

Resumen

La oxidación de los lípidos es una de las principales formas de deterioro de los alimentos. Así mismo, también es uno de los procesos perjudiciales que ocurren en la mayoría de organismos vivos, provocando daños en moléculas fundamentales para el funcionamiento de estos. Las moléculas clasificadas como polifenoles poseen la capacidad de neutralizar los radicales libres que se forman y propagan la oxidación de la materia grasa, y estos están presentes en cantidades significativas en la mayoría de frutas.

Los objetivos de este estudio son comprobar que la piel de kiwi presenta actividad antirradicalaria así como cuantificarla, determinar el tiempo mínimo de extracción en el que se ha extraído los máximos componentes antioxidantes, optimizar el solvente de extracción, comprobar su capacidad de retrasar el proceso de oxidación sobre un modelo de emulsión y realizar una primera prueba para la determinación de los polifenoles presentes en ella.

Para realizar estas pruebas, la piel de kiwi se somete a un proceso de extracción con diferentes solventes, en este caso acetona y etanol (con agua), en diferentes concentraciones, y los diferentes extractos se someterán a los ensayos Folin-Ciocalteu, TEAC, DPPH y ORAC. Para determinar su capacidad de retrasar la oxidación de la materia grasa en emulsiones, se realizara el seguimiento de la oxidación de una emulsión de grasa en agua (10% de grasa), y por ultimo, para caracterizar los polifenoles presentes, se analizarán las muestras mediante HPLC.

Los resultados obtenidos indican los óptimos siguientes: como disolvente de extracción 25% de acetona en agua con una cantidad de polifenoles totales de 2812mg eq. ácido gálico/100g de muestra seca determinada por Folin-Ciocalteu, un 18% de acetona y 0,1523 meq. Trolox/g muestra seca para DPPH, 28% de acetona y 0.2149 meq. Trolox/g muestra seca para TEAC y 35% de etanol y 0,2497 meq. Trolox/g muestra seca en el caso del ensayo ORAC. En el caso de las emulsiones se comprueba que la adición de un 2% de extracto alarga la oxidación a 100meq. O₂ activo/kg de emulsión a un 300% del tiempo de la emulsión control.





ÍNDICE

RESUMEN	1
ÍNDICE	3
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 El estrés oxidativo en la salud humana	6
1.2 Especies oxidantes. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres.	6
1.2.1 Generación <i>in vivo</i> de especies reactivas y mecanismos de defensa antioxidante.....	7
1.3 Compuestos fenólicos y diseño de alimentos funcionales.....	8
1.3.1 Las frutas como fuentes de compuestos fenólicos.....	10
1.3.2 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	16
1.3.3 Biodisponibilidad de compuestos fenólicos	18
1.3.4 Diseño de alimentos funcionales con efecto antioxidante.....	18
1.4 Evaluación de la efectividad de alimentos ricos en antioxidantes.	21
1.4.1 Pruebas químicas <i>in vitro</i> de medida de la actividad antioxidante	21
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Productos comerciales	29
3.1.2 Equipos.....	30
3.1.3 Muestras	30
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Preparación de la muestra.....	31
3.2.2 Obtención del extracto	32
3.2.3 Eliminación de antioxidantes naturales del aceite de girasol.....	34
3.2.4 Preparación de emulsiones	35
3.2.5 Cuantificación de polifenoles totales	37
3.2.6 Cuantificación de actividad antioxidante	37
3.2.7 Determinación de valor de peróxidos.....	41
3.2.8 Análisis mediante HPLC.....	44
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 Resultados	47
4.1.1 Determinación del tiempo mínimo de extracción.....	47



4.1.2	Optimización del método de extracción.....	48
4.1.3	Ensayo Folin-Ciocalteu	49
4.1.4	Ensayo TEAC	50
4.1.5	Ensayo DPPH	51
4.1.6	Ensayo ORAC	52
4.1.7	Ensayo con emulsiones	53
4.1.8	Caracterización de polifenoles mediante HPLC	56
4.2	Discusión.....	59
4.2.1	Determinación del tiempo mínimo de extracción.....	59
4.2.2	Optimización del método de extracción.....	60
4.2.3	Ensayo Folin-Ciocalteu	61
4.2.4	Ensayo DPPH	62
4.2.5	Ensayo TEAC	64
4.2.6	Ensayo ORAC	67
4.2.7	Comparativa entre métodos.....	68
4.2.8	Ensayo con emulsiones	72
4.2.9	Caracterización de polifenoles mediante HPLC	75
5	PRESUPUESTO	77
5.1	Reactivos.....	77
5.2	Amortizaciones.....	78
5.3	Personal	80
5.4	Coste total.....	81
6	IMPACTO MEDIOAMBIENTAL	83
	CONCLUSIONES	85
	AGRADECIMIENTOS	87
	BIBLIOGRAFÍA	89
	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	91



1 INTRODUCCIÓN

Los subproductos de manipulación y comercialización de zumos, así como los desechos de industrialización de estos productos suponen muchas toneladas al día en las zonas productoras, ocasionando problemas ambientales y de gestión. Estos materiales son generalmente muy ricos en sustancias bioactivas, que son las responsables de las propiedades saludables que se les atribuye a los hábitos dietéticos en los que las frutas y hortalizas son constituyentes relevantes, como es el caso de la dieta Mediterránea.

En los últimos años ha aumentado considerablemente la preocupación por una dieta que permita prevenir efectos nocivos inherentes a la vida y también el interés en los alimentos funcionales. Es decir, al alimentarse no solo se busca la ingestión de los compuestos mayoritarios necesarios como combustible y como eslabones constructores de estructuras. También se pretende “proteger” el organismo mediante aquellos compuestos, minoritarios pero con una función específica importante.

Mediante procedimientos relativamente simples se pueden producir extractos enriquecidos en estos constituyentes bioactivos, fundamentalmente sustancias antioxidantes y anticarcinógenas. Además se puede obtener fibra dietética de una calidad nutricional bastante superior de las que se encuentran actualmente en el mercado.

Los extractos e ingredientes obtenidos pueden ser incorporados a zumos u otros alimentos para proporcionarles el carácter de alimentos funcionales.

En este sentido, en el presente trabajo se pretende analizar las propiedades funcionales de la piel de kiwi, residuo importante de la industria de tratamiento de frutas, diseñando un protocolo de extracción de los posibles compuestos responsables, cuantificándolos y analizando su actividad antioxidante.



1.1 El estrés oxidativo en la salud humana

El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS.

Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento [Lee et al., 2004]. La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años [Lampe 1999; Prior 2003].

Así, las evidencias epidemiológicas que asocian el consumo de vegetales y frutas con una menor incidencia de enfermedades crónicas, junto con la mayor preocupación de los consumidores por mantener un buen estado de salud, está llevando a las industrias alimentarias a diseñar alimentos funcionales que supongan un aporte extra de estos antioxidantes naturales.

1.2 Especies oxidantes. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres.

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para



estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de oxido-reducción. El termino especies reactivas del oxígeno (**Tabla 1.1**) es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O₃, ONOO⁻, O₂, o H₂O₂.

Tabla 1.1. Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS)

Radicales		No radicales	
Nombre	Formula	Nombre	Formula
Hidroxilo	·OH	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	RO·	Oxígeno molecular	O ₂
Hidroperoxilo	HOO·	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Superóxido	O ₂ ⁻ ·	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	ROO·	Ácido nitroso	HNO ₂
Óxido nítrico	NO·	Catión nitrilo	NO ₂ ⁺
Dióxido de nitrógeno	NO ₂ ·	Peroxinitrito	ONOO ⁻
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Ozono	O ₃

Extraída de Halliwell y Whiteman (2004) con modificaciones

1.2.1 Generación *in vivo* de especies reactivas y mecanismos de defensa antioxidante.

Aunque ciertas condiciones ambientales favorecen la formación de especies reactivas y radicales libres, los procesos fisiológicos normales del organismo generan *per se* cierta tasa de estas sustancias oxidantes [Lee et al., 2004]. Las principales fuentes endógenas de especies oxidantes y radicales libres en el organismo son:

- Generación de especies reactivas durante la respiración mitocondrial. En la formación de ATP a través del metabolismo oxidativo y transporte electrónico mitocondrial el O₂ se reduce normalmente hasta agua, siguiendo la vía tetravalente. Así, el O₂ se reduce en 4 etapas y en cada una de las cuales se



transfiere un electrón. Sin embargo, el transporte electrónico mitocondrial es imperfecto y la reducción monoelectrónica del oxígeno genera $O_2^{\cdot-}$. La dismutación espontánea y enzimática del $O_2^{\cdot-}$ da lugar a la formación de H_2O_2 , y tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 , pueden generar radicales $\cdot OH$ a través de reacciones tipo Fenton catalizadas por metales de transición. De este modo, se estima que en condiciones fisiológicas normales entre el 1 y el 3% del oxígeno consumido por el organismo no llega a formar agua y acaba generando radicales libres y ROS.

- Reacciones en cadena de peroxidación lipídica. Los radicales libres y otras especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico ($R\cdot$), el cual puede reaccionar con O_2 dando lugar a un radical peroxilo ($ROO\cdot$). Los radicales peroxilo contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica sustrayendo átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos, generando así nuevos radicales lipídicos ($R\cdot$) y hidroperóxidos lipídicos ($ROOH$). Estos últimos se descomponen en radicales alcoxilo ($RO\cdot$) y peroxilo ($ROO\cdot$) contribuyendo a la propagación del daño oxidativo. Esta descomposición se ve facilitada por la exposición a luz ultravioleta o por la presencia de iones metálicos, a través de reacciones tipo Fenton. Así, metales de transición tales como el hierro y el cobre son capaces de acelerar la iniciación y propagación del proceso de peroxidación lipídica.

Es evidente que los procesos que generan especies reactivas y radicales libres *in vivo* son muy diversos. Para contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas el organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante, integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

1.3 Compuestos fenólicos y diseño de alimentos funcionales.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o incluso radiación ultravioleta. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en



sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. [Martínez-Valverde et al., 2000].

Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas (se conocen más de 8000), la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido siquímico (Ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico) y el metabolismo de los fenilpropanoides [Robards et al., 1999]. Los fenilpropanoides simples poseen un esqueleto básico de 9 carbonos (C6-C3) y derivan de los aminoácidos fenilalanina y tirosina producidos en la ruta del ácido siquímico. Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico molecular.

- Ácidos cinámicos (C6-C3)
- Ácidos benzoicos (C6-C1 o C6-C2)
- Flavonoides (C6-C3-C6)
- Proantocianidinas o taninos condensados ((C6-C3-C6)_n)
- Estilbenos (C6-C2-C6)
- Cumarinas (C6-C3)
- Lignanós (C6-C3-C3-C6)
- Ligninas ((C6-C3)_n)

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como las ligninas. Dentro de cada familia, el número de compuestos fenólicos existentes será más o menos variado. Por ejemplo, se conocen más 4000 flavonoides diferentes, distribuidos en varias subfamilias. Los compuestos fenólicos están presentes en todo el reino vegetal y sus cantidades y tipos varían en función de la especie vegetal y variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, etc. En los alimentos, los compuestos fenólicos habitualmente se presentan conjugados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos.

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición recomiendan un



consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo [World Health Organization 1990; World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research 1997]. Así, muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos [Manach et al., 2004]. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton [Rice-Evans et al., 1997]. Además de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuyen actividades biológicas beneficiosas para salud. Entre estas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, inhibidores de enzimas prooxidantes.

En este capítulo se describen brevemente los principales grupos de compuestos fenólicos. Se tratan además, aspectos relevantes de los compuestos fenólicos como su biodisponibilidad, metabolismo y actividad antioxidante.

1.3.1 Las frutas como fuentes de compuestos fenólicos

Las frutas, constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta. En ellas es frecuente encontrar derivados de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, antocianinas, flavonoles, catequinas, y taninos condensados e hidrolizables [Macheix et al., 1990]. La mayoría de estos compuestos permanecen en productos elaborados a base de frutas y bayas [Heinonen et al., 1998a], como por ejemplo zumos, mermeladas, jaleas, gelatinas, etc. [Häkkinen et al., 2000; Zafrilla et al., 2001]. A continuación se describen los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en los alimentos vegetales.

Ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos (Figura 1.1) son abundantes en los alimentos. Los más frecuentes son el ácido cafeico, y en menor medida el ácido ferúlico, que se encuentra asociado a la fibra dietética mediante la formación de enlaces éster con la hemicelulosa. El ácido



cafeico también se encuentra esterificado, principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico (ácido 5cafeilquínico), que está presente en el café, y en muchas frutas y verduras. Se pueden diferenciar dos grupos principales de ácidos fenólicos, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos.

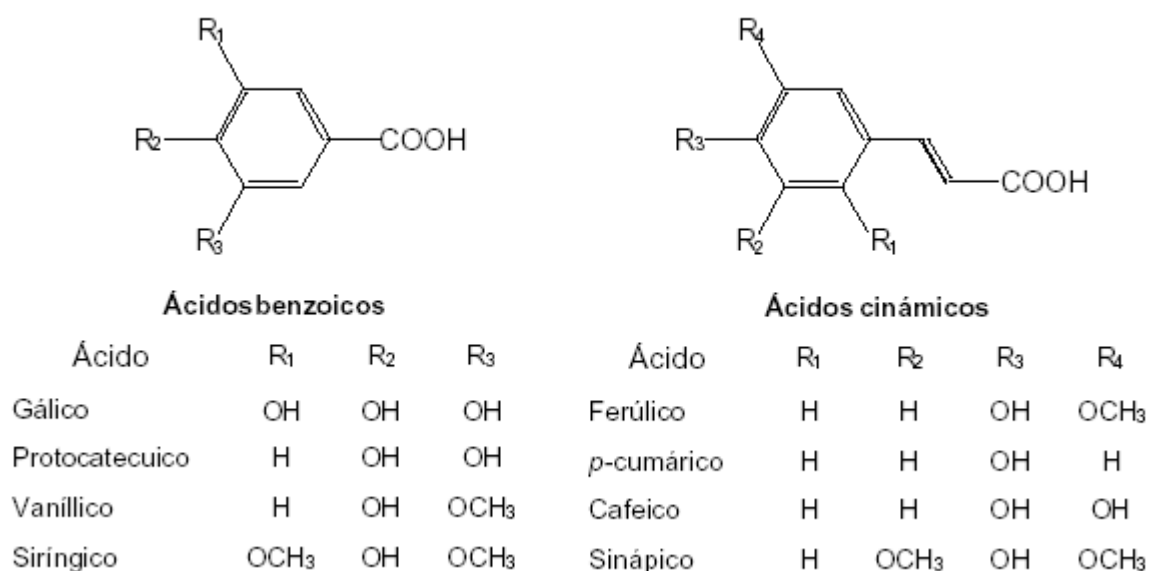


Figura 1.1 Estructura química de los principales ácidos fenólicos

Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C6-C1. Los principales son los ácidos gálico, salicílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéuico, vanílico y siringico, estos cuatro últimos se consideran universales ya que forman parte de las ligninas. Generalmente se presentan de forma conjugada en los vegetales, aunque pueden ser detectados en forma libre en algunas frutas o tras su liberación como consecuencia del procesado. El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o como sus dímeros (ácido elágico), trímeros (ácido tergálico) o tetrámeros (ácido galágico), los dos últimos menos frecuentes. Los ácidos gálico y elágico son componentes esenciales de los taninos hidrolizables, como por ejemplo los elagitaninos de fresas, frambuesas y zarzamoras. Generalmente los contenidos en estos ácidos son bajos a excepción de las frutas rojas [Manach et al., 2004].

Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en materias vegetales, incluyendo muchos alimentos y bebidas. Entre ellas, las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Salvo en el caso de alimentos procesados, raramente se encuentran como



ácidos libres y de forma predominante aparecen esterificados con ácido quínico, tartárico o glucosa. Los más comunes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico. Uno de los conjugados más frecuentes en frutas es el ácido clorogénico, que resulta de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico. Así, el ácido cafeico, libre o esterificado, constituye el ácido fenólico más abundante en muchas frutas [Manach et al., 2004].

Taninos hidrolizables.

Los taninos hidrolizables resultan de la esterificación de los ácidos gálico y elágico (Figura 1.2). Se distinguen 2 grupos principales; los galotaninos, que son frecuentes en frutas como el mango, y los elagitaninos, característicos de frutas rojas como las fresas, frambuesas y zarzamoras.

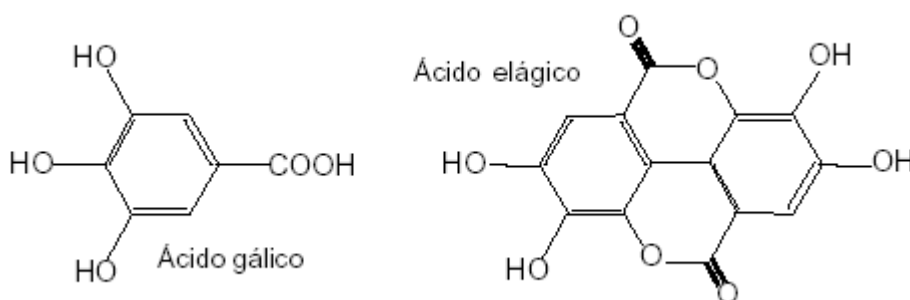


Figura 1.2 Estructura química de los ácidos gálico y elágico

El procesado incrementa el contenido en ácido elágico libre llegando en torno al doble del contenido presente en la fruta fresca [Amakura et al., 2000].

Estilbenos.

Los estilbenos tienen un esqueleto básico de 14 carbonos (C6-C2-C6) y su distribución en alimentos vegetales no es muy amplia. Los estilbenos con mayor interés nutricional son el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) y el piceido (resveratrol-3-O-β-D-glucósido), presentes en uvas y vinos (Figura 1.3). El resveratrol se encuentra en uvas, zumos de uva y vinos, por lo que estos alimentos van a ser las principales fuentes de estilbenos en la dieta. El resveratrol muestra actividades antitumorales e inhibe reacciones que incrementan el riesgo de enfermedades coronarias [Manach et al., 2004]. Un vino tinto puede contener 200 mg/L de resveratrol. Las uvas rojas de la variedad Napoleón, contienen 2.4 mg de estilbenos (resveratrol y piceido) por Kg de peso fresco.



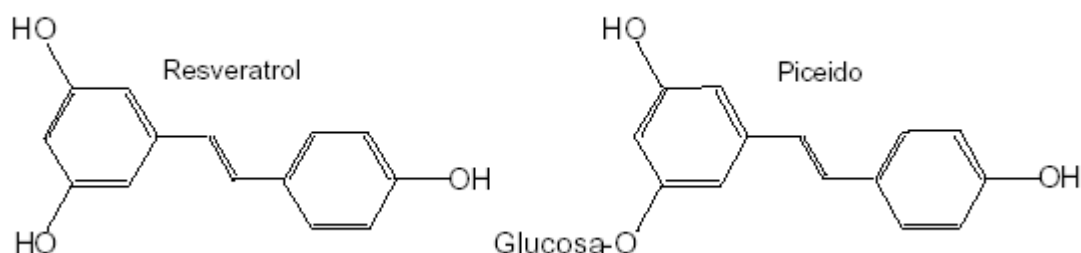


Figura 1.3 Estructura química de los estilbenos

Flavonoides.

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 1.4) [Manach et al., 2004]. En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y dentro de cada clase se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos. Los flavonoides se encuentran a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides; los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados) y los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas). La mayoría de los tejidos de la planta pueden sintetizar flavonoides, los cuales se presentan en forma de glicósidos solubles en agua en las hojas y frutas empleadas en la alimentación humana. Las agliconas de los flavonoles y flavonas no se encuentran en el vegetal fresco pero pueden presentarse como consecuencia del procesado. Los azúcares predominantemente se unen al núcleo del flavonoide mediante enlace β -glicosídico, preferentemente en posición 3, aunque las uniones se pueden producir en otras posiciones. Se han identificado más de 80 azúcares diferentes unidos a los flavonoides; monosacáridos, disacáridos, trisacáridos e incluso tetrasacáridos [Hollman y Arts 2000]. Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico [Manach et al., 2004].



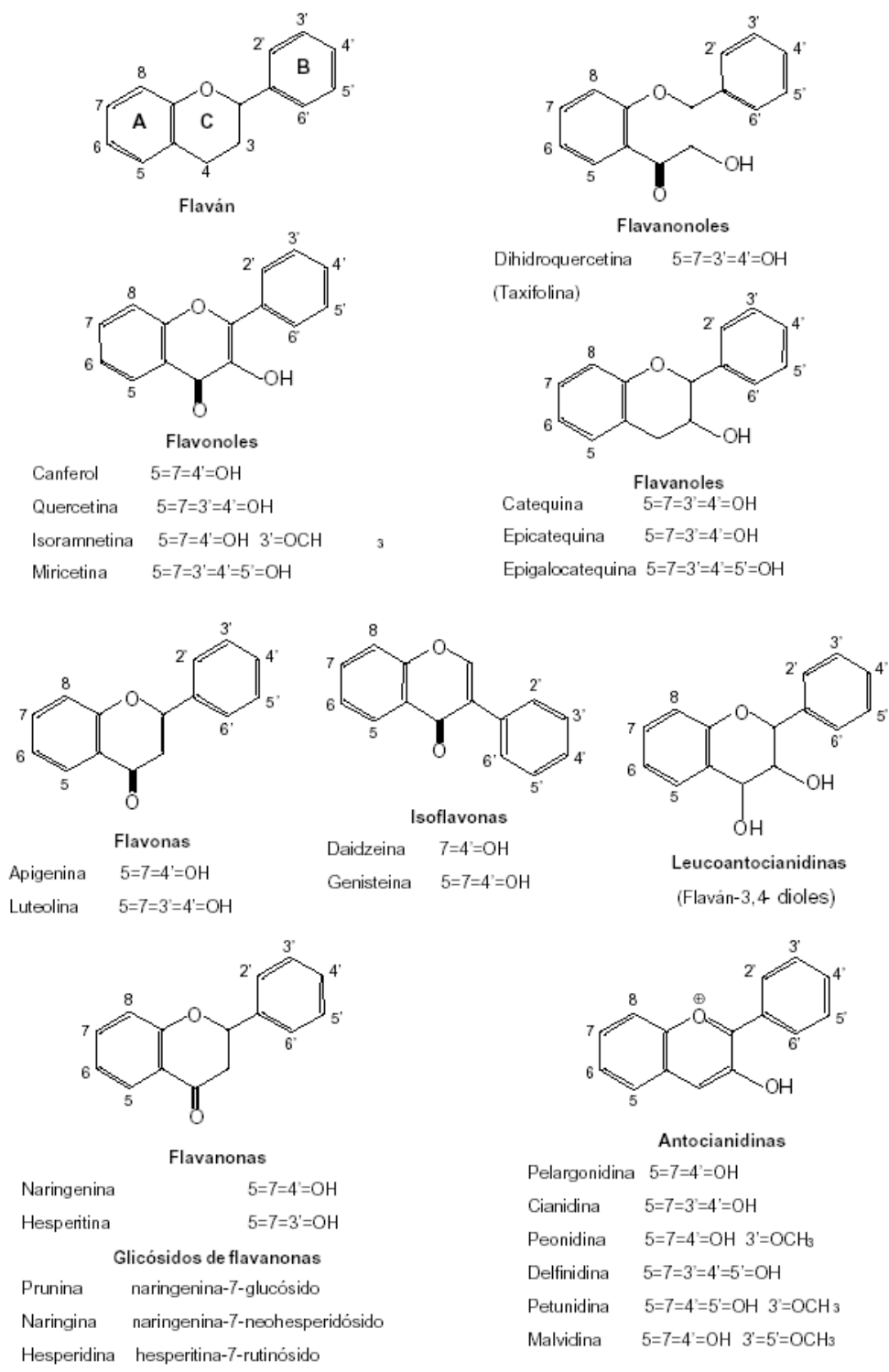


Figura 1.4 Estructura química de los flavonoides

Los principales flavonoles son; quercetina, kaemferon, myrcetina e isoramnetina [Hollman y Arts 2000] y algunos de sus glicósidos son la rutina (quercetina-3-Oramnosilglucósido) y



la hiperina (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosido) [Robards et al., 1999]. Las principales fuentes de estos flavonoides son frutas y verduras. Los mayores niveles de quercetina se encuentran en las cebollas (280- 490 mg/Kg de porción comestible). Entre los zumos, el de uva contiene 4.4 mg/L de quercetina y 6.2 de kaemferol y el de naranja 5.7 mg/L de quercetina. El vino tinto 8.3 mg/L de quercetina y 8 mg/L de kaemferol y el té negro 15-17 mg/L de quercetina, 14-16 mg/L de kaemferol y 3 mg/L de myrcetina [Hollman y Arts 2000].

Los flavanoles predominantes son la catequina y su isómero epicatequina, la galocatequina y su isómero epigalocatequina, y los ésteres con ácido gálico en posición 3 como el galato de epicatequina y el galato de epigalocatequina. Los flavanoles glicosilados son poco frecuentes. Algunas fuentes de flavanoles en la dieta son el té, las frutas y las legumbres. Los vinos tintos alcanzan contenidos de 208 mg/L de catequina y entre 15 y 88 mg/L de epicatequina [Hollman y Arts 2000]. Las antocianidinas tienen la estructura básica del catión flavilio.

En los alimentos son seis las antocianidinas más importantes; cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina y malvidina, contribuyendo a la coloración de numerosas frutas. En los vegetales frescos, generalmente se encuentran unidas a azúcares dando lugar a los antocianos o antocianinas, que son responsables de los colores azules, púrpuras, rojos y matices intermedios de estas coloraciones de frutas rojas como cerezas, ciruelas, fresas y uvas. Los azúcares más comunes son; glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, normalmente unidos a la posición 3 o a las posiciones 3 y 5, generando diglicósidos. Los antocianos más comunes en las frutas son los 3 monoglucósidos de cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina y petunidina, la cianidina-3-galactósido y la cianidina-3-arabinósido [Robards et al., 1999].

También se encuentran disacáridos de glucosa (soforósidos), de ramnosa y glucosa (rutinósidos), de xilosa y glucosa (samubiósidos) y trisacáridos. Además de las glicosilaciones, se pueden encontrar antocianos acilados con ácidos cinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico) y ácidos alifáticos (acético, málico, malónico, oxálico o succínico).



1.3.2 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias en la efectividad como antioxidantes entre los distintos grupos de compuestos. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales [Rice-Evans et al., 1997]:

Como antirradicalarios.

Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, anticipando las reacciones de terminación. El radical fenoxilo generado es menos reactivo ya que se estabiliza por resonancia con los electrones p del anillo aromático. Así, las características estructurales que determinan la capacidad de los compuestos fenólicos para captar radicales son:

- La presencia de dos grupos hidroxilo en posición *orto* (3', 4') en el anillo B (e.j. quercetina, catequina).
- La presencia de dos grupos hidroxilo en posición *meta* (5, 7) en el anillo A (e.j. canferol).
- La presencia en el anillo del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y, junto con el grupo 4-ceto (e.j. quercetina). Estas estructuras son importantes para la deslocalización de electrones y estabilización del radical fenoxilo, siempre que además estén presentes los dos *orto*-hidroxilo en el anillo B.

Como quelantes de metales.

Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los *o*-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton. Generalmente, los siguientes grupos funcionales se consideran importantes para la actividad quelante de metales [Kokhar y Apenten 2003]:

- La presencia de grupos hidroxilo en posición *orto* (e.j. 3'-4' o 7-8).
- La presencia del grupo 4ceto y grupos hidroxilo en posición 5 y/o 3 (e.j. quercetina).
- La presencia de un gran número de grupos hidroxilo (e.j. ácido tánico).



Además de las características estructurales anteriormente mencionadas, existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de grupos hidroxilo, el grado de polimerización o la presencia de azúcares unidos determinarán propiedades de los compuestos fenólicos tales como la solubilidad y la tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno. El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros. Por ejemplo, los taninos son más efectivos frente a los radicales peroxilo que los fenoles simples. La actividad para captar O₂⁻ aumenta con el grado de polimerización de los flavanoles y los dímeros de ácido ferúlico inhiben la peroxidación lipídica en mayor extensión que los monómeros [Moure et al., 2001]. La eficacia antioxidante de las teaflavinas aumenta cuando se unen con ácido gálico o sus polímeros [Rice-Evans et al., 1997].

Los compuestos fenólicos con un elevado número de grupos hidroxilo en sus estructuras moleculares muestran una mayor actividad antioxidante *in vitro*. Es el caso de las teaflavinas y catequinas del té [Rice-Evans et al., 1997]. Además, en los flavonoles, los hidroxilos en las posiciones 2', 3' y 4' incrementan la estabilidad de los radicales permitiendo la deslocalización de electrones en los dobles enlaces del anillo benceno. La presencia de sustituyentes voluminosos en los anillos, que inducen la donación de electrones, tiene dos efectos: aumenta la efectividad como antioxidantes de los compuestos fenólicos al disminuir la fuerza de los enlaces O-H y, por otro lado, el impedimento estérico generado por los sustituyentes en la región del radical, disminuye la velocidad de las reacciones de propagación en la que está implicado el propio radical fenoxilo, contribuyendo a su estabilización [Robards et al., 1999].

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos varía, además, en función de su solubilidad relativa en fase acuosa o lipofílica (coeficiente de reparto). Los flavonoides y los ácidos cinámicos poseen coeficientes de partición intermedios, que dependen en gran medida de su estructura química y de los sustituyentes asociados (grupos hidroxilo, metoxilo, azúcares, etc.). Generalmente, los compuestos hidrofóbicos entran en las células más rápido que los hidrofílicos por procesos de difusión simple que les permite atravesar la membrana. Una vez en el organismo, los compuestos fenólicos más hidrofóbicos tendrán su destino en ambientes lipídicos y los más hidrofílicos quedarán en medios más acuosos [Parr y Bolwell 2000]. Así, la unión de azúcares hace a los



compuestos fenólicos más hidrosolubles pero disminuye su actividad antioxidante [Rice-evans et al., 1997]. Por ello, los compuestos fenólicos con más afinidad por los ambientes lipídicos del organismo podrían tener una mayor relevancia en la prevención de enfermedades. De hecho, los compuestos fenólicos de carácter liposoluble y capaces de unirse a lípidos previenen la oxidación de las LDL *ex vivo* de forma directa y/o mediante la preservación de otros antioxidantes liposolubles como a-tocoferol [Zhu et al.,2000].

1.3.3 Biodisponibilidad de compuestos fenólicos

Los efectos beneficiosos derivados del consumo de compuestos fenólicos dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. La gran variedad estructural de los compuestos fenólicos, así como la influencia de factores genéticos, agronómicos, del procesado y almacenamiento sobre sus niveles en los alimentos, hace difícil estimar con exactitud la ingesta de compuestos fenólicos en la dieta [Duthie et al., 2003]. Se estima que la ingesta aditiva de flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas en las sociedades occidentales es de 100-150 mg/día. A estas cantidades habría que añadir una ingesta variable de ácidos hidroxicinámicos, antocianos y proantocianidinas, aportada principalmente por café, té, bayas y vino. Así, la ingesta total de compuestos fenólicos probablemente alcanza 1 g/día en personas que ingieran varias raciones de fruta y verdura al día [Manach et al., 2004].

1.3.4 Diseño de alimentos funcionales con efecto antioxidante

En los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las industrias alimentarias y los consumidores por el concepto de alimento funcional. Así, con un consumidor cada vez más interesado en alimentos más saludables y una industria alimentaria que ha comprendido la potencialidad del mercado de los alimentos funcionales, se ha iniciado a nivel mundial una intensa actividad investigadora en el área de estos "novel food". El término alimento funcional hace referencia a alimentos o ingredientes que mejoran el estado general de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad [Rafter 2002]. Se trata además de productos alimenticios que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales [Roberfroid 2002]. Un alimento puede hacerse funcional siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones [Roberfroid 2000; 2002]:

1. Eliminar componentes perjudiciales presentes en el alimento (e.j. alérgenos).



2. Incrementar la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta unos niveles en que pueda inducir los beneficios esperados o incrementar la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que esta demostrado su efecto beneficioso.
3. Añadir un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (e.j. prebióticos, antioxidantes no vitamínicos).
4. Sustituir un componente, generalmente un macronutriente (e.j. grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto beneficioso (ej. inulina).
5. Incrementar la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

Estos efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente con el objetivo de validar sus efectos y para poder aprobar las declaraciones nutricionales en su etiqueta [Roberfroid 2002]. En el año 2005 se publicó un documento en el que se establecen los criterios consensuados para la evaluación del apoyo científico a las declaraciones nutricionales relacionadas con la salud de los alimentos funcionales (PASSCLAIM) [Aggett et al., 2005]. En la **Tabla 1.2** se recogen dichos criterios.

Tabla 1.2 Criterios consensuados para la comprobación científica de las declaraciones nutricionales en el ámbito de la Unión Europea (PASSCLAIM).

1. El alimento o componente del alimento al cual se atribuye el efecto beneficioso debe ser caracterizado.

2. La comprobación de una declaración nutricional debe estar basada principalmente en datos obtenidos en estudios de intervención en humanos. El diseño de los estudios de intervención debe incluir las siguientes consideraciones:

- Los grupos de estudio deben ser representativos de la población a la cual va destinado el alimento funcional.
- Deben establecerse unos grupos control adecuados.
- La duración de la intervención y el seguimiento deben ser adecuados para demostrar el efecto propuesto.
- Debe caracterizarse la dieta habitual de los participantes así como los aspectos



más relevantes de sus hábitos de vida.

- La cantidad de alimento o componente activo debe ser consecuente con el modo propuesto de consumo.
- Ha de tenerse en cuenta el efecto de la matriz del alimento así como el contexto dietético del efecto funcional del componente activo.
- Se ha de comprobar de la conformidad con la ingesta del alimento o componente activo bajo examen.
- Ha de considerarse el poder estadístico para el contraste de la hipótesis.

3. Cuando el efecto beneficioso no puede evaluarse de forma directa, los estudios de intervención deben emplear (bio) marcadores. Estos deben ser:

- Biológicamente válidos. Para ello, su relación con el efecto final y la variabilidad dentro de la población deben ser bien conocidas.
- Debe ser metodológicamente válido en cuanto a sus características analíticas.

4. En un estudio de intervención, la variable estudiada debe cambiar de un modo estadísticamente significativo y el cambio observado debe ser biológicamente relevante de acuerdo a la declaración nutricional que se pretende apoyar.

5. Una declaración nutricional debe ser comprobada científicamente considerando la totalidad de los datos obtenidos.

Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo [Roberfroid 2000]. Por esta razón, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta. En este contexto, la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de alimentos funcionales con una actividad antioxidante incrementada [Larrosa et al., 2002]. De hecho, en el campo del desarrollo de nuevos ingredientes se está produciendo un aumento en la producción de este tipo de extractos vegetales en los cuales los compuestos bioactivos son aislados y concentrados para su uso como suplementos, alimentos nutracéuticos o como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales [Pszczola 2003].

No obstante, una alternativa natural a la adición de estos extractos o del propio compuesto activo previamente aislado podría ser la selección de materias primas ricas en el principio



activo cuyos niveles se desean incrementar. Como se ha mencionado anteriormente, las frutas rojas y bayas se caracterizan por su elevado contenido en compuestos fenólicos antioxidantes tales como los antocianos, que a su vez les confieren colores atractivos. Además, existe abundante información en la literatura científica relativa a los niveles de compuestos fenólicos de este tipo de frutas, así como de su actividad antioxidante y de su estabilidad tras el procesado [Wang et al., 1996; Heinonen et al., 1998a; Häkkinen et al., 2000; Zafrilla et al., 2001]. Así, el empleo de estas frutas como ingredientes funcionales en las proporciones adecuadas, podría favorecer el desarrollo de alimentos funcionales ricos en compuestos fenólicos y con una elevada actividad antioxidante. Además, el hecho de ser elaborados de forma natural a partir de frutas de colores atractivos podría favorecer la aceptación del producto final por parte del consumidor, e incluso se podrían utilizar como potenciales colorantes naturales sin clasificación E..

1.4 Evaluación de la efectividad de alimentos ricos en antioxidantes.

La evaluación de la efectividad de un alimento rico en antioxidantes puede abordarse de distintas maneras. Por lo general pueden adoptarse las siguientes estrategias complementarias [Collins 2005]:

- Evaluar la actividad antioxidante total *in vitro* mediante pruebas químicas.
- Evaluar su efectividad *in vitro* para proteger frente al daño oxidativo inducido en cultivos celulares.
- Comprobar su actividad *in vivo* tras la suplementación en humanos, generalmente evaluando cambios en biomarcadores del daño oxidativo, y/o en el estado antioxidante total de los individuos.

1.4.1 Pruebas químicas *in vitro* de medida de la actividad antioxidante

En investigación, la medida de la actividad antioxidante total de un alimento o una muestra biológica aporta información valiosa sobre procesos de adición y sinergia que se producen como consecuencia de interacciones entre distintas moléculas bioactivas en la matriz de la muestra analizada. Estos procesos dan lugar, por lo general, a una actividad antioxidante total mayor que la correspondiente a la suma de las actividades de los antioxidantes individuales que la componen, lo cual nos dará una aproximación más real al



efecto potencial que podría ejercer *in vivo* un alimento rico en sustancias antioxidantes [Liu 2003].

Así, existen numerosos métodos de medida de la actividad antioxidante total, los cuales se han aplicado a diferentes muestras biológicas y alimentos. Estos métodos se basan generalmente en la captación o secuestro de radicales libres generados en la mezcla de reacción (O_2^- , $\cdot OH$, $ROO\cdot$, $ONOO^-$, etc.), mientras que otros están basados en la reducción de iones metálicos tales como el Fe^{3+} o el Cu^{2+} [Sánchez-Moreno 2002; Schlesier et al., 2002; Prior et al., 2005]. A continuación se describen brevemente algunos de los métodos más comúnmente utilizados para la medida de la actividad antioxidante total de compuestos químicos, alimentos y muestras biológicas (plasma/suero, orina, etc.).

Actividad reductora del hierro (III)/poder antioxidante (Ensayo FRAP):

Esta técnica fue desarrollada por Benzie y Strain (1996) como método de medida de la capacidad antioxidante plasmática, aunque posteriormente ha sido aplicado a muestras de alimentos. El método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo por hierro (III) con la molécula tripiridil-s-triazina (TPTZ) a su forma de hierro (II). De este modo se genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra, puede cuantificarse por colorimetría en base a un patrón de hierro (II). La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. El ensayo FRAP es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos. Sin embargo, en el caso de algunos polifenoles se han descrito reacciones más lentas, llegando incluso a requerir 30 minutos hasta completar la reducción del complejo. El poder reductor de los compuestos fenólicos se asocia al número de grupos $-OH$ y en grado de conjugación de la molécula. Debido al potencial redox del complejo Fe^{3+} -TPTZ (0.7 V), el ensayo FRAP es capaz de detectar compuestos con un menor potencial redox y por lo tanto se considera un método adecuado para evaluar la capacidad de los antioxidantes para modular el tono redox de células y tejidos. Sin embargo, cuando se aplica en plasma o suero no es capaz de detectar la actividad de antioxidantes con grupos sulfhidrilo como el glutatión o algunas proteínas, por lo que dará valores de capacidad antioxidante del suero o plasma ligeramente más bajos de los reales. Además, cuando se analizan alimentos vegetales, se han descrito interferencias de azúcares y ácido cítrico [Prior et al., 2005].



Capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox (Ensayo TEAC)

El ensayo TEAC o ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión $ABTS^+$ generado en el medio de reacción. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm [Sánchez-Moreno 2002]. Dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm [Prior et al., 2005]. Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical $ABTS^+$ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el $ABTS^+$ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este [Sánchez-Moreno 2002]. El ensayo TEAC presenta además variaciones en el modo mediante el cual se genera el radical catión ABTS. Principalmente se consideran dos modos [Schlesier et al., 2002: Prior et al., 2005].

- La generación por reacciones enzimáticas, en las que el ABTS se incuba con H_2O_2 y con metamioglobina, hemoglobina o peroxidasa de rábano.
- La generación por reacciones químicas, en las que el ABTS se hace reaccionar con dióxido de manganeso, peroxosulfato de potasio o cloruro de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP). Estas reacciones químicas por lo general requieren tiempos largos de incubación (16 horas en el caso del peroxosulfato de potasio) o altas temperaturas (60°C en el caso del ABAP).

Así por ejemplo, el método original descrito por Miller et al. (1993) emplea metamioglobina y H_2O_2 para generar ferrilmioglobina, la cual reacciona con el ABTS para generar el $ABTS^+$. La muestra a analizar se añade antes de la formación del $ABTS^+$ por lo que se trata de un ensayo de inhibición. Este orden de adición de los reactivos ha hecho que el método sea criticado, ya que posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales puede llevar a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales [Prior et al., 2005]. Sin embargo, se trata de un método ampliamente utilizado en ensayos clínicos, al ser un método rápido, sencillo y



automatizable. Incluso existen kits comercializados para su uso en investigación. Además, el $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos [Schlesier et al., 2002; Prior et al., 2005], por ello se le ha llamado en ocasiones capacidad antioxidante total.

Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (Ensayo DPPH)

Este método se basa en la reducción del radical DPPH^{\cdot} por los antioxidantes de la muestra [Brand-Williams et al., 1995]. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general empleando soluciones patrón de Trolox. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método [Prior et al., 2005]. En general la reacción puede medirse a los 2, 3, 4, 5 y 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo se espera que la mayoría de sustancias completen la reacción con el DPPH, y posteriormente en intervalos de 5 minutos hasta que las variaciones de absorbancia esté en torno a 0.003/minuto, lo cual indicaría que la reacción se ha completado [Schlesier et al., 2002].

El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que para su cuantificación no requiere un equipamiento sofisticado, sencillamente un espectrofotómetro. A diferencia del ensayo TEAC, en este ensayo no es necesario preparar radical previamente puesto que el DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol para el desarrollo del método. Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total. Es adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, pero no lo es para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma o suero, ya que las proteínas precipitan con el metanol del medio de reacción [Sánchez-Moreno 2002]. No obstante



algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al del DPPH, como es el caso de los carotenoides [Prior et al., 2005].

Ensayo de los fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total [Prior et al., 2005]. El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y Rossi (1965) de un método empleado para la determinación de tirosina, el cual se basaba en la oxidación de los fenoles por un reactivo de molibdeno y wolframio (tungsteno). La mejora introducida por Singleton y Rossi fue el uso de un heteropolianión fosfórico de molibdeno y wolframio que oxida los fenoles con mayor especificidad ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$).

La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método simple, preciso y sensible pero que sin embargo sufre de numerosas variaciones cuando es aplicado por diferentes grupos de investigación, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes empleados de muestra, concentraciones de reactivos, y tiempos y temperaturas de incubación. Además, se producen variaciones en el modo de expresar los resultados de modo que el patrón recomendado de ácido gálico se ha sustituido en ocasiones por los ácidos ferúlico, tánico, cafeico, clorogénico, protocatéuico, vanílico o por catequina. Esto da lugar a variaciones de varios órdenes de magnitud en las medidas de compuestos fenólicos obtenidas por diferentes grupos, lo que dificulta la comparación de resultados. Existen además diversas sustancias de naturaleza no fenólica que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas, por lo que deben hacerse correcciones para estas sustancias. Entre ellas destacan las proteínas, el ácido ascórbico, el ácido úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares y algunas sales inorgánicas [Prior et al., 2005].

No obstante, a pesar de estos inconvenientes, el ensayo de los fenoles totales se emplea con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales (ej.



frutas y zumos de frutas), al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante [Schlesier et al., 2002; Sun et al., 2002]. Así, cuando se evalúan las propiedades antioxidantes de estos alimentos, el análisis de fenoles totales constituye un método complementario al análisis cromatográfico de los principales grupos de compuestos fenólicos que caracterizan a cada variedad de fruta o verdura, a la vez que proporciona información valiosa a la hora de seleccionar variedades con mayor potencial antioxidante.

El ensayo de Folin-Ciocalteu también se ha empleado en estudios *in vivo* para la determinación de los niveles de compuestos fenólicos totales en plasma/suero tras la ingesta de vino [Duthie et al., 1998; Serafini et al., 1998] y zumos de frutas ricos en compuestos fenólicos [Pedersen et al., 2000]. Para su aplicación a plasma o suero se requiere una serie de pasos de extracción e hidrólisis que comprenden el tratamiento con HCl y NaOH en metanol. Para evitar interferencias con las proteínas, estas se precipitan con ácido metafosfórico y posteriormente se realiza una extracción de los compuestos fenólicos ligados a las proteínas plasmáticas con una mezcla de acetona y agua [Serafini et al., 1998].



2 OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto es analizar la actividad antioxidante de la piel de kiwi, un residuo de la industria alimentaria, con la finalidad de obtener evidencias científicas para un posible aprovechamiento de sus propiedades antioxidantes en la industria alimentaria.

Dicho objetivo se ha perfilado en los siguientes objetivos particulares:

1. Optimizar el protocolo de extracción de moléculas antirradicalarias, variando el tiempo y el solvente de extracción.
2. Determinación de los polifenoles totales y la actividad antiradicalaria mediante los métodos de Folin-Ciocalteu, TEAC, DPPH y ORAC.
3. Analizar la disminución de la oxidación de aceite de girasol (libre de antioxidantes propios) al añadirle diferentes proporciones de extracto de piel de kiwi y comparar su comportamiento con el de diversas proporciones de vitamina C.





3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Productos comerciales

- Metanol (CH_3OH) (PA)
- Etanol 96% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (PA)
- Etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (PA)
- Acetona (CH_3COCH_3)(PA)
- Alúmina (Al_2O_3) (QP)
- Tween 20 ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_6(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$)
- Acetonitrilo (CH_3CN) (calidad HPLC)
- Ácido acético (CH_3COOH) (calidad HPLC)
- Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) (PA)
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (PA)
- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt (ABTS)
- Soluciones tampón de fosfato (PBS) 0.075M pH=7.4
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)
- 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid (Trolox)
- 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride (AAPH)
- Fluoresceína: Fluorescein Sodium Salt (PA)
- Soluciones tampón de fosfato (PBS) 0.01M pH=7.4
- Cloruro de hierro (II) (FeCl_2) (PA)
- Ácido clorhídrico (HCl) 35% (PA)
- Tiocianato de amonio (NH_4SCN) (PA)
- Almidón indicador para iodometrías (PA)
- Ácido salicílico (Ácido 2-hidroxibenzoico) (PA)
- Triclorometano (CHCl_3) (PA)
- Tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (PA)
- Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (PA)



- Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% (PA)
- Ácido acético glacial (CH₃COOH) (PA)
- Ioduro de potasio (KI) (PA)

Nota: Todos los reactivos han sido adquiridos a través de Sigma-Aldrich© y Panreac©

3.1.2 Equipos

- Balanza analítica
- Vortex
- Volteador de tubos de ensayo
- Baño de ultrasonidos
- Centrifuga
- Sonicador
- Estufa a 40°C
- Baño con termostato
- Fluorímetro Fluostar Omega
- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8524A
- HPLC Agilent serie 1200 con columna Luna 3 micras (150x4.6 mm) y detector UV
- Congeladores (-20°C, -80°C)
- Licuadora domestica
- Molinillo de café
- Bomba de vacío de membrana

3.1.3 Muestras

- Piel de kiwi obtenida de kiwi comprado en comercios locales.
- Aceite de girasol comercial



3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de la muestra

Para su posterior análisis, la piel de kiwi se somete a un proceso de purificación y extracción. El objetivo de este primer método es eliminar cualquier resto de pulpa de kiwi de la piel.

Material

Aparatos

- Licuadora domestica

Productos

- Piel de kiwi obtenida en comercio local

Método

1. Limpiar la piel de kiwi de cualquier resto de pulpa.
2. Licuar la piel de kiwi para obtener el máximo de superficie de contacto a la hora de realizar la extracción.

Dado algunos problemas que presentaba la manipulación de la piel de kiwi durante todo el proceso de extracción, se decide realizar un proceso de liofilización para facilitar su manipulación y así agilizar el proceso.

Material

Aparatos

- Liofilizador
- Congelador
- Molinillo de café
- Bascula analítica

Productos



- Piel de kiwi limpia de restos de pulpa y licuada.

Método

1. Pesar la piel de kiwi en recipientes de plástico, obteniendo así el peso húmedo, a continuación, tapar los recipientes con papel absorbente.
2. Introducir los recipientes de plástico en el congelador. Una vez congelados introducirlos en el liofilizador durante 4 días.
3. Pesar la muestra una vez liofilizada, obteniendo así el peso seco, triturar con el molinillo de café para obtener un polvo lo más fino y homogéneo posible.
4. Guardar el polvo obtenido de la trituración en un desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

Mediante este método hemos obtenido un polvo de fácil manejo, al cual serán referidos todos los resultados a partir de este momento. La relación de pesos entre peso húmedo: peso seco es de 982:255, que se puede aproximar a 4:1 asumiendo 3% de error.

3.2.2 Obtención del extracto

Este método tiene como fin extraer el contenido a caracterizar de la piel de kiwi mediante un solvente, para su posterior análisis.

Material

Aparatos

- Balanza analítica
- Volteador de tubos de ensayo
- Baño de ultrasonidos
- Centrifuga

Productos

- Acetona
- Etanol
- Metanol
- Agua Milli-Q
- Piel de kiwi liofilizada



Método

1. Pesar 0.5g de piel de kiwi liofilizado en un tubo de plástico de ensayo.
2. Añadir un volumen de líquido para realizar una extracción 1:10 (p/v)
3. Colocar el tubo en el volteador durante 30' (a excepción del caso de optimización del tiempo, en el cual el tiempo puede ser 30', 1, 2, 4, 6 o 24 horas).
4. A continuación, colocar el tubo durante 10' en el baño de ultrasonidos.
5. Centrifugar el tubo para separar el sobrenadante en la centrifugadora durante 10' a 3000rpm.
6. Recuperar el sobrenadante e introducirlo en el congelador (-20°C) hasta su uso.

La **tabla 3.1** muestra las diferentes extracciones realizadas y los solventes utilizados en cada una de ellas.

Tabla 3.1 Composición de los solventes de las diferentes extracciones.

Extracción	Composición %			
	Acetona	Etanol	Agua	Metanol
A:50 E:00 W:50	50	-	50	-
A:70 E:00 W:30	70	-	30	-
A:00 E:50 W:50	-	50	50	-
A:00 E:70 W:30	-	70	30	-
A:70 E:30 W:00	70	30	-	-
A:30 E:70 W:00	30	70	-	-
A:20 E:20 W:60	20	20	60	-
A:30 E:30 W:40	30	30	40	-
A:40 E:40 W:20	40	40	20	-
A:50 E:20 W:30	50	20	30	-
A:20 E:50 W:30	20	50	30	-
A:80 E:10 W:10	80	10	10	-
A:10 E:80 W:10	10	80	10	-



A:20 E:00 W:80	20	-	80	-
A:00 E:20 W:80	-	20	80	-
30'	30	-	70	-
1h	30	-	70	-
2h	30	-	70	-
4h	30	-	70	-
6h	30	-	70	-
24h	30	-	70	-
H ₂ O	-	-	100	-
Me75	-	-	25	75
Emulsión Piel	-	-	25	75
Emulsión Pulpa	-	-	25	75

3.2.3 Eliminación de antioxidantes naturales del aceite de girasol

Para analizar la actividad antioxidante en el seno de emulsiones de los extractos obtenidos, es necesario preparar un modelo de emulsión en el que conozcamos a la perfección todos y cada uno de sus componentes, así como su concentración. Para ello, es necesario obtener un aceite libre de antioxidantes naturales para que estos no interfieran en los resultados.

Material

Aparatos

- Bomba de vacío de membrana
- Montaje de columna de filtración + kitasato

Productos

- Alúmina (QP)



- Aceite de girasol comercial

Método

1. Pesar una relación de alúmina 2:1,4 del aceite que se quiera filtrar y ponerla en una estufa a 100°C durante 24 horas.
2. Rellenar la columna de filtración con la mitad de la alúmina secada, enchufar la bomba de vacío e introducir el aceite a filtrar.
3. Una vez filtrado todo el aceite, vaciar la columna de alúmina que ha retenido antioxidantes, limpiarla, rellenar con la otra mitad de alúmina y volver a montar el montaje de filtración.
4. Introducir nuevamente el aceite filtrado en la columna para conseguir un segundo filtrado.
5. Una vez acabado el segundo proceso de filtración, guardar el aceite libre de antioxidantes en congelador a -20°C y protegido de la luz si va a ser utilizado en los días siguientes. En caso contrario, ha de ser guardado a -80°C.

3.2.4 Preparación de emulsiones

Una vez obtenido el aceite libre de antioxidantes, se preparan las emulsiones. Para ello se utiliza un emulsionante sintético, el Tween 20, para garantizar la estabilidad de la emulsión en el tiempo.

Material

Aparatos

- Balanza analítica
- Sonicador

Productos

- Aceite libre de antioxidantes naturales
- Agua Milli-Q
- Tween 20
- Extracto metanólico (75%) de piel de kiwi
- Extracto metanólico (75%) de pulpa de kiwi



- Disolución de ácido salicílico al 10%

Método

Preparación de la emulsión madre

1. Disolver el tween 20 en agua en proporción 1:90
2. Añadir lentamente una proporción de aceite 1:9 a la disolución de tween 20 acabada de preparar mientras se encuentra en el sonicador, para favorecer la creación de la emulsión.

Preparación de las diferentes emulsiones

Se preparan las emulsiones deseadas siguiendo las composiciones indicadas en la tabla 3.2

Tabla 3.2 Concentración final de las emulsiones (en %)

Nº Emulsión	% emulsión madre	% Extracto piel	% Acido Ascórbico(10%)	% Extracto pulpa	% MeOH 75%
1	90	-	-	-	10
2	90	10	-	-	-
3	90	2	-	-	8
4	90	0.5	-	-	9.5
5	90	-	10	-	-
6	90	-	0.33	-	0.66
7	90	-	-	10	-
8	90	-	-	0.33	0.66

De esta manera se obtienen emulsiones con un contenido final del 10% en aceite.



3.2.5 Cuantificación de polifenoles totales

3.2.5.1 Ensayo Folin-Ciocalteu

Para analizar la cantidad de polifenoles totales, se procede a realizar el ensayo Folin-Ciocalteu [Rossi; Singleton, 1965], modificado por Peschel (2006).

Material

Aparatos

- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8524A

Productos

- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Carbonato de Sodio al 20%
- Agua Milli-Q

Método

1. Añadir muestra en proporción 1:200 a la cubeta (agua mili-Q en el caso del blanco)
2. Añadir agua mili-Q en proporción 1:2
3. Añadir reactivo Folin-Ciocalteu en proporción 1:25
4. Añadir carbonato de sodio al 20% en una proporción de 3:25 y agitar.
5. Al cabo de 1 hora de la primera adición del carbonato de sodio, enrasar a volumen final con agua mili-Q, agitar y proceder a la lectura a $\lambda = 756$ nm.

El método es calibrado mediante patrones de ácido gálico y los resultados de las muestras están expresados en mg eq. ácido gálico/ 100g muestra.

3.2.6 Cuantificación de actividad antioxidante

3.2.6.1 Ensayo DPPH

Este método se basa en la reducción del radical DPPH· por los antioxidantes de la muestra [Brand-Williams et al., 1995]. Este radical presenta una coloración púrpura, con



un máximo de absorbancia a 515 nm. La desaparición de esta coloración indica la actividad antioxidante de la muestra analizada.

Material

Aparatos

- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8524A

Productos

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (radical DPPH)
- Metanol

Método

1. Pesar 25.6mg de radical DPPH y diluir hasta los 100mL con metanol y posteriormente diluirla 1:10 con metanol.
2. Añadir una proporción de 1:10 de muestra (en el caso del blanco metanol).
3. Añadir una proporción de 9:10 de la dilución 1:10 de DPPH y agitar.
4. Realizar una lectura a $\lambda = 515$ nm (lectura a t=0)
5. Al cabo de 1 hora, realizar una segunda lectura a $\lambda = 515$ nm (lectura a t=60)

El resultado se obtiene como

$$\% \text{ perdida absorbancia} = \left[\frac{(abs_0 - abs_{60})}{abs_0} - \frac{(abs_{B0} - abs_{B60})}{abs_{B0}} \right] * 100 \quad (\text{eq})$$

donde:

abs_x = absorbancia en t=x

abs_{Bx} = absorbancia del blanco en t=x

El método es calibrado mediante patrones de Trolox, y los resultados son expresados en equivalentes a milimoles de Trolox/g muestra, meq. Trolox/g muestra en el resto del documento a partir de ahora.



3.2.6.2 Ensayo TEAC

El ensayo TEAC presenta similitudes con el ensayo DPPH ya que ambos utilizan un “radical estable” que presenta coloración, y permite observar la capacidad antioxidante de la muestra, pero difieren en que el radical $ABTS^+$ es necesario prepararlo en el laboratorio ya que tiene una estabilidad descrita de 34 días mientras que el radical DPPH es comercializado directamente para su uso. El procedimiento se realizó según el método descrito por Re et al. (1999)

Material

Aparatos

- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8524A
- Baño termostático a 30°C

Productos

- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt (ABTS)
- Persulfato de potasio
- Solución tampón de fosfato pH 7.4 (PBS)

Método

1. Preparar el radical catiónico mediante la mezcla de ABTS y persulfato de potasio con concentraciones finales de ambos de 7mM y 2.45 mM respectivamente.
2. Diluir la disolución de $ABTS^+$ con PBS de tal forma que la absorbancia de la nueva dilución se encuentre en 0.73 ± 0.01 a 30°C. Con el fin de mantener esta temperatura, las muestras y las diluciones deberán permanecer en el baño termostático ajustado a esta temperatura.
3. Preparar los recipientes donde añadiremos una proporción 99:100 de la dilución de $ABTS^+$. Medir la absorbancia de estas diluciones a $\lambda = 734$ nm y a $\lambda = 402$ nm (absorbancia $t=0$).
4. Añadir muestra (PBS en el caso del blanco) en proporción 1:100, agitar y dejar reposar en el baño durante 5 min. Este proceso se repite para cada uno de los recipientes a intervalos de 20 segundos.



5. Una vez transcurridos los 5 minutos, realizar una segunda lectura a $\lambda = 734$ nm y $\lambda = 402$ nm (absorbancia $t=5$) de la primera muestra añadida. Repetir el proceso para los siguientes recipientes.

El orden de las muestras a analizar en cada serie de 15 análisis es el siguiente: Blanco-1-2-3-4-5-6-Blanco-6-5-4-3-2-1-Blanco. Este orden se ha de respetar para minimizar cualquier posible impacto que pudiera tener el orden en los resultados. El porcentaje de pérdida de absorbancia se calcula:

$$\% \text{ perdida absorbancia} = \left[\frac{(abs_0 - abs_5)}{abs_0} - \frac{(abs_{B0} - abs_{B5})}{abs_{B0}} \right] * 100 \quad (\text{eq})$$

donde:

abs_x = absorbancia en $t=x$

abs_{Bx} = absorbancia del blanco en $t=x$

El método es calibrado mediante patrones de Trolox, y los resultados son expresados en meq. Trolox/ g muestra.

3.2.6.3 Ensayo ORAC

El ensayo ORAC se realiza siguiendo el procedimiento descrito por Ou B. et al (2001). Este consiste en la cuantificación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición del ataque radicalario a la fluoresceína por parte del radical AAPH.

Material

Aparatos

- Fluorímetro Fluostar Omega (con placas de 96 pocillos 200 μ L)

Productos

- 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride (AAPH)
- Fluoresceína (PA)
- Soluciones tampón de fosfato (PBS) 0.01M a 37°C
- 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid (Trolox)
- Agua Milli-Q



Método

1. Preparar 5 patrones de Trolox de 20, 40, 100, 200 y 300 μM en PBS.
2. Preparar una disolución de fluoresceína de 0.05032 ppm.
3. Añadir 3:5 de Fluoresceína a cada uno de los pocillos.
4. Añadir 1:10 de muestra, patrón o blanco (según corresponda) a los pocillos y colocar la placa a incubar a 37°C durante 10 minutos.
5. Realizar una primera lectura
6. Preparar una disolución de AAPH en PBS de 54,24g/L. En caso de no usarla inmediatamente, esta disolución ha de ser guardada en un baño de hielo y protegida de la luz.
7. Añadir 3:10 de la disolución de AAPH a cada uno de los pocillos.
8. Realizar lecturas a intervalos de cada 2 minutos durante 90 minutos para obtener los datos de la cinética.

Los datos obtenidos son las áreas debajo de las curvas de fluorescencia, aproximadas por el método de los trapecios. El tratamiento es análogo a los que se han utilizado en los métodos TEAC y DPPH.

$$\text{disminucion fluorescencia} = \left[\frac{A_i}{Fl_0} - \frac{A_B}{Fl_{B0}} \right] \quad (\text{eq})$$

donde:

A_i = Área calculada de la muestra del pocillo i

A_B = Área del blanco

Fl_0 = Lectura inicial de la muestra del pocillo i

Fl_{B0} = Lectura inicial del blanco

El método es calibrado mediante patrones de Trolox, y los resultados son expresados en meq. Trolox/ g muestra.

3.2.7 Determinación de valor de peróxidos

Para la determinación del valor de peróxidos en las emulsiones, que nos cuantifica la oxidación primaria del aceite que lo forma, se procede al análisis mediante el método de ferro-cianato, calibrado por el método oficial Cd. 8 – 53 revisado en 1997 (AOCS, 2000).



3.2.7.1 Valor de peróxido por el método ferrocianato

Este método consiste en la reacción entre hierro (II) y los peróxidos en la emulsión, para formar hierro (III), que combinado con el anión tiocianato presenta una coloración rojo intenso cuyo espectro presenta un máximo a $\lambda = 500\text{nm}$.

Material

Aparatos

- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8524A
- Balanza analítica

Productos

- Etanol 96%
- Cloruro de hierro (II)
- Ácido clorhídrico 35%
- Tiocianato de amonio

Método

1. Preparar una disolución de cloruro de hierro (II) X g/L (o M), en 3.5% de ácido clorhídrico. Preparar una disolución de tiocianato de amonio al 30%. Ambas disoluciones pueden ser guardadas en nevera para futuros ensayos.
2. Pesar aproximadamente 10 μg de emulsión en una cubeta (no añadir nada en el caso del blanco).
3. Añadir 4 mL de etanol 96%.
4. Añadir una proporción de 1:50 de las disoluciones de cloruro de hierro (II) y tiocianato de amonio y homogeneizar.
5. Realizar la lectura a $\lambda = 500\text{ nm}$.

Este método es calibrado mediante el método oficial Cd 8-53 revisado en 1997 (AOCS, 2000), y los valores están expresados en meq. O₂ activo/Kg de emulsión.

3.2.7.2 Índice de peróxidos método oficial Cd 8-53



El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del ioduro de potasio en las condiciones de trabajo descritas. La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de ioduro de potasio. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato de sodio.

Material

Aparatos

- Balanza analítica

Productos

- Triclorometano
- Ácido acético glacial
- Ioduro de potasio
- Almidón soluble para iodometrías
- Tiosulfato de sodio pentahidratado
- Dicromato de potasio
- Ácido clorhídrico 35%
- Ácido salicílico
- Hipoclorito de sodio

Método

1. Mezclar 3 volúmenes de ácido acético glacial con 2 volúmenes de cloroformo para que el volumen final sea de 500 mL.
2. Disolver un exceso de ioduro de potasio (KI) en agua destilada hirviendo (sobre unos 10 g de KI en 6 mL de agua, preparación diaria).
3. Pesar 12,45 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), disolverlo y enrasarlo con agua destilada en un aforado de 500 mL (0.1N). Preparar una dilución 1:10 (0.01N).
4. Pesar 1 g de almidón y disolverlo en una pequeña cantidad de agua destilada fría. Añadir, agitando, 200 mL de agua hirviendo y dejarlo hervir durante unos segundos. Inmediatamente enfriarlo de forma rápida. Añadir 0,25 g de ácido salicílico (1,25 g/L) como conservante del indicador. (2-3 semanas de estabilidad en refrigeración)



5. Pesar $5,00 \pm 0,05$ g de muestra en un erlenmeyer de 100 mL con tapón de cristal, añadiendo 30 mL de la solución ácido acético – cloroformo. Agitar hasta que la muestra se disuelva.
6. Añadir 0,5 mL de la solución saturada de KI.
7. Dejar reposar la solución durante 1 minuto, agitándola de vez en cuando durante este minuto.
8. Añadir inmediatamente 30 mL de agua destilada.
9. Valorar esta solución con la solución de tiosulfato de sodio, añadiéndolo de forma gradual y con agitación continua hasta que el color amarillo prácticamente haya desaparecido.
10. Añadir unos 2 mL de la solución indicadora de almidón.
11. Continuar la valoración, siempre con agitación constante para liberar todo el ioduro que pueda tener la solución, hasta que el color azul desaparezca.

NOTA (1). Se debe realizar un blanco en cada tanda de análisis para verificar que el material y los reactivos estén correctos.

NOTA (2) Si en el punto final de la valoración se ha usado menos de 0,5 mL de solución 0,1 N de tiosulfato de sodio, repetir la determinación usando la solución 0,01 N.

El valor de peróxidos se expresa en miliequivalentes de peróxido/kg de muestra y se calcula de la siguiente forma:

$$VP = \frac{(V - B) \cdot N \cdot 1000}{P} \quad (\text{eq})$$

Donde:

V= volumen de tiosulfato gastado en el blanco

B= volumen de tiosulfato gastado en la muestra

N= normalidad de la solución de tiosulfato usada

P= peso en gramos de la muestra

3.2.8 Análisis mediante HPLC

Para comenzar con la identificación de los polifenoles presentes en la muestra, se procede a su análisis mediante HPLC. Esta técnica permite comparar los cromatogramas obtenidos para las muestras con los obtenidos para algunos patrones. La comparación se realiza básicamente por el tiempo de retención.



Material

Aparatos

- HPLC Agilent serie 1200
- Columna HPLC Luna 3micras PFP (150x4.6 mm)
- Detector UV

Productos

- Agua Milli-Q
- Acetonitrilo (calidad HPLC)
- Ácido acético (calidad HPLC)
- Patrones de polifenoles
- Extracciones de piel de kiwi

Método

Todas las impurezas se filtran a través de un filtro de 0.45 micras, para eliminar cualquier sólido o impureza.

Análisis de las muestras. Colocar los gradientes de la maquina según la tabla siguiente.

Tabla 3.3 Parámetros de fase móvil HPLC.

Tiempo (min)	% A (H ₂ O)	% B (Acetonitrilo)	Flujo (mL/min)
0	80	20	1
10	55	45	1





4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Para la determinación de todos los resultados obtenidos se ha trabajado con triplicados de todas las muestras, dando el resultado como media \pm intervalo de confianza (calculado a partir de una distribución t-student con $p < 0.05$)

4.1.1 Determinación del tiempo mínimo de extracción

Con el fin de determinar el tiempo mínimo de extracción en el cual se extrajeran la práctica totalidad de los antioxidantes presentes en la muestra, se realiza una que consiste en realizar extracciones con el mismo solvente, en este caso acetona al 30%, y a continuación analizar el extracto obtenido para realizar una comparativa. Los análisis que se realizan son el método Folin-Ciocalteu para la determinación de los polifenoles totales y el método DPPH para la actividad antioxidante en los extractos. Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 4.1**:

Tabla 4.1 Polifenoles totales (ppm eq. ácido gálico) y capacidad antioxidante (meq. Trolox/ g muestra) para las extracciones a diferentes tiempos.

Tiempo	Folin-Ciocalteu (ppm eq. ácido gálico)*	DPPH (meq. Trolox/ g muestra)*
30'	2314 \pm 89 ^a	0,1099 \pm 0,0101 ^a
1 h	2411 \pm 282 ^a	0,1086 \pm 0,0163 ^a
2 h	2342 \pm 69 ^a	0,1071 \pm 0,0090 ^a
4h	2354 \pm 86 ^a	0,1077 \pm 0,0042 ^a
6h	2393 \pm 78 ^a	0,1110 \pm 0,0116 ^a
24h	2333 \pm 38 ^a	0,1125 \pm 0,0055 ^a

* Valores expresados como media \pm intervalo de confianza (t-student $p < 0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas entre si ($p < 0.05$)



El tiempo de extracción mínimo se estimó limitando el tiempo relativo de manipulación total de las muestras a un máximo del 10% del tiempo de extracción. Dado que el tiempo de manipulación en ninguno de los casos disminuía de los 3 minutos, el tiempo mínimo de extracción se fijó en 30 minutos.

4.1.2 Optimización del método de extracción

A continuación, y con la intención de optimizar la extracción de compuestos antioxidantes de la piel de kiwi, se llevan a cabo una serie de pruebas para comprobar con que solvente y en que concentración se logra la máxima extracción. Para ello, se utiliza un modelo de diagrama tricomponente y se analizan los extractos obtenidos. En la **tabla 4.2** se puede ver resumido las concentraciones de los diferentes solventes en cada una de las extracciones.

Tabla 4.2 Composición del solvente de las extracciones (en %)

Extracción	% componente		
	Acetona	Etanol	Agua
A:50 E:00 W:50	50	-	50
A:70 E:00 W:30	70	-	30
A:00 E:50 W:50	-	50	50
A:00 E:70 W:30	-	70	30
A:70 E:30 W:00	70	30	-
A:30 E:70 W:00	30	70	-
A:20 E:20 W:60	20	20	60
A:30 E:30 W:40	30	30	40
A:40 E:40 W:20	40	40	20
A:50 E:20 W:30	50	20	30
A:20 E:50 W:30	20	50	30
A:80 E:10 W:10	80	10	10



A:10 E:80 W:10	10	80	10
A:20 E:00 W:80	20	-	80
A:00 E:20 W:80	-	20	80

Adicionalmente, también se realizan análisis de extracciones obtenidas utilizando metanol al 75% y agua destilada. El metanol al 75% es uno de los solventes más usados en extracciones, y el caso del agua permite obtener los valores de polifenoles y actividad antioxidante aproximados que tendría una infusión de nuestra muestra.

4.1.3 Ensayo Folin-Ciocalteu

Se realiza el análisis de polifenoles totales siguiendo el método Folin-Ciocalteu descrito en el apartado 3.2.5.1, una vez tratados los datos obtenemos la concentración de polifenoles totales en la muestra seca, se recogen en la **tabla 4.3**.

Tabla 4.3 Concentración de polifenoles totales (mg eq. ácido gálico/ 100g muestra) según el solvente utilizado.

Extracción	Folin-Ciocalteu (ppm eq. ácido gálico)*
A:50 E:00 W:50	2149 ± 156 ^h
A:70 E:00 W:30	1992 ± 110 ^h
A:00 E:50 W:50	892 ± 135 ^c
A:00 E:70 W:30	564 ± 113 ^b
A:70 E:30 W:00	NC
A:30 E:70 W:00	NC
A:20 E:20 W:60	1829 ± 189 ^g
A:30 E:30 W:40	1792 ± 42 ^g
A:40 E:40 W:20	1273 ± 66 ^f
A:50 E:20 W:30	1941 ± 133 ^g



A:20 E:50 W:30	1310 ± 179 ^f
A:80 E:10 W:10	613 ± 109 ^b
A:10 E:80 W:10	179 ± 101 ^a
A:20 E:00 W:80	2152 ± 145 ^h
A:00 E:20 W:80	1160 ± 11 ^e
MeOH 75%	1053±1 ^d
H ₂ O	611±94 ^b

* Valores expresados como media ± intervalo de confianza (t-student p<0.05). Letras diferentes representan diferencias significativas entre si (p<0.05)

N.C.: No cuantificable

4.1.4 Ensayo TEAC

Para la determinación del óptimo de extracción en cuanto a actividad antioxidante de la muestra, se procede a realizar tres análisis diferentes: TEAC, DPPH y ORAC. Para el ensayo TEAC, se realiza siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.6.1, obteniendo los resultados descritos en la **tabla 4.4**:

Tabla 4.4 Capacidad antioxidante (meq. Trolox/ g muestra) según el solvente utilizado mediante TEAC a ? = 734 nm y ? = 402 nm

Nº extracción	TEAC	
	(meq. Trolox/ g muestra)*	
	? = 734 nm	? = 402 nm
A:50 E:00 W:50	0,1654 ± 0,0349 ^e	0,1869 ± 0,0381 ^e
A:70 E:00 W:30	0,1214 ± 0,0698 ^d	0,1310 ± 0,0710 ^d
A:00 E:50 W:50	0,0808 ± 0,0112 ^c	0,0939 ± 0,0100 ^c
A:00 E:70 W:30	0,0621 ± 0,0107 ^c	0,0738 ± 0,0122 ^c
A:70 E:30 W:00	0,0145 ± 0,0007 ^a	0,0152 ± 0,0006 ^a
A:30 E:70 W:00	0,0114 ± 0,0020 ^a	0,0124 ± 0,0019 ^a



A:20 E:20 W:60	0,1165 ± 0,0442 ^d	0,1321 ± 0,0411 ^d
A:30 E:30 W:40	0,1363 ± 0,0129 ^e	0,1534 ± 0,0072 ^e
A:40 E:40 W:20	0,1181 ± 0,0120 ^d	0,1345 ± 0,0080 ^d
A:50 E:20 W:30	0,1433 ± 0,0113 ^e	0,1562 ± 0,0142 ^e
A:20 E:50 W:30	0,1045 ± 0,0040 ^d	0,1264 ± 0,0078 ^d
A:80 E:10 W:10	0,0143 ± 0,0004 ^b	0,0185 ± 0,0002 ^b
A:10 E:80 W:10	0,0122 ± 0,0031 ^a	0,0156 ± 0,0027 ^a
A:20 E:00 W:80	0,1185 ± 0,0089 ^d	0,1332 ± 0,0086 ^d
A:00 E:20 W:80	0,0666 ± 0,0128 ^c	0,0758 ± 0,0162 ^c

* Valores expresados como media ± intervalo de confianza (t-student p<0.05). Letras diferentes representan diferencias significativas entre si (p<0.05)

4.1.5 Ensayo DPPH

Para la realización de este ensayo, se ha proseguido tal i como se describe en el apartado 3.2.6.2, obteniendo los resultados descritos en la **tabla 4.5**:

Tabla 4.5 Capacidad antioxidante (meq. Trolox/ g muestra) según el solvente utilizado mediante DPPH

Nº extracción	DPPH (meq. Trolox/ g muestra)*
A:50 E:00 W:50	0,1343 ± 0,0186 ^f
A:70 E:00 W:30	0,1170 ± 0,0115 ^e
A:00 E:50 W:50	0,0432 ± 0,0017 ^d
A:00 E:70 W:30	0,0311 ± 0,0023 ^c
A:70 E:30 W:00	0,0066 ± 0,0003 ^a
A:30 E:70 W:00	0,0056 ± 0,0013 ^a



A:20 E:20 W:60	0,1175 ± 0,0187 ^e
A:30 E:30 W:40	0,1021 ± 0,0093 ^e
A:40 E:40 W:20	0,0406 ± 0,0024 ^d
A:50 E:20 W:30	0,1009 ± 0,0121 ^e
A:20 E:50 W:30	0,0471 ± 0,0016 ^t
A:80 E:10 W:10	0,0395 ± 0,0048 ^d
A:10 E:80 W:10	0,0101 ± 0,0001 ^b
A:20 E:00 W:80	0,1067 ± 0,0022 ^e
A:00 E:20 W:80	0,0920 ± 0,0327 ^e
MeOH 75%	0.0520± 0.0177 ^d
H ₂ O	0.0196±0.0000 ^b

* Valores expresados como media ± intervalo de confianza (t-student p<0.05). Letras diferentes representan diferencias significativas entre si (p<0.05)

4.1.6 Ensayo ORAC

Para la realización de este ensayo, se ha proseguido tal i como se describe en el apartado 3.2.6.3, obteniendo los resultados descritos en la **tabla 4.6**:

Tabla 4.6 Capacidad antioxidante (meq. Trolox/ g muestra) según el solvente utilizado mediante ORAC

Nº extracción	ORAC (meq. Trolox/ g muestra)*
A:50 E:00 W:50	0,0684 ± 0,0106 ^a
A:70 E:00 W:30	0,0982 ± 0,063 ^a
A:00 E:50 W:50	0,1919 ± 0,0176 ^c
A:00 E:70 W:30	0,1815 ± 0,0058 ^c



A:70 E:30 W:00	0,1157 ± 0,0135 ^b
A:30 E:70 W:00	0,0652 ± 0,0067 ^a
A:20 E:20 W:60	0,2148 ± 0,0086 ^d
A:30 E:30 W:40	0,1873 ± 0,0087 ^t
A:40 E:40 W:20	0,2094 ± 0,0074 ^d
A:50 E:20 W:30	0,2065 ± 0,0144 ^d
A:20 E:50 W:30	0,2568 ± 0,0095 ^e
A:80 E:10 W:10	0,1073 ± 0,0104 ^b
A:10 E:80 W:10	0,1893 ± 0,0141 ^c

* Valores expresados como media ± intervalo de confianza (t-student p<0.05). Letras diferentes representan diferencias significativas entre si (p<0.05)

4.1.7 Ensayo con emulsiones

Con el fin de estudiar la capacidad antioxidante del extracto sobre lípidos, se realiza el ensayo sobre las emulsiones de aceite en agua al 10% a las que se les adiciona extracto, para lograr las concentraciones finales indicadas en la **tabla 4.7**. Simultáneamente, se estudia el efecto de la vitamina C y del extracto de pulpa de kiwi sobre la misma matriz de emulsión. Todas las extracciones y disoluciones se realizan con metanol al 75%.

Tabla 4.7 Concentración final de las emulsiones (en %)

Nº Emulsión	% emulsión madre	% Extracto piel	% Acido Ascórbico(10%)	% Extracto pulpa	% MeOH 75%
1	90	-	-	-	10
2	90	10	-	-	-
3	90	2	-	-	8
4	90	0.5	-	-	9.5
5	90	-	10	-	-



6	90	-	0.33	-	0.66
7	90	-	-	10	-
8	90	-	-	0.33	0.66

Para la determinación del valor de peróxido presente en la muestra, se procede según el método expuesto en el apartado 3.2.7.1. La **tabla 4.8** recoge la evolución temporal del valor de peróxido presente en cada una de las emulsiones.



Tabla 4.8 Evolución del valor de peróxido de las emulsiones a lo largo del tiempo (meq. O₂/Kg.de emulsión)

Emulsión	Tiempo (h)															
	0	24	44	68	96	140	164	187,5	212,5	237	259,5	288	334	356	380,5	403,5
Control	NC	5,3	47,8	111,6	226,9	342,2	709,0	698,7	545,0	602,4	1096,2					
10% Piel	NC	1,4	26,1	10,1	13,5	16,9	20,2	13,6	18,4	30,1	37,4	48,6	105,7	54,8	93,4	230,5
2% Piel	NC	NC	29,7	19,3	46,5	73,7	100,9	95,5	115,8	167,3	287,3	393,2	344,2	525,4	669,4	1070,1
0.5% Piel	NC	10,1	36,2	49,5	285,4	331,1	471,9	580,5	619,1	645,1	914,5					
10% ácido ascórbico	NC	NC	23,6	42,1	102,5	162,9	421,8	449,3	198,6	365,2	492,1					
0.33% ácido ascórbico	NC	65,4	205,3	276,3	356,6	436,8	695,5	807,3	500,5	456,1	574,2					
10% Pulpa	NC	22,5	70,4	118,3	205,0	291,8	553,6	687,3	619,7	623,2	897,8					
0.33% Pulpa	NC	15,3	60,8	111,6	182,8	254,1	594,2	812,2	921,0	886,7	1273,5					

NC = No cuantificable



4.1.8 Caracterización de polifenoles mediante HPLC

Para la caracterización de polifenoles, se seguirá el método detallado en el apartado 3.2.8. En primer lugar se inyectarán los patrones de polifenoles, epicatequina y quercitina, y a continuación, se inyectarán las muestras. Los cromatogramas obtenidos son los siguientes:

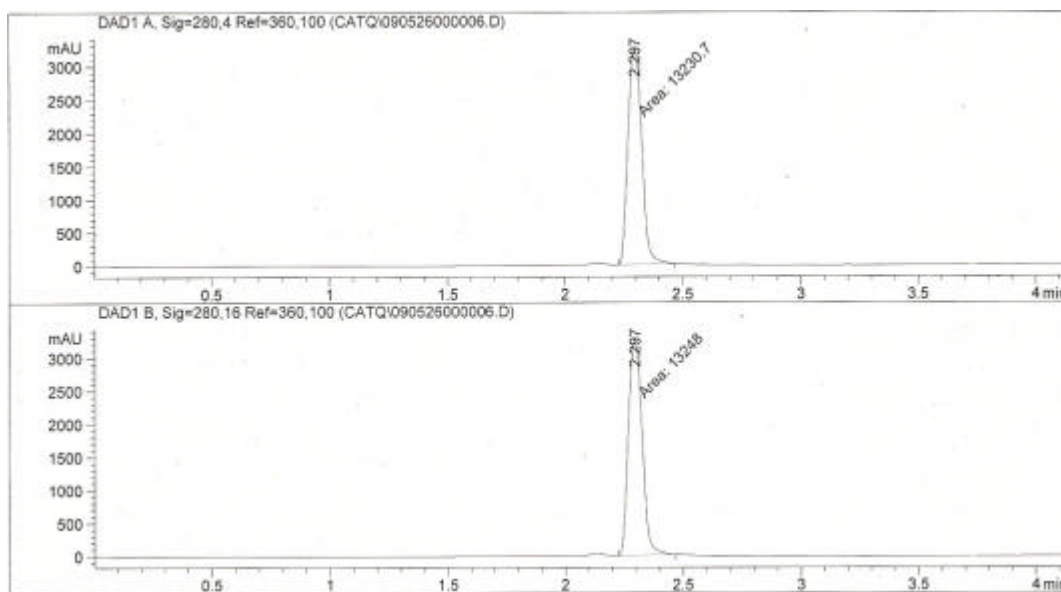


Figura 4.1 Cromatograma HPLC de quercitina

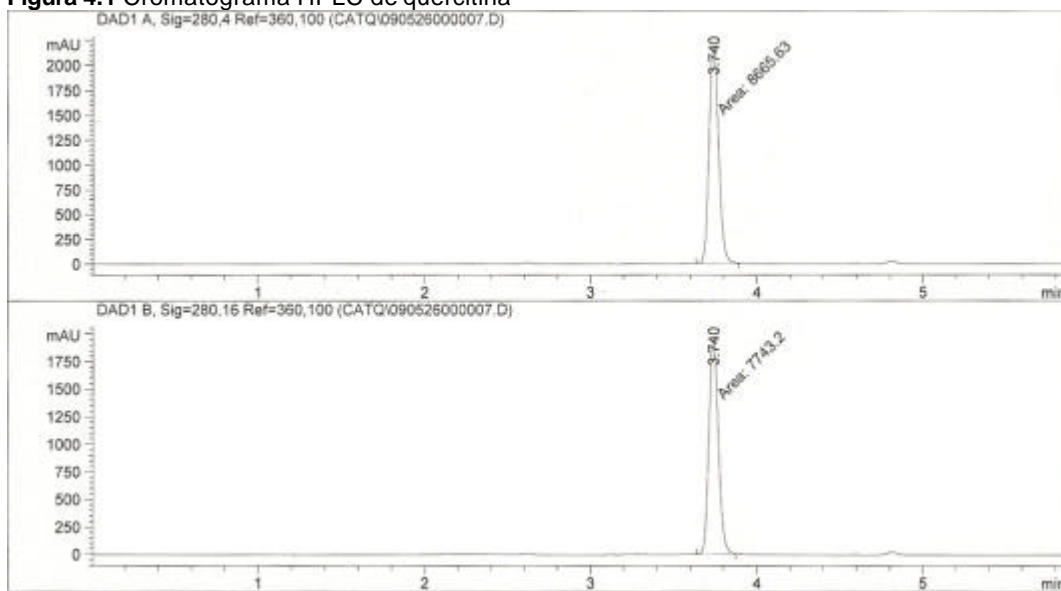


Figura 4.2 Cromatograma HPLC de epicatequina



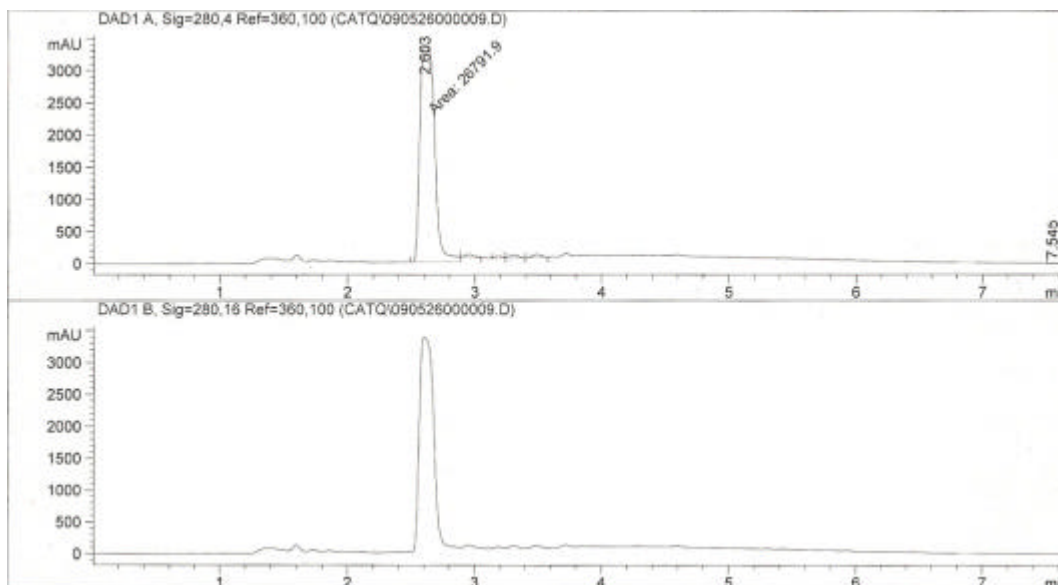


Figura 4.3 Cromatograma HPLC del extracto con solvente de acetona al 30%

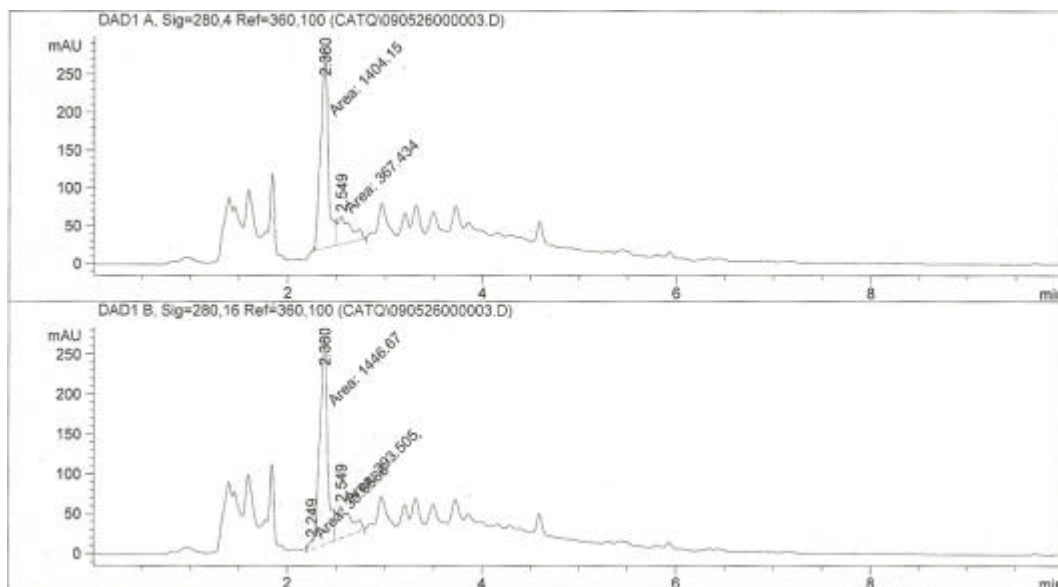


Figura 4.4 Cromatograma HPLC del extracto con solvente de etanol al 30%

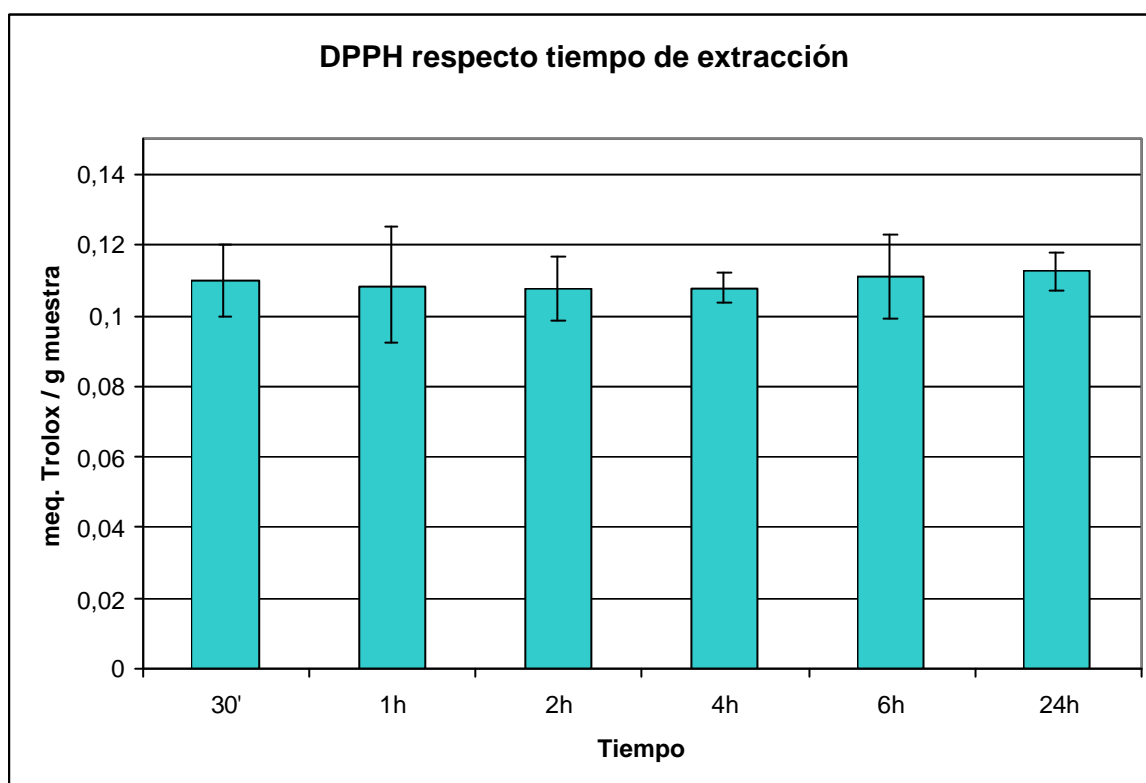




4.2 Discusión

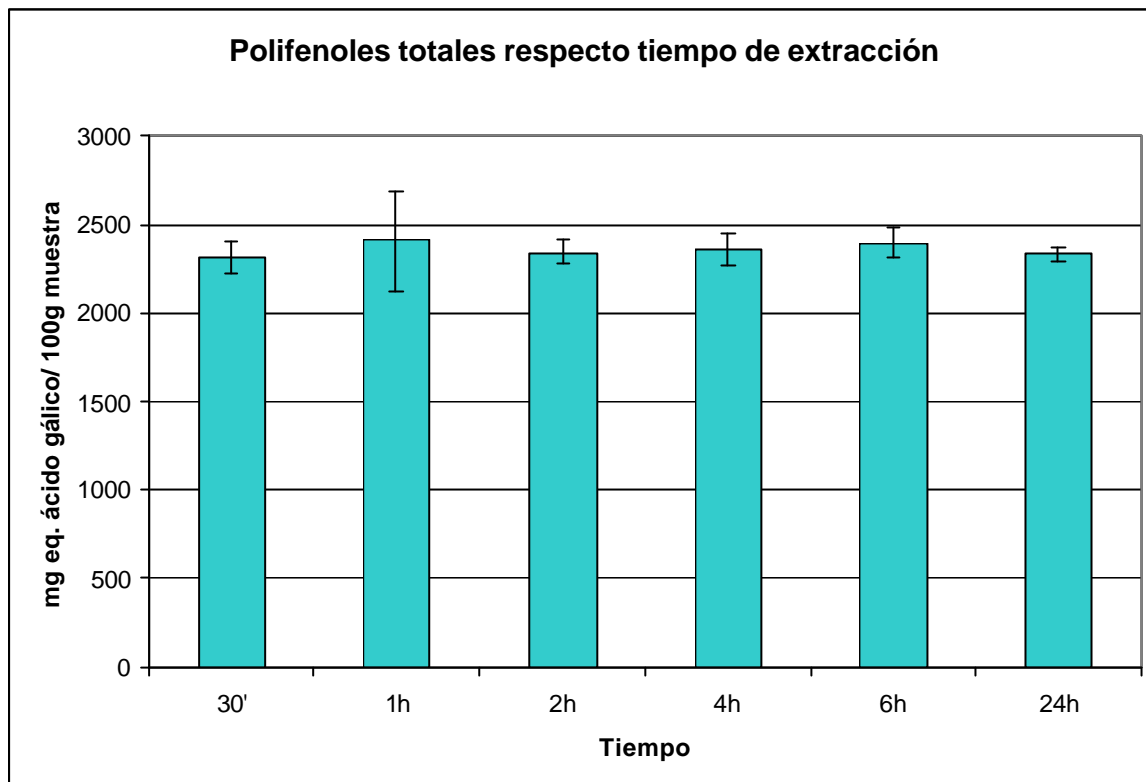
4.2.1 Determinación del tiempo mínimo de extracción

En las gráficas 4.1 y 4.2 se recogen los datos del ensayo del tiempo mínimo para llegar al estado de equilibrio de extracción. En la primera se representa los meq. Trolox/ g muestra frente al tiempo, lo que indica la actividad antiradicalaria. En la segunda se representan los mg eq. ácido gálico/ 100g muestra, que es el valor de polifenoles totales.



Gráfica 4.1 Variación de la actividad antioxidante respecto el tiempo de extracción. (El intervalo de confianza ha sido calculado según una distribución t-student ($p > 0.05$))





Gráfica 4.2 Variación de la cantidad de polifenoles totales respecto el tiempo de extracción. (El intervalo de confianza ha sido calculado según una distribución t-student ($p > 0.05$))

Se puede afirmar que no existen diferencias significativas considerando $p < 0.05$ entre los diferentes tiempos de extracción. Por lo tanto, el tiempo óptimo de extracción es inferior a los 30 minutos. Por este motivo, para la realización de los siguientes ensayos se toma 30 minutos. Además, este ensayo da una primera aproximación del orden de magnitud alrededor del cual se hallarán los valores cuando se realicen las pruebas posteriores.

4.2.2 Optimización del método de extracción

Para hallar la composición óptima del solvente de extracción se llevaron a cabo los ensayos de Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC y ORAC según están descritos en los apartados 3.2.5 y 3.2.6 respectivamente. A partir de los resultados expuestos en los apartados del 4.1.3 a 4.1.6, se inicia un análisis de parametrización de la respuesta de extracción en función de la composición del solvente. Este análisis se lleva a cabo mediante una función creada para este fin mediante el programa matemático MATLAB. Esta función, detallada en el anexo B, tiene como variables de entrada la composición del solvente y los resultados obtenidos en el ensayo (Folin-Ciocalteu, DPPH, TEAC, ORAC), y como parámetros de salida, la grafica 3D, la parametrización de la superficie graficada, la



composición del máximo de extracción en caso de estar dentro de la superficie graficada, y en caso contrario, una aproximación de la composición de éste.

4.2.3 Ensayo Folin-Ciocalteu

Se comienza el tratamiento de resultados con el análisis de la cantidad de polifenoles totales en la muestra por el método de Folin-Ciocalteu. A partir de la función citada en el apartado anterior y descrita en el anexo B, se tratan los datos y se obtiene la superficie recogida en la figura 4.5.

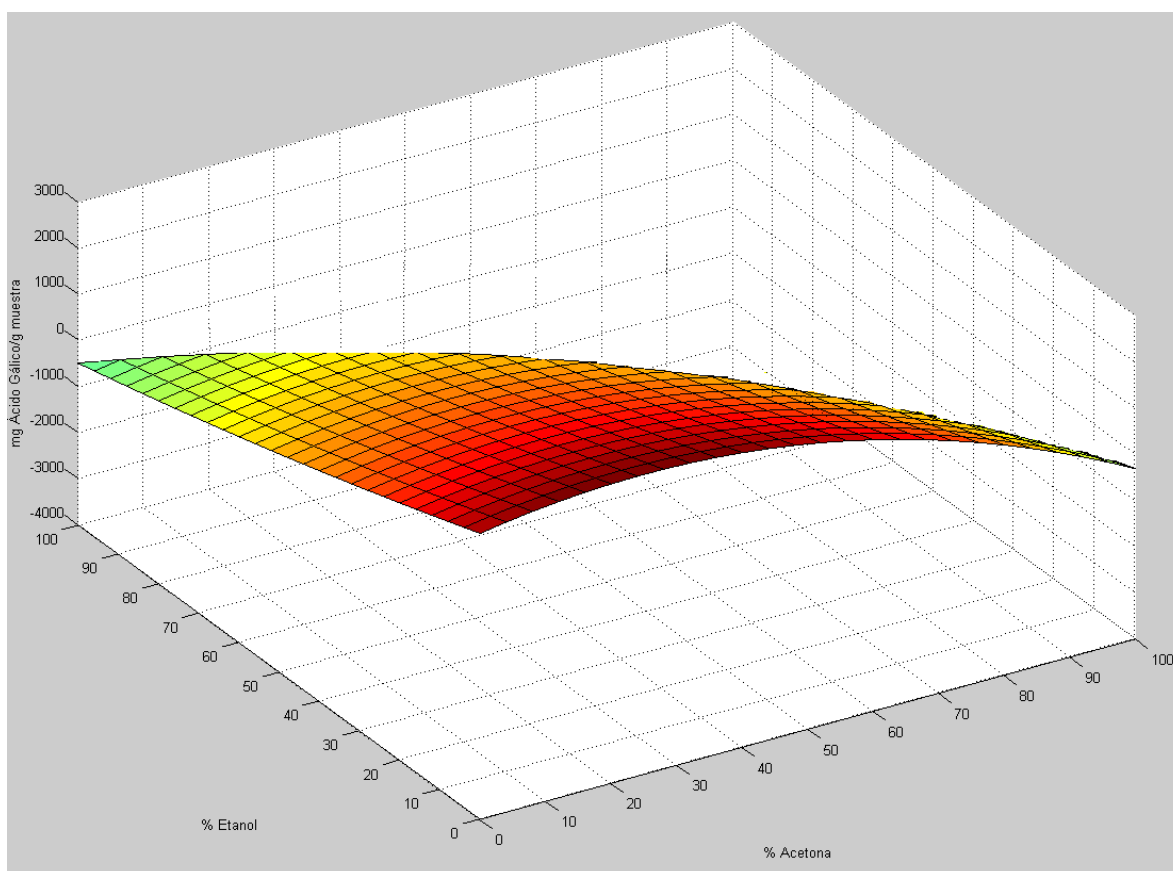


Figura 4.5 Superficie de respuesta de la cantidad de polifenoles totales (en mg eq. ácido gálico/ 100g muestra) mediante Folin-Ciocalteu respecto la composición del solvente.

La ecuación de la superficie parametrizada (eq.1),

$$z = -0.49522 \cdot x^2 + 24.455 \cdot x + 0.048377 \cdot y^2 - 31.765 \cdot y + 2195.208 \quad (\text{eq. 1})$$

donde:

x = % Acetona en el solvente

y = % Etanol en el solvente

z = mg eq. ácido gálico/ 100g muestra



El valor en el que se obtiene el máximo rendimiento de extracción es aquel en el que el solvente tiene un 25% de acetona, redondeado al entero más próximo. Para este valor se estima, al sustituir en la superficie parametrizada, una cantidad de 2812.7mg eq. ácido gálico/ 100g muestra de polifenoles totales. Asimismo, también se realiza el mismo ensayo para un solvente de 75% de metanol y para agua pura, dando unos resultados de 1053 y 611 mg eq. ácido gálico/ 100g muestra respectivamente. Por todo lo expuesto se observa, que el óptimo solvente llega a ser casi tres veces más eficaz que el solvente más ampliamente utilizado en la extracción de polifenoles (metanol 75%) al ser usado sobre la muestra sujeta a ensayo, y casi cinco veces más si es comparado con el agua.

Si se compara estos resultados con los obtenidos de las variedades de uva Ancelota y Tannat [Rockenbach et al, 2008], de 7950 y 6900mg eq. ácido gálico/ 100g muestra de uva total en peso seco en solvente óptimo, se aprecia que el contenido en polifenoles es entre dos y tres veces superior al de la piel de kiwi.

4.2.4 Ensayo DPPH

En segundo lugar se analizan los resultados obtenidos mediante el ensayo DPPH de manera análoga a los análisis de resultados anteriores. Así se obtiene la gráfica 3D, la parametrización de la superficie de respuesta y la determinación de la composición de solvente que da una respuesta máxima. La figura 4.6 muestra la superficie de respuesta obtenida mediante el programa.



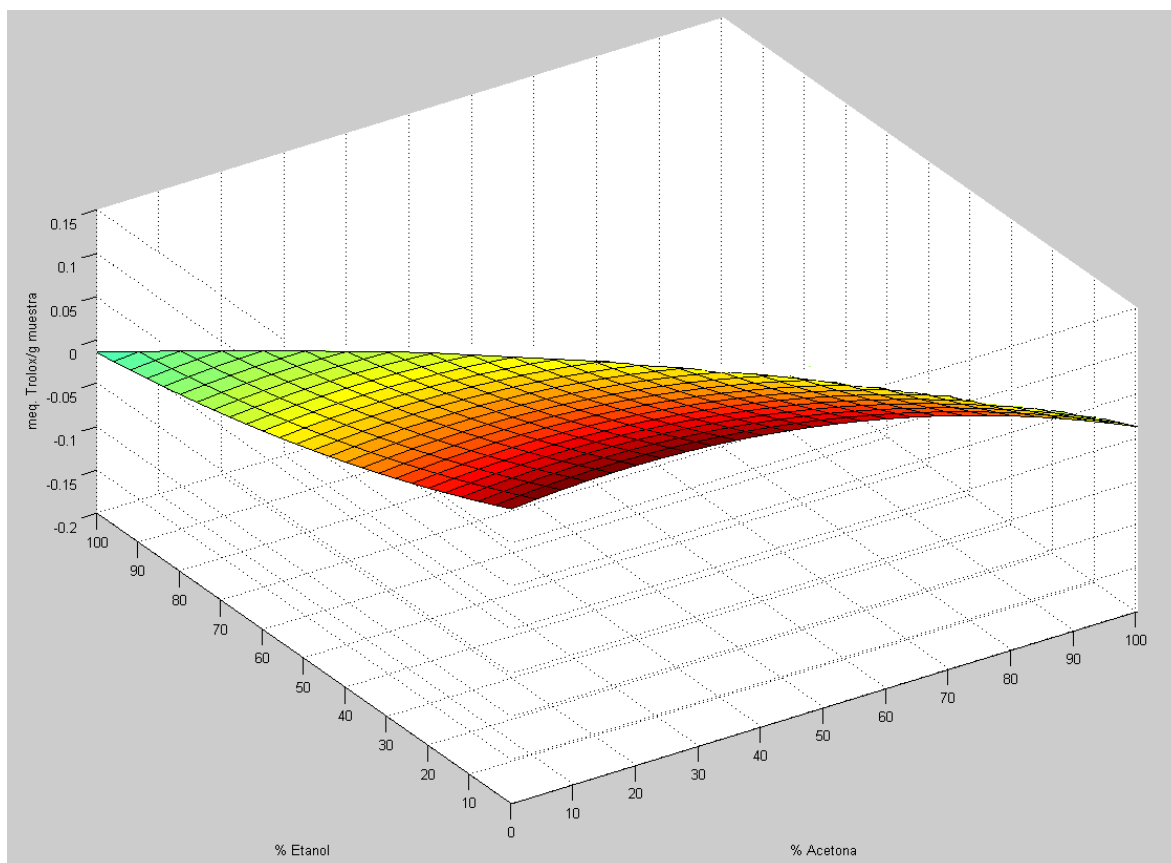


Figura 4.6 Superficie de respuesta de la actividad antioxidante (en meq. Trolox/ g muestra) mediante DPPH respecto la composición del solvente.

En este caso, la función mediante la cual tratamos los resultados nos da como respuesta la ecuación paramétrica (eq. 2) de la superficie graficada, que corresponde a:

$$z = -1.9577 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 0.00068782 \cdot x - 7.5874 \cdot 10^{-6} \cdot y^2 - 0.002308 \cdot y + 0.13992 \quad (\text{eq. 2})$$

donde:

x = % Acetona en el solvente

y = % Etanol en el solvente

z = meq. Trolox/ g muestra

Nuevamente, mediante la utilización de la parametrización obtenida a través de la función de MATLAB, se obtiene que la composición del solvente que da un resultado óptimo en el ensayo DPPH es de acetona al 18%, redondeando a la unidad más próxima, con una estimación de actividad antioxidante de 0.1523 meq. Trolox/ g muestra. Como en el caso del ensayo de polifenoles totales, también se realizaron pruebas utilizando como solvente de extracción metanol al 75% y agua pura, obteniéndose 0.052 y 0.0196 meq. Trolox/g muestra respectivamente, y como en el caso anterior, el solvente más ampliamente



utilizado muestra unos resultados tres veces inferiores al del solvente óptimo encontrado por este análisis, y el agua presenta un poder de extracción 5 veces menor.

4.2.5 Ensayo TEAC

Se realiza el mismo procedimiento que el seguido en el tratamiento de los resultados del ensayo Folin-Ciocalteu y se analizan los resultados obtenidos mediante el ensayo TEAC, para, de la misma manera que en el apartado anterior, obtener la gráfica 3D, la parametrización de la superficie de respuesta y la determinación de la composición de solvente que da una respuesta máxima de actividad antioxidante. Para este ensayo, se han tratado por separado los resultados obtenidos mediante la lectura a dos longitudes de onda: $\lambda = 402\text{nm}$ y $\lambda = 734\text{nm}$.

Primeramente se analizan los resultados obtenidos mediante la lectura a $\lambda=402\text{nm}$. La figura 4.7 muestra la superficie de respuesta.

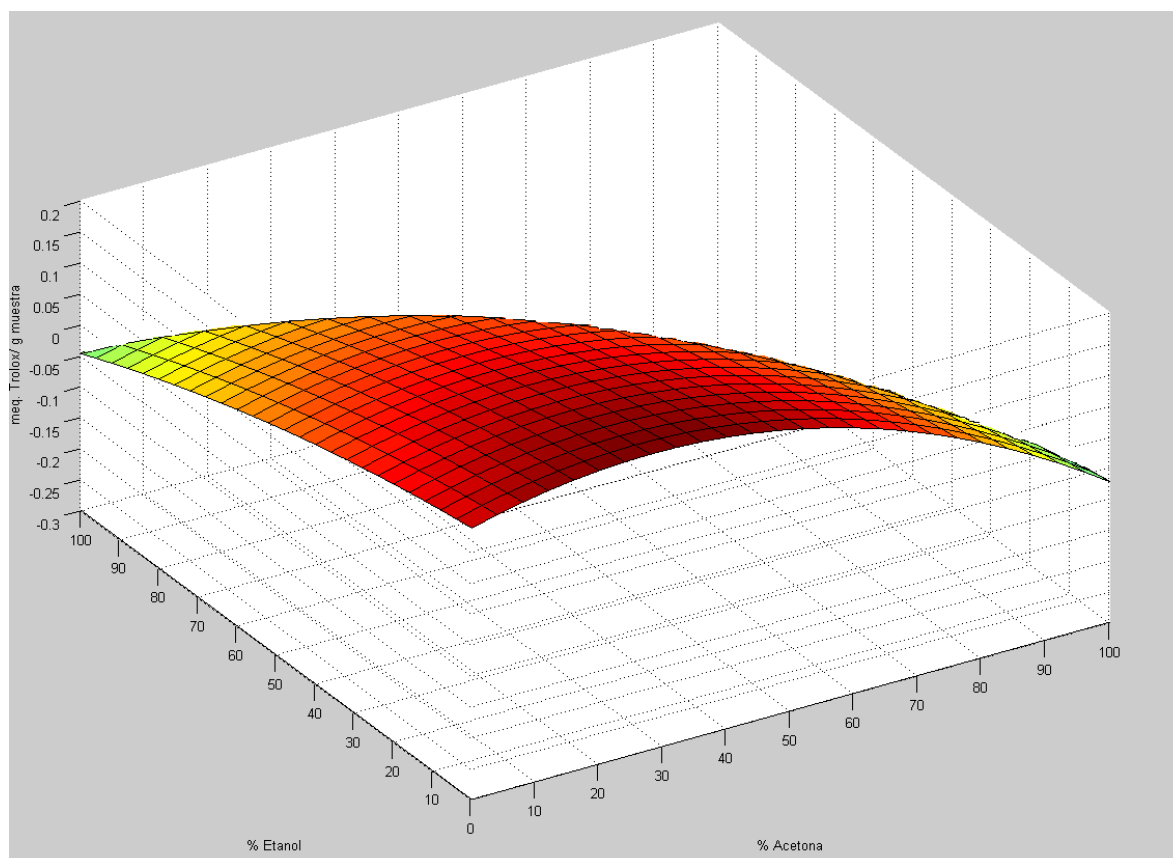


Figura 4.7 Superficie de respuesta de la actividad antioxidante (en meq. Trolox/ g muestra) mediante TEAC a $\lambda=402\text{nm}$ respecto a la composición del solvente.



Como en el caso anterior, se obtiene también la parametrización correspondiente a la superficie creada mediante la función, que se recoge en la ecuación (eq. 3):

$$z = -4.8742 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 0.0027582 \cdot x - 9.2722 \cdot 10^{-6} \cdot y^2 - 0.0009263 \cdot y + 0.13762 \quad (\text{eq. 3})$$

donde:

x = % Acetona en el solvente

y = % Etanol en el solvente

z = meq. Trolox/ g muestra

Una vez más, mediante la parametrización anterior, podemos encontrar la composición de solvente que da un resultado óptimo en el ensayo de TEAC. En nuestra muestra el valor óptimo es un solvente al 28% en acetona (redondeando al entero más próximo), con una estimación del resultado del ensayo TEAC de 0.2149 meq. Trolox/ g muestra.

Análogamente, se realiza el mismo procedimiento con los resultados de lectura para una $\lambda = 734\text{nm}$. La representación en 3D corresponde a la figura 4.8, que es prácticamente igual a la de $\lambda = 402\text{nm}$, tal y como cabía esperar tanto por la bibliografía [Sánchez-Moreno 2002] como por los datos obtenidos experimentalmente.



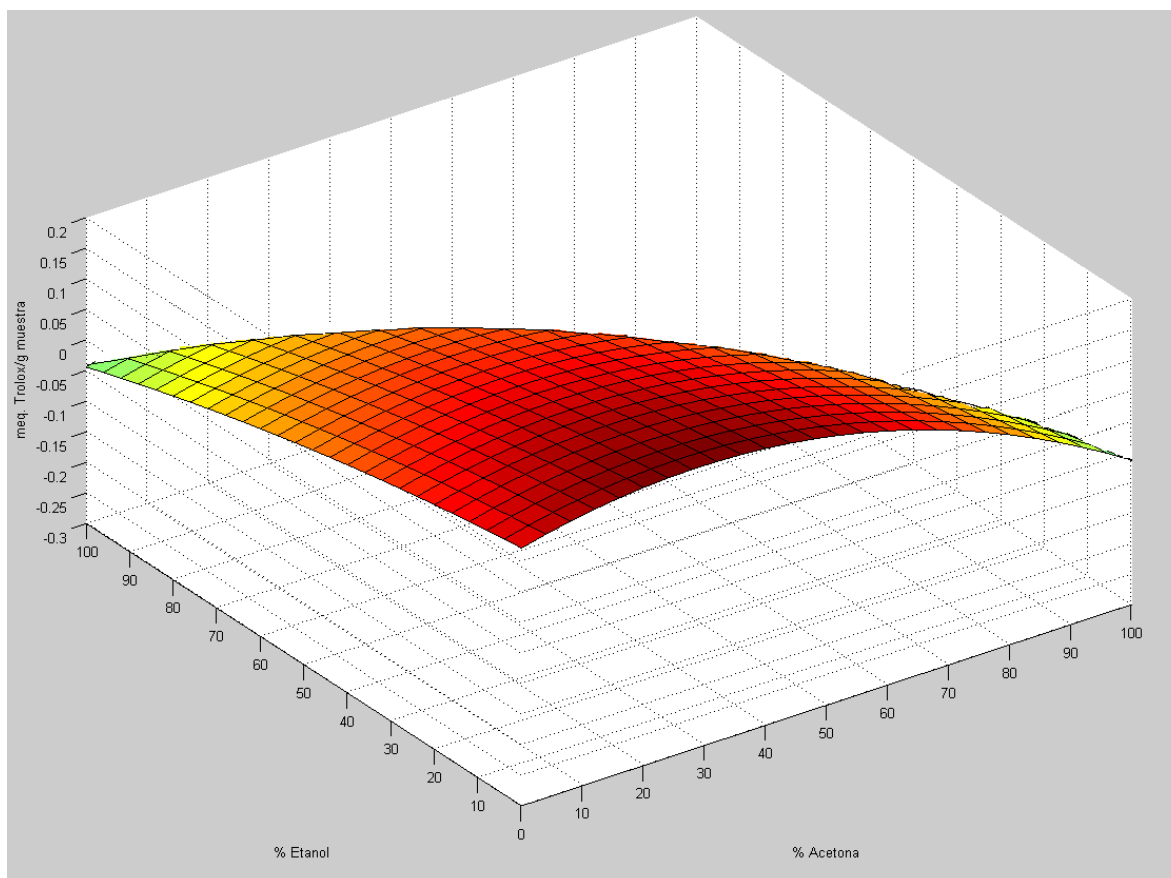


Figura 4.8 Superficie de respuesta de la actividad antioxidante (en meq. Trolox/ g muestra) mediante TEAC a $\lambda=734\text{nm}$ respecto la composición del solvente.

La ecuación paramétrica (eq. 4) de la superficie graficada es:

$$z = -4.3995 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 0.00254 \cdot x - 7.319 \cdot 10^{-6} \cdot y^2 - 0.0009248 \cdot y + 0.12162 \quad (\text{eq. 4})$$

donde:

x = % Acetona en el solvente

y = % Etanol en el solvente

z = meq. Trolox/ g muestra

En $\lambda=734\text{nm}$ la composición óptima del solvente que da el valor máximo es de acetona al 29%, con una estimación de actividad antioxidante de 0.1953 meq. Trolox/ g muestra. La diferencia obtenida respecto al valor de $\lambda=402\text{nm}$ no es estadísticamente significativa.

Si se compara estos resultados con los obtenidos de las variedades de uva Ancelota y Tannat [Rockenbach et al, 2008], de 0.4034 y 0.4762 meq. Trolox/ g muestra en solvente óptimo, se observa que aún estando dentro del mismo orden de magnitud, los resultados obtenidos con estas dos variedades de uvas son aproximadamente el doble que el obtenido en la piel del kiwi.



4.2.6 Ensayo ORAC

Como ultimo ensayo realizado para optimizar el método de extracción, se analiza la actividad antioxidante por el método ORAC, tal y como se describe en el apartado 3.2.6.3. Se procede al tratamiento de los resultados, y se obtiene la figura 4.9.

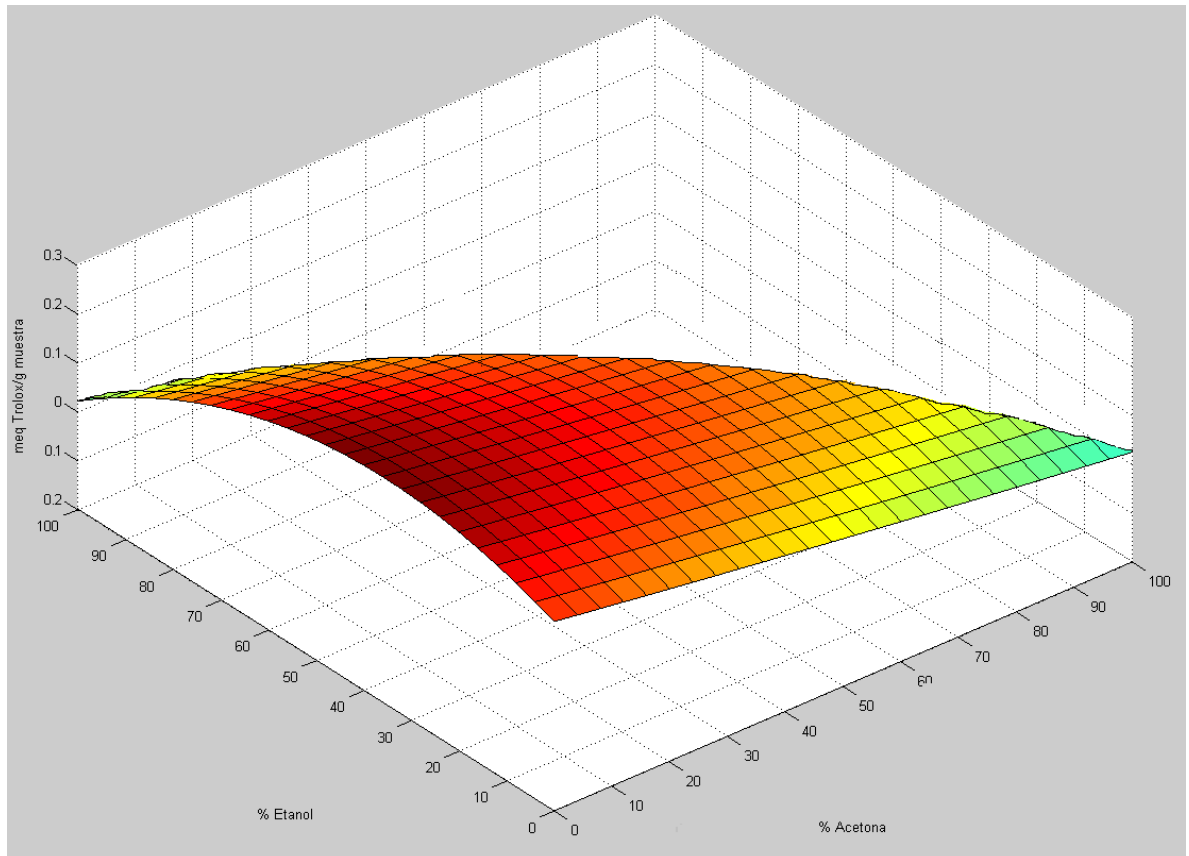


Figura 4.9 Superficie de respuesta de la actividad antioxidante (en meq. Trolox/ g muestra) mediante ORAC respecto la composición del solvente.

Asimismo y mediante la misma función también obtenemos la ecuación de la superficie parametrizada (eq.5),

$$z = -1.4066 \cdot 10^{-6} \cdot x^2 - 0.0013429 \cdot x - 4.9325 \cdot 10^{-5} \cdot y^2 + 0.0034863 \cdot y + 0.18297 \quad (\text{eq. 5})$$

donde:

x = % Acetona en el solvente

y = % Etanol en el solvente

z = meq. Trolox/ g muestra



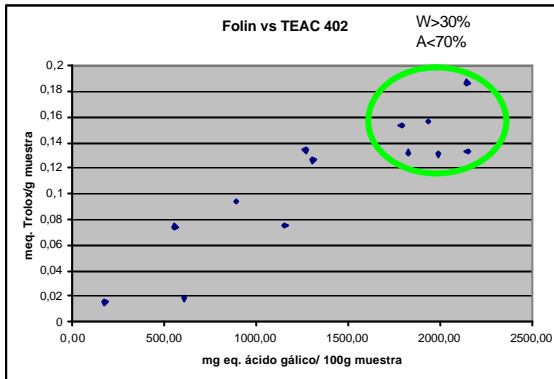
La composición óptima del solvente que da un valor máximo es de etanol al 35%, redondeando al entero más próximo, con un valor estimado mediante la parametrización de 0.2497 meq. Trolox/ g muestra.

En este último ensayo, se denota una peculiaridad respecto a los ensayos anteriores, y es que el ORAC, a diferencia del Folin, TEAC y DPPH, ha obtenido la máxima extracción mediante un solvente en base etanol, a diferencia de los otros tres casos anteriores en el que el solvente óptimo era en base acetona. Este fenómeno puede venir dado por varios motivos. En primer lugar, por la diferencia de solvente en si, ya que cabe la posibilidad de que al utilizar diferentes solventes, los componentes extraídos sean diferentes, y por lo tanto, reaccionen de manera dispar con los radicales introducidos en los ensayos, dado que el radical ABTS es catiónico y los radicales DPPH y AAPH son neutros y con estructuras moleculares diferentes. Otra posible explicación sería la posibilidad de ataque de los solventes al material plástico de la placa de ensayo, aunque esta posibilidad es muy remota, ya que los solventes se encuentran en concentraciones inferiores al 1%, porque en la realización del ensayo se han tenido que diluir las muestras.

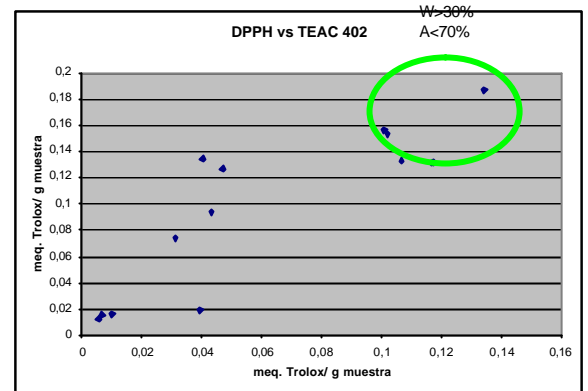
4.2.7 Comparativa entre métodos

Tal y como se acaba de exponer, existen diferencias entre los diferentes métodos de análisis debidas a diversos factores, tales como la influencia del disolvente en los componentes extraídos, la interacción cruzada solvente-extracto-radical, la sensibilidad y selectividad del método, etc.... Con la intención de realizar una comparativa entre los diferentes métodos, se procede a enfrentar los resultados de las pruebas, para poder identificar si existe relación entre ellos.

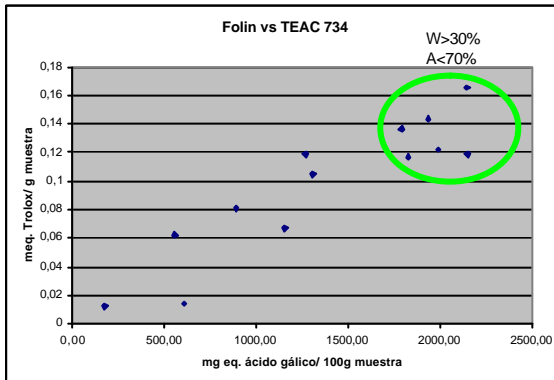




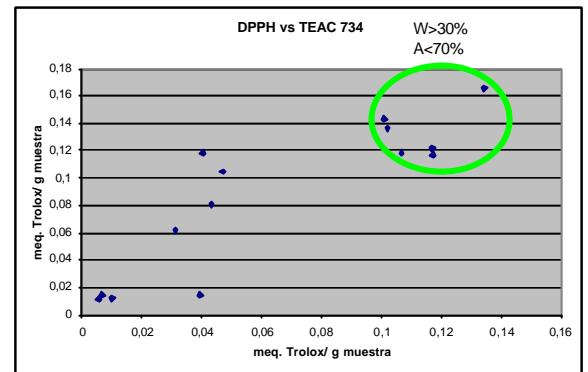
Gráfica 4.3 Relación del contenido total de polifenoles obtenido mediante el método Folin-Ciocalteu frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC ($\lambda=402\text{nm}$).



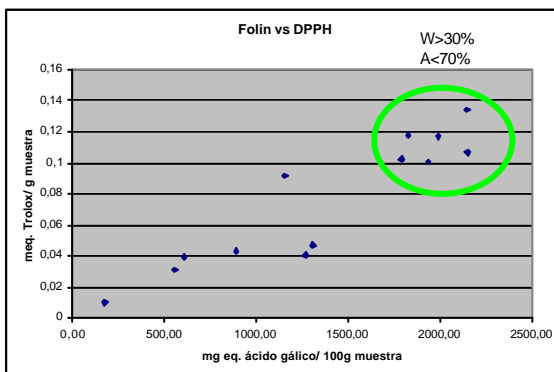
Gráfica 4.6 Relación de la actividad antioxidante medida mediante el ensayo DPPH frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC ($\lambda=402\text{nm}$).



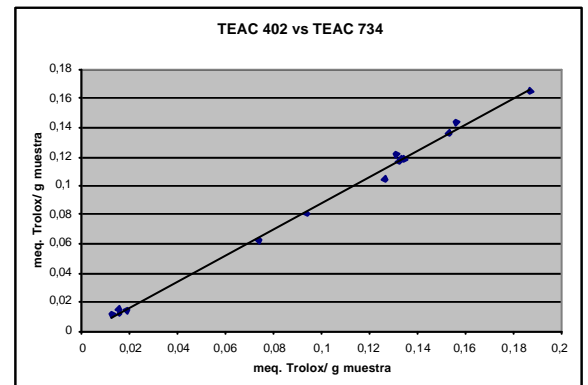
Gráfica 4.4 Relación del contenido total de polifenoles obtenido mediante el método Folin-Ciocalteu frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC ($\lambda=734\text{nm}$).



Gráfica 4.7 Relación de la actividad antioxidante medida mediante el ensayo DPPH frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC ($\lambda=734\text{nm}$).

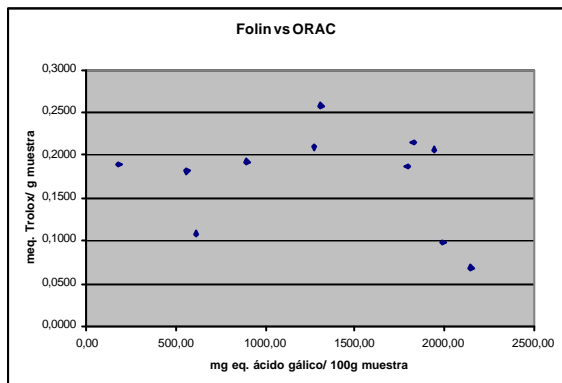


Gráfica 4.5 Relación del contenido total de polifenoles obtenido mediante el método Folin-Ciocalteu frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo DPPH.

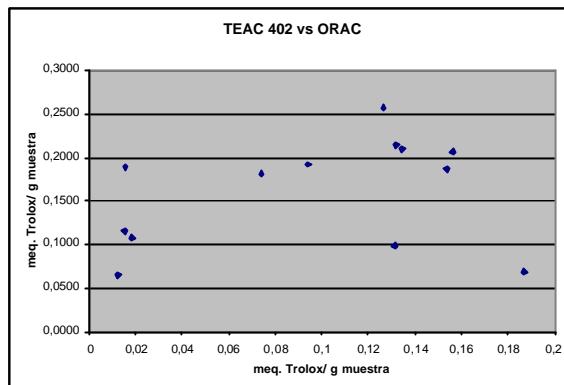


Gráfica 4.8 Relación de la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC ($\lambda=402\text{nm}$) frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC ($\lambda=734\text{nm}$).

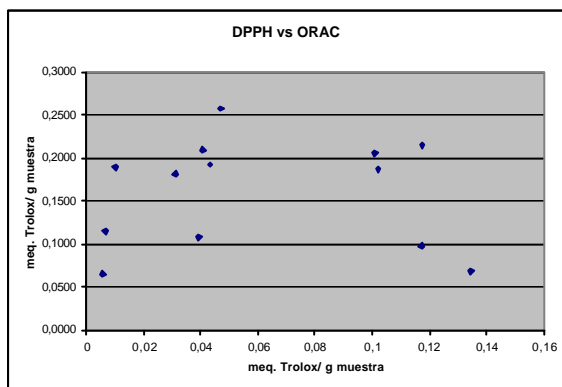




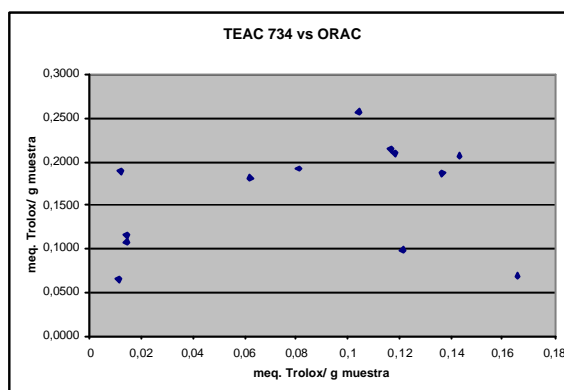
Gráfica 4.9 Relación del contenido total de polifenoles obtenido mediante el método Folin-Ciocalteu frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo ORAC.



Gráfica 4.11 Relación de la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC (?=402nm) frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo ORAC.



Gráfica 4.10 Relación de la actividad antioxidante medida mediante el ensayo DPPH frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo ORAC.



Gráfica 4.12 Relación de la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC (?=734nm) frente a la actividad antioxidante medida mediante el ensayo ORAC.

Como se puede observar, tanto los resultados obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu como los obtenidos con los ensayos TEAC y DPPH, presentan una distribución lineal creciente. Este hecho denota una correlación entre los resultados, exceptuando alguna desviación, hallada mayoritariamente en aquellas muestras con los valores tanto de polifenoles totales como de actividad antioxidante bajos. En estos casos cualquier pequeño error en el método, como sus límites de cuantificación, pueden estar afectando a este resultado. También, como se han visto en los análisis de resultados individuales, observamos que los extractos en base acetona en los ensayos de Folin-Ciocalteu, TEAC y DPPH se encuentran situados en la esquina superior derecha de las gráficas dado a su mayor respuesta de capacidad antioxidante.

Asimismo, ninguna de las tres pruebas anteriormente citadas tiene correlación alguna con el ensayo ORAC, como se puede observar en las graficas 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12, para las



extracciones realizadas, ya que presentan una dispersión aleatoria en los enfrentamientos graficados. Como se explicó más arriba, esto puede ser tanto debido a la naturaleza de los componentes extraídos, como a la propia de los solventes utilizados, como también a la posibilidad de una sinergia solvente-extracto-radical. También cabe destacar que el método ORAC tiene una sensibilidad cincuenta veces superior que los otros métodos, lo que puede afectar a los resultados.

Por último, tal y como se observa en la gráfica 4.8, existe correlación entre los resultados obtenidos en el ensayo TEAC para las dos longitudes de onda; ambos equivalentes para la determinación de la actividad antioxidante de una muestra.

Una vez analizados todos los resultados, se confecciona una tabla resumen con los resultados obtenidos del análisis y discusión de los ensayos.

Tabla 4.9 Resumen de resultados de optimización de extracción

Ensayo	Solvente óptimo	Resultado estimado máximo
Folin-Ciocalteu	Acetona 25%	2812.7 mg eq. ácido gálico/ 100g muestra
DPPH	Acetona 18%	0.1523 meq. Trolox/ g muestra
TEAC 402	Acetona 28%	0.2149 meq. Trolox/ g muestra
TEAC 734	Acetona 29%	0.1953 meq. Trolox/ g muestra
ORAC	Etanol 35%	0.2497 meq. Trolox/ g muestra

Tabla 4.10 Resumen de correlaciones entre métodos

Método \ Método	Folin	DPPH	TEAC 402	TEAC 734	ORAC
Folin					
DPPH	SI				
TEAC 402	SI	SI			
TEAC 734	SI	SI	SI		

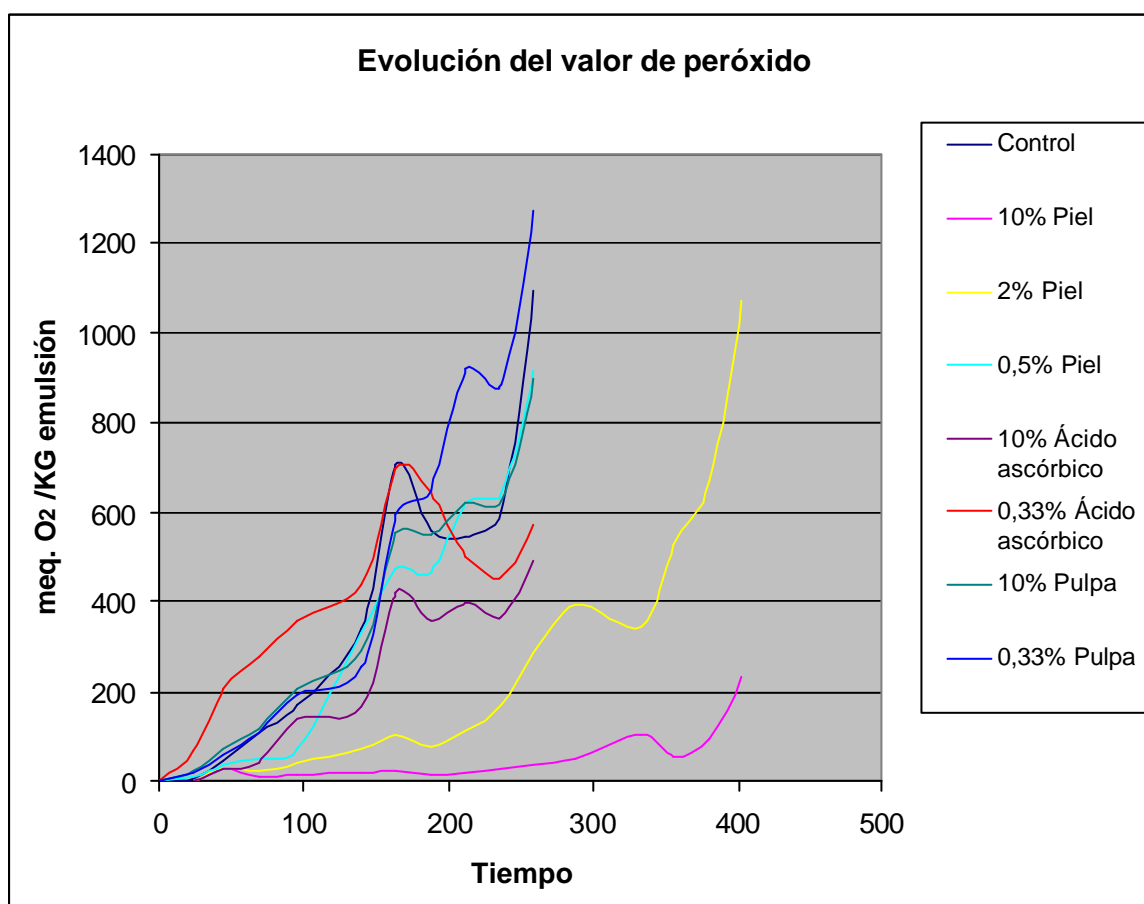


ORAC	NO	NO	NO	NO	
------	----	----	----	----	--

Los valores para el ensayo Folin-Ciocalteu y TEAC (ambas ?) no dan resultados significativamente diferentes teniendo en cuenta el margen de error de la regresión.

4.2.8 Ensayo con emulsiones

A continuación, se analizan los datos obtenidos del ensayo con emulsiones como sistema modelo de alimentos. En él se parte de ocho emulsiones, cada una por triplicado, con el fin de analizar la actividad antioxidante del extracto sobre un sistema modelizado de emulsión de grasa en agua. La grafica 4.13 muestra la evolución del valor de peróxido respecto al tiempo en el seno de las emulsiones. Los datos utilizados se encuentran tabulados en el apartado 4.2.7.



Gráfica 4.13 Evolución del valor de peróxido (meq. O₂/ Kg de emulsión) de las emulsiones respecto el tiempo.



Los resultados están expresados en relación a un Kg de emulsión. Si se deseara obtener el resultado en función de los Kg de aceite en el seno de emulsión, éste sería un orden de magnitud superior, ya que un 10% de la emulsión es aceite.

Se observa una tendencia de todas las emulsiones a excepción dos de ellas a seguir el mismo comportamiento que la emulsión control. Estas dos últimas, corresponden a las emulsiones a las que se le ha añadido un 10% y un 2% de extracto de piel de kiwi, en volumen final de emulsión.

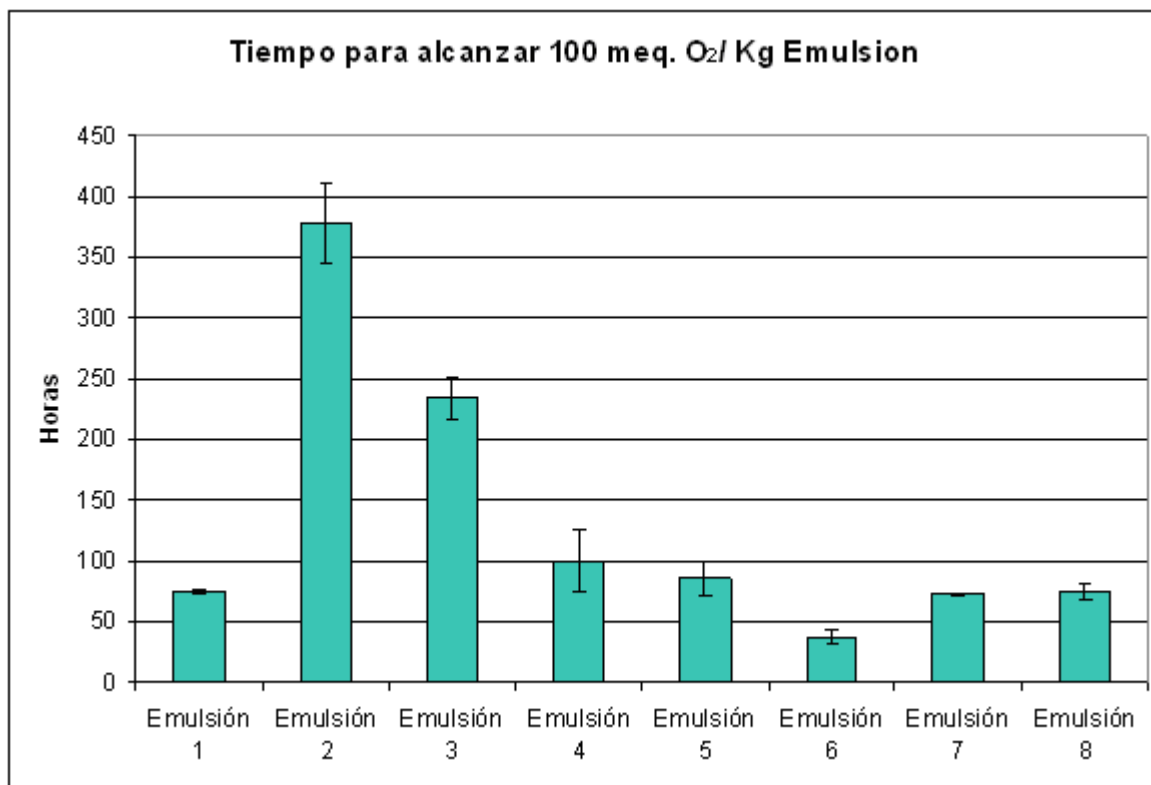
Para analizar el efecto de la adición del extracto y estudiar estadísticamente los resultados, se toma como referencia el tiempo en el cual la emulsión alcanza un valor de peróxido de 100 meq. O₂/ Kg emulsión. Se compara dicho tiempo en las diferentes emulsiones. Se determina si la adición de extracto ha influido en el proceso de oxidación. Los valores de tiempo necesario para alcanzar ese valor son los indicados en la **Tabla 4.11** y visualizados en la grafica 4.14.

Tabla 4.11 Tiempo necesario para alcanzar 100 meq. O₂/ Kg Emulsión

Nº Emulsión	Tiempo necesario*
Control	75,3 ± 1.2 ^b
10% Piel	378,1 ± 32.3 ^f
2% Piel	234,3 ± 16.7 ^e
0.5% Piel	107,5 ± 8.1 ^c
10% ácido	85,6 ± 13.6 ^b
0.33% ácido	37,2 ± 6.7 ^a
10% Pulpa	72,7 ± 0.3 ^b
0.33% Pulpa	74,8 ± 6.2 ^b

* Valores expresados como media ± intervalo de confianza (t-student p<0.05). Letras diferentes representan diferencias significativas entre si (p<0.05)





Gráfica 4.14 Tiempo necesario para alcanzar 100 meq. O₂/ Kg de emulsión de las diferentes.

Las emulsiones a las que les fue añadido el extracto de piel de kiwi presentan unos tiempos de oxidación significativamente mayores ($p < 0.05$) que la emulsión control, por lo que se puede afirmar que el extracto de piel de kiwi previene la oxidación en este sistema modelo de emulsión. En concreto la emulsión con un 10% de extracto necesitó un 400% más de tiempo que la emulsión control, la que contenía un 2% necesitó un 200% más y la de un 0.5% de extracto necesitó un 45% más de tiempo que la emulsión control. Lo cual indica que el tiempo para alcanzar una oxidación de 100 meq. O₂ activo /Kg emulsión es proporcionalmente dependiente de la concentración de extracto añadido.

Por otro lado, las emulsiones preparadas con extracto de pulpa de kiwi no presentan un comportamiento diferente que la emulsión control ($p < 0.05$), y las emulsiones preparadas con la disolución de ácido ascórbico al 10% presentan comportamientos dispares. La emulsión con un 10% de disolución de ácido ascórbico, presenta un comportamiento similar al obtenido en la emulsión con un 0.5% de extracto de piel, aunque los datos no llegan a ser significativamente superiores a la muestra control ($p < 0.05$). En cambio, la emulsión con un 0.33% de disolución de ácido ascórbico, presenta una oxidación más temprana que la emulsión control, por lo que se puede afirmar ($p < 0.05$) que el ácido



ascórbico en estas concentraciones y sobre el modelo de emulsión preparado actúa como un pro-oxidante.

4.2.9 Caracterización de polifenoles mediante HPLC

Mediante los cromatogramas obtenidos (figuras de 4.1 a 4.4), se observa que ambos extractos, tanto el de 30% de acetona como el de 30% de etanol, presentan un pico a 2,6 y 2,3 minutos de tiempo de retención respectivamente. Esta pequeña variación, aunque puede venir dada por que se extraigan diferentes componentes, tiene más sentido pensar que es debido a que los solventes interfieran en el tiempo de retención, ya que únicamente se realizó un tratamiento previo de filtración para evitar taponamientos de la columna.

No se han identificado los picos. Pero dado los tiempos de retención de las muestras y del patrón inyectado de quercitina, podría corresponder a este polifenol.

Cabe destacar que el cromatograma del extracto de acetona al 30% ha dado un área de pico de más de 26700 unidades, mientras que el área de pico del extracto de etanol al 30% ha dado de 1400, una diferencia significativa que ratifica lo que todas las pruebas anteriores demostraban: el extracto con acetona al 30% lograría extraer mayor cantidad de polifenoles, y por consiguiente, mayor capacidad antioxidante que el extracto con etanol al 30%.





5 PRESUPUESTO

En el presente proyecto solo se tendrán en cuenta los costes de reactivos, de amortización de aparatos y de personal, dado que en estudios anteriores se observaron que tanto los costes de energía como los costes en material de vidrio de laboratorio son muy inferiores respecto los tres primeros.

5.1 Reactivos

Los costes de los reactivos se calcula como:

$$\text{Coste reactivos} = \sum \text{Coste unidad} \cdot n^{\circ} \text{ unidades}$$

Tabla 5.1 Detalle de coste de reactivos

Reactivo	Cantidad	Precio/unidad	Precio Total
Metanol	1garrafa 5l	63,75/5l	63,75 €
Etanol 96%	1garrafa 5l	48,75/5l	48,75 €
Acetona	1garrafa 5l	81,8/5l	81,80 €
Alúmina	1kg	19,2/500g	38,40 €
Tween 20	3g	50/1kg	0,15 €
Acetonitrilo HPLC	1L	236,6/3l	78,87 €
Acido acético HPLC	3mL	246,3/3l	0,74 €
Carbonato de sodio	2bote	46,97/500g	93,94 €
Reactivo Folin	100mL	29/100ml	29,00 €
Persulfato de potasio	20g	55,06/100g	11,01 €
ABTS	3g	173,5/5g	104,10 €
PBS 0,075M	2L	63,4/1L	63,40 €
DPPH	0,2g	48,1/1g	9,62 €
Trolox	3g	129/5g	77,40 €



AAPH	1g	23/25g	0,92 €
Fluoresceína	2g	15,7/25g	1,26 €
PBS 0,01M	100mL	63,4/1L	6,34 €
Cloruro de hierro	30g	69,6/25g	83,52 €
Acido clorhídrico	50mL	59,41/2,5L	1,19 €
Tiocianato de amonio	30g	30,33/500g	1,82 €
Almidón	3g	30,22/25g	3,63 €
Acido salicílico	1g	12,21/100g	0,12 €
Triclorometano	1L	57,75/1L	57,75 €
Tiosulfato de sodio	13g	31,36/500g	0,82 €
Dicromato de potasio	20g	33,22/500g	1,33 €
Hipoclorito de sodio	50mL	31,1/500mL	3,11 €
Acido acético glacial	600mL	69,97/2,5l	16,79 €
Ioduro de potasio	10g	24/100g	2,40 €
Total sin IVA			938,98 €
IVA (16%)			150,24 €
Total			1.023,02 €

5.2 Amortizaciones

En este capítulo, se reflejan los costes que se originan por desgaste de los instrumentos utilizados para el desarrollo del proyecto. De esta manera se crea un fondo que permita sustituirlos en el momento que sea necesario. Se ha considerado que todos los instrumentos específicos utilizados son activos inmovilizados, ya que permanecen en la empresa-laboratorio más de doce meses.

El método de cálculo es el siguiente:



$$\text{Amortización} = \frac{\text{Valor amortizable}(\text{€})}{\text{Vida Útil}(\text{años}) \cdot \frac{365 \text{ días}}{\text{año}}} \cdot \text{Periodo utilización}(\text{días})$$

Con lo que:

$$\text{Valor amortizable} = \text{Valor de adquisición} - \text{valor residual}$$

El valor residual es el valor del bien al final de su vida útil, en nuestro caso es nulo porque los equipos de laboratorio sería obsoletos o inservibles, entonces:

$$\text{Valor amortizable} = \text{Valor de adquisición}$$

El uso de estos aparatos ha sido durante seis meses a excepción del HPLC, en cuyo caso el uso fue de un día.

Teniendo en cuenta todo esto, se define el coste de amortización como una cuota anual:

En la **tabla 5.2** se recogen los cálculos referentes a la cuota anual para cada elemento y la suma total:

Tabla 5.2 Detalle de amortizaciones de activos

Equipo	Valor amortizable	Vida útil	Periodo de utilización (días)	Amortización
Baño de ultrasonidos	900€	5	120	59,18 €
Centrifuga	420€	10	120	13,81 €
Sonicador	4700€	8	120	193,15 €
Fluorímetro Fluostar Omega	19600€	10	20	107,40 €
Espectrofotómetro Hewlett	14000€	10	120	460,27 €
HPLC Agilent serie 1200	42000€	10	1	11,51 €
Bomba de vacío de membrana	450€	10	10	1,23 €
Total				846,55 €



La amortización referente a los reactivos no se tiene en cuenta porque su tiempo de vida suele ser inferior a un año y su valor de adquisición es poco elevado.

5.3 Personal

Para calcular los costes de personal se debe tener en cuenta no sólo lo que gana el titulado/empleo (sueldo bruto) sino también la parte que paga la empresa por empleado en concepto de seguridad social. Los gastos de personal se calculan según la fórmula:

$$\text{Costes Personal}(\text{€}) = RH(\text{horas} \cdot \text{persona}) \cdot \frac{SBA + SS(\text{€} \cdot \text{año} \cdot \text{persona})}{\frac{n^\circ \text{ horas trabajadas}}{\text{año}}}$$

donde:

RH = Recursos Humanos asignados al proyecto (hora-persona)

SBA = Sueldo Bruto Anual (de una persona)

SS = Cuota Empresa a la Seguridad Social (0,32·SBA)

Como el personal contratado no tiene el mismo sueldo, el coste total será:

$$\text{Costes personal} = \sum_{\text{Categorías}} \text{Coste personal}_i$$

Consultando el Convenio General de la industria Química (2004-2006) se establecen los siguientes grupos profesionales:

- Grupo profesional 1: ayudantes en elaboración de muestras.
- Grupo profesional 5: encargada/autora del proyecto.
- Grupo profesional 7: equipo de profesores.

El Convenio fija en 1752 horas de trabajo efectivo la jornada laboral máxima anual. Por lo tanto, el salario bruto anual y por hora para cada uno de estos grupos es (actualizado a 2009):



Tabla 5.3 Salario de los diferentes grupos profesionales

Grupo profesional	Euros/año	Euros/hora
Profesional 1	13.035,81€	7,44 €
Profesional 5	19.162,09€	10,94 €
Profesional 7	27.244,84€	15,55 €

A continuación se detallan los cálculos para cada grupo profesional:

Tabla 5.4 Detalle de los costes de personal

	Desglose RH		Total RH	SBA	SS	Jornada laboral anual max.	Gastos personal
	pers.	horas					
Ayudantes	1	60	60	13.035,81€	4.562,53 €	1.752	446,43 €
Proyectista	1	540	540	19.162,09€	6.706,73 €	1.752	5.906,12 €
Profesores	1	150	150	27.244,84€	9.535,69 €	1.752	2.332,61 €
Total							8.685,16 €

5.4 Coste total

Una vez desglosados todos los costes, el coste total se calcula sumando los costes de reactivos, de amortización y de personal, con lo que lleva a un presupuesto total aproximado de **10554.73€**





6 IMPACTO MEDIOAMBIENTAL

En el presente proyecto se han utilizado diferentes reactivos que pueden causar daños al medio ambiente directamente, como otros que son nocivos para los organismos vivos. Por este motivo se ha prestado especial detalle en la clasificación de los diferentes residuos generados, y su entrega posterior a un tratador externo por vía de los técnicos de laboratorio encargados de esta labor. En la **tabla 6.1** se clasifican los diferentes tipos de residuos generados, su procedencia y cantidad.

Tabla 6.1 Resumen de residuos generados

Residuo	Procedencia	Volumen	Clasificación
Restos emulsiones	Ensayo emulsiones	80mL	Ninguna
Etanol	Varios	50mL	Disolventes orgánicos
Acetona	Varios	40mL	Disolventes orgánicos
Metanol	Varios	40mL	Disolventes orgánicos
Ferrocianuro en base etanol	Índice peróxidos método ferrocianuro	3.6L	Disolventes orgánicos con metales
Tungsteno Molibdeno	Ensayo Folin-Ciocalteu	400mL	Metales pesados
Radical ABTS en base agua	Ensayo TEAC	350mL	Ninguna*
Radical DPPH en base metanol	Ensayo DPPH	150mL	Disolventes orgánicos*
Radical AAPH en base agua	Ensayo ORAC	20mL	Ninguna*



Cloroformo Ácido Acético	Índice peróxidos método oficial	100mL	Disolventes orgánicos
-----------------------------	------------------------------------	-------	--------------------------

* Los radicales tienen una vida media de horas, por lo que no es necesario su tratamiento especial.

Por otra parte, cabría analizar el impacto medioambiental que podría surgir de los resultados de este proyecto. Dado que los resultados obtenidos tanto sobre capacidad antiradicalaria como su capacidad de retrasar el proceso oxidativo en el *model food system* son positivos, la utilización de este residuo de las industrias procesadoras de frutas como materia prima para obtención de antioxidantes conllevaría una disminución de residuos orgánicos generados por este tipo de industria, disminuyendo así los problemas de gestión y medioambientales derivados de estos residuos.



CONCLUSIONES

Como se ha podido comprobar a lo largo del proyecto, la piel de kiwi presenta una capacidad antioxidante y cantidad total de polifenoles comparable con otros residuos de las industrias alimentarias ampliamente estudiados, como las pieles y semillas de uva. Por este hecho, podemos considerar la piel de kiwi un residuo con un gran potencial de propiedades antioxidantes.

En lo referente al tiempo de extracción, se ha podido comprobar que se alcanza el equilibrio de extracción en un tiempo relativamente corto (30 minutos). Para llevarlo a cabo se ha utilizado una relación muestra:solvente de 1:10. Se ha determinado la cantidad de polifenoles totales, calculada mediante el ensayo Folin-Ciocalteu, y la actividad antiradicalaria, mediante el ensayo DPPH, dando unos valores de 2400 mg eq. ácido gálico /100g muestra seca y 0.1 meq. Trolox/g muestra seca respectivamente.

Se ha cuantificado la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles de la piel de kiwi mediante los análisis de Folin-Ciocalteu, TEAC, DPPH y ORAC. A partir de ellos, y mediante regresión a una superficie de respuesta, se ha obtenido la concentración óptima para los diferentes métodos. Por ejemplo para el método Folin-Ciocalteu la parametrización de la superficie es: $z = -0.49522 \cdot x^2 + 24.455 \cdot x + 0.048377 \cdot y^2 - 31.765 \cdot y + 2195.208$. El rango de solvente óptimo se encuentra entre 25 y 30% de acetona para los ensayos de Folin-Ciocalteu, TEAC y DPPH, y de un 35% de etanol para el ORAC. Todas ellas dan unos resultados entre 0.15 y 0.25 meq. Trolox/g muestra, y de 2812mg eq. ácido gálico/100g muestra en el caso del método Folin-Ciocalteu.

En el caso del análisis hecho a partir del modelo de emulsión, para comprobar la eficacia como antioxidante del extracto de piel de kiwi sobre grasa libre en presencia de agua, se ha comprobado que la adición de éste retrasa el proceso oxidativo. Se observa que la adición de una pequeña cantidad de extracto (un 2%) provoca que la emulsión tarde en alcanzar un valor de 100 meq. O₂ activo/kg de emulsión el triple de tiempo. Este hecho comprueba que este extracto puede ser utilizado para retrasar los procesos de oxidación en alimentos, con un resultado satisfactorio.



Aunque en un primer momento se podría suponer que la vitamina C pudiera ser la causante de la capacidad antioxidante que presenta la piel de kiwi, los ensayos con ésta demuestran que no posee capacidad antioxidante relevante. En cambio suponemos que la vitamina E, presente en la piel de kiwi, si que podría ser responsable en parte de dicha capacidad antioxidante, aunque no la única.

El impacto ambiental que se ha producido durante la realización del presente proyecto ha sido mínimo. Todos los residuos han sido clasificados según la normativa del laboratorio, y posteriormente han sido llevados a un tratador autorizado para su eliminación.

El presupuesto total para realizar el presente estudio ha sido de 10554.73€. Este valor es aceptable para todo el trabajo realizado.

Pasos futuros

Como pasos futuros, cabría destacar la identificación y cuantificación exacta de los polifenoles presentes en la piel de kiwi, mediante un HPLC-masas. De esta manera se podría determinar qué polifenoles son los responsables de las propiedades sujetas a estudio

Otro futuro análisis a realizar, sería la capacidad de retrasar la oxidación que presenta la piel de kiwi sobre grasas en alimentos sólidos, tales como carnes y pescados y evaluar, mediante pruebas sensoriales discriminatorias si proporcionan un sabor detectable al alimento



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio Laura, Carlos y Dani por todo el soporte que me han ofrecido durante la realización del proyecto.

A mi tutora Maria Pilar, por ofrecerme la oportunidad de realizar este proyecto, durante el cual he aprendido mucho sobre el trabajo en laboratorio, y además me he divertido.

Y sobretodo agradecer a mi novia Roser, que aún estando lejos, ha estado siempre a mi lado haciéndome estos meses más llevaderos.





BIBLIOGRAFÍA

AMAKURA Y, UMINO T, TSUJI S, TONOGAI Y. (2000). *Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries*. J Agric Food Chem 48:6292-6297.

BECKMAN KB, AMES BN. (1998). *The free radical theory of ageing matures*. Physiol Rev. 78: 547-581

BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensm Wiss Technol. 28:25-30

HOLLMAN PCH, KATAN MB. (1997). *Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man*. Biomed Pharmacother. 51:305-310

HOLLMAN PCH, ARTS ICW. (2000). *Flavonols, flavones and flavanols: Nature, occurrence and dietary burden*. J Sci Food Agric. 80:1081-1093

LAMPE JW. (1999). *Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies*. Am J Clin Nutr. 70:475S- 490S

LEE J, KOO N, MIN DB. (2004). *Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3:21-33

MACHEIX JJ, FLEURIET A, BILLOT J. (1990). *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 378 p.

MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L. (2004). *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr. 79:727-747

MARTINEZ-VALVERDE I, PERIAGO MJ, Ros G. (2000). *Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta*. Arch Latinoam Nutr. 50:5- 18

OU B, HAMPSCH-WOODILL M, PRIOR R (2001). *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. J Agric Food Chem 49 (10): 4619–26.



PESCHEL W, SANCHEZ-RABANEDA F, DIEKMANN W, PLESCHER A, GARTZIA I, JIMENEZ D, LAMUELA-RAVENTOS R, BUXADERAS S, CODINA C. (2006) *An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes*. Food Chem. 97:137-150

PRIOR RL. (2003). *Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage*. Am J Clin Nutr. 78:570S-578S

PRIOR RL, WU X, SCHAICH K. (2005). *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. J Agric Food Chem. 53:4290- 4302

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biological Medicine v.26 n. 9 p. 1231-1237

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. (1997). *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends Plant Sci 2:152-159

ROBARDS K, PRENTZLER PD, TUCKER G, SWATSITANG P, GLOVER W. (1999). *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chem. 66:401-436

ROBARDS K, PRENTZLER PD, TUCKER G, SWATSITANG P, GLOVER W. (1999). *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chem. 66:401-436

ROCKENBACH II, da SILVA GL, RODRIGUES E, KUSKOSKI EM, FETT R. (2008). *Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape bagasse extracts from Tannat and Ancelota*. Ciênc.Tecnol.Aliment., Campinas, 28(supl): 238-244

SINGLETON VL, ROSSI JA (1965) *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am J Enol Vitic 16: 144–158



BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

LAMPERI L, CHIUMINATTO U, CINCINELLI A, GALVAN P, GORDANI E, LEPRI L, Del BUBBA M. (2008). *Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56 (15): 6536-6546

ARNOUS A, MEYER AS. (2008). *Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins*. Food and Bioproducts Processing. 86 (C2): 79-86

Lo SCALZO R, IANNOCCARI T, SUMMA C. (2007) *The relationship between the composition of different table grape (*Vitis vinifera* L.) extracts and three methods of measuring their free radical scavenging properties*. Italian Journal of Food Science. 19 (3): 329-341

AHN T, PALIYATH G, MURR DP. (2007). *Antioxidant enzyme activities in apple varieties and resistance to superficial scald development*. Food Research International. 40 (8): 1012-1019

TOMER DP, McLEMAN LD, OHMINE S, SCHERER PM, MURRAY BK, O'NEILL KL. (2007). *Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays*. Journal of Medicinal Food. 10 (2): 337-344





INDICE DE ANEXOS

<u>INDICE DE ANEXOS</u>	93
<u>ANEXO A. RECTAS DE CALIBRADO</u>	95
<u>A.1 Ensayo Folin-Ciocalteu</u>	95
<u>A.2 Ensayo TEAC</u>	97
<u>A.3 Ensayo DPPH</u>	99
<u>A.4 Ensayo ORAC</u>	101
<u>A.5 Calibrado del método de ferrocianato mediante el método oficial</u>	103
<u>ANEXO B. PROGRAMA DE TRATAMIENTO DE DATOS</u>	105





ANEXO A. RECTAS DE CALIBRADO

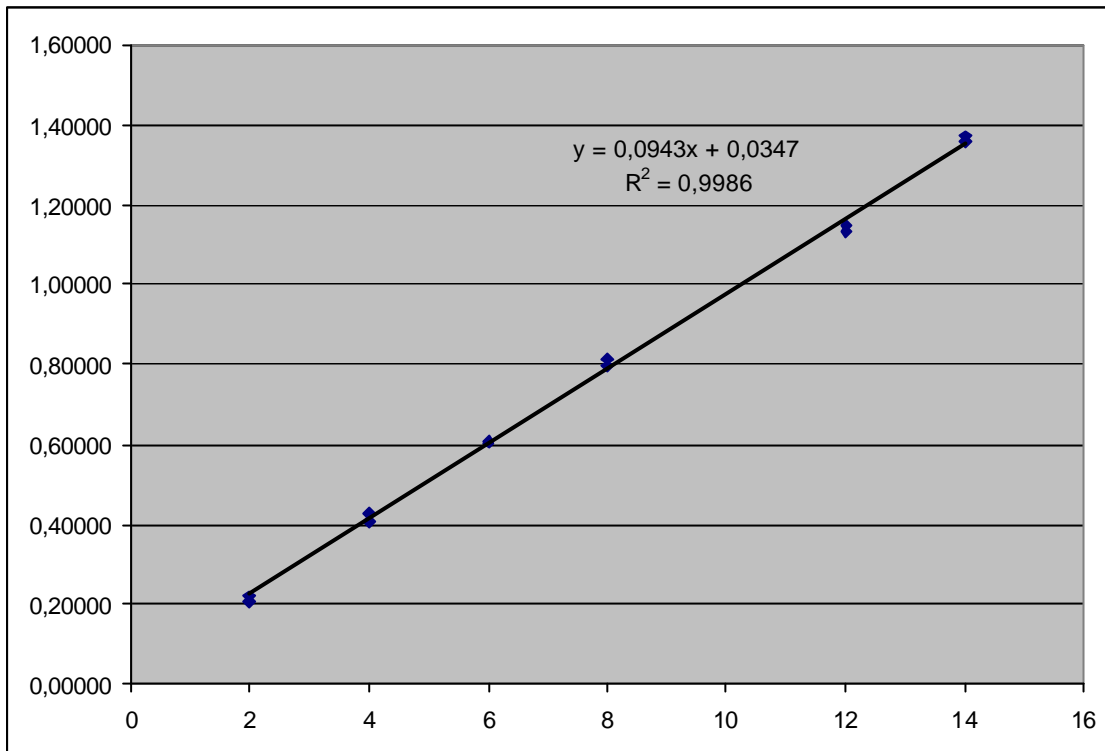
A.1 Ensayo Folin-Ciocalteu

Para realizar el calibrado del ensayo Folin-Ciocalteu se realizan las pruebas con patrones de ácido gálico con las concentraciones y respuestas resumidos en la **tabla A.1**:

Tabla A.1 Absorbancia de los patrones del método Folin-Ciocalteu.

Concentración en cubeta (ppm)	Absorbancia
2	0,21986
2	0,20574
4	0,40866
4	0,42305
6	0,60772
6	0,60384
8	0,79663
8	0,81254
12	1,14966
12	1,13549
14	1,37026
14	1,35884





Gráfica A.1 Recta de calibrado del método Folin-Ciocalteu

Por lo tanto, para obtener los mg eq. ácido gálico/100g de muestra, la fórmula a utilizar es:

$$\frac{\text{mg eq. ácido gálico}}{100\text{g muestra}} = \frac{(\text{Abs} - 0,0347)}{0,0943} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} (\text{en cubeta}) \right) \cdot \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \cdot \frac{4\text{mL cubeta}}{0,02\text{mL muestra}} \cdot \frac{5\text{mL muestra}}{\text{peso muestra(g)}} \cdot 100\text{g} \quad (\text{eq 1})$$

donde:

Abs = absorbancia obtenida mediante en método Folin-Ciocalteu.

Peso muestra = Peso de muestra liofilizada utilizada en la extracción en gramos.



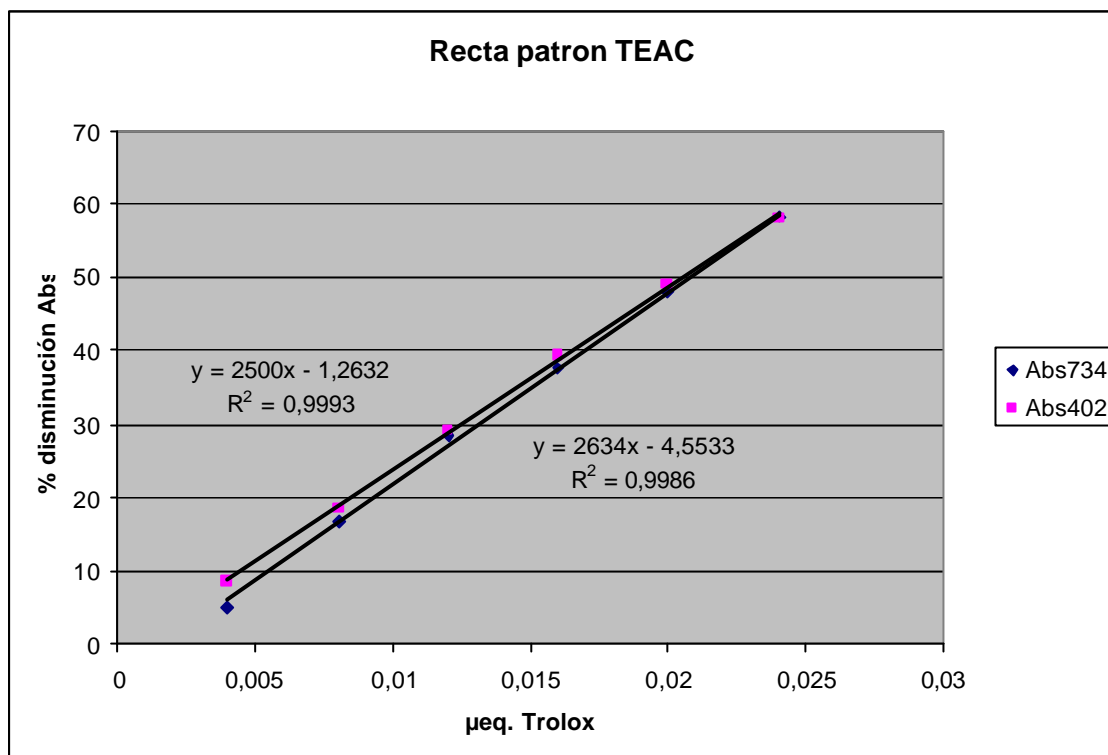
A.2 Ensayo TEAC

Para realizar el calibrado del ensayo TEAC se realizan las pruebas con patrones de Trolox con las concentraciones y respuestas resumidos en la tabla A.2:

Tabla A.2 Disminución de absorbancia los patrones del método TEAC.

Concentración final Trolox (μM)	Disminución absorbancia a $\lambda=734$ (%)	Disminución absorbancia a $\lambda=402$ (%)
0,004	5,064704	8,445621
0,008	16,785874	18,413291
0,012	28,302374	29,163291
0,016	37,492874	39,358291
0,020	48,094374	48,958291
0,024	58,192374	58,078291





Gráfica A.2 Recta de calibrado del método TEAC a λ=734 y λ=402

Por lo tanto, para obtener los meq. Trolox/g de muestra, las formulas a utilizar para λ=734 (eq 2) y λ=402 (eq 3) son:

$$\frac{\text{meq.Trolox}}{\text{g muestra}} = \frac{(\% \text{disminucion Abs} + 4.5533)}{2634} \left(\frac{\text{meq}}{\text{mL}} (\text{cubeta}) \right) \cdot \frac{2 \text{ml cubeta}}{0.02 \text{mL extracto}} \cdot \frac{5 \text{mL extracto}}{\text{peso muestra(g)}} \cdot \frac{1 \text{meq.}}{1000 \text{meq.}} \quad (\text{eq 2})$$

FD

$$\frac{\text{meq.Trolox}}{\text{g muestra}} = \frac{(\% \text{disminucion Abs} + 1.2632)}{2500} \left(\frac{\text{meq}}{\text{mL}} (\text{cubeta}) \right) \cdot \frac{2 \text{ml cubeta}}{0.02 \text{mL extracto}} \cdot \frac{5 \text{mL extracto}}{\text{peso muestra(g)}} \cdot \frac{1 \text{meq.}}{1000 \text{meq.}} \quad (\text{eq 3})$$

FD

donde:

% disminución abs = Porcentaje de disminución de la absorbancia.

FD = Factor de dilución.

Peso muestra = Peso de muestra liofilizada utilizada en la extracción en gramos.



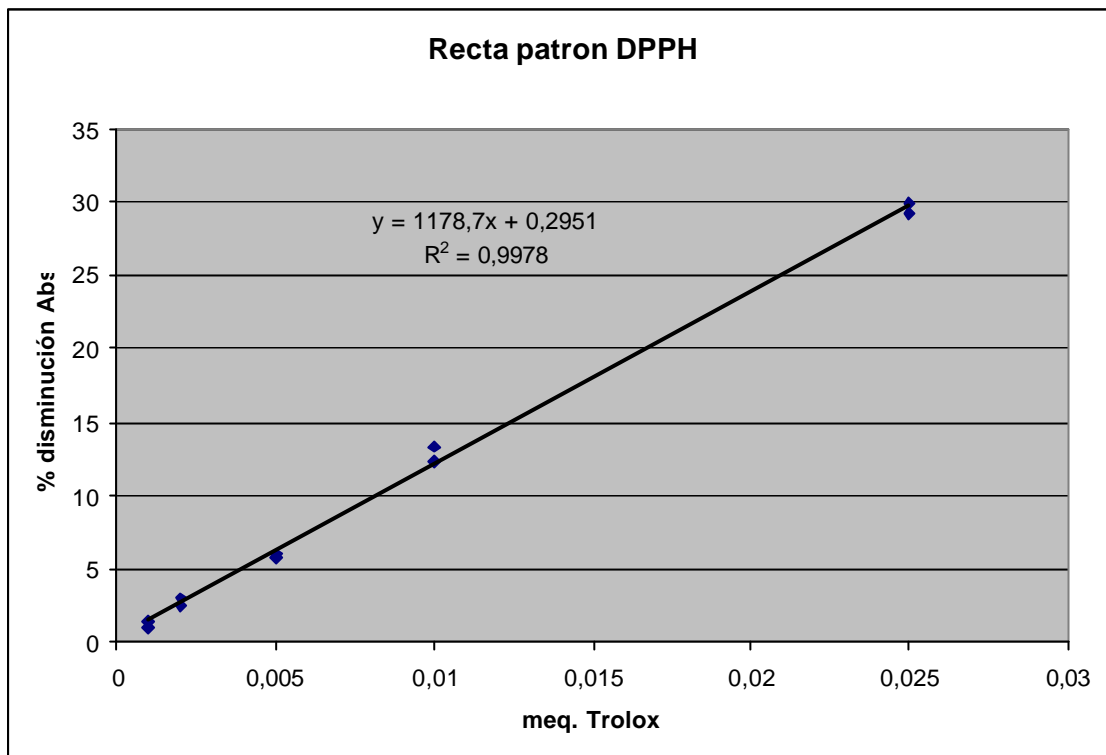
A.3 Ensayo DPPH

Para realizar el calibrado del ensayo DPPH se realizan las pruebas con patrones de Trolox con las concentraciones y respuestas resumidos en la tabla A.3:

Tabla A.3 Disminución de absorbancia los patrones del método DPPH.

Concentración Trolox (mM)	Disminución absorbancia a $\lambda=515$ (%)
0,025	29,23888
0,025	29,84187
0,010	12,3051
0,010	13,32371
0,005	5,788092
0,005	5,945166
0,002	2,949904
0,002	2,48124
0,001	1,414771
0,001	1,034409





Gráfica A.3 Recta de calibrado del método DPPH

Por lo tanto, para obtener los meq. Trolox/g de muestra, la formula a utilizar es:

$$\frac{\text{meq.Trolox}}{\text{g muestra}} = \frac{(\% \text{disminucion Abs} - 0.2951)}{1178.7} \left(\frac{\text{meq}(\text{extracto})}{\text{mL}} \right) \cdot \frac{FD}{\text{mLañadidos}} \cdot \frac{5\text{mLextracto}}{\text{pesomuestra(g)}}$$

(eq 4)

donde:

% disminución abs = Porcentaje de disminución de la absorbancia.

FD = Factor de dilución.

Peso muestra = Peso de muestra liofilizada utilizada en la extracción en gramos.

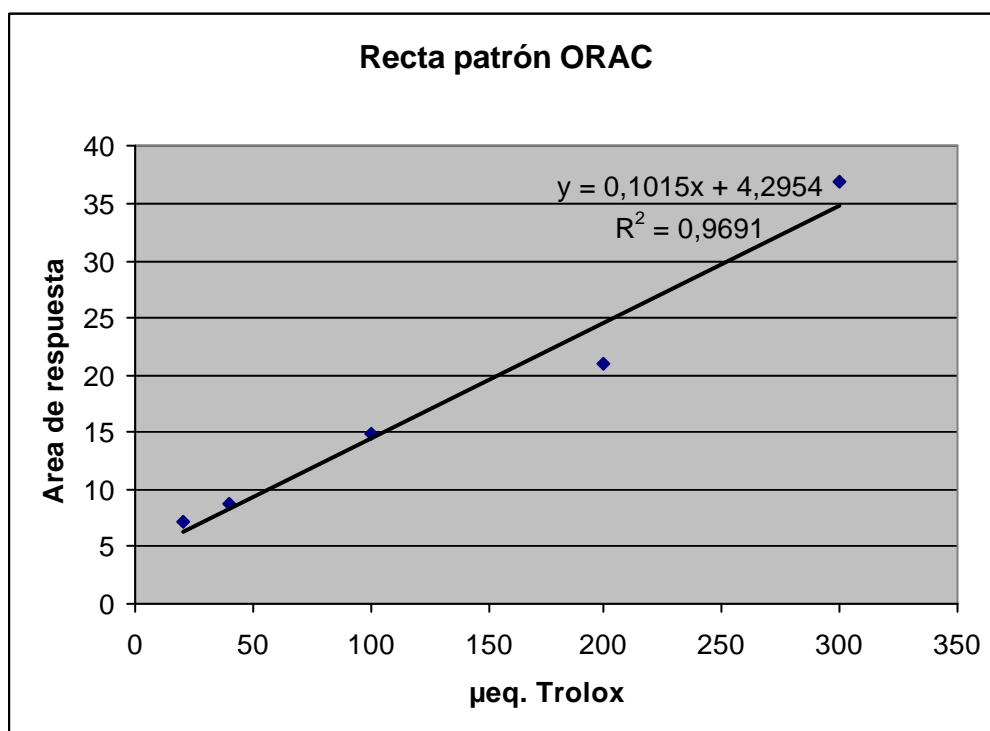


A.4 Ensayo ORAC

Para realizar el calibrado del ensayo ORAC se realizan las pruebas con patrones de Trolox con las concentraciones y respuestas resumidos en la tabla A.4:

Tabla A.4 Área de respuesta de los patrones del método ORAC.

Concentración Trolox (mM)	Área obtenida
20	7,04602373
40	8,74387511
100	14,7011424
200	21,0522429
300	36,9193128



Gráfica A.4 Recta de calibrado del método ORAC

Por lo tanto, para obtener los meq. Trolox/g de muestra, la fórmula a utilizar es:



$$\frac{meq.Trolox}{g\text{ muestra}} = \frac{(Area\text{ respuesta} - 0.42954)}{0.1015} \left(\frac{meq}{L} (extracto) \right) \cdot \frac{1meq.}{1000meq} \cdot \frac{1L}{1000ml} \cdot \frac{5mL\text{ extracto}}{peso\text{ muestra}(g)} \cdot FD \quad (eq\ 5)$$

donde:

Área de respuesta = Área obtenida del ensayo.

FD = Factor de dilución.

Peso muestra = Peso de muestra liofilizada utilizada en la extracción en gramos.



A.5 Calibrado del método de ferrocianato mediante el método oficial

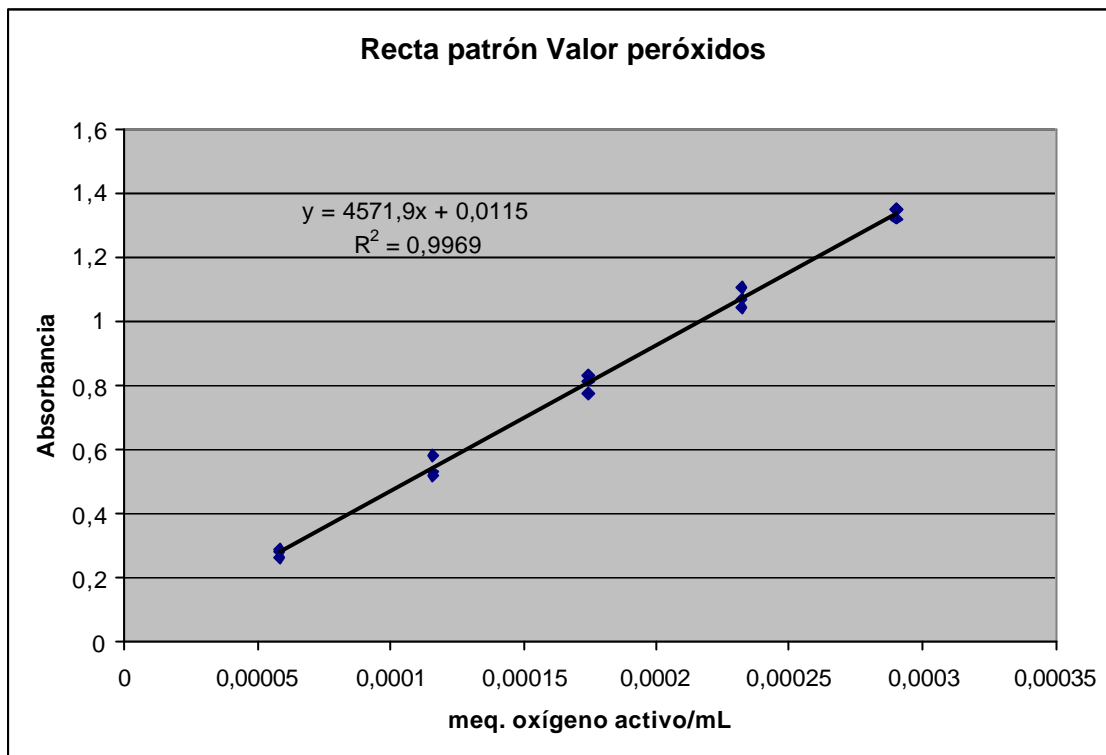
Para calibrar el método del ferrocianato, utilizaremos un aceite cuya oxidación es perfectamente conocida. En este caso, el aceite utilizado presenta un valor de peróxido de 149.88 meq. oxígeno activo/kg de aceite.

En la **tabla A.5** se muestran los meq. oxígeno activo añadidos y su respuesta mediante el método del ferrocianato.

Tabla A.5 Absorbancia los patrones del método del ferrocianuro.

meq. oxígeno activo/mL cubeta	Absorbancia a $\lambda=500$
5,8062E-05	0,27769
5,8062E-05	0,28945
5,8062E-05	0,26465
0,00011612	0,58182
0,00011612	0,5289
0,00011612	0,51681
0,00017419	0,77614
0,00017419	0,83183
0,00017419	0,8149
0,00023225	1,1024
0,00023225	1,0709
0,00023225	1,0428





Gráfica A.5 Recta de calibrado del método del ferrocianuro mediante aceite con un valor de peróxido conocido.

Por lo tanto, para obtener los meq. oxígeno activo/kg de emulsión, la formula a utilizar es:

$$\frac{\text{meq.oxígeno activo}}{\text{kg emulsión}} = \frac{(\text{Abs} - 0,0115)}{4571,9} \left(\frac{\text{meq}}{\text{mL}} (\text{cubeta}) \right) \cdot \frac{4\text{mL cubeta}}{\text{peso emulsión (g)}} \cdot \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} \cdot \text{FD} \quad (\text{eq 5})$$

donde:

Abs = Absorbancia obtenida mediante el método de ferrocianuro.

FD = Factor de dilución.

Peso emulsión = Peso de emulsión para realizar el método en gramos.



ANEXO B. PROGRAMA DE TRATAMIENTO DE DATOS

Con el fin de agilizar el tratamiento de datos y proporcionar la parametrización de la superficie de respuesta, así como otros datos de interés de la respuesta, se programa una función en Matlab para facilitar esta tarea.

El código del programa es el siguiente:

```
function para=TratDatos(X,Y,RES)
mat=[X.^2 X Y.^2 Y ones(length(Y),1)];
para=inv(mat'*mat)*mat'*RES;
[x,y]=meshgrid(0:4:100);
z=para(1)*x.^2+para(2)*x+para(3)*y.^2+para(4)*y+para(5);
surf(x,y,z)
['parametrización ' num2str(para(1)) '*x^2 + ' num2str(para(2)) '*x + ' num2str(para(3))
'*y^2 + ' num2str(para(4)) '*y + ' num2str(para(5)) ' = z']
xmax=-para(2)/(2*para(1));
ymax=-para(4)/(2*para(3));
min=para(1)<0;
min2=para(3)<0;
if min*min2==1
aux1=(xmax>0);
aux2=(ymax>0);
aux3=((xmax+ymax)<100);
if aux1*aux2*aux3==1
['maximo en' num2str(xmax) ' x ' num2str(ymax) ' y ']
elseif aux1==0
if aux2==0
['máximo en 0 x 0 y ']
elseif ymax>100
['máximo en 0 x 100 y ']
else
['máximo en 0 x ' num2str(ymax) ' y ']
```



```
end
elseif aux2==0
  if xmax>100
    ['máximo en 100 x 0 y ']
  else
    ['máximo en ' num2str(xmax) ' x 0 y ']
  end
else
  for i=0:100
    base(i+1)=para(1)*i^2+para(2)*i+para(3)*(100-i)^2+para(4)*(100-i)+para(5);
    if i>1
      if base(i+1)<base(i)
        zm=base(i);
        xmax=i;
        ymax=100-i;
        i=100;
      end
    end
  end
  ['máximo en' num2str(xmax) ' x ' num2str(ymax) ' y ']
end

else
  ['máximo localizable gráficamente']
  if min==1
    ['cerca de ' num2str(xmax) ]
  elseif min2==1
    ['cerca de ' num2str(ymax) ]
  end
end
```

