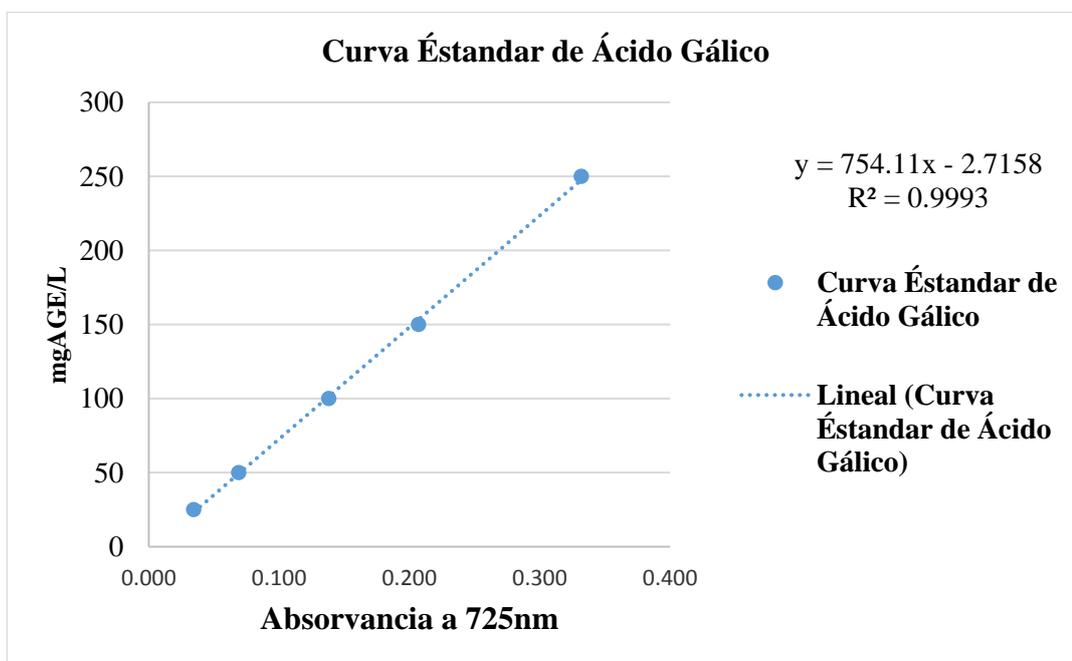
- Siger, A; Nogala-Kalucka, M; Lampart-Szczapa, E.2008. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J Food Lipids* 15:137–149.
- Sineiro, J; Domínguez, H; Núñez, MJ. 1998. Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales. *Grasas y Aceites* 49:191-202.
- Soto, C; Chamy, R; Zúñiga, ME. 2004. Effect of enzymatic application on borage (*Borago officinalis*) oil extraction by cold pressing. *J Chem Eng of Japan* 37:326-331.
- Starke-Reed, P. 2003. Antioxidantes: nutrición del instituto nacional de estudios sobre el envejecimiento. Maryland, Estados Unidos.
- Tobar, RJ. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH Y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis Ing. Pereira, Colombia, Universidad Tecnológica de Pereira.
- Tobar, P; Moure, A; Soto, C; Chamy, R; Zúñiga, ME. 2005. Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an enzyme assisted process. *J Water Sci Technol* 517:47-52.
- Tomas-Barberán, Fa. 2003. Calidad seguridad y bioactividad de alimentos de origen vegetal. *Alimentación, nutrición y salud* 10(2).
- Toro, ZN; Suárez, OL. 2012. Obtención y caracterización del aceite de las semillas de *Vitis labrusca l.* (Uva Isabella) y evaluación de su actividad antioxidante. Tesis Quim. Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Tuberoso, C; Kowalczyk, A; Sarritzu, E; Cabras, P. 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oil seeds for food use. *Food Chem* 103(4):1494-1501.
- Trujillo, N; Durán, D; Hernández, J.2011. Contenido fenólico e identificación de levaduras e importancia vínica de la uva Isabella (*Vitis Labrusca*) procedente de Villa del Rosario (Norte de Santander). Medellín, Colombia, Universidad de Antioquia. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica* 18 (1):17-25.
- Valente, T; Hidalgo, J; Bolea, I; Ramírez, B; Anglés, N; Reguant, J; Morelló, JR; Gutiérrez, C; Boada, M; Unzeta, M .2009. A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *Journal of Alzheimer's Disease* 18(4):849-865.

- Van Babel, B; Hartonene, K; Rappe, C; Riekkola ML.1999. "Pressurised hot water/steam extraction of polychlorinated dibenzofurans and naphthalenes from industrial soil". *Analyst* 124: 1351.
- Vázquez Roncero, A; Janer Del Valle, C; Janer Del Valler, María L. 1973. Determination of total polyphenols in olive oils. *Grasas y Aceites* 24(6):350-357.
- Wang, CC; Chu, CY; Chu, KO; Choy, KW; Khaw, KS; Rogers, MS; Pang, CP. 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem* 50(5): 952-954.
- Wijendran, V; & Hayes, KC. 2004. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition* (24):597-615.
- Zuñiga, ME; Soto, C; Mora, A; Chamy, R; Lema, JM. 2003. Enzymic pre-treatment of Guevina avellana mol oil extraction by pressing. *Process Biochem* 39:51-57.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. CURVAS ESTÁNDAR Y CROMATOGRAMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

a. Curva Estándar para los compuestos fenólicos totales en el aceite de semilla de uva.



$$Y = 754.11 (\text{Abs}) - 2.7158$$

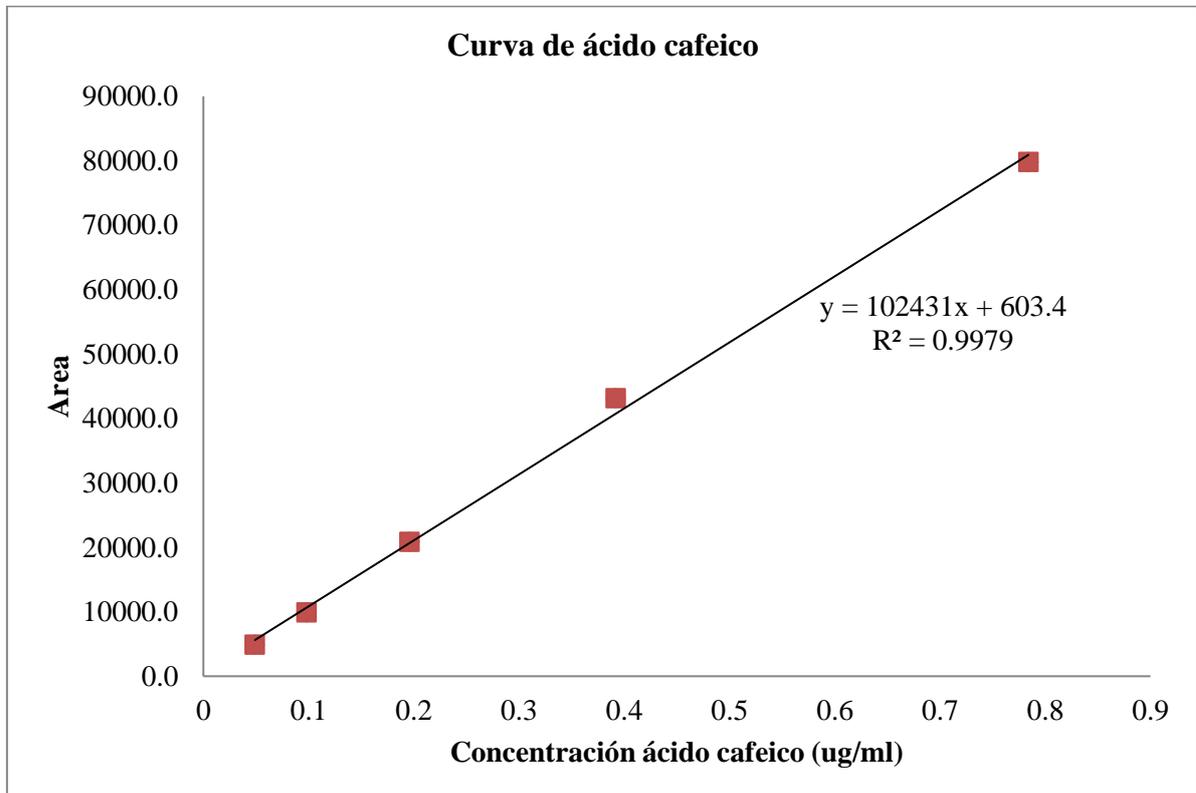
Donde:

Y: mg de ácido gálico equivalente/L (mgAGE/L)

Abs: Absorbancia a 725 nm

b. Curva Estándar para los compuestos fenólicos por HPLC en el aceite de semilla de uva.

b.1 Curva estándar de ácido cafeico para su cuantificación en el aceite de semilla de uva.



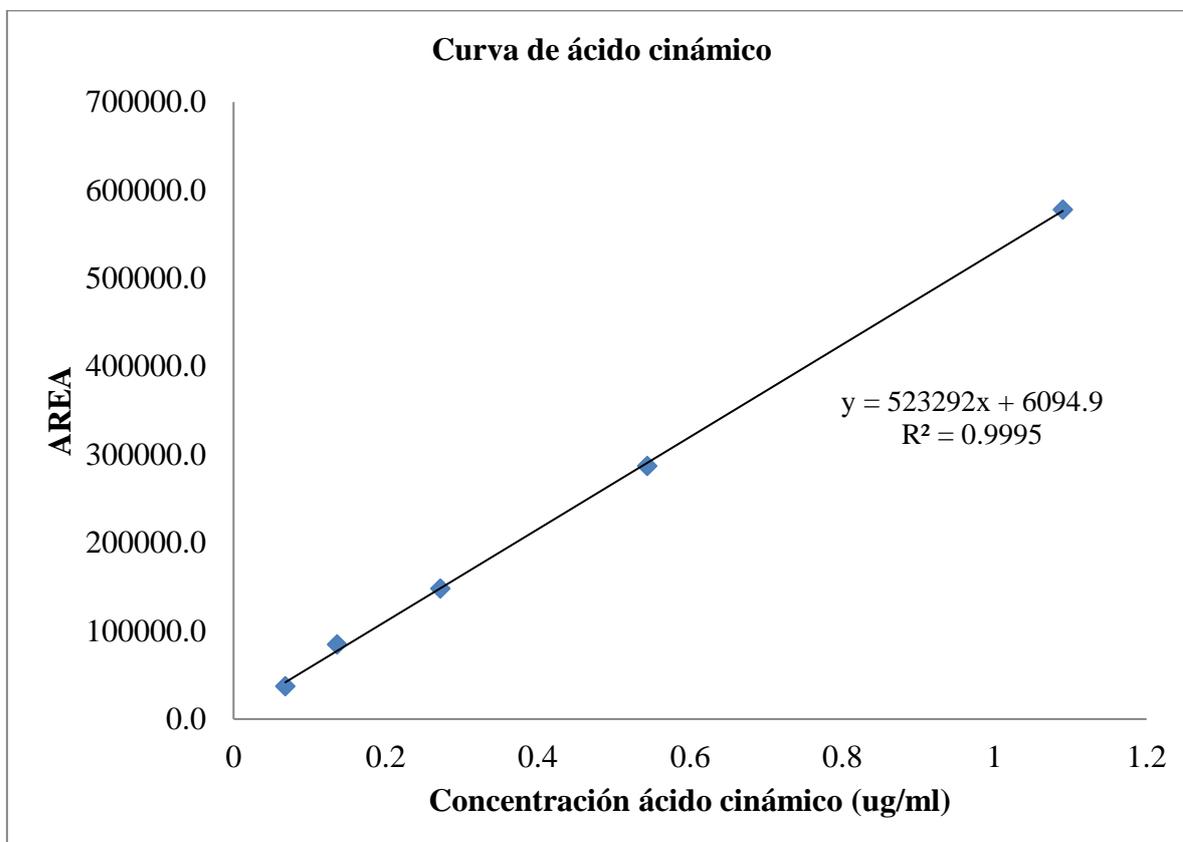
$$Y=102431 X - 603.4$$

Donde:

Y: Área del pico cromatográfico

X: Concentración en $\mu\text{g/mL}$

b.2 Curva estándar de ácido cinámico para su cuantificación en el aceite de semilla de uva.



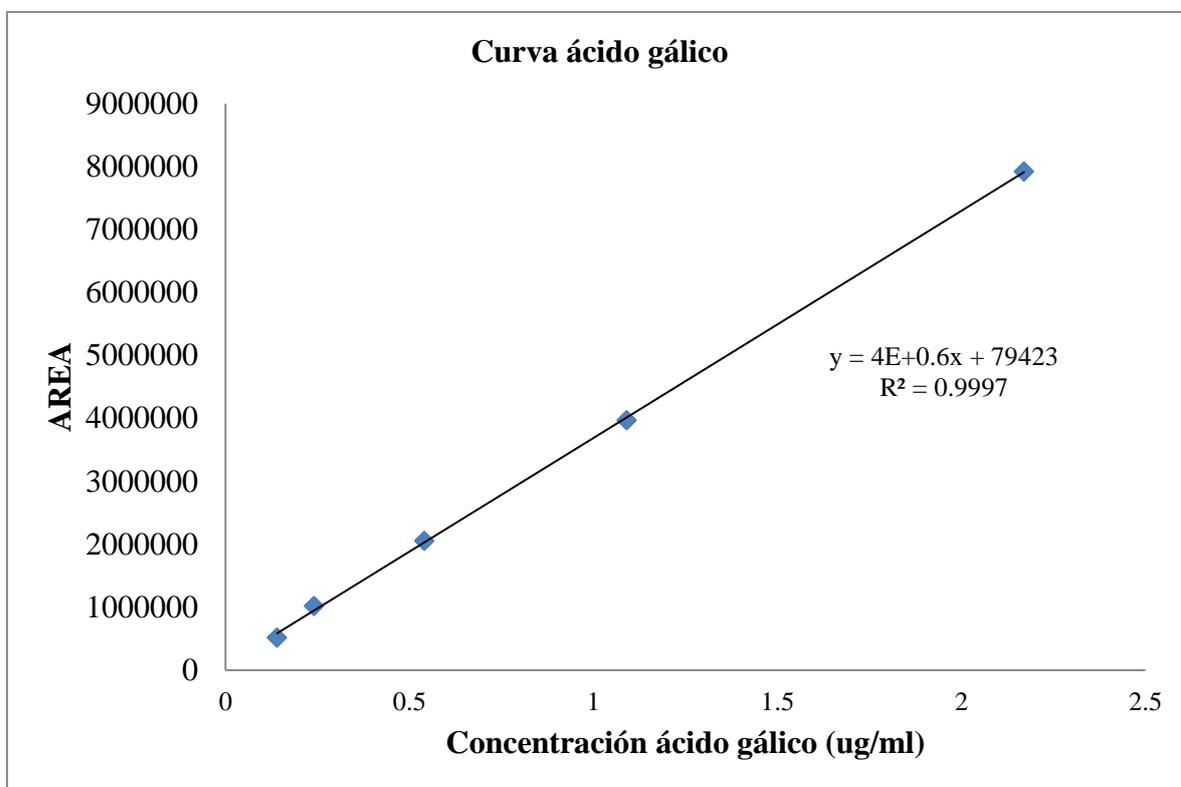
$$Y=102431 X - 603.4$$

Donde:

Y: Área del pico cromatográfico

X: Concentración en $\mu\text{g/mL}$

b.3 Curva estándar de ácido gálico para su cuantificación en el aceite de semilla de uva.



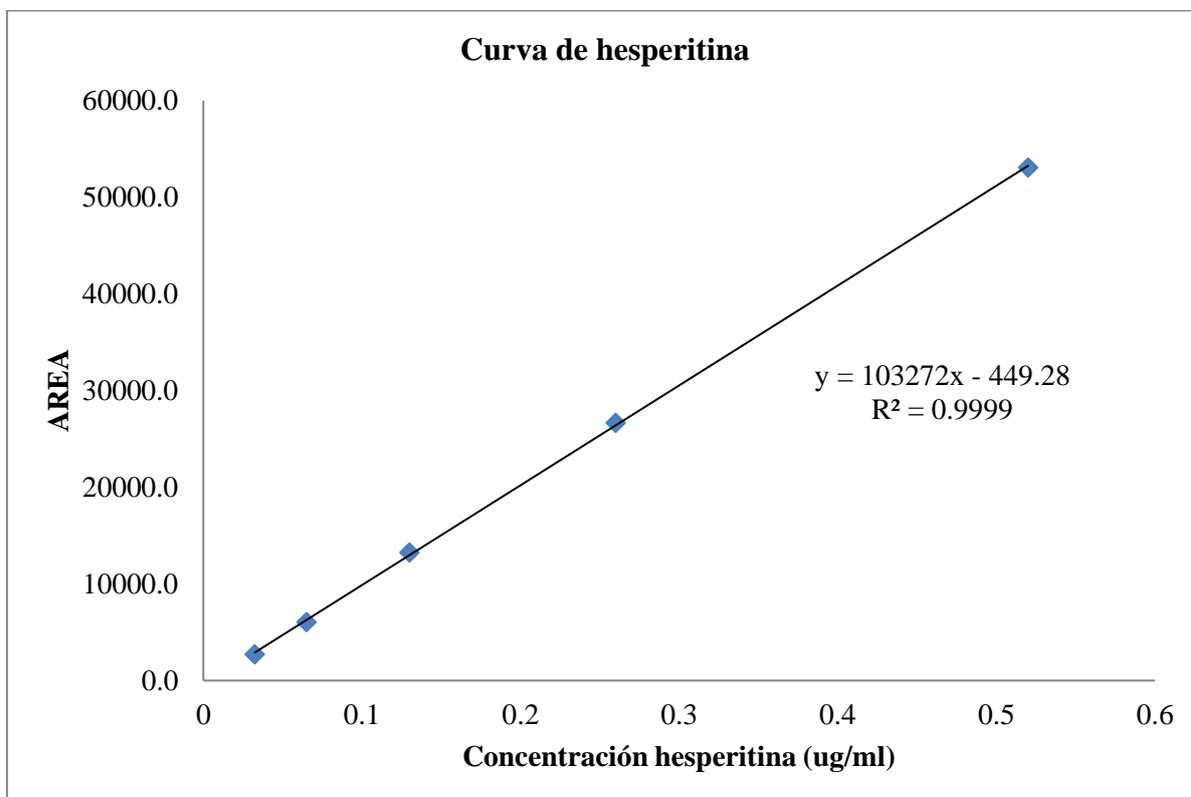
$$Y = 4E + 0.6X + 79423$$

Donde:

Y: Área del pico cromatográfico

X: Concentración en µg/mL

b.4 Curva estándar de hesperitina para su cuantificación en el aceite de semilla de uva.



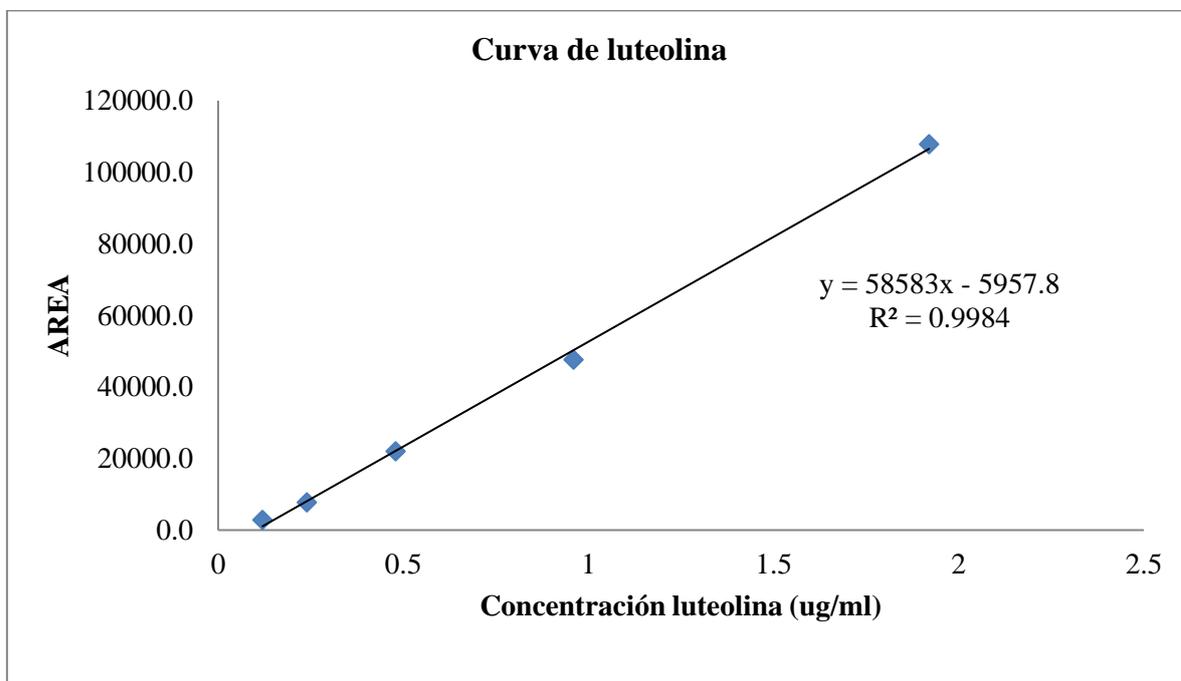
$$Y = 103272X - 449.28$$

Donde:

Y: Área del pico cromatográfico

X: Concentración en $\mu\text{g/mL}$

b.5 Curva estándar de Luteolina para su cuantificación en el aceite de semilla de uva.



$$Y = 58583X - 5957.8$$

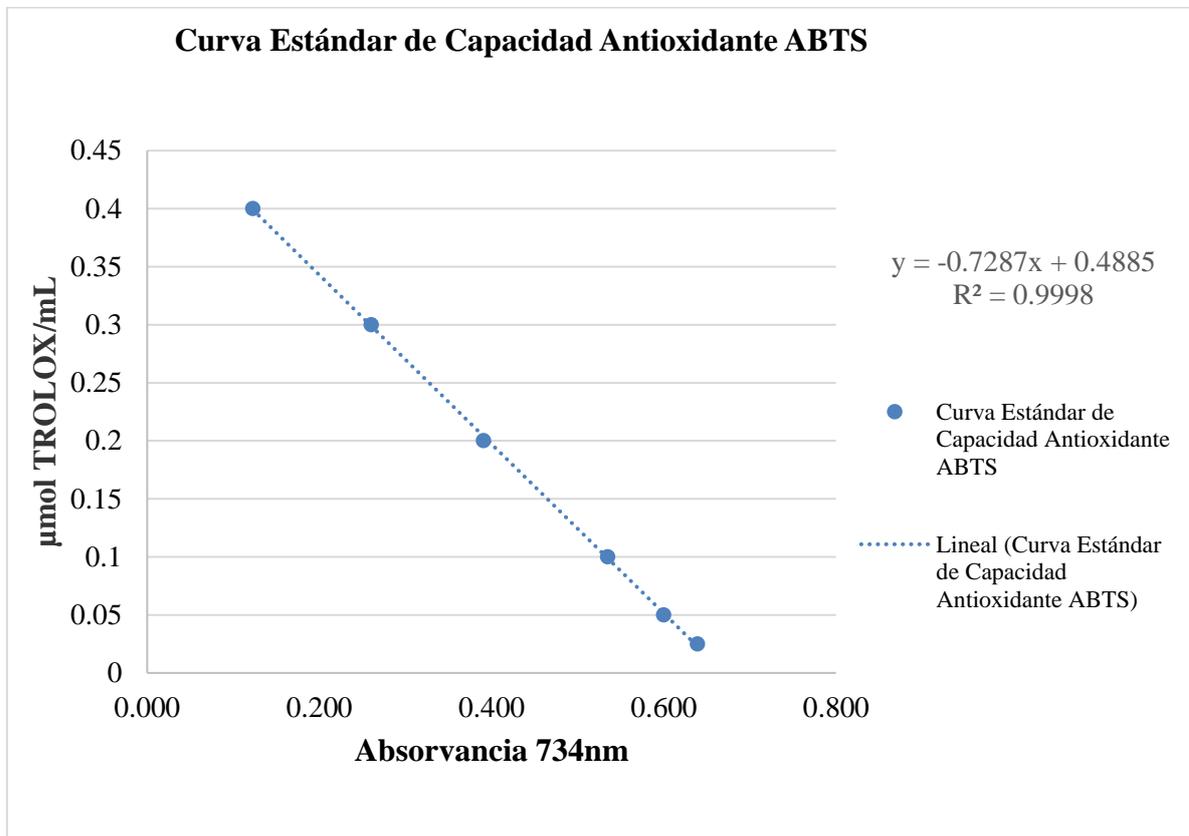
Donde:

Y: Área del pico cromatográfico

X: Concentración en $\mu\text{g/mL}$

c. Curva estándar para la determinación de la capacidad antioxidante.

c.1 Curva estándar de trolox para determinar la capacidad antioxidante en el aceite mediante el método ABTS.



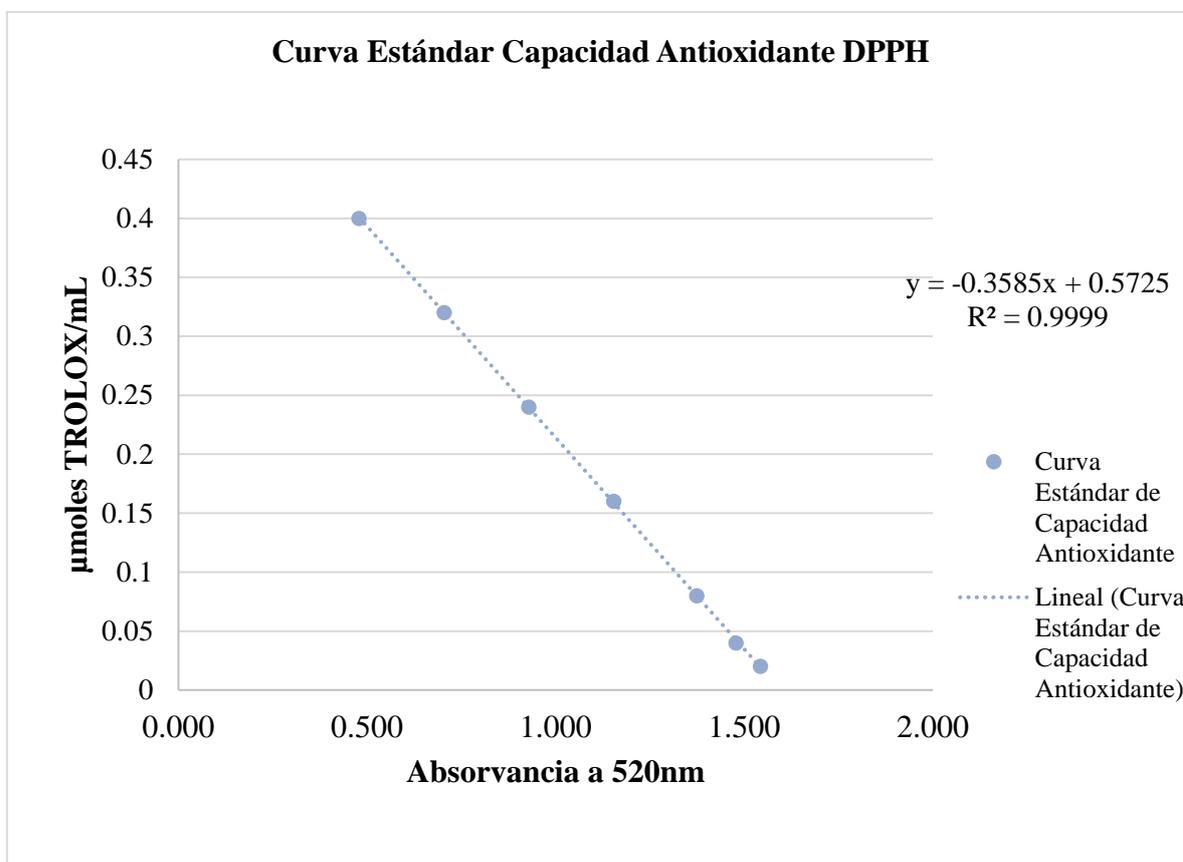
$$Y = -0.7287 (\Delta Abs) + 0.4885$$

Donde:

Y: μmol de Trolox Equivalente/mL

ΔAbs: Absorbancia a 734nm

c.2 Curva estándar para determinar la capacidad antioxidante en el aceite mediante el método DPPH.



$$Y = -0.3585 (\Delta \text{Abs}) + 0.5725$$

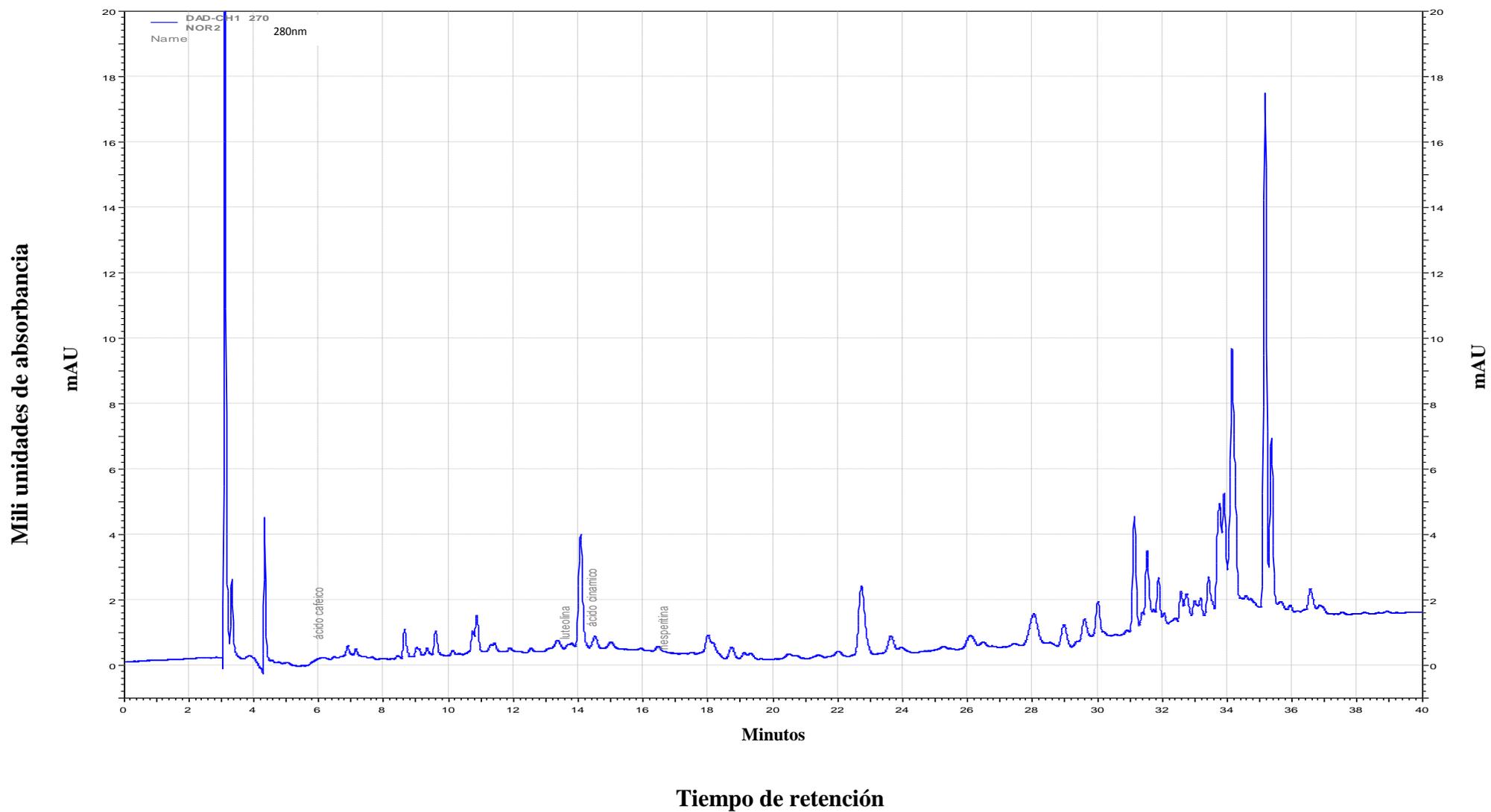
Donde:

Y: μmol de Trolox Equivalente/mL

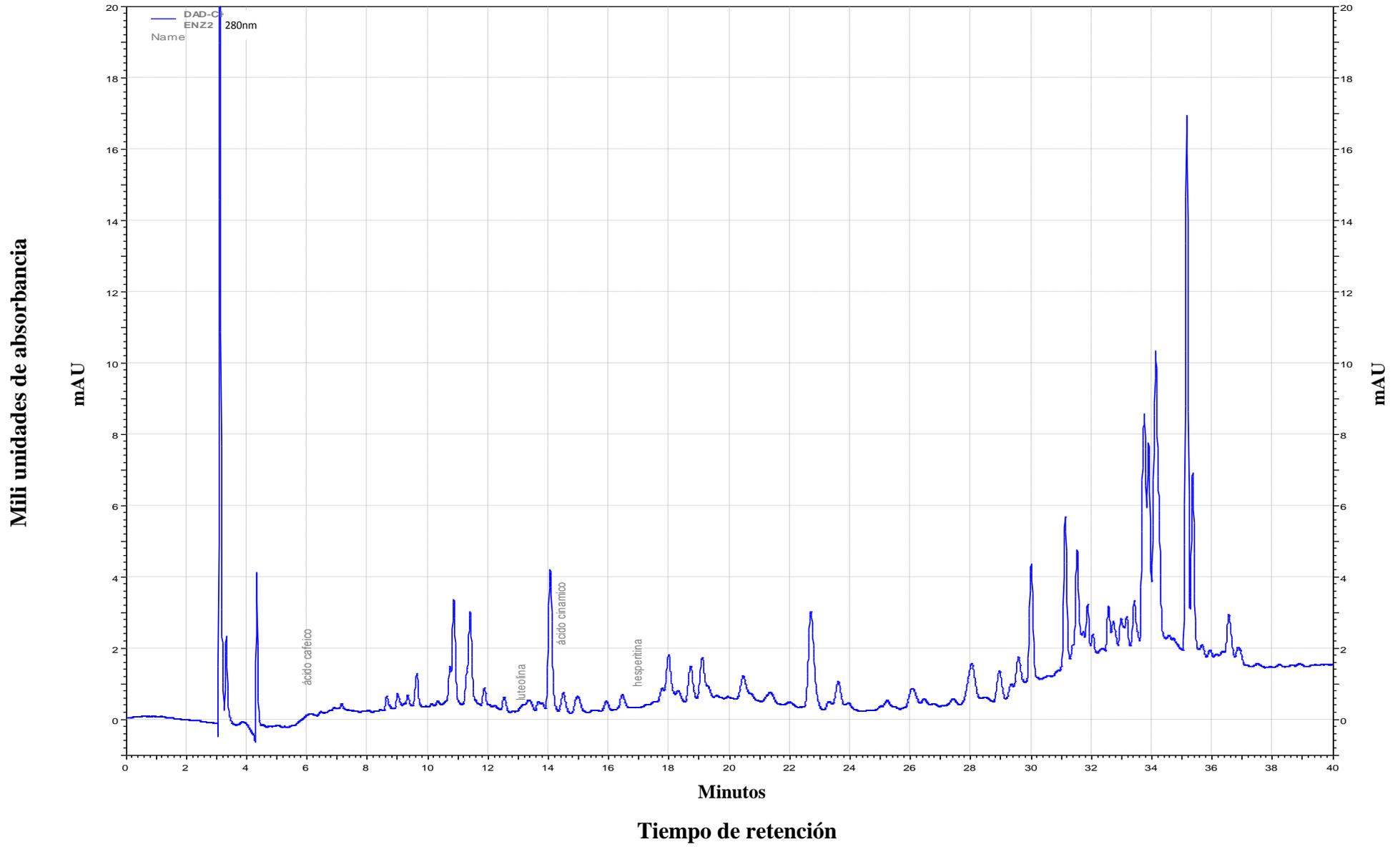
ΔAbs: Absorbancia a 520 nm

d. Cromatograma para la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides en el aceite crudo de semilla de uva sin tratamiento y con tratamiento enzimático

d.1 Sin tratamiento enzimático



d.2 Con tratamiento enzimático



ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Pruebas estadísticas para la comparación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en los aceites de semilla de uva extraídos con y sin tratamiento enzimático.

- a. Análisis de Varianza (ANOVA) simple para compuestos fenólicos totales por Tratamientos (tipo de extracción).

Datos de entrada para el ANOVA.

- **Variable dependiente:** Compuestos fenólicos
- **Factor:** Tratamientos
- **Número de observaciones:** 15
- **Número de niveles:** 5

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Compuestos fenólicos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Compuestos fenólicos para los 5 diferentes niveles de Tratamientos. La prueba-F en el cuadro ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla ANOVA para Compuestos Fenólicos por Tratamientos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	52203,3	4	13 050,8	309,82	0,0000
Intra grupos	421,246	10	42,1246		
Total (Corr.)	52624,6	14			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de Compuestos fenólicos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 309,815, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia

estadísticamente significativa entre la media de Compuestos fenólicos entre un nivel de Tratamientos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó la Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para compuestos fenólicos por tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Uva por Ex. Convencional	3	127,525	X
Uva Celulasa 0.5% 4h	3	148,473	X
Uva Celulasa 2% 18h	3	179,475	X
Uva Celulasa 2% 4h	3	253,21	X
Uva Celulasa 0.5% 18h	3	279,185	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 0,5% 4h	*	130,712
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 2% 18h	*	99,7101
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 2% 4h	*	25,9749
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva por Ex. Convencional	*	151,66
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva Celulasa 2% 18h	*	-31,0023
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva Celulasa 2% 4h	*	-104,737
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva por Ex. Convencional	*	20,9475
Uva Celulasa 2% 4h - Uva Celulasa 2% 18h	*	73,7352
Uva Celulasa 2% 4h - Uva por Ex. Convencional	*	125,685
Uva Celulasa 2% 18h - Uva por Ex. Convencional	*	51,9498

* indica una diferencia significativa.

Este cuadro aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 10 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,0543478	0,993586

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
Uva Celulosa 0,5% 18h / Uva Celulosa 2% 18h	5,23268	6,65063	0,619048	0,7647
Uva Celulosa 0,5% 18h / Uva Celulosa 2% 4h	5,23268	7,67948	0,464286	0,6341
Uva Celulosa 0,5% 18h / Uva Celulosa 0.5% 4h	5,23268	6,32601	0,684211	0,8125
Uva Celulosa 0,5% 18h / Uva por Ex. Convencional	5,23268	6,32601	0,684211	0,8125
Uva Celulosa 0,5% 4h / Uva Celulosa 2% 18h	6,65063	6,32601	1,10526	0,9500
Uva Celulosa 0,5% 4h / Uva Celulosa 2% 4h	7,67948	6,32601	1,47368	0,8085
Uva Celulosa 0,5% 4h / Uva por Ex. Convencional	6,65063	6,32601	1,10526	0,9500
Uva Celulosa 2% 18h / Uva Celulosa 2% 4h	6,65063	7,67948	0,75	0,8571
Uva Celulosa 2% 18h / Uva por Ex. Convencional	6,32601	6,32601	1,0	1,0000
Uva Celulosa 2% 4h / Uva por Ex. Convencional	7,67948	6,32601	1,47368	0,8085

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de compuestos fenólicos dentro de cada uno de los 5 niveles de Tratamientos es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. El cuadro también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0,05, de los cuales hay 0, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

b. Análisis de Varianza (ANOVA) simple para contenido de compuestos fenólicos por tipo de compuesto.

Datos de entrada para el ANOVA.

Variable dependiente: contenido ($\mu\text{g/g}$ muestra)

Factor: compuesto

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 2

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para contenido. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de contenido para los 2 diferentes niveles de compuesto. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

b.1 Ácido cafeico

Cuadro ANOVA por contenido de compuesto fenólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,000 096	1	0,000096	96,00	0,0006
Intra grupos	0,000 004	4	0,000001		
Total (Corr.)	0,0001	5			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de contenido en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 96,0, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido entre un nivel de compuesto y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó la Prueba de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Prueba de múltiples rangos para contenido por compuesto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>compuesto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Ácido cafeico (sin trat. Enzimático)	3	0,118	X
Ácido cafeico (con trat. Enzimático)	3	0,126	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
Ácido cafeico (con trat. Enzimático) - Ácido cafeico (sin trat. Enzimático)	*	0,008

+/- <i>Límites</i>
0,0022669
6

* indica una diferencia significativa.

Este cuadro aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

b.2 Ácido cinámico

Cuadro ANOVA para contenido por compuesto.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,005046	1	0,005046	5046,00	0,0000
Intra grupos	0,000004	4	0,000001		
Total (Corr.)	0,00505	5			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de contenido en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 5046,0 es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido entre un nivel de compuesto y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó la Prueba de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Prueba de múltiples rangos para contenido por compuesto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Compuesto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Ácido cinámico (sin trat. Enzimatico)	3	0,115	X
Ácido cinámico (con trat. Enzimatico)	3	0,173	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
Ácido cinámico (con trat. Enzimatico) - Ácido cinámico (sin trat. Enzimatico)	*	0,058

<i>+/- Límites</i>
0,00226696

* indica una diferencia significativa.

Este cuadro aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

b.3 Hesperitina

Cuadro ANOVA para contenido por compuesto.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0018375	1	0,0018375	3675,00	0,0000
Intra grupos	0,000002	4	5,E-7		
Total (Corr.)	0,0018395	5			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de contenido en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3675,0 es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de contenido entre un nivel de compuesto y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó la Prueba de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Prueba de múltiples rangos para contenido por compuesto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Compuesto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Hesperitina (sin trat. Enzimatico)	3	0	X
Hesperitina (con trat. Enzimatico)	3	0,035	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Hesperitina (con trat. Enzimatico) – Hesperitina (sin trat. Enzimatico)	*	0,035	0,00160299

* indica una diferencia significativa.

Este cuadro aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

c. Análisis de Varianza (ANOVA) simple para capacidad antioxidante por Tratamientos (tipo de extracción).

Datos de entrada para el ANOVA.

- Variable dependiente: Capacidad antioxidante
- Factor: Tratamientos
- Número de observaciones: 15
- Número de niveles: 5

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para Capacidad antioxidante. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Capacidad antioxidante para los 5 diferentes niveles de Tratamientos. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

c.1 Método ABTS.

Cuadro ANOVA para capacidad antioxidante por tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0800052	4	0,0200013	472,90	0,0000
Intra grupos	0,000422946	10	0,0000422946		
Total (Corr.)	0,0804281	14			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de Capacidad antioxidante en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 472,904, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Capacidad antioxidante entre un nivel de Tratamientos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Capacidad antioxidante por Tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Uva por Ex. Convencional	3	1,59828	X
Uva Celulasa 0,5% 4h	3	1,70728	X
Uva Celulasa 2% 18h	3	1,72442	X
Uva Celulasa 2% 4h	3	1,77831	X
Uva Celulasa 0,5% 18h	3	1,81138	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 0.5% 4h	*	0,104097	0,0118315
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 2% 18h	*	0,0869513	0,0118315
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 2% 4h	*	0,033066	0,0118315
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva por Ex. Convencional	*	0,213092	0,0118315
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva Celulasa 2% 18h	*	-0,0171453	0,0118315
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva Celulasa 2% 4h	*	-0,0710307	0,0118315
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva por Ex. Convencional	*	0,108995	0,0118315
Uva Celulasa 2% 18h - Uva Celulasa 2% 4h	*	-0,0538853	0,0118315
Uva Celulasa 2% 18h - Uva por Ex. Convencional	*	0,180026	0,0118315
Uva Celulasa 2% 4h - Uva por Ex. Convencional	*	0,126141	0,0118315

* indica una diferencia significativa.

Este cuadro aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 10 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,36957	0,311757

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
Uva Celulasa 0,5% 18h / Uva Celulasa 0.5% 4h	0,003674	0,00212118	3,0	0,5000
Uva Celulasa 0,5% 18h / Uva Celulasa 2% 18h	0,003674	0,00212118	3,0	0,5000
Uva Celulasa 0,5% 18h / Uva Celulasa 2% 4h	0,003674	0,003674	1,0	1,0000
Uva Celulasa 0,5% 18h / Uva por Ex. Convencional	0,003674	0,0132468	0,0769231	0,1429
Uva Celulasa 0,5% 4h / Uva Celulasa 2% 18h	0,00212118	0,00212118	1,0	1,0000
Uva Celulasa 0,5% 4h / Uva Celulasa 2% 4h	0,003674	0,00212118	3,0	0,5000
Uva Celulasa 0,5% 4h / Uva por Ex. Convencional	0,00212118	0,0132468	0,025641	0,0500
Uva Celulasa 2% 18h / Uva Celulasa 2% 4h	0,003674	0,00212118	3,0	0,5000
Uva Celulasa 2% 18h / Uva por Ex. Convencional	0,003674	0,0132468	0,0769231	0,1429
Uva Celulasa 2% 4h / Uva por Ex. Convencional	0,00212118	0,0132468	0,025641	0,0500

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Capacidad antioxidante dentro de cada uno de los 5 niveles de Tratamientos es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

El cuadro también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0,05 de los cuales hay 2, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

c.1 Método DPPH.

Cuadro ANOVA para Capacidad antioxidante por tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,00940829	4	0,00235207	649,02	0,0000
Intra grupos	0,0000362402	10	0,00000362402		
Total (Corr.)	0,00944453	14			

El cuadro ANOVA descompone la varianza de Capacidad antioxidante en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 649,023 es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05 existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Capacidad antioxidante entre un nivel de Tratamientos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Capacidad antioxidante por Tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje Duncan

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Uva por Ex. Convencional	3	0,05316	X
Uva Celulasa 0,5% 4h	3	0,093884 2	X
Uva Celulasa 2% 18h	3	0,10024	X
Uva Celulasa 2% 4h	3	0,111775	X
Uva Celulasa 0,5% 18h	3	0,128253	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 0,5% 4h	*	0,0343684	0,00346332
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 2% 18h	*	0,0280126	0,00346332
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva Celulasa 2% 4h	*	0,016478	0,00346332
Uva Celulasa 0,5% 18h - Uva por Ex. Convencional	*	0,0750926	0,00346332
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva Celulasa 2% 18h	*	-0,0063558	0,00346332
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva Celulasa 2% 4h	*	-0,0178904	0,00346332
Uva Celulasa 0,5% 4h - Uva por Ex. Convencional	*	0,04708	0,00346332
Uva Celulasa 2% 18h - Uva Celulasa 2% 4h	*	-0,011535	0,00346332
Uva Celulasa 2% 18h - Uva por Ex. Convencional	*	0,0407242	0,00346332
Uva Celulasa 2% 4h - Uva por Ex. Convencional	*	0,0586146	0,00346332

* indica una diferencia significativa.

Este cuadro aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 10 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna

de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa Duncan. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Verificación de Varianza.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,597403	0,672873

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
Uva Celulasa 0.5% 18h / Uva Celulasa 0.5% 4h	0,00186843	0,00285407	21,0	0,6000
Uva Celulasa 0.5% 18h / Uva Celulasa 2% 18h	0,00186843	0,000407725	0,428571	0,0909
Uva Celulasa 0.5% 18h / Uva Celulasa 2% 4h	0,00186843	0,000407725	21,0	0,0909
Uva Celulasa 0.5% 18h / Uva por Ex. Convencional	0,00186843	0,00248009	0,567568	0,7241
Uva Celulasa 0.5% 4h / Uva Celulasa 2% 18h	0,00285407	0,000407725	49,0	0,0400
Uva Celulasa 0.5% 4h / Uva Celulasa 2% 4h	0,000407725	0,000407725	1,0	1,000
Uva Celulasa 0.5% 4h / Uva por Ex. Convencional	0,000407725	0,00248009	0,027027	0,0526
Uva Celulasa 2% 18h / Uva Celulasa 2% 4h	0,00285407	0,000407725	49,0	0,0400
Uva Celulasa 2% 18h / Uva por Ex. Convencional	0,00285407	0,00248009	1.32432	0,8605
Uva Celulasa 2% 4h / Uva por Ex. Convencional	0,000407725	0,00248009	0,027027	0,0526

El estadístico mostrado en este cuadro evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Capacidad antioxidante dentro de cada uno de los 5 niveles de Tratamientos es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

El cuadro también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 2, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Análisis estadístico para la evaluación de la co-relación entre el rendimiento por extracción y los valores de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

Estadístico de Pearson.

Devuelve el coeficiente de correlación producto o momento r de Pearson, r , un índice adimensional acotado entre -1,0 y 1,0 que refleja el grado de dependencia lineal entre dos conjuntos de datos, y se interpreta de la siguiente manera:

- Si $r = 1$, existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.
- Si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva.
- Si $r = 0$, no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica que las variables son independientes: pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.
- Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa.
- Si $r = -1$, existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada relación inversa: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante.

a. Co-relación entre rendimiento y compuestos fenólicos totales

Aceite de semilla de uva	Rendimiento b.h (%)	Compuestos fenólicos totales (mg AGE/Kg aceite)
A ₀ (Uva por Ex. Convencional)	5,53	127,53
A ₁ (Uva Celulasa 0,5% 4h)	7,85	148,47
A ₂ (Uva Celulasa 2% 18h)	9,03	279,19
A ₃ (Uva Celulasa 2% 4h)	8,97	253,21
A ₄ (Uva Celulasa 0,5% 18h)	8,75	179,48

r: 0,784

Respuesta: Al ser el $r > 0$, existe una correlación positiva entre rendimiento por extracción y el contenido de compuestos fenólicos totales para las muestras de aceite sin tratamiento (A_0) y con tratamiento enzimático (A_1, A_2, A_3, A_4).

b. Co-relación entre rendimiento y capacidad antioxidante (ABTS)

Aceite de semilla de uva	Rendimiento b.h (%)	ABTS (mmoles TE/Kg aceite)
A_0 (Uva por Ex. Convencional)	5,53	1,59
A_1 (Uva Celulasa 0,5% 4h)	7,85	1,71
A_2 (Uva Celulasa 2% 18h)	9,03	1,81
A_3 (Uva Celulasa 2% 4h)	8,97	1,78
A_4 (Uva Celulasa 0,5% 18h)	8,75	1,72

r: 0,947

Respuesta: Al ser el $r > 0$, existe una correlación positiva entre rendimiento por extracción y capacidad antioxidante por ABTS (fase lipofílica) para las muestras de aceite sin tratamiento (A_0) y con tratamiento enzimático (A_1, A_2, A_3, A_4).

c. Co-relación entre rendimiento y capacidad antioxidante (DPPH)

Aceite de semilla de uva	Rendimiento b.h (%)	DPPH (mmoles TE/Kg aceite)
A_0 (Uva por Ex. Convencional)	5,53	0,05
A_1 (Uva Celulasa 0,5% 4h)	7,85	0,09
A_2 (Uva Celulasa 2% 18h)	9,03	0,13
A_3 (Uva Celulasa 2% 4h)	8,97	0,11
A_4 (Uva Celulasa 0,5% 18h)	8,75	0,10

r: 0,955

Respuesta: Al ser el $r > 0$, existe una correlación positiva entre rendimiento por extracción y capacidad antioxidante por DPPH (fase hidrofílica) para las muestras de aceite sin tratamiento (A_0) y con tratamiento enzimático (A_1, A_2, A_3, A_4).

ANEXO 3. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

a. Determinación de compuestos fenólicos totales.

Objetivo:

Determinar el contenido de polifenoles totales en las muestras de aceite de semilla de uva, aplicando el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Vázquez *et al.* (1973).

Fundamento:

El conjunto de los compuestos fenólicos del aceite se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se reduce dando una mezcla de óxido de tungsteno (W_8O_{23}) y óxido de molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul.

Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Ácido gálico.
- Carbonato sódico.
- n-hexano.
- Metanol.

Material:

- Matraces aforados de 100 mL y 50 mL.
- Pipetas aforadas de 1, 10, 20 y 50 mL.
- Pipetas de 5 y 20 mL.
- Matraces erlenmeyer.
- Ampollas de decantación.

Instrumental:

- Espectrofotómetro UV
- Cubetas de plástico de 10 mm.

Preparación de la recta de calibrado

La recta de calibrado se prepara a partir de una disolución de ácido gálico de 0,5 g/L tomando volúmenes de 10, 20, 30 y 50 mL de esta disolución y enrasando hasta 100 mL con agua destilada ; de este modo se obtienen disoluciones de 50, 100, 150 y 250 mg/L, respectivamente. A continuación, de cada una de estas disoluciones, se toma 1 mL y se introduce en un matraz aforado de 100 mL. Se adicionan 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de Na₂CO₃ al 20%. Se agita la mezcla y se enrasa con agua bidestilada desionizada hasta 100 mL. Transcurridos 30 minutos se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 725 nm utilizando como blanco todos los reactivos a adicionar a excepción de la muestra patrón hasta completar los 100ml con agua destilada (ver figura a)

Procedimiento:

Se pesan con exactitud, en un matraz erlenmeyer unos 15 g de aceite. Se adicionan 20 mL de hexano, agitando vigorosamente la mezcla hasta que el aceite se disuelva completamente. La mezcla se transfiere a una ampolla de decantación, procediendo a la extracción con una mezcla de MeOH/H₂O (40:60) utilizando un volumen total de 50 mL fraccionando en tres volúmenes de 15, 15 y 20 mL. La agitación de la mezcla en la ampolla debe hacerse con suavidad, a fin de evitar emulsiones. Las 3 alícuotas de la extracción se transfieren a un matraz aforado de 50 mL enrasando con la mezcla MeOH/H₂O. De esta disolución se toma 1 mL y se introduce en un matraz aforado de 100 mL, adicionando a continuación, 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de Na₂CO₃ al 20%. Se enrasa con agua bidestilada desionizada, se agita y se deja reposar 30 minutos. La lectura se realiza (al igual que los patrones) a 725 nm frente al blanco (ver figura b).

Expresión de resultados.

Los resultados obtenidos en función de la recta de calibrado, se expresarán en mg/Kg en ácido gálico.

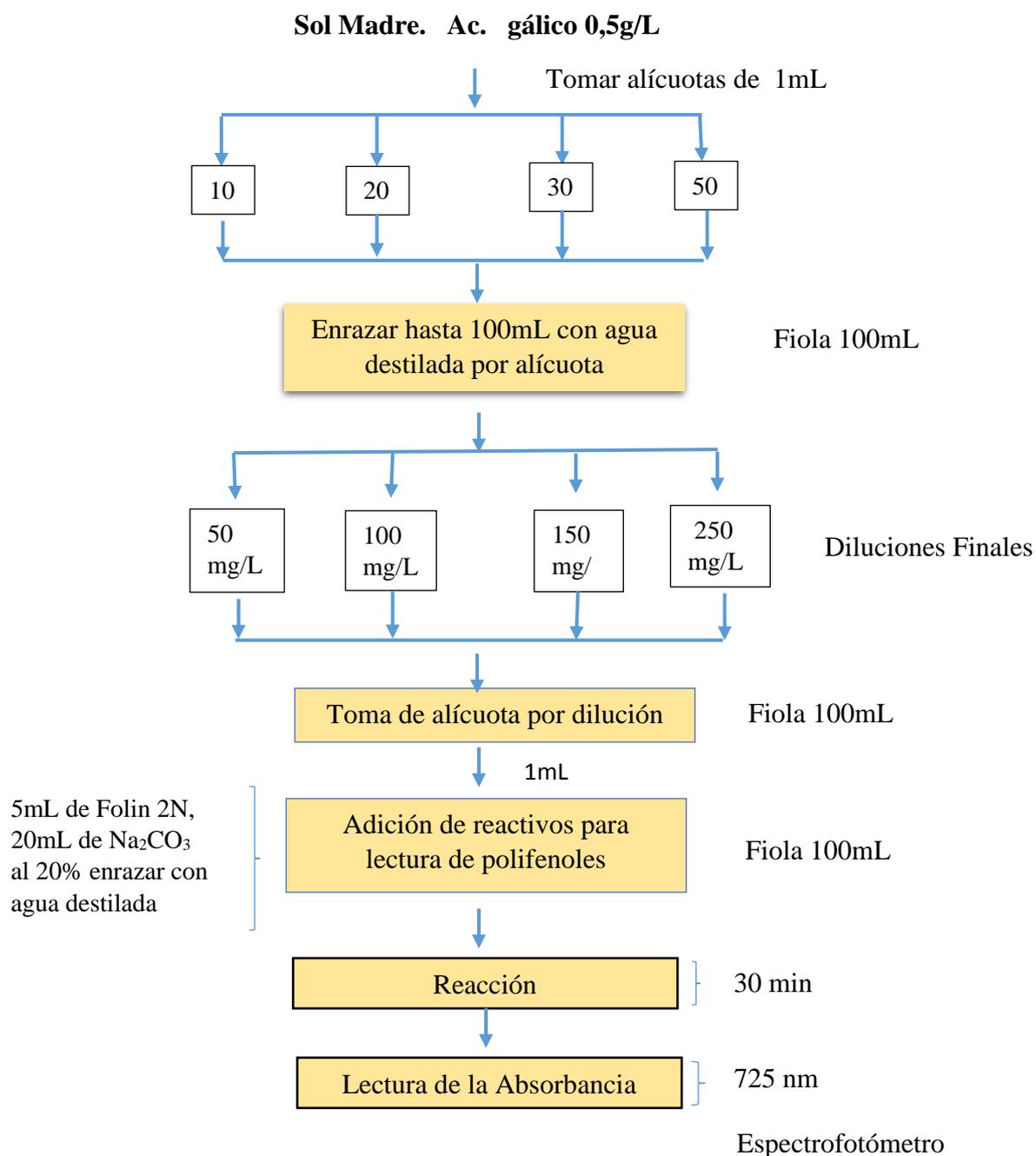


Figura a. Procedimiento para la elaboración de la curva de calibrado para la determinación de compuestos fenólicos totales.

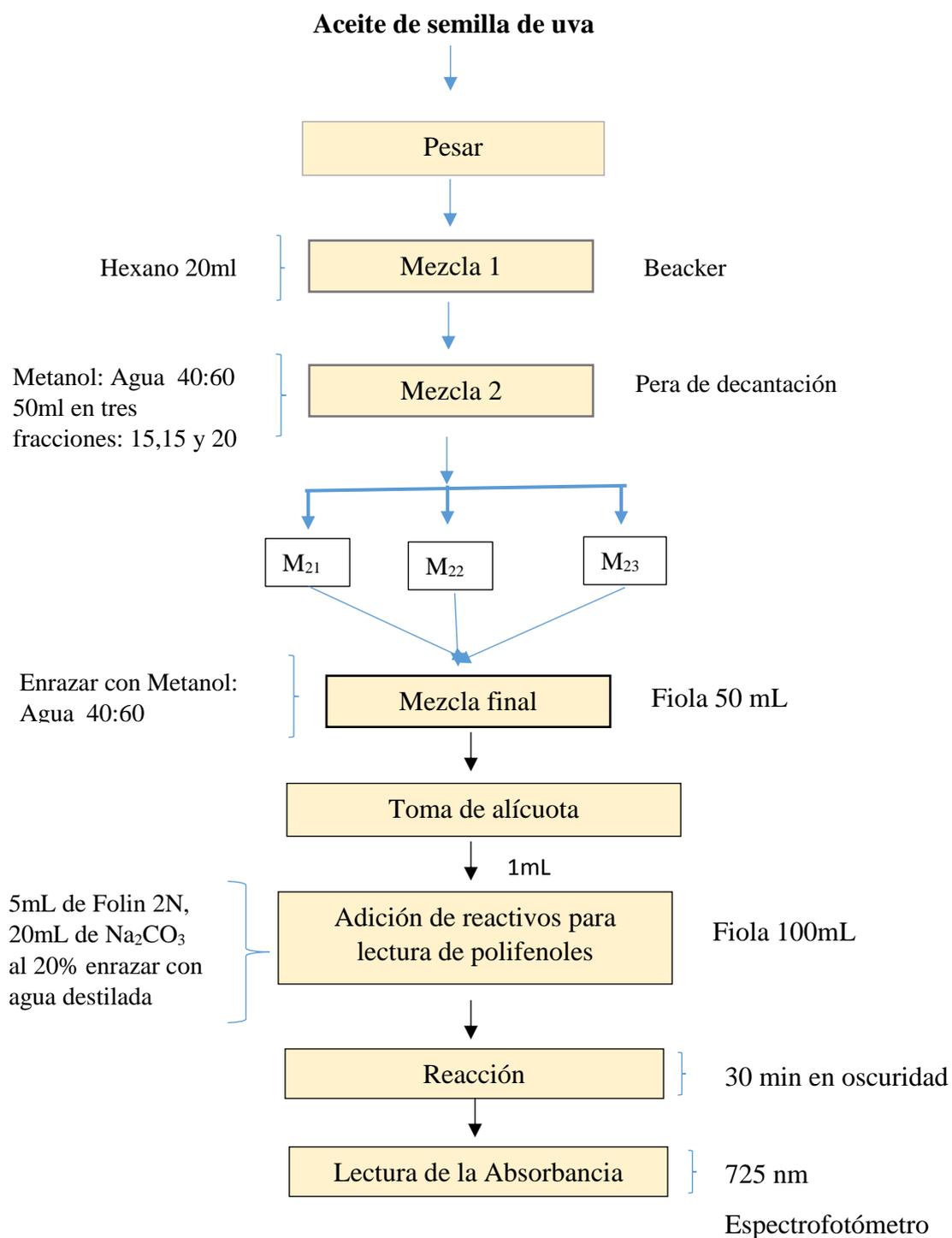


Figura b. Procedimiento para la determinación de compuestos fenólicos totales en el aceite de semilla de uva.

Determinación de la capacidad antioxidante.

Objetivo.

Evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de aceite de semilla de uva empleando los métodos: ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)} y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

Procedimiento de extracción de los compuestos antioxidantes.

Para el método DPPH se ha ensayado en un extracto metanólico obtenido del aceite de semilla de uva (ver figura c), mientras que para el método ABTS se ha ensayado directamente en el aceite diluido en n-hexano.

Reactivos.

- n-hexano (Panreac).
- Metanol (Merck)

Materiales.

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g
- Micropipetas de 100, 1000 μ L.
- Pipetas *Pasteur* 5 mL.
- Pipetas y matraces aforados.
- Tubos de centrifuga.
- Centrifuga.
- Agitador.

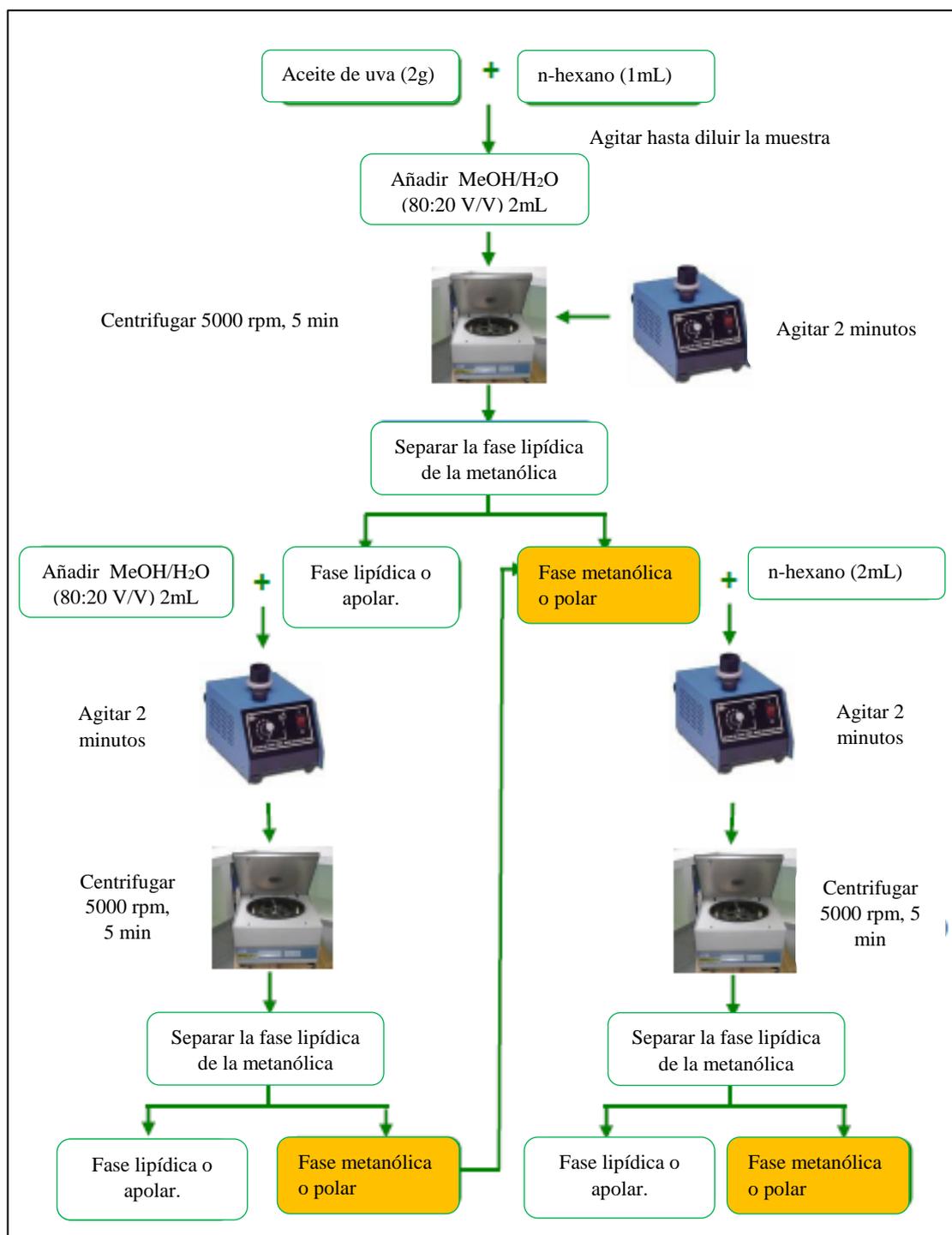
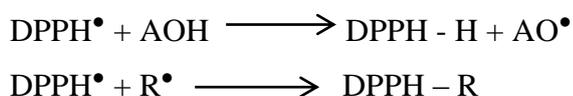


Figura c. Procedimiento de extracción de compuestos antioxidantes en las muestras de aceite de semilla de uva.

b.1. Método DPPH.

Fundamento.

Se emplea un radical coloreado, el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), en disolución metanólica. El DPPH• se comercializa como radical estable. Se sigue como referencia el método descrito por Morales y Jiménez-Pérez (2001), con algunas modificaciones (Delgado-Andrade et al. 2005). El radical DPPH• tiene un máximo de absorción a 520 nm, pero dicha absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AOH) o de un radical (R•):



En general, el radical formado a partir del antioxidante (AO•) es más estable; también puede producirse una reacción radical-radical que da origen a una molécula estable (Valavanidis *et al.* 2004). Mediante este método se evalúa la actividad antioxidante de la fase metanólica o fracción polar, previamente obtenida de las muestras de aceite de semilla de uva, que contiene algunos de los compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos) (ver figura d).

Reactivos.

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox)
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- Metanol.

Material.

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g.
- Micropipetas, 10 -100 µL; 100 - 1000 µL.

Instrumental.

- Espectrofotómetro UV.
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor.

Preparación de los reactivos.

- **Preparación de la disolución del radical DPPH• (74 mg/mL):** se pesan 7,4 mg de DPPH• y se disuelven en 100 mL de metanol. La disolución preparada es estable durante 12 h a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- **Preparación de la disolución de trabajo DPPH•:** esta disolución debe prepararse a diario. Se diluye con metanol hasta que la medida en el espectrofotómetro a 520 nm se sitúa en 1,8 unidades de absorbancia. El ajuste del instrumento se fija con metanol.

Preparación de la recta de calibración.

Utilizando Trolox en metanol se prepara una disolución madre 4 mM. Posteriormente se preparan diluciones entre 0,005-0,5 μ moles Trolox/mL. Cada punto de la recta se prepara igual que las muestras, es decir poniendo 400 μ L de las diferentes concentraciones de Trolox y 3 mL de la disolución DPPH•. Se agita la mezcla durante 30 segundos y se deja en oscuridad a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia a 520 nm transcurridos 60 minutos (ver figura d).

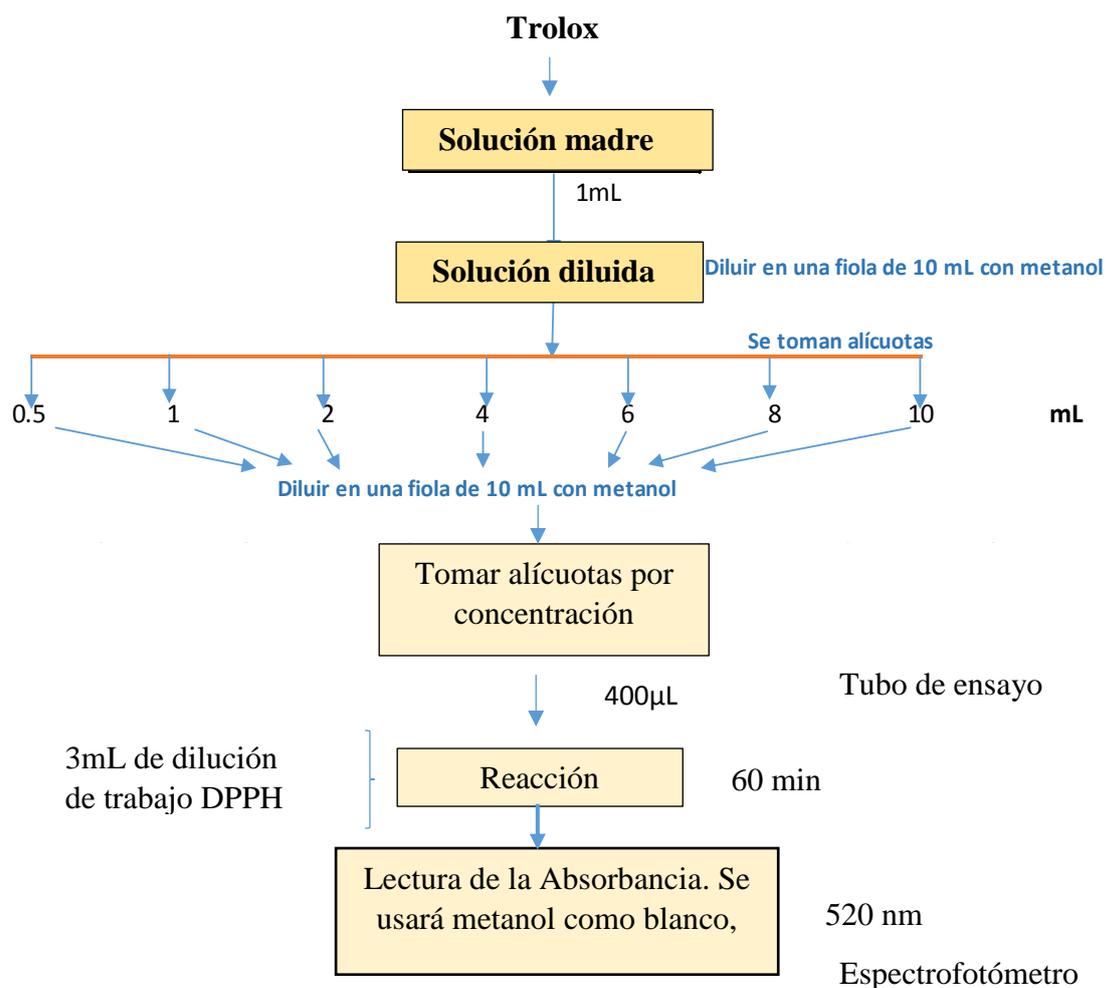


Figura d. Procedimiento para la elaboración de la curva de calibrado para la determinación de capacidad antioxidante por DPPH.

Medida de la capacidad antioxidante de las muestras.

Se trabaja directamente con el extracto metanólico del aceite. Se toman 3 mL del radical DPPH• y se añaden a 400 µL del extracto metanólico del aceite a ensayar. Se agita y se deja en oscuridad a temperatura ambiente, procediendo a la medida de su absorbancia a los 60 minutos, una vez alcanzado el equilibrio (Keceli *et al.* 2001). Todas las medidas se han realizado por triplicado.

Expresión de los resultados.

Los resultados obtenidos por el método DPPH se expresan en forma del índice TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). Dicho valor se define como los mmoles de Trolox que tienen la misma capacidad antioxidante que 1 Kg de la muestra a ensayar.

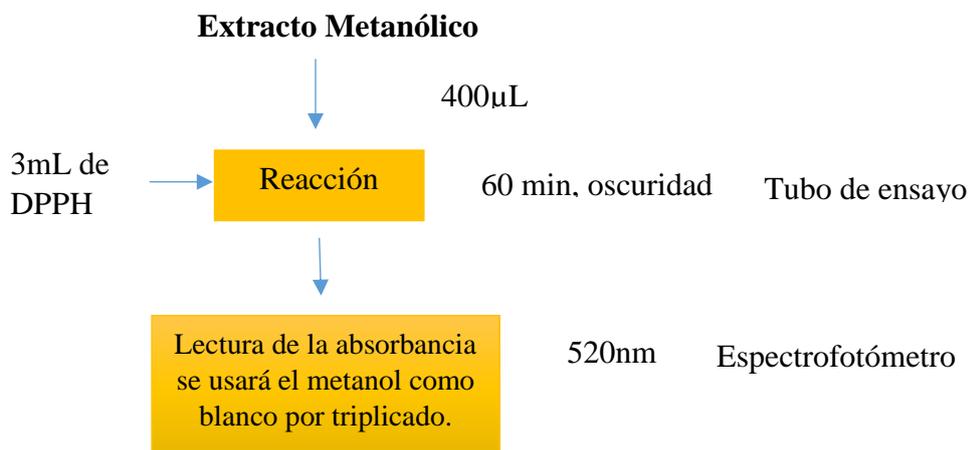
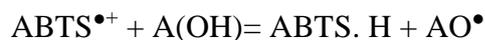


Figura e. Procedimiento para la determinación de capacidad antioxidante en el aceite de semilla de uva.

b.2. Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)}

Fundamento.

El método descrito por Samaniego *et al.* (2007), se basa en la inhibición por el antioxidante problema de la absorbancia producida por el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, que es un compuesto cromóforo muy estable, soluble en agua y con un máximo de absorción a 734 nm. Esta absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AOH) o de un radical (R^{\bullet}):



El proceso que tiene lugar consiste en que se forma primero el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable. Al añadir las sustancias antioxidantes presentes en el aceite de semilla de uva, la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido. Se cuantifica empleando una curva de calibrado que relaciona el porcentaje de pérdida de absorbancia y la concentración del antioxidante de referencia (Trolox).

Reactivos.

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox).
- Sal amónica del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)
- Persulfato potásico.
- Etanol.
- n-hexano.

Material.

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g.
- Micropipetas 10 - 100 μ L; 100 -1000 μ L.

Instrumental.

- Espectrofotómetro UV.
- Cubetas de cuarzo de 10 mm.

Preparación de reactivos.

- **Disolución ABTS 7mM:** se pesan 0,096 g de sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelven hasta 25 mL de agua bidestilada desionizada.
- **Disolución de persulfato potásico:** para conseguir una concentración final 140 mM, se pesan 0,945 mg de K₂S₂O₈ y se disuelven hasta un volumen de 25 mL de agua destilada desionizada.

- **Preparación del radical ABTS^{•+}**: se hace reaccionando el ABTS y el persulfato potásico. Se parte de un volumen de 5 mL de ABTS 7 mM y de 88 mL de K₂S₂O₈ 140 mM; la reacción estequiometría es de 1:0,5. La oxidación del ABTS es inmediata, pero la absorbancia máxima y estable no se alcanza hasta las 6 horas; la mezcla se mantiene estable en oscuridad de 12 a 16 horas a temperatura ambiente. El radical catiónico es estable durante 2 días, almacenado en oscuridad.
- **Preparación de la disolución de ABTS^{•+}**: la disolución ABTS^{•+} se mezcla con etanol (1:112), hasta que su absorbancia a 734 nm sea de 0,70±0,02, medida en cubetas de cuarzo de 10 mm a una temperatura de 30°C. En el caso de que la absorbancia esté por encima de ese valor, la mezcla se diluye con etanol. Si la absorbancia está por debajo, se añade disolución de ABTS^{•+}, hasta que la señal sea adecuada. Se hace el espectro del ABTS^{•+}: etanol desde 250-900 nm. Se emplea etanol para ajustar el blanco (Samaniego *et al.* 2007).

Preparación de la recta de calibración.

Se prepara una disolución madre de Trolox 5 mM, pesando 10 mg de Trolox y adicionando unas gotas de metanol hasta disolución completa del mismo. Después se enrasa con agua destilada hasta un volumen final de 10 mL. A partir de esta disolución madre, se preparan los distintos puntos que integrarán la recta de calibrado, con concentraciones comprendidas entre 0,08 y 0,8 μmol Trolox/mL. Las diluciones se preparan por triplicado. Cada punto de la recta se prepara igual que las muestras, es decir, poniendo 100 μL de cada dilución y 2 mL de la disolución ABTS^{•+}, se agita durante 30 segundos. Posteriormente, se deja en oscuridad a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a los 30 minutos exactos, obteniendo así el valor de absorbancia final (ver figura f).

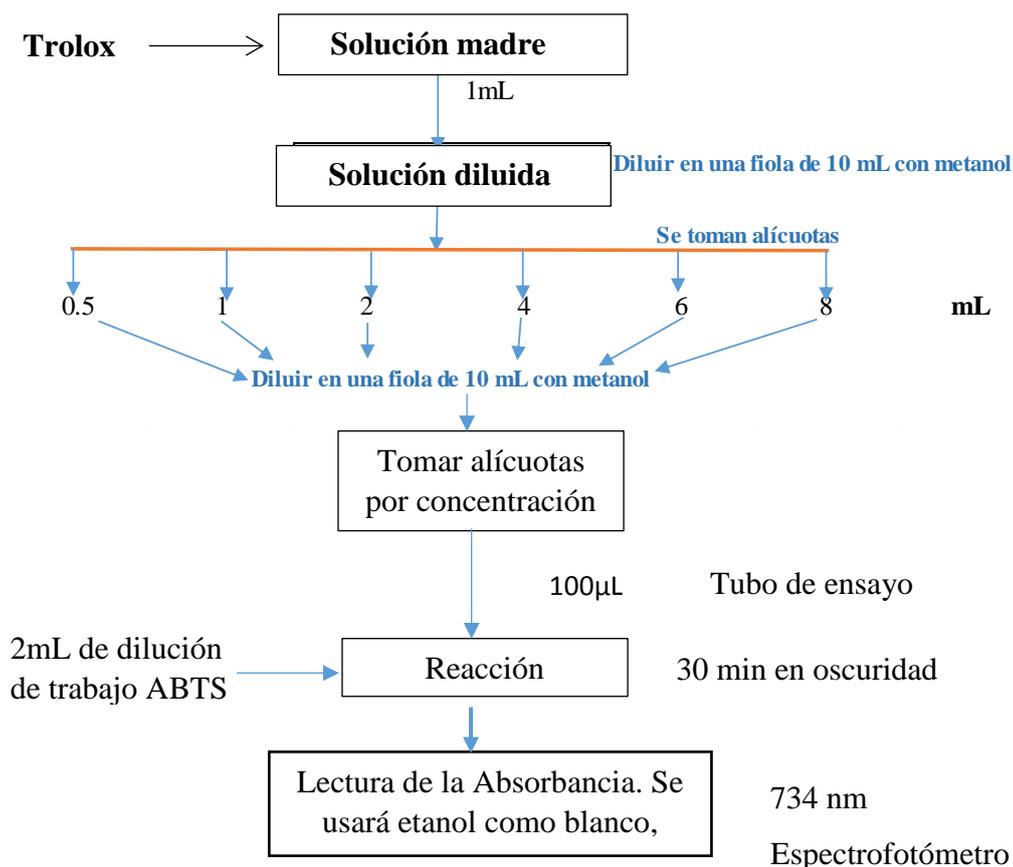


Figura f. Procedimiento para la determinación de capacidad antioxidante en el aceite de semilla de uva.

Medida de la capacidad antioxidante de las muestras.

Se toman 2 mL de la disolución ABTS^{•+} y se añaden 100 µL de la muestra de aceite de argán a ensayar a una dilución 1:4 en n-hexano. Posteriormente, se mezcla bien durante 30 segundos y se mide la absorbancia a 734 nm a los 30 minutos. Todas las medidas se han realizado por triplicado (ver figura g).

Expresión de los resultados.

Los resultados obtenidos se expresan en forma de un índice, el valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). Dicho valor se define como los mmoles de Trolox que tienen la misma capacidad antioxidante que 1 Kg de la muestra a ensayar.

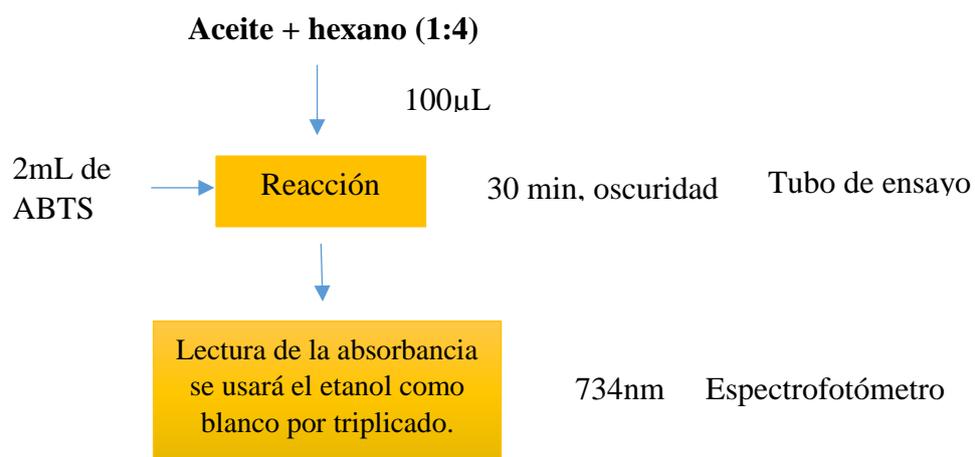


Figura g. Procedimiento para la determinación de capacidad antioxidante por ABTS en el aceite de semilla de uva.