

**Universidad Pública de Navarra**

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

**NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA**

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE UVA  
PARA USO ALIMENTARIO**

presentado por

**JAVIER LARREA POSADAS. (e)k**

*aurkeztua*

**MASTER DE TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS  
AGROALIMENTARIAS**

*Septiembre, 2012*

# RESUMEN

---

La uva (*Vitis vinífera*) es conocida en todo el mundo por ser la fruta de la que procede el vino. Durante la vinificación se desprenden del fruto subproductos como las pepitas, pieles, etc. que últimamente están cobrando especial importancia debido a su contenido en polifenoles y sus propiedades antioxidantes.

Diversos estudios han ido dirigidos a investigar diferentes métodos de extracción para obtener extractos con la mayor cantidad de polifenoles posibles y elevados valores de actividad antioxidante. Así pues con la idea de poder optimizar este proceso surge este trabajo.

Se inicia el estudio con una comparativa entre diferentes métodos de secado de la muestra como paso previo a la extracción. Estos métodos son secado por estufa a vacío (50 °C, 120 minutos, 200 mbar) y secado por liofilización (10 horas a -45 °C, vacío a 0,25 mbar, 11 horas a 0 °C). Tras ello y con el fin de comprobar los resultados se realizó una extracción sólido-líquido (50 % etanol, 40 ml/g, 20-30-40-50 °C, 120 minutos) y se determinó la cantidad en fenoles totales y actividad antioxidante mediante los métodos Folin-Ciocalteu y DPPH respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la mayor cantidad de polifenoles (30.93 mg AG/g extracto seco) y la mayor actividad antioxidante (0.247 mM Trolox/g extracto seco) se obtenía bajo un secado por liofilización y una extracción sólido-líquido a 50 °C.

En la actualidad se están investigando métodos de extracción no convencionales que sirvan de alternativa a la clásica extracción sólido-líquido. Así pues surge el segundo de los objetivos, que consiste en optimizar las condiciones de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos (tiempo de extracción, temperatura de extracción e intensidad del ultrasonido), con el fin de maximizar la actividad antioxidante extraíble de los extractos de pepita de uva.

Aunque el modelo no presenta un ajuste muy exacto, y da valores de R<sup>2</sup> algo bajos, el método DPPH presenta cierta significatividad, por lo tanto a la hora de ajustar el método se dio mayor importancia a este parámetro que a los de TPC y FRAP.

Tras la realización de la optimización por medio de un modelo de superficie de respuesta, se obtienen unas condiciones que maximizan el método de extracción que resultan ser las máximas para cada uno de los parámetros, dando por lo tanto una extracción con las siguientes condiciones: 50 °C, 50 minutos, 100 % intensidad de ultrasonido.



<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>52</b>
3.1 ESQUEMA DE TRABAJO PARA LA COMPARACIÓN DEL TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS.....	52
3.2 ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDOS .....	54
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
4.1 OBTENCIÓN DE LA PEPITA.....	56
4.2 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD .....	57
4.3 SECADO .....	57
4.3.1 Secado a vacío .....	57
4.3.2 Secado por liofilización.....	58
4.4 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO .....	59
4.4.1 Método de extracción .....	59
4.5 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS .....	60
4.5.1 Método de extracción .....	60
4.6 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	61
4.6.1 Contenido en fenoles totales (TPC). Método Folin-Ciocalteu.....	61
4.6.2 Determinación de actividad antioxidante (AA). Método DPPH .....	62
4.6.3 Determinación de actividad antioxidante (AA). Método FRAP.....	63
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	65
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
5.1 VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	66
5.1.1 Veracidad del método TPC.....	66
5.1.2 Veracidad del método DPPH .....	68
5.1.3 Veracidad del método FRAP.....	71
5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA ANTES DE LA EXTRACCIÓN.....	73
5.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS .....	75
5.3.1 Modelo de superficie de respuesta.....	75
5.3.2 Análisis de regresión .....	80
5.3.3 Optimización de las condiciones de extracción .....	86
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>89</b>
<b>8. ANEJOS.....</b>	<b>98</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

---

TABLA 1.1. Alimentos ricos en distintos polifenoles.....	18
TABLA 3.1 Guión seguido para la comparativa entre secados.....	53
TABLA 3.2 Guión seguido para la optimización de la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos.....	55
TABLA 4.1 Pesos tras el pelado de la uva.....	57
TABLA 4.2 Cantidad de humedad de las muestras.....	57
TABLA 4.3 Humedad de las muestras en función del tiempo de secado.....	58
TABLA 4.4 Masa de la muestra tras tamizar a 450 $\mu\text{m}$ .....	58
TABLA 4.5 Masa de la muestra tras tamizar a 450 $\mu\text{m}$ .....	59
TABLA 5.1 Resultados del estudio de repetitividad del método TPC en espectrofotómetro de doble haz.....	66
TABLA 5.2 Resultados del estudio de repetitividad del método TPC en espectrofotómetro de placas.....	67
TABLA 5.3 Resultados del estudio de repetitividad del método DPPH en espectrofotómetro de doble haz.....	69
TABLA 5.4 Resultados del estudio de repetitividad del método DPPH en espectrofotómetro de placas.....	70
TABLA 5.5 Resultados del estudio de repetitividad del método FRAP en espectrofotómetro de placas.....	71
TABLA 5.6 Análisis estadístico de la extracción sólido-líquida.....	73
TABLA 5.7 Niveles de los factores utilizados en el diseño experimental.....	76
TABLA 5.8 Diseño experimental.....	77
TABLA 5.9 Cantidad de polifenoles totales y actividad antioxidante de las pruebas de superficie de respuesta.....	78
TABLA 5.10 Coeficiente de regresión, R <sup>2</sup> y p-valores de las tres variables respuesta.....	80
TABLA 5.11 Solución global de la optimización de respuesta.....	87

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

FIGURA 1.1. Anillo fenólico.....	9
FIGURA 1.2 Estructura general de un flavonoide.....	10
FIGURA 1.3 Cavitación ultrasónica.....	28
FIGURA 1.4 Evolución de la intensidad respecto al tiempo en el método TRAP.....	38
FIGURA 1.5 Mecanismo de reacción en el método FRAP.....	41
FIGURA 1.6 Estructuras de bathocuproine y neocuproine usadas en el ensayo de reducción de cobre.....	42
FIGURA 3.1 Esquema de trabajo para la comparación entre secados.....	52
FIGURA 3.2 Esquema de trabajo para la optimización de la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos .....	59
FIGURA 4.1 Reacción FRAP.....	63
FIGURA 5.1 Recta patrón para el método TPC en espectrofotómetro de doble haz.....	67
FIGURA 5.2 Recta patrón para el método TPC en espectrofotómetro de placas.....	68
FIGURA 5.3 Recta patrón para el método DPPH en espectrofotómetro de doble haz.....	69
FIGURA 5.4 Recta patrón para el método DPPH en espectrofotómetro de placas.....	70
FIGURA 5.5 Recta patrón para el método FRAP en espectrofotómetro de placas.....	72
FIGURA 5.6 TPC frente a temperatura y tiempo.....	81
FIGURA 5.7 TPC frente a temperatura e intensidad.....	81
FIGURA 5.8 TPC frente a tiempo e intensidad.....	82
FIGURA 5.9 DPPH frente a temperatura y tiempo.....	83
FIGURA 5.10 DPPH frente a temperatura e intensidad.....	83
FIGURA 5.11 DPPH frente a tiempo e intensidad.....	84
FIGURA 5.12 FRAP frente a temperatura y tiempo.....	85
FIGURA 5.13 FRAP frente a temperatura e intensidad.....	85
FIGURA 5.14 FRAP frente a tiempo e intensidad.....	86
FIGURA 8.1 Control de temperatura a 10 °C.....	98
FIGURA 8.2 Control de temperatura a 18 °C.....	98
FIGURA 8.3 Control de temperatura a 30 °C.....	99
FIGURA 8.4 Control de temperatura a 42 °C.....	99
FIGURA 8.5 Control de temperatura a 50 °C.....	99

# INTRODUCCIÓN

---

La uva (*Vitis vinifera*) es una de las frutas más cultivadas del mundo. Si bien el vino ha sido consumido por el hombre desde la antigüedad, sólo a fines de la década del 70 surge la relación entre el consumo moderado de vino y la conservación de la salud. Aparte del vino, en los últimos años está cobrando especial importancia los subproductos de la vinificación (pepitas, pieles, tallos, etc.) debido a sus componentes fenólicos con propiedades antioxidantes (Carrera, Ruiz-Rodríguez et al. 2012; Casazza, Aliakbarian et al. 2010; Casazza, Aliakbarian et al. 2012).

Las pepitas de uva son una rica fuente de fenoles monoméricos, como (+)-catequinas, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-O-galato, así como procianidinas diméricas, triméricas y tetraméricas. Así pues, empezaron a desarrollarse estudios en los que se utilizaban extractos de hollejos para utilizarlos como suplementos en la dieta y se confirmó que las propiedades antioxidantes de estos compuestos tenían su efecto (Murga, Ruiz et al. 2000; Landrault, Poucheret et al. 2001; Yilmaz and Toledo 2004).

Los polifenoles extraídos de las pepitas de uva actúan como antimutagénicos y agentes antivirales, y están estudiados sus efectos beneficiosos en la prevención de tumores. Otra característica propia de estos compuestos es la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL) siendo más eficaces aún que los valores dados por  $\alpha$ -tocoferol (Ahn, Grün et al. 2002; Lau and King 2003; Medina, Lois et al. 2006).

Pero no solo sirven estos polifenoles como agentes preventivos de enfermedades, en otros estudios se ha demostrado que añadiendo extractos de pepitas de uva en pequeñas cantidades al producto a comerciar inhibía la oxidación prematura del alimento, alargando su vida útil (Ozoglu and Bayndrl 2002).

Uno de los principales problemas que surgió a raíz de aceptar el uso de los polifenoles como aditivos funcionales fue el tratamiento previo de la muestra y el cómo extraerlos, ya que al principio en muchos de los casos se producía una masiva pérdida de los compuestos fenólicos o bien de su capacidad antioxidante.

En diversos estudios se usan tratamientos previos de las muestras simples, es decir, secan las muestras en hornos convencionales a elevada temperatura durante tiempos largos, algunos incluyen tratamientos a vacío, pero muy pocos usan la tecnología de la liofilización (Pinelo, Sineiro et al. 2006; Makris, Boskou et al. 2007).

Las extracciones de polifenoles se han realizado con muchos tipos de solventes, pero generalmente los más usados han sido siempre metanol, etanol y acetona. En la bibliografía consultada las proporciones de solvente y agua son muy variables, pero tienen tendencia a estar en torno al 50 % de solvente y 50 % de agua. Generalmente los

ensayos encaminados a extraer la máxima cantidad de polifenoles utilizan metanol o acetona, pero los estudios encaminados a la extracción para el uso agroalimentario utilizan etanol (Velioglu, Mazza et al. 1998; Ghafoor, Hui et al. 2009; Carrera, Ruiz-Rodríguez et al. 2012).

Como en la extracción de polifenoles de muchos otros productos las primeras investigaciones se llevaron a cabo con extracciones líquido-líquido o sólido-líquido, las cuales daban valores aceptables. Pero conforme avanzaba la tecnología se empezaron a estudiar nuevas técnicas de extracción muy diferentes a las convencionales, como podían ser microondas, irradiación, etc. (Casazza, Aliakbarian et al. 2010).

Una de estas técnicas que se empezaron a investigar fueron los ultrasonidos, ya que es una tecnología rápida y eficaz. Los estudios sobre esta técnica están aumentando exponencialmente durante los últimos años, y los resultados obtenidos son inmejorables, ya que la relación entre la cantidad de polifenoles extraída, la facilidad y la economicidad del método hace que sea una técnica accesible a cualquier estudio.

A la hora de determinar la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante de un producto existen numerosos métodos disponibles. Éstos se dividen en según sean reacciones SET, HAT. Los métodos con reacciones HAT (ORAC, TRAP, TOSC, PCL, ETC.) consisten en reacciones de transferencia de un átomo de H (Hidrogen Atom Transfer), y las reacciones SET (FRAP y CRA) consisten en reacciones de transferencia de un electrón. Algunos métodos conllevan ambas reacciones, como es el caso de ABTS, DPPH y Folin-Ciocalteu (Prior, Wu et al. 2005).

Así pues los objetivos planteados para este trabajo están encaminados a obtener una extracción maximizada de los polifenoles de las pepitas de uva mediante la comparativa entre diferentes tratamientos previos y métodos extractivos.

El primero de los objetivos planteados fue comparar dos tratamientos previos de las muestras. Éstos consistían en dos tipos de secado, siendo uno por estufa a vacío y el otro por liofilización, y así comprobar con cuál de los dos se obtenían mejores resultados.

El segundo de los objetivos fue el de optimizar una extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos mediante la realización de un diseño experimental de superficie de respuesta, y así poder estandarizar el método para su futura utilización en la industria agroalimentaria

# 1. ANTECEDENTES

---

## 1.1 POLIFENOLES

### 1.1.1 Los compuestos fenólicos en las plantas.

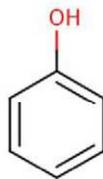
Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario.

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Robbins 2003).

### 1.1.2 Clasificación de los compuestos fenólicos

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.

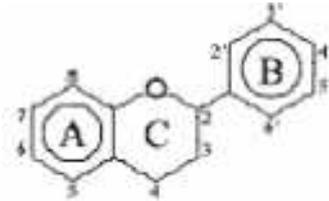


**Figura 1.1.** Anillo fenólico

Los polifenoles alimentarios se pueden clasificar en dos grupos: extraíbles y no extraíbles. Los extraíbles son compuestos de pesos moleculares bajos o medios que se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos y acuoso-orgánicos. Los no extraíbles son compuestos con un elevado peso molecular, o polifenoles unidos a fibra dietética o proteínas que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones (Bravo, Abia et al. 1994)

Por lo que se refiere a los polifenoles extraíbles, se pueden clasificar, en función de su estructura química, en ácidos fenólicos, estructuras simples (y que pueden aparecer libres, como el caféico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico, o esterificados,

como el clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico) y flavonoides, estructuras mucho más complejas, que a su vez se subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros, etc. Los flavonoides se forman a partir de fenilalanina, tirosina y grupos acetato.



**Figura 1.2** Estructura general de un flavonoide

Los grupos de flavonoides más extendidos son las flavonas y los flavonoles. Los flavonoles forman O-glucósidos, pero las flavonas pueden formar O-glucósidos y C-glucósidos, que no se pueden romper por hidrólisis ácida, a diferencia de los O-glucósidos. Lo mismo ocurre con las flavanonas (Bravo, Abia et al. 1994).

Los polifenoles no extraíbles incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un elevado número de unidades en la cadena polimérica. Los taninos hidrolizables son estructuras poliméricas que pueden derivar del ácido gálico o de su producto dimérico de condensación, el ácido hexahidroxidifénico.

Los taninos condensados o proantocianidinas, por su parte, son estructuras poliméricas, formadas por la unión de flavan-3-oles, y pueden ser: procianidinas, con una sustitución 3,4-dihidroxi en el anillo B (sólo están formadas por unidades de epicatequina); prodelfinidinas, con una sustitución 3,4,5-trihidroxi en el anillo B; propelargonidinas, con una sustitución 4-hidroxi en el anillo B, aunque éstas últimas son mucho menos frecuentes en alimentos. Los carbonos 2,3 y 4 del anillo B son asimétricos y pueden aparecer con diferentes configuraciones. Generalmente, las uniones se producen entre el C4 de la unidad superior y el C6 o el C8 de la unidad inferior, aunque en ocasiones puede aparecer otro enlace entre el C2 de la unidad superior y el C5 o el C7 de la inferior. Además, las unidades de flavanoles pueden llevar sustituyentes acilos o glucosilos, y uno de los más frecuentes sustituyentes acilo es el ácido gálico, que forma un enlace éster con el grupo hidroxilo en la posición C3 (Santos-Buelga and Scalbert 2000)

En cuanto al modo de acción de los polifenoles, los grupos OH del anillo B pueden donar un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose el flavonoide en una molécula radicalica relativamente estable. También son capaces de quelar metales, formando complejos que, aun así, mantienen la capacidad antioxidante. En cualquier caso, éste sería un

efecto adverso en personas con deficiencias crónicas de algunos metales (Heim, Tagliaferro et al. 2002)

Finalmente, algunos polifenoles, además de su propia acción antioxidante, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes, como la genisteína, una isoflavona que potencia la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la SOD (Donma and Donma 2005)

provocado que se hayan publicado un gran número de trabajos estudiando este aspecto (Villaño, Fernández-Pachón et al. 2005; Siquet, Paiva-Martins et al. 2006). De manera general, se puede señalar que la presencia de sustituyentes hidroxilo aumenta la capacidad antioxidante. En el caso de los flavonoles, la mayor capacidad antioxidante se produce con una estructura orto-dihidroxi en el anillo B y un OH en la posición 3, un doble enlace 2,3 y una función oxo en el C4, lo que ocurre con la quercetina. Por otro lado, la glucosilación de los flavonoides reduce su capacidad antioxidante en relación a las correspondientes agliconas.

Por otro lado, algunos autores han señalado el hecho de que, dado que a pH fisiológico algunos de los grupos fisiológicos de los polifenoles pueden estar desprotonados, lo que reduciría la capacidad antioxidante respecto a la forma protonada (Lemanska, Szymusiak et al. 2001))

En lo que se refiere a los taninos condensados, no hay resultados concluyentes sobre el efecto que puede tener el número de monómeros en la cadena sobre la capacidad antioxidante del compuesto (Santos-Buelga and Scalbert 2000)

En cualquier caso, siempre hay que tener en cuenta el tipo de medio en el que actuarán los antioxidantes como punto de partida para definir su acción; así, se ha observado en ensayos en liposomas que los ácidos dihidroxifenólicos son más antioxidantes que los trihidroxifenólicos, al contrario de lo que ocurre en medio acuoso, debido a sus mayores coeficientes de partición. Igualmente, en este medio parece ser que el sustituyente del anillo fenólico tiene una importancia menor que en el medio acuoso (Siquet, Paiva-Martins et al. 2006)

Igualmente, se debe considerar que estructuras polifenólicas que presentan una mayor capacidad antioxidante *in vitro*, no necesariamente la tendrán *in vivo*; así, un reciente estudio demostró que ciertos polifenoles metilados, que *in vitro* presentan una capacidad antioxidante muy inferior a la de sus formas no metiladas, mostraban después una mayor capacidad para proteger a cultivos celulares de la toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno (Deng, Zhang et al. 2006). De la misma manera, los compuestos fenólicos más abundantes en los alimentos no son necesariamente los más absorbidos; el ácido gálico, por ejemplo, presente en general en concentraciones mucho más bajas que otros polifenoles, es uno de los que presenta mayores tasas de absorción.

Precisamente, el metabolismo de los polifenoles, las tasas de absorción y las posibilidades de que puedan ejercer sus efectos antioxidantes *in vivo* tras ser absorbidos,

han sido también profusamente estudiados. Los glucósidos de flavonoides son absorbidos en el intestino tras degradarse, dando lugar a las agliconas, que van al hígado, donde experimentan procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación, y de ahí pasan a la sangre, dependiendo del compuesto en cuestión el tiempo necesario para alcanzar máximos en sangre, y estando entre 30 minutos y 9 horas. El grado de glicosilación influye en la absorción intestinal.

Por lo que se refiere al resto de los compuestos polifenólicos, en general no absorbidos, se debería tener en cuenta, en primer lugar, que podrían tener un efecto a nivel local en el tracto gastrointestinal. Esto es importante, dado que el tracto gastrointestinal está continuamente expuesto a la acción de los radicales libres. Por ejemplo, en el estómago se producen mezclas de ácido ascórbico y hierro, dando lugar a una combinación prooxidante; aparecen peróxidos lipídicos, aldehídos citotóxicos e isoprostanos de la dieta, y en el intestino se activan células inmunes debido a toxinas de los alimentos (Rivero, Pérez-Magariño et al. 2005)

Así mismo, parece ser que parte de los polifenoles que llegan intactos al intestino grueso son fermentados por la microflora intestinal, proporcionando un medio ambiente antioxidante en el colon y pasando después los productos obtenidos a través de la vena porta hasta el hígado, donde serían metabolizados (Santos-Buelga and Scalbert 2000); (Heim, Tagliaferro et al. 2002).

En cualquier caso, se debe también indicar que muchos polifenoles con estructuras oligo- o poliméricas, que durante mucho tiempo se habían considerado no disponibles en el intestino delgado, han mostrado ciertas tasas de absorción en diversos estudios. Así, aunque los oligómeros de procianidinas no pueden ser absorbidos como tales, los jugos gástricos los descomponen en monómeros de epicatequina y unidades diméricas y oligoméricas que sí pueden ser absorbidas, y en pruebas de digestión *in vitro* se ha observado que un pequeño porcentaje de los taninos condensados pueden ser hidrolizados por las enzimas del tracto gastrointestinal, de los que a su vez en torno a la mitad podrían ser absorbidos en el intestino delgado (Serrano, Goñi et al. 2007).

Finalmente, no hay que olvidar que se han indicado posibles efectos prooxidantes de ciertos polifenoles. Se han descrito efectos cromosómicos inducidos por las isoflavonas de la soja, así como que potencian carcinógenos químicos y que ejercen efectos negativos en la función cognitiva de los ancianos (Donma and Donma 2005). Por lo que, al igual que ocurre con otros compuestos antioxidantes, la ingesta de polifenoles se debe mantener dentro de unos rangos para que sus posibles efectos beneficiosos no se transformen en negativos para la salud

### **1.1.3 Actividad biológica de los compuestos fenólicos**

#### **1.1.3.1. Actividad biológica de los compuestos fenólicos presentes en alimentos.**

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, anti-diarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina mono-amina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la anti-mutagénica, anti-cancerígena y anti-envejecimiento (Velioglu, Mazza et al. 1998).

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, anti-trombótica y vasodilatadora (Siddhuraju and Becker 2003).

También hay que decir que existe evidencia epidemiológica acerca de los beneficios para la salud del consumo abundante de frutas y verduras en la dieta. Altas ingestas de frutas y verduras están asociadas con el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. El pensamiento vigente vincula el alto contenido de antioxidantes con la inhibición de las enfermedades provocadas por el daño oxidativo, tales como la enfermedad cardíaca, las hemiplejias y el cáncer (Robbins 2003).

Se ha probado, tanto epidemiológica, así como experimentalmente, la relación existente entre una ingesta aumentada de antioxidantes en la dieta, así como de vitaminas C y E, y  $\beta$  caroteno y la prevención de la enfermedad coronaria. (Vinson and Hontz 1995) determinó que la ingesta de flavonoides en la dieta, la mayoría a partir de té, se asoció con una reducción de las muertes por enfermedades coronarias. Los flavonoides de las plantas, específicamente los del té, son poderosos antioxidantes, comprobados *in vitro* en un sistema de oxidación de lipoproteínas (LDL) simulando lo que ocurre en el cuerpo humano.

Pero aparte de estos alimentos también se estudió que las hierbas utilizadas para realzar y complementar los sabores de los alimentos son fuentes de compuestos fenólicos; el consumo de hierbas está asociado con una baja incidencia de cáncer y baja mortalidad por esta misma enfermedad (Zheng and Wang 2001).

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos actúan en forma preventiva en el desarrollo del cáncer y de la enfermedad coronaria. La ingestión de vino tinto desalcoholizado ó de una mezcla de compuestos fenólicos extraída del vino tinto mejora el status antioxidante del plasma en humanos. El consumo de dietas controladas altas en frutas y verduras incrementa significativamente la capacidad antioxidante del plasma en humanos. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación negativa

significativa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad debida a la enfermedad cardíaca (Kähkönen 1999).

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anti-cáncer, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria (Siddhuraju and Becker 2003).

Los flavonoides provenientes de verduras y frutas consumidos en la dieta están inversamente relacionados con la mortalidad causada por la enfermedad coronaria. Los flavonoides del vino tinto han demostrado fuerte actividad de inhibición de la oxidación de las LDL; *in vitro* e *in vivo* reducen la agregación de las plaquetas y esto se asocia con la reducción de la mortalidad por enfermedad cardiovascular. La (+) catequina ha demostrado prevenir la oxidación del plasma humano e inhibir la oxidación de las LDL. Los flavonoides pueden explicar los efectos protectores de la dieta mediterránea (rica en vegetales, frutas y vino) contra las enfermedades cardiovasculares. La mayor concentración de (+) catequina en el plasma se observó en sujetos que consumieron frutas, verduras y vino. Su acción antioxidante y antiagregación de las plaquetas puede explicar parcialmente la protección relativa contra la enfermedad coronaria (Ruidavets, Teissedre et al. 2000).

Los flavonoides son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente 2/3 de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias) (Robbins 2003); (Hagerman, Riedl et al. 1998).

Existen numerosos estudios sobre la actividad antioxidante de los alimentos de consumo corriente en las diferentes culturas: las frutas, las hierbas, el té, el cacao, las verduras, los cereales, entre otros.

### **Frutas**

Las especies frutales tipo baya, *Vaccinium myrtillus* (arándano), *Ribes nigrum* (cassis o grosella negra), *Ribes grossularia* (uva-espina ó grosella), *Rubus idaeus* (frambuesa), *Ribes rubrum* (grosella roja) y *Fragaria ananassa* (fresa), son una fuente importante de antioxidantes en la dieta. En estas frutas se encuentran presentes derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, antocianos, flavonoles, catequinas y taninos (hidrolizables y condensados). Muchos de estos compuestos

exhiben una variedad de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y acciones vasodilatadoras. Los extractos de las frutas antes mencionadas resultaron altamente antioxidantes, inhibieron la formación de hidroperóxidos en metil-linoleato y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de los liposomas. También tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente (Kähkönen 1999).

Las frutas en general, contienen una amplia gama de flavonoides y ácidos fenólicos que muestran actividad antioxidante. Los principales subgrupos en frutas son los antocianos, proantocianidinas, flavonoles y catequinas. Los estudios sobre la actividad antioxidante han sido enfocados principalmente en uvas, en las cuales se ha verificado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad humanas (LDL) en un nivel comparable con el del vino. El extracto de frutillas frescas ha actuado como un antioxidante 5 veces más activo que el trolox, en un sistema artificial que genera peróxido. Los extractos de moras, grosella roja y negra, arándano, frambuesas negras y rojas poseen una alta actividad como captadores de radicales superóxido. Los ácidos hidroxinámicos típicamente presentes en las frutas han demostrado inhibir la oxidación en las LDL *in vitro*. Los extractos fenólicos de bayas inhiben la oxidación de las LDL humanas y la oxidación de los liposomas (Kähkönen 1999).

Los cítricos contienen flavonoides en forma de flavonas polimetoxiladas y flavanonas glicosiladas. Tienen propiedades anticancerígenas, antivirales, antiinflamatorias, efectos sobre la fragilidad capilar y capacidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Las cáscaras y las semillas de los cítricos tienen capacidad antioxidante con respecto a la oxidación del citonela, debida a estos compuestos fenólicos. Sus extractos pueden ser útiles para evitar la oxidación de los jugos de frutas y aceites esenciales. Generalmente, las semillas poseen mayor actividad antioxidante que las cáscaras. No siempre se verifica una relación directa entre mayor concentración fenólica y mayor actividad antioxidante en los cítricos (Bocco, Cuvelier et al. 1998).

### ***Infusiones***

El té se ha usado como bebida de consumo diario y como medicina por cientos de años en China. Posee efectos antipiréticos y diuréticos, actividad antioxidante, antimutagénica y anticáncer, así como también capacidad para capturar los radicales libres y el oxígeno activo. Previene el daño oxidativo sobre el DNA e inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La ingesta regular de té mejora el status antioxidante *in vivo*, y por lo tanto, disminuye la incidencia de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades coronarias. Los antioxidantes del té protegen contra fuertes mutágenos en modelos animales. Por otra parte, en estudios epidemiológicos se ha comprobado una disminución de la incidencia de cáncer en asociación a altos consumos de té. El poder antioxidante del té se correlaciona fuertemente con el contenido de polifenoles totales, en particular epicatequina. La actividad antioxidante se incrementa con el incremento de los sustituyentes del tipo orto di-hidroxi. El té verde

contiene 30 a 42 % de catequinas sobre la masa total seca, mientras que el té negro contiene 3 al 10 % y el té Oolong, semifermentado, contiene 8 al 20 % de catequina. Por otra parte los extractos de té verde tienen fuerte acción antioxidante, debida a los compuestos activos catequina, epigallocatequin-galato, epicatequin-galato, epigallocatequina y epicatequina. Finalmente, comparando el té verde no fermentado con el té negro fermentado se observó que el primero tiene un poder antioxidante superior. (Roedig-Penman and Gordon 1997) .

Los granos de cacao no fermentados son ricos en polifenoles, los cuales comprenden del 12 al 18 % del peso seco total del grano entero. Los polifenoles presentes son catequinas, procianidinas y antocianidinas, y tras la fermentación y el secado, los flavonoides derivan en taninos. Los fenoles del cacao tienen propiedades antioxidantes *in vitro*.

El café verde tiene alto contenido de polifenoles, entre ellos el ácido ferúlico y cafeico, cuya actividad antioxidante ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo*. El grado de tostado disminuye la concentración en polifenoles. Otro tipo de café, en este caso, el café descafeinado, no presenta diferencias con el café sin descafeinar respecto de su poder antioxidante. La protección contra la oxidación de las LDL no se debe a un solo compuesto, sino que es el resultado de la acción de varios compuestos fenólicos.

Como conclusión se extrae que la composición química de las bebidas varía ampliamente debido a que consisten en epicatequinas en el té verde, epicatequinas y taninos en el té negro, catequinas, procianidinas y antocianinas en el cacao, y en el café hay ácido clorogénico, ácido cafeico y melanoidinas. Café, cacao y té contienen polifenoles con altas actividades antioxidantes (Richelle, Tavazzi et al. 2001).

### ***Espicias***

En hierbas aromáticas tales como Salvia, tomillo, Ginkgo biloba, menta, artemisia, aloe, valeriana, ciboulette, diente de león, dill, lavanda, hinojo, orégano, mejorana, melisa, perejil, romero, albahaca, laurel, sauco, coriandro, perejil, azafrán, diente de león, manzanilla, tilo, tomillo, y vinca se estudió el poder antioxidante y la composición polifenólica.

Cada hierba tiene una composición fenólica diferente, y el poder antioxidante de cada uno de estos compuestos también es diferente. La actividad anti-oxidante de los flavonoides se incrementa con el número de grupos hidroxilo sustituyentes del anillo B, específicamente en el C3. Por tanto existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las hierbas, en consecuencia, las hierbas son una buena fuente potencial de antioxidantes naturales. Romero y tomillo presentaron mayor concentración polifenólica y mayor poder antioxidante (Proestos, Chorianopoulos et al. 2005).

### **Hortalizas**

Se ha encontrado actividad antioxidante en alubias, remolacha, maíz tierno, brócoli, ajo, cebolla, espárragos, papas, romero, salvia, orégano, tomillo, nuez moscada, avena, hojas de pino (el picnogenol se obtiene del *Pinus marítima* y actúa como captor de radicales libres hidroxilo y superóxido) y corteza de abedul. Sin embargo, no se encontró correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de plantas en los grupos estudiados trabajando sobre la oxidación del metil-linoleato.

Así como en las bayas si se encontró relación entre alto contenido de polifenoles y alta actividad antioxidante. Las verduras ensayadas mostraron baja concentración de fenoles. Pero la piel de remolacha, la piel de patatas color púrpura y la piel de la remolacha azucarera mostraron actividad antioxidante interesante (Kähkönen 1999).

Pero no solo se encuentran estas propiedades en las hortalizas típicas de huerta. *Moringa oleifera* es un árbol nativo del noroeste de la India que se cultiva como cerco verde, pero que sus frutos verdes se consumen como una verdura.. El extracto metabólico de esta planta ha demostrado tener actividad antiúlcera gástrica en un estudio realizado en ratas. El jugo de hojas frescas posee acción antibacteriana contra *Micrococcus pyogenes* var. *Aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En un ensayo en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas adicionada de jugo fresco de *Moringa oleifera*, se observó un descenso del nivel de colesterol en el suero, en el hígado y en el riñón. . El poder reductor o antioxidante de los extractos de *Moringa* aumenta con el aumento de concentración de polifenoles de estos extractos. Los flavonoides están entre los más potentes antioxidantes de las plantas debido a que poseen uno ó más de los siguientes componentes estructurales que están involucrados en la actividad antirradical o antioxidante: un grupo orto-difenol en el anillo B, un doble enlace conjugado en 2-3, con una función -oxo en el C4 y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Siddhuraju and Becker 2003).

### **Dietas**

Como se ha explicado, los antioxidantes de la dieta abarcan un amplio número de compuestos. En un gran número de alimentos vegetales, se ha evaluado el contenido de distintos antioxidantes concretos y se han determinado las principales fuentes de los mismos. A modo de ejemplo, la Tabla 1.1 muestra los alimentos más ricos en diferentes polifenoles.

**Tabla 1.1.** Alimentos ricos en distintos polifenoles

Grupo de compuestos	Compuesto	Alimentos
<b>Flavanoles</b>	Epigallocatequina	Té verde y té negro
<b>Flavanonas</b>	Naringinina	Piel de cítricos
	Taxifolina	Cítricos
	Hesperidina	Naranja
<b>Flavonoles</b>	Kaempferol	Endivia, brócoli y té negro
	Quercetina	Cebolla, lechuga, brócoli, aceituna, té, vino tinto, arándanos
	Miricetina	Arándanos, uvas, vino tinto
<b>Flavonas</b>	Crisina	Piel de frutas
	Apigenina	Puerro
	Rutina	Piel de tomate, vino tinto
	Luteolina	Pimiento rojo
<b>Ácidos fenólicos</b>	Ácido fenólico	Trigo, maíz, tomate, espinacas, espárragos
	Ácido caféico	Uvas blancas, vino blanco, tomates, espinacas, espárragos
	Ácido gálico	Té
	Ácido clorogénico	Manzana, pera, cereza, ciruela, melocotón, albaricoque, tomate
<b>Antocianidinas</b>	Malvidina	Uvas tintas, vino tinto
	cianidina	Cerezas, fresas, frambuesas, uvas

No obstante, se debe señalar que, aunque ciertos alimentos puedan presentar un contenido apreciable en antioxidantes, si su ingesta es escasa, el aporte de ese alimento a la capacidad antioxidante total de la dieta será inferior al de otros alimentos con menor contenido en antioxidantes, pero más consumidos. En ese sentido, se debe destacar el enfoque novedoso de nuestro grupo al determinar la capacidad antioxidante de la dieta española, considerando diferentes grupos de alimentos vegetales en la proporción en la que son consumidos (Saura-Calixto and Goñi 2006). En este trabajo se observó que la mayor parte de esta capacidad antioxidante proviene de las bebidas, que aportan más del 50 %, mientras que, por ejemplo, el aceite de oliva, un alimento rico en antioxidantes, aporta menos del 1 % del total.

De la misma manera, resulta destacable un estudio prospectivo con 22.000 individuos realizado por (Trichopoulou, Costacou et al. 2003), en el que se determinó que la dieta Mediterránea previene la mortalidad total, por cáncer y por enfermedades cardiovasculares, pero que ninguno de los alimentos constituyentes de dicha dieta se puede relacionar aisladamente con dichos efectos.

Por tanto, de manera global se deberían recomendar dietas ricas en antioxidantes más allá de consumos aislados de un cierto alimento. No obstante, es también necesario indicar que en sujetos de riesgo o con ciertas enfermedades en las que los antioxidantes pueden jugar un efecto beneficiosos, sí se podría enfatizar el consumo de alimentos específicos o de suplementos dietéticos, que podrían suponer un aporte extra (considerando siempre que el aporte de antioxidantes que se esté efectuando no suponga una dosis suprafarmacológica tal que estos compuestos se transformen en prooxidantes). En este sentido, durante los últimos se han desarrollado numerosas investigaciones buscando ingredientes funcionales, esto es, compuestos aislados o mezclas que añadidos a los alimentos podrían proporcionarles unos efectos beneficiosos extras en la salud y que podrían cubrir los déficits existentes en ciertos sectores de la población.

### **1.1.3.2 Actividad biológica de los compuestos fenólicos de vinos y uvas**

#### ***Vinos***

Si bien el vino ha sido consumido por el hombre desde la antigüedad, sólo a fines de la década del 70 surge la relación entre el consumo moderado de vino y la conservación de la salud. En 1978, Genevois analizó los resultados de encuestas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre las causas de mortalidad en 23 países euro-peos y notó que el infarto de miocardio era una de las causas principales de muerte para los hombres entre 55 y 64 años. Esta tasa de mortalidad variaba en los distintos países, de modo que los 23 países se podían agrupar en tres clases: los países vitivinícolas, Europa central y Europa del norte. Los países vitivinícolas presentaban la tasa de mortalidad debida a infarto de miocardio más baja, luego se ubicaba Europa central y, finalmente con la tasa más elevada, Europa del norte. En 1979, St-Léger realizó una encuesta en 18 países desarrollados sobre los factores asociados a la mortalidad cardíaca, considerando unos 16 parámetros, entre ellos el consumo de vinos. Encontró una asociación negativa entre la tasa de mortalidad por infarto de miocardio y el consumo habitual de vino. En Francia e Italia la tasa de mortalidad fue 3 a 5 veces más baja que en Escocia e Irlanda. Los países como Bélgica ó Alemania, que consumen vino, pero también cerveza y destilados, se ubicaron entre los extremos. Esto permitió concluir que el efecto protector del vino ante el infarto de miocardio proviene de algún constituyente diferente del alcohol. En 1982, Masquelier atribuyó los efectos benéficos de los vinos a los procianidoles (taninos) y catequinas.

En 1992, Renaud analizó estudios epidemiológicos sobre mortalidad cardiovascular, tratando de establecer la causa de las diferencias entre Francia y el resto de los países. En el caso general, una alta ingesta de grasas saturadas se relaciona positivamente con la alta mortalidad causada por la enfermedad coronaria. Sin embargo, la situación de Francia resulta paradójica, ya que existe una alta ingesta de grasas saturadas pero una baja mortalidad por enfermedades coronarias. Esta paradoja se atribuye en parte al consumo de vino. Estudios epidemiológicos indican que el consumo de alcohol, en el nivel de ingesta de Francia (20 a 30 g por día), puede reducir el riesgo de mortalidad por enfermedades coronarias en un 40 %. El alcohol inhibe la agregación

de las plaquetas, y este fenómeno se asocia a la enfermedad cardiovascular (Renaud and De Lorgeril 1992).

Kanner, en 1994, estudió tres variedades de uvas y dos vinos actuando como antioxidantes en la peroxidación de lípidos (LDL humana) *in vitro* ante la presencia de catalizadores biológicos tales como mioglobina, citocromo C, ascorbato de hierro y iones  $\text{Cu}^{+2}$  (como catalizador inorgánico). Se estableció que el vino tinto inhibía la oxidación en forma más eficiente que la  $\alpha$ -tocoferol. Los componentes polifenólicos del vino tinto son los responsables de la “paradoja francesa”, por medio de la prevención de la oxidación de las LDL (Kanner, Frankel et al. 1994).

Finalmente, Frankel estableció en 1997 en estudios *in vitro*, que el vino tinto inhibe la oxidación, catalizada por el cobre, de las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL). Los compuestos fenólicos del vino tinto son los responsables de la acción antioxidante, y por lo tanto del efecto protector ante la enfermedad cardiovascular (Frankel, Waterhouse et al. 1995). También en este estudio se determinó la actividad antioxidante de 20 vinos, en la inhibición de la oxidación de las LDL humanas catalizada por el cobre *in vitro*. Se determinó una asociación directa entre la concentración de polifenoles totales y la inhibición relativa de la oxidación de la LDL; el ácido gálico y la catequina fueron los compuestos fenólicos individuales que presentaron mayor coeficiente de correlación (mayor asociación) con la inhibición de la oxidación de las LDL. También se concluyó que la actividad antioxidante no depende de un solo compuesto fenólico, sino que está distribuida entre distintos compuestos. El resveratrol no presenta relación con la actividad antioxidante.

Las propiedades antioxidantes del vino tinto reducen la capacidad de oxidación del suero de la sangre y la oxidabilidad de las LDL, así como inhiben el pasaje de monocitos (un tipo de leucocitos o glóbulos blancos) de la sangre dentro de la pared arterial, retardando el inicio de la aterosclerosis (Estruch 2000).

La inhibición de la oxidación de las LDL humanas fue demostrada por la adición de una mezcla de polifenoles de vino. El vino tinto diluido 1000 veces inhibió *in vitro* la oxidación de las LDL humanas en forma más eficiente que la  $\alpha$ -tocoferol. La (+) catequina y la (-) epicatequina son las unidades básicas del grupo de las catequinas. Las procianidinas están formadas por la asociación de varias unidades monoméricas: 2 a 5 unidades para los oligómeros de catequina y más de 5 unidades para los polímeros. Estas moléculas poseen una estructura que les confiere propiedades antioxidantes. Los flavonoides son las moléculas más lipofílicas dentro de los antioxidantes naturales, pero son menos que el  $\alpha$ -tocoferol. La  $\alpha$ -tocoferol parece estar localizado en los lípidos de la membrana, dentro de la doble capa de fosfolípidos, mientras que los flavonoides están probablemente situados en la superficie polar de la doble capa. Los radicales libres, transportados en el plasma en forma acuosa, serán capturados más fácilmente por los flavonoides, que por el  $\alpha$ -tocoferol que se encuentra menos disponible. Por lo tanto, los flavonoides pueden concentrarse cerca de la superficie membranosa de las partículas de LDL, y así capturar los radicales libres acuosos. De esta forma previenen el consumo de

la  $\alpha$ -tocoferol lipofílico, y por lo tanto, la oxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Se encontró alta correlación entre fenoles totales y capacidad antioxidante. Entre los fenoles individuales, los que mejor correlacionaron con la actividad antioxidante fueron el ácido gálico, la procianidina B3, la catequina, la epicatequina, el ácido caftarico y las procianidinas B1 y B2. Otro grupo, con menor correlación fue compuesto por procianidina B4 y ácido cafeico. La menor correlación estuvo dada por los antocianos. Esto demuestra que los fenoles contenidos en el vino en diferentes concentraciones son activos en la actividad antioxidante. Al ensayar 54 vinos franceses se concluye que la mayor capacidad antioxidante se encuentra en los vinos tintos en la variedad Pinot noir; en los vinos blancos, Chardonnay elaborado con maceración, llega a valores semejantes a los vinos tintos. Los vinos dulces de la variedad Semillón tienen mayor poder antioxidante que los vinos secos. La ingesta de catequina es 6 veces mayor al consumir vinos Pinot noir que al consumir vinos variedad Chardonnay elaborados del modo clásico (Landrault, Poucheret et al. 2001).

Se ha probado la actividad de los compuestos fenólicos del vino para inhibir la agregación de las plaquetas, así como la actividad antioxidante. Estas características reducen el desarrollo de la placa oclusiva en las arterias del corazón.

Entre los polifenoles del vino se encuentra la catequina. Este compuesto se ha probado *in vivo*, en ratas, como parte de la dieta, verificándose un retardo en el desarrollo de tumores en ratones transgénicos, que normalmente generan tumores (Ebeler, Brennehan et al. 2002).

En alimentos que contienen emulsiones de aceite de maíz se ha verificado la acción antioxidante de los vinos, así como en lípidos de pescado y en pescado congelado se ha comprobado la acción de polifenoles provenientes de uvas. Los vinos presentan acción antioxidante sobre aceite de maíz libre de tocoferoles naturales emulsionado con lecitina de soja. Este tipo de emulsión es frecuente en alimentos. Se ensayaron vinos blancos, rosados y tintos; se determinaron dienos conjugados hidroperóxidos y hexanal, productos originados por la oxidación. La actividad antioxidante resultó asociada al contenido de fenoles totales. Por lo tanto el vino tinto resultó más efectivo que el rosado, y este, a su vez, mejor que el vino blanco. Se ha determinado que la actividad antioxidante de los jugos de uva y de vinos parece basarse en su capacidad para capturar radicales libres. Los vinos tintos, debido al proceso de maceración, tienen mayor actividad antioxidante que los jugos de uva que los originan (Sánchez-Moreno 2002).

En 13 vinos italianos típicos se estudió la composición fenólica en relación con su actividad antioxidante total. Existe una alta correlación entre el contenido fenólico de los vinos y la actividad antioxidante total, siendo los vinos tintos más antioxidantes que los blancos. Parece ser que la absorción de los polifenoles es limitada, y que se produce una extensa degradación en el tracto digestivo. En consecuencia, los polifenoles pueden actuar en el tracto digestivo limitando la formación de especies reactivas del oxígeno o bien capturándolas debido a su gran potencial de reducción. Por lo tanto, las vitaminas

C, E y  $\beta$  caroteno son protegidas del ataque de los radicales libres, y debido a su buena biodisponibilidad pueden ser absorbidas por los tejidos, aumentando así el status antioxidante del cuerpo (Simonetti, Pietta et al. 1997).

El vino tinto es una buena fuente de polifenoles y puede contener de 1000 a 4000 mg/L de estos compuestos. Las propiedades antioxidantes de los vinos tintos han sido correlacionadas con su contenido en flavanoles, antocianos y ácido tánico, pero estas propiedades se correlacionan mejor con los fenoles totales que con los compuestos individuales. El contenido de flavanoles totales (flavanoles monoméricos: catequina y epicatequina y poliméricos: proantocianidinas) está fuertemente relacionado con las propiedades antioxidantes de los vinos y con la captura de radicales libres hidroxilo (Arnous, Makris et al. 2001).

Pero también hay que tener en cuenta que no todos los fenoles presentes en el vino poseen la misma capacidad antioxidante, algunas moléculas son más eficaces que otras. En 26 vinos blancos griegos se evaluó el poder antioxidante, antirradical y reductor. El poder antioxidante de los vinos se correlacionó con los fenoles totales, si bien es menor que en los vinos tintos. La actividad antirradical se correlacionó con los fenoles totales y con los hidroxicinamatos (ésteres del ácido tartárico con ácido cafeico, p-cumárico y ferúlico). Los no hidroxicinamatos (catequina, epicatequina y ácido gálico) se correlacionaron con el poder reductor (Makris, Psarra et al. 2003).

Los compuestos fenólicos de los vinos pueden dividirse en dos categorías: los no flavonoides (comprenden los hidroxibenzoatos y los hidroxicinamatos) y los flavonoides, que incluyen los flavonoles (quercetina, miricetina), los flavan-3-oles (catequina y epicatequina), los polímeros de la catequina o procianidinas, y los antocianos. Colectivamente, son 20 veces más abundantes en vinos tintos que en vinos blancos. En este estudio se obtuvo una correlación positiva entre el potencial antioxidante total del vino y el ácido gálico, la catequina y la epicatequina, así como los polifenoles totales (Minussi, Rossi et al. 2003).

En un modelo de resistencia a la insulina asociado con hipertensión, como son las ratas alimentadas con fructosa, se probó que un extracto de polifenoles de vino tinto (100 mg/kg), etanol (1 mL/kg), o la combinación de ambos previno el desarrollo de alta presión. Por otra parte, se probó que los polifenoles del vino, el etanol o la asociación de ambos, previno la hipertrofia cardíaca y la superproducción de especies re-activas del oxígeno por el corazón o la aorta, mientras que el etanol corrigió la resistencia a la insulina, pero no fue capaz de reducir la hipertrofia cardíaca (Al-Awwadi, Bornet et al. 2004).

Estudios *in vivo* en 8 voluntarios humanos acerca de la modificación de la capacidad antioxidante del plasma han permitido conocer que el máximo aumento de la capacidad antioxidante ocurre 55 minutos después de la ingesta de 300 ml de vino tinto. Existieron diferencias significativas en la capacidad antioxidante del plasma medida antes y después de la ingesta de vino (Fernández-Pachón, Villaño et al. 2005).

**Uva**

Las semillas de uva contienen además de un 7 % de fenoles complejos, 40 % de fibra, 16 % de aceite, 11 % de proteínas, azúcares y sales minerales. El 63 % de los fenoles totales de las vides de variedades tintas se encuentra en las semillas, el 34 % en las pieles y el 3 % en el jugo (Murga, Ruiz et al. 2000).

Entre los compuestos fenólicos presentes en las semillas de uva se incluyen varios flavonoides, tales como flavan-3-ol monoméricos: (+) catequina, (-) epicatequina) y epicatequin-3-O-galato, dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros de hasta 15-16 unidades (procianidinas poliméricas) y ácidos fenólicos (gálico y elágico). Pueden existir también pequeñas cantidades de galocatequinas. Los polifenoles procianidínicos son los oligómeros de las unidades flavan-3-oles, especialmente catequina y epicatequina. Las procianidinas dímeras son las más simples y tienen uniones de tipo C4 – C8 entre los monómeros. Los dímeros procianidínicos más comunes son B1, B2, B3 y B4. Estos están seguidos de los isómeros con uniones C4 – C6, tales como B5, B6, B7 y B8. Todas las procianidinas aciladas encontradas en semillas de uva son ésteres del ácido gálico. En las semillas de uva también existen cantidades substanciales de procianidinas altamente polimerizadas; más del 55 % de las procianidinas en semillas de uva consisten en polímeros de más de 5 unidades (Yilmaz and Toledo 2004).

**1.1.4 Efectos antioxidantes de extractos vegetales en alimentos.**

Los extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos parecen ser los mejores candidatos para su uso como antioxidantes en productos cárnicos ya que se obtienen fácilmente a partir de fuentes naturales y además evitan la aparición de fenómenos oxidativos. Las propiedades antioxidante de dichos compuestos se han probado con éxito tanto en sistemas modelo como en productos cárnicos (Vuorela, Salminen et al. 2005); (Estévez, Ventanas et al. 2007). De hecho, el número de trabajos donde se evalúa la actividad antioxidante de los mismos es innumerable.

Así pues, destaca el empleo de extractos de romero, debido a la presencia de carnosol, rosmanol, isorosmanol y rosmaridifenol, compuestos con elevado poder antioxidante. De hecho, se ha utilizado con éxito en carnes procesadas como las hamburguesas de vacuno, en las cuales el romero mostró una gran capacidad antioxidante además de cierto efecto antimicrobiano (Sánchez- Escalante, 2001). También se ha comprobado la actividad antioxidante de aceites esenciales de romero en productos cárnicos cocidos elaborados a partir de materia prima de cerdo Ibérico, dicha actividad fue similar a la del BHT (Estévez, Ventanas et al. 2007). Este hecho sugiere la posibilidad de que estos antioxidantes naturales pudieran ser usados como alternativa al uso de antioxidantes sintéticos en productos cárnicos. Asimismo, se comprobó que las plantas que contienen licopeno, como el tomate y el pimiento rojo poseen una importante actividad antioxidante (Sánchez-Escalante, Djenane et al. 2001). Compuestos extraídos a partir de aceites esenciales de orégano, borraja y salvia también

han sido estudiados por su potencial antioxidante. Estos compuestos también suelen mostrar actividad antimicrobiana que los hace útiles para mejorar la seguridad alimentaria del producto mediante la inhibición del crecimiento de patógenos alimentarios.

Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio donde se comprobó la actividad antioxidante de diferentes hierbas silvestres entre las que se encontraban el orégano, la salvia, el tomillo, la canela, la albahaca, la pimienta blanca y negra. En este estudio se pudo comprobar que estas hierbas incorporadas en forma de extractos a la carne de cerdo previenen la oxidación lipídica (Tanabe, Yoshida et al. 2002). Asimismo, se demostró que los compuestos tipo terpeno-fenoles aislados de dichas especias y/o hierbas aromáticas poseían gran capacidad antioxidante, siendo especias como el romero, la salvia, el clavo y el orégano las más eficaces frente a las reacciones de oxidación, como anteriormente se ha mencionado.

Por otro lado, (Estévez, Kylli et al. 2008) han logrado identificar recientemente los mecanismos involucrados en las interacciones entre proteínas y compuestos fenólicos. Según estos autores, los compuestos fenólicos podrían ejercer acciones antioxidantes o pro-oxidantes sobre las proteínas, en función de su estructura química, la concentración en el producto, el estado oxidativo del mismo así como la estructura y características de las proteínas. De hecho, en sistemas cárnicos cocidos el uso de compuestos fenólicos ya había sido usado con éxito para inhibir la oxidación de proteínas (Vuorela, Salminen et al. 2005).

Asimismo, un estudio reciente evaluó la capacidad antioxidante de extractos de frutas silvestres mediterráneas (*Arbutus unedo*, L., *Crataegus monogyna*, L., *Rosa canina*, L. y *Rubus ulmifolius*) en productos cárnicos cocidos de cerdo (hamburguesas de cerdo). El empleo de estos extractos naturales como antioxidantes mejoró la estabilidad oxidativa del producto reduciendo las reacciones de oxidación de lípidos y proteínas (Ganhao, Morcuende et al. 2010).

De todos ellos *Arbutus unedo*, L., *Rubus ulmifolius*, S y *Rosa canina*, L. demostraron tener una intensa actividad antioxidantes siendo esta atribuida a su elevado contenido en compuestos fenólicos. Así pues, el empleo de extractos naturales de frutas silvestres mediterráneas no sólo permite reducir las reacciones de oxidación en el producto, sino que también mejora su estabilidad oxidativa y prolonga su vida útil manteniendo sus propiedades organolépticas inalterables durante más tiempo.

Por lo tanto, queda demostrado mediante diferentes estudios los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos presentes en extractos de frutas, verduras y especias, sobre los procesos degradativos de lípidos y proteínas de la carne y productos cárnicos.

También se han estudiado los efectos de extractos de algunas plantas en el aceite de girasol. Por ejemplo en el estudio realizado por (Ahn, Kim et al. 2008), se demostraba que los extractos de plantas naturales como romero, brócoli y algunos

cítricos, podían inhibir eficazmente la oxidación lipídica del aceite de girasol microencapsulado. Se consiguió utilizando un método de envoltura con dextrina con suplementos como proteína de leche isolada, lecitina de soja y emulsiones de trifosfato de sodio.

### **1.1.5 Efectos antioxidantes de los extractos de semillas de uva en alimentos**

Existen antecedentes sobre el empleo de procianidinas de semillas de vid como antioxidante en distintos productos alimentarios, tales como carne de vaca, carne de pavo, pescado azul y aceites de algas.

El extracto de semillas de uva agregado a carne de vaca molida cocida retardó la oxidación durante el almacenamiento en frío luego de la cocción, el extracto de semillas redujo la formación de hexanal respecto del testigo en un 97 %, luego de 3 días de refrigeración. Agregado al 0,02 % no afectaron el aroma ni el sabor (Ahn, Grun et al. 2002).

La carne de pavo es particularmente propensa a la oxidación debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), su alta concentración en hierro libre y su escasa capacidad de acumular vitamina E, a partir de la dieta. El extracto de semillas agregado a la carne de pavo retardó la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento en frío. El agregado de extracto de semillas a carne de pavo, ya sea por ingestión o por adición post mortem redujo el nivel de oxidación en hamburguesas preparadas con carne de pavo (Lau and King 2003).

El extracto de semillas de uva ha sido empleado para prolongar la vida útil del pescado azul (*Trachurus trachurus*). Los análisis sensoriales revelaron que los testigos pierden su calidad sensorial de fresca al tercer día de conservación a 4 °C; los panelistas identificaron claramente el olor a rancio. El pescado suplementado con procianidinas conservó el olor a pescado fresco durante 7 días en las muestras tratadas con una dosis de 50 ppm, y durante 10 días en los tratamientos con 100 ppm (Medina, Lois et al. 2006).

Los aceites de algas producidos por tecnologías de fermentación tienen muchos beneficios como alimentos funcionales por su alto contenido en ácidos grasos del tipo  $\omega$  3. Estos ácidos se enrancian fácilmente. Las proteínas aisladas de suero de leche crean emulsiones físicamente estables e incrementan la estabilidad ante la oxidación de estas emulsiones. El extracto de semillas de uva agregado a una emulsión de aceite de algas estabilizada con proteínas aisladas de suero de leche inhibió la formación de propanal y de lípidos hidroxiperóxidos a pH 3 y a pH 7 (Hu, McClements et al. 2004).

## 1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

### 1.2.1 Extracción sólido-líquido

En China se analizó la cantidad de L-teína que había en 27 tipos de té diferentes de V gama (ready to drink). Para la extracción de este compuesto y otros polifenoles se usó un método combinado de extracción sólido-líquido y cromatografía líquida de alta eficacia. Con este estudio se obtuvo un parámetro para diferenciar diversos tipos de té en función de su contenido en polifenoles y L-teína (Chen, Wang et al. 2012).

La extracción de compuestos polifenólicos de las hojas de *Inga edulis* (Mimosa) fue optimizada por la maximización simultánea de los rendimientos en fenoles totales, flavonoides totales y flavanoles totales utilizando el diseño experimental de superficie de respuesta. En un primer juego de experimentos se pudo identificar la temperatura, el tiempo de contacto y la proporción de etanol en la extracción. Las condiciones óptimas fueron 86,8 % etanol, 58,2 °C y un tiempo de contacto de 46,8 min. (Silva, Rogez et al. 2007).

Wijngaard, Ballay et al. (2012) hacen un estudio por medio de una superficie de respuesta para optimizar la extracción sólido líquida de polifenoles de la piel de la patata generada industrialmente. La eficacia de la extracción fue optimizada por medio de la actividad antioxidante, contenido en fenoles y el nivel de ácido caféico. En el estudio se determina que los parámetros óptimos son 75 % etanol, 80 °C y 22 minutos dando 352 mg equivalentes Trolox/ 100 g piel de patata. Una vez obtenidos los datos de actividad antioxidante se comparó con una extracción por líquido a presión y se observó que no se obtenían mejores resultados.

Latoui, Aliakbarian et al. (2012) en un estudio tuvieron como objetivo primario valorizar los compuestos fenólicos de *Vitex agnus-castus* (Pimentero). Fueron evaluados los tiempos de extracción (30-360 min), proporción sólido-líquido (0,1-0,3 g materia seca/ml solvente), tipo de solvente y diferentes tipos de tejidos (hoja, raíz y semilla). La mayor cantidad de polifenoles obtenida fue en extractos de hojas tras 180 minutos usando una proporción sólido-líquido 0,1g/ml. Las raíces resultaron ser una buena fuente de antocianos con un rendimiento de 0,62 mg/g biomasa usando etanol como solvente durante 180 minutos y una proporción de 0,2 g/ml.

La guayaba destaca su contenido en vitamina C; concentra unas siete veces más que la naranja. Aporta en menor medida otras vitaminas del grupo B (sobre todo niacina o B3). Si la pulpa es anaranjada, es más rica en provitamina A (carotenos). Ambas vitaminas, cumplen además una función antioxidante. Para la extracción de estos compuestos antioxidantes se pesó 0,5 g de muestra y se agregaron 10 ml de metanol: agua (50:50). La mezcla fue puesta en agitación por 30 minutos a 50 °C. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó en la oscuridad a -20 °C. El residuo fue sometido a una segunda extracción con 10,0 ml de acetona: agua (70:30) a temperatura 50 °C por 30 minutos y se centrifugó a 6.000 r.p.m.

por 15 min a 4°C. En total se efectuaron cuatro extracciones con acetona: agua (70:30). Los cinco sobrenadantes fueron reunidos y almacenados a -20° C en oscuridad, estos fueron centrifugados a 5000 r.p.m. por 45 minutos a 4°C. Sobre los sobrenadantes se efectuó la cuantificación de fenoles y las medidas de actividad antioxidante (Rojas-Barquera and Narváez-Cuenca 2009).

Los polifenoles poliméricos son los pigmentos más abundantes en el té negro. En el estudio realizado por Krishnan and Maru (2006) se expone una comparativa de rendimientos, propiedades físico-químicas y actividades biológicas de cinco polifenoles poliméricos del té negro. Para la extracción se utilizó los métodos de líquido-líquido y sólido-líquido, y se compararon teniendo en cuenta los costes económicos, tiempo y mano de obra y viabilidad de la aplicación. La extracción sólido-líquida dio mayores rendimientos de polifenoles poliméricos, y una significativa reducción en los costes y en el tiempo, además de que era más fácil de realizar.

### **1.2.1.1 Extracción sólido-líquida de los compuestos fenólicos de la uva**

Los subproductos de la vinificación presentan un alto impacto medioambiental debido a su elevada demanda de oxígeno química y bioquímica. El estudio realizado por (Casazza, Aliakbarian et al. 2010) se centró en la optimización de la tradicional tecnología de extracción sólido-líquido en pieles de uva Pinot Noir. Para este propósito se combinaron diferentes factores, como tiempo de extracción (9, 19 y 29 horas) y proporción sólido-líquido (0,1, 0,2 y 0,3 g de materia seca /ml) por medio de un diseño experimental de superficie de respuesta, en donde las variables fueron los rendimientos de extracción de polifenoles totales, flavonoides y trans-reservatrol. Los resultados demostraron que la piel de esta variedad de uva tenía altos niveles de ambos polifenoles (3,22 mg eq ac. Gálico/g materia seca) y flavonoides (1,01 mg CE/g materia seca) siendo la mejor extracción a 19 horas. Sin embargo en el estudio se demostró que altas proporciones sólido-líquido no mejoraban ostensiblemente el rendimiento de extracción, por lo tanto se usó una proporción media como la más eficiente y así se ahorraban en costes.

Los compuestos fenólicos juegan un papel significativo en la enología ya que son responsables del color y el sabor del vino. En un estudio realizado para uvas Cabernet Sauvignon y Merlot de diferentes territorios de Bordeaux, se quería desarrollar un método eficiente para extraer y fraccionar proantocianos de las pepitas y proantocianidinas y antocianos de las pieles. El método de extracción consistió en mezclar 5 g de polvo de muestra con 45 ml de acetona-agua (80:20 v/v) seguido de 45 ml metanol-agua (60:40 v/v) en una proporción de sólido-líquido 7:5:1 (v/m) a 20 °C. los sobrenadantes tras la centrifugación fueron evaporados a 30 °C para eliminar los solventes orgánicos. El fraccionamiento posterior se realizó con HPLC-UV tanto para las pieles como para las semillas (Chira K 2007).

Las pepitas de uva son un subproducto de uva obtenido en la vinificación, y son una buena fuente de compuestos funcionales. En Bucic-Kojic, Planinic et al. (2007) se estudió el efecto de diferentes temperaturas y de las proporciones sólido-líquido en los

rendimientos de extracción sólido-líquido y el efecto de cuatro tamaños de partícula en las cinéticas de extracción de polifenoles totales con una relación etanol y agua 50:50. La temperatura, la proporción sólido-líquido y el grado de molido tuvieron una influencia positiva en la extracción. Entre el 14,7 y el 66,8 % de los polifenoles totales por materia seca fueron extraídos en un tiempo de 200 minutos.

Pinelo, Sineiro et al. (2006) en su trabajo hicieron un estudio sobre las condiciones que maximizan los rendimientos fenólicos y la actividad antioxidantes de los extractos de los hollejos. La optimización se llevo a cabo por la metodología de superficie de respuesta, usando etanol como solvente a 50 °C como temperatura de extracción. Para la configuración particular experimental utilizada, los valores óptimos para tres variables extractivas resultaron ser: 2 ml/min de caudal, 2,5 g de muestra y 0,5 mm de tamaño de partícula. Los valores más altos de fenoles y actividad antioxidante correspondieron a las condiciones de extracción en las que la proporción difusividad/tamaño de partícula era mayor.

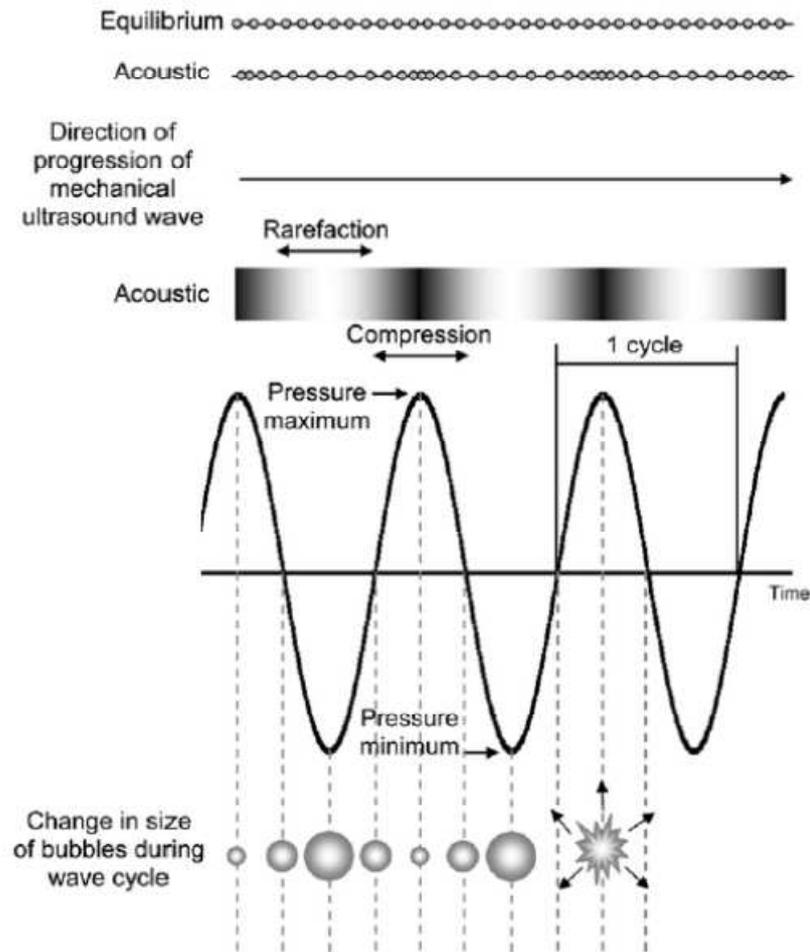
En la producción de vino blanco, al igual que en todos los procesos de vinificación, se obtienen subproductos de los que se pueden recuperar compuestos con polifenólicos con capacidad antioxidante. Las extracciones fueron diseñadas usando mezclas de etanol/agua. Se midieron los polifenoles totales, flavonoides totales, flavanoles totales y contenido en taninos. Entre los subproductos evaluados, las semillas mostraron una mayor cantidad en polifenoles totales (13,76 g por 100 g materia seca), seguido de los palillos y las pieles (7,47 y 0,97 g) los extractos con la mayor actividad antioxidante se obtuvo con un 57 % de etanol, y mejoró tras acidificarlo con HCl 0.1 % (Makris, Boskou et al. 2007).

### **1.2.2 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS**

La tecnología del ultrasonido está basada en ondas mecánicas a una frecuencia por encima del umbral de la audición humana (>16 kHz). Estas ondas viajan bien a través de la masa del material, o bien en su superficie a una velocidad que es característica de la naturaleza de la onda y del material sobre el que está propagándose. Los ultrasonidos pueden dividirse en diferentes rangos de frecuencias. Los de baja intensidad son los utilizados normalmente como técnicas de análisis para proporcionar información de la propiedades físico-químicas en alimentos, como firmeza, madurez, contenido en azúcares, acidez, etc.

Por el contrario, los niveles de potencia usados en aplicaciones de baja frecuencia (16 – 100 kHz) son tan amplios (10 – 1.000 W/cm<sup>2</sup>) que se usan para alterar, bien física o químicamente, las propiedades de los alimentos.

El efecto de los ultrasonidos en los líquidos es principalmente relacionado al fenómeno de cavitación. Los ultrasonidos son propagados a través de una serie de ondas de compresión y rarefacción inducidas en las moléculas del medio que traspasan.



**Figura 1.3.** Cavitación ultrasónica(Soria and Villamiel 2010)

A una potencia suficientemente alta, el ciclo de rarefacción puede que exceda las fuerzas de atracción de las moléculas del líquido y las burbujas de la cavitación del gas nucleico existente dentro del fluido. Estas burbujas, distribuidas a lo largo de todo el líquido, crecen durante el periodo de unos pocos ciclos a tamaño crítico hasta que se convierte en inestable y violentamente colapsa. La implosión de las burbujas de cavitación unida a la acumulación de energía en puntos calientes, generan temperaturas (5.000 K) y presiones (1.000 atm) extremas, las cuales producen, a su vez, una muy alta energía de cizallamiento y turbulencias en la zona de cavitación. La combinación de estos factores (presión, calor y turbulencia) tiene una variedad de efectos en el sistema de irradiación de ultrasonidos. La energía y la intensidad junto con la viscosidad del medio, tensión superficial, presión de vapor, naturaleza y concentración del gas disuelto, presencia de partículas sólidas y temperatura y presión del tratamiento, determinan la extensión de la cavitación.

Un efecto importante es que las moléculas de agua se rompen generando muchos radicales libres altamente reactivos ( $H_2O \rightarrow H + \bullet OH$ ), que pueden reaccionar o modificar otras moléculas. Este amplio rango de mecanismos involucrados en el tratamiento con ultrasonidos puede inducir efectos físicos o químicos, con mucho potencial para ser usado en la industria alimentaria.

Los ultrasonidos de alta intensidad son usados como un método alternativo, barato, reproducible, simple y efectivo para mejorar el proceso de extracción de bioactivos en alimentos. Todos los efectos mecánicos involucrados en ultrasonidos pueden acelerar la difusión interna dando paso a un incremento de la transferencia de masa, y permiten una mayor penetración del solvente en la matriz de la muestra. Si el sustrato está seco, entonces el ultrasonido puede ser usado para facilitar la hinchazón e hidratación y causar una ampliación de los poros de la pared celular (Soria and Villamiel 2010).

La cantidad de polifenoles, así como la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por métodos de extracción clásicos y por ultrasonidos fueron comparados para muestras de absintio (*Artemisa vulgaris* y *Artemisa campestris*). Los ultrasonidos afectaban positivamente al rendimiento de extracción y a las cinéticas de extracción, pero el extracto obtenido por los métodos clásicos mostraron mayores actividades antioxidantes y también contenían más componentes fenólicos así como en flavonoides que los extractos obtenidos por otros dos tipos de técnicas (Karabegovic, Nikolova et al. 2011).

El jugo de manzana es un subproducto obtenido de la producción de sidra, y ha sido estudiado porque es una fuente potencial de polifenoles. La metodología de ultrasonidos se usó para mejorar la eficiencia de extracción en términos de tiempo empleado y contenido total de polifenoles. Un estudio previo fue realizado para optimizar la proporción de etanol en el extracto acuoso, y se estipuló que debía ser 50 % v/v y en un ratio <15 % w/v para el sólido-líquido. Tras analizar los resultados de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos mediante un análisis de superficie respuesta, se obtuvo que el rendimiento había aumentado en un 20 %. La extracción asistida por ultrasonidos para el jugo de manzana parece ser una alternativa relevante, rápida y sostenible a los procesos clásicos (Viot, Tomao et al. 2010).

Relacionado con el estudio anterior (Pingret, Fabiano-Tixier et al. 2012) analizaron las propiedades del zumo de manzana. Este zumo tiene un alto contenido en polifenoles explotables. Así pues se usó la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos para producir extractos ricos en antioxidantes. Primero se analizó la cantidad de muestra seca que se debía preparar por mililitro (150 mg) y las condiciones del ultrasonido se obtuvieron mediante el método estadístico de superficie de respuesta. Una comparación mostraba que el contenido en fenoles totales obtenidos por ultrasonidos fue un 30 % mayor que con métodos convencionales. Además los extractos obtenidos por ultrasonidos mostraron mayor actividad antioxidante y se demostró por análisis HPLC. Con este método se probaba su futuro uso industrial.

Las flores de *Delorix regia* (Franboyán) de Costa de Marfil tradicionalmente se usan como bebidas tras una maceración, y produce efectos beneficiosos para la salud debido a sus contenidos en polifenoles. En un estudio que se realizó (Adjé, Lozano et al. 2010) se comparaban diferentes métodos y resultó que el método de ultrasonidos

reducía el tiempo de maceración (1/3 del tiempo normal), pero no mostraba un aumento considerable en la extracción de polifenoles. Sin embargo este método de bajo coste y respetuoso con el medio ambiente provee productos ricos en polifenoles en productos ecológicos

En una revisión bibliográfica realizada para analizar diferentes sistemas de extracción de componentes en frutas y vegetales durante 10 años. Entre los métodos de análisis están extracciones líquido-líquido (LLE), fase-sólido (SPE), fluidos supercríticos (SFE), líquido presurizado (PLE) y microondas (MAE). Pero el método que dio mejores resultados comparando precios, tiempo y cantidad de solventes utilizados fue la extracción de ultrasonidos, y además aceleraba el proceso de extracción (García-Salas, Morales-Soto et al. 2010).

Hay una gran demanda en desarrollar métodos de extracción eficientes para reducir el tiempo de extracción e incrementar el rendimiento y la actividad antioxidante. Los rendimientos, y las cinéticas de extracción y actividades antioxidantes de la piel seca de la granada fueron estudiados tras usar ultrasonidos en pulsos o en modo continuo y los resultados fueron comparados con el método de extracción clásico. Los factores estudiados fueron intensidad y tiempo de tratamiento para extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos continuos. Para los ultrasonidos con pulsos se estudiaron la intensidad, número de repetición de pulsos, y la duración e intervalo del pulso. Los resultados mostraron que todos los factores afectaban significativamente el rendimiento de antioxidantes, pero solo el tiempo de tratamiento tenía un efecto significativo en la actividad antioxidante. Comparando el método de pulsos frente al tradicional se obtenía un rendimiento mayor del 22 % y se reducía el tiempo de extracción en un 87 %. Similarmente en continuo, el rendimiento antioxidante se incrementaba un 24 % y se reducía el tiempo un 90 %. Por tanto si se quiere un mayor rendimiento en menor tiempo se usaba extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos continuos, mientras si se prefería rendimientos algo menores pero ahorrar energía se usaba ultrasonidos por pulsos (Pan, Qu et al. 2012).

La extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos también se usó para la obtención de antioxidantes polifenólicos de *Aronia melanocarpa* (Grosella negra). Fue evaluada la influencia de varios factores (tiempo, temperatura de extracción, composición de los solventes, mezcla sólido-solvente, tamaño de partícula e irradiación ultrasónica) en las cinéticas de extracción y rendimientos. Tras los análisis se vieron efectos producidos por los ultrasonidos muy claros, ya que se obtuvo un incremento del rendimiento de un 85 %. También influyeron positivamente tratamientos a altas temperaturas y la presencia de etanol (Galvan D'Alessandro, Kriaa et al. 2012).

En un estudio sobre *Origanum majorana* (Mejorana o mayorana), se evaluó la optimización de la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos para maximizar la actividad antioxidante, la cantidad de fenoles totales y el contenido de polifenoles individuales en extractos de *Origanum*. Los rendimientos de extracción sólido-líquida

asistida por ultrasonidos fueron significativamente mayores que con la extracción sólido/líquido. (Hossain, Brunton et al. 2012)

La tecnología de ultrasonidos fue también aplicada para la extracción de polifenoles y antioxidantes para el salvado de arroz, usando etanol como solvente. Para desarrollar el experimento se usó un análisis de superficie de respuesta, en las que se tenía en cuenta tres parámetros, porcentaje de solvente, temperatura y tiempo. El contenido en fenoles totales aumentó desde 2,37 a 6,35 mg ácido gálico/g. la actividad antioxidante se midió con FRAP y DPPH y también aumentó de 31,74 a 57,23  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  y 16,88 a 55,61 % respectivamente. Los rendimientos de extracción aumentaron del 11 al 20,2 % (Tabaraki and Nateghi 2011).

En Nigeria se investigó la influencia de las condiciones de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos en la calidad de extractos obtenidos de *Mesembryanthemum edule* (Uña de gato comúnmente conocida). Se analizó como afectaba el solvente utilizado, etanol y metanol, así como el tiempo de extracción, 5 o 10 minutos, para mejorar la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante. Tras el experimento se observó que el solvente utilizado y en menor medida el tiempo de extracción afectaban a los fenoles totales y la actividad antioxidante. Con etanol se obtenían mayores actividades antioxidante sobre todo si se usaba una sonicación de 10 minutos. Así pues se concluyó que la capacidad antioxidante de *M. edule* está fuertemente influenciada por la naturaleza del solvente de extracción y la duración de la sonicación (Falleh, Ksouri et al. 2012).

### **1.2.2.1 Extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos de los compuestos polifenólicos de la uva**

Polifenoles, los bien conocidos antioxidantes naturales, son los metabolitos secundarios más abundantes en los desechos de uva. Por tanto Casazza, Aliakbarian et al. (2010) investigaron algunos métodos no convencionales de extracción frente al clásico sólido-líquido, para obtener compuestos fenólicos de las pieles y pepitas de la uva. En este estudio se analizaron extracciones sólido-líquido, ultrasonidos, microondas y extracción a altas temperaturas y presiones. Se usaron como solventes etanol y metanol. Los análisis de calidad y cantidad se hicieron mediante HPLC.

Para la determinación de compuestos fenólicos presentes en uva (Carrera, Ruiz-Rodríguez et al. 2012), desarrolló un nuevo método de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos. Esta metodología contenía diferentes variables de extracción como temperatura (0-75 °C), amplitud de onda (20, 50, 100 %), pulsos (0,2, 0,6, 1s), cantidad de muestra (0,5 - 2 g) y el tiempo de extracción (3 - 15 min). Se analizaron cantidad total de compuestos fenólicos, cantidad total de antocianos y la cantidad total de taninos. El método desarrollado producía unas recuperaciones iguales o mayores para estos tres parámetros en comparación con los métodos clásicos, y además el tiempo de extracción se redujo a 6 minutos en vez de los 60 minutos de los métodos anteriores.

Los ácidos tartáricos y málicos, son los ácidos orgánicos más abundantes en uvas. Se usan para determinar el periodo de la vendimia, debido a que cada ácido presenta un comportamiento diferente durante el proceso de maduración, por ejemplo el ácido málico muestra un decrecimiento mientras que el tartárico se mantiene invariable durante el periodo de maduración. Por este y otros motivos, Palma and Barroso (2002), hicieron un estudio para la optimización de la extracción de estos ácidos por medio de ultrasonidos, en muestras de uvas y subproductos de la vinificación. Bajo las condiciones óptimas de extracción (200 W, 70 %, 30 minutos), se concluyó que la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos tenía mejoras en el rendimiento frente a la extracción sólido/líquido convencional en los subproductos, mientras que en los subproductos las diferencias eran menos marcadas.

También existen estudios realizados sobre los subproductos de la vinificación, por ejemplo en un ensayo realizado sobre pepitas de uva en China, se analizaban 5 factores: la media de extracción, repeticiones de la extracción, solventes utilizados, tamaño de la muestra y métodos de molienda, entre extracciones realizadas por ultrasonidos y agitación tradicional. Una extracción sonicando durante veinte minutos y en tres repeticiones daba mejor rendimiento que una con agitación durante cien minutos. La muestra estaba mezclada con solventes en relación Metanol/agua/HCl (70:29:1 v/v/v). También se observó que las muestras molidas en pequeños tamaños y a poder ser con formas redondeadas daban mejores resultados (Changmou, 2010).

Siguiendo el hilo de las pepitas en otro estudio se quiso determinar la cantidad de antocianos que había en la variedad de uva Campbell Early. Para ello se usó una extracción mediante ultrasonidos, y para determinar las condiciones de extracción se usó el diseño estadístico de superficie de respuesta. Una vez realizado el experimento y teniendo en cuenta los resultados de la superficie respuesta, se dedujo que las mejores condiciones para la extracción en este tipo de uva eran 52,35 % etanol, 45,14 °C, y 24,5 minutos. Bajo estas condiciones se consiguieron 6.24 mg de antocianos/ml de extracto de piel, lo que coincidía con los valores esperados (Ghafoor, Hui et al. 2009).

Un caso excepcional es el de la mermelada de uva, ya que no es muy común en nuestro país, pero que fuera de nuestras fronteras se consume debido al ya conocido efecto beneficioso de los compuestos de la uva. Usando la metodología estadística de la superficie de respuesta se determinó que los mejores rendimientos se conseguían en el baño a 80 W, poniendo una muestra de 2 gramos con una proporción etanol/agua 60:40. La sonicación duraba 20 minutos y la temperatura del baño se mantuvo a 50 °C (Morelli and Prado 2012).

Algunos investigadores han ido más allá y han combinado la técnica del ultrasonidos con enzimas. Los resultados indicaron que las condiciones óptimas de temperatura eran de 74 °C durante 13 minutos para un tratamiento de solo sonicación, mientras que cuando se combinaba con enzimas se usaba una concentración de éstas de 0,05 % durante 10 minutos. Este último método de extracción incremento el rendimiento en un 7,3 % y además acorto el tiempo de tratamiento (Lieu and Le 2010).

### 1.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 1.3.1. Metodología disponible para la determinación de capacidad antioxidante

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen una gran capacidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos de alimentos. Se han planteado una serie de condiciones que debería reunir un procedimiento estandarizado de medida de capacidad antioxidante *in vitro* (Frankel and Meyer 2000; Prior, Wu et al. 2005):

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomo de hidrógeno
- Especificar el sustrato de oxidación
- Medir reacciones químicas que de hecho ocurran en reacciones potenciales, es decir, asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo
- Ser sencillo.
- Tener un mecanismo y un punto final definido.
- Poseer una instrumentación más o menos disponible.
- Tener una buena reproducibilidad entre días.
- Ser adaptable para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos.
- Usar distintas fuentes de radicales.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.

Sin embargo, la realidad es que no existe ningún método en la actualidad que reúna tales características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, en vez de por la combinación de varios, como se hace en la actualidad. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes...) y en un mismo alimento puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerar las posibles mecanismo de acción de todos los antioxidantes presentes en un alimento.

Por otro lado, además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de alimentos, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes, etc. (Mantle, Anderton et al. 1998; Yu and Ong 1999; Frankel and Meyer 2000).

Por ejemplo, en lo que se refiere a las emulsiones, los antioxidantes lipofílicos son mejores para las emulsiones o/w, porque se sitúan entre el agua y el aceite, protegiendo el aceite, mientras que los hidrofílicos se disuelven en la fase acuosa. A su vez, los antioxidantes hidrofílicos son mejores para medios aceitosos, porque se sitúan entre el medio y el aire, protegiendo al aceite, mientras que los lipofílicos se disuelven en el medio. Esto se conoce como paradoja polar de Porter (Frankel and Meyer 2000).

Así mismo, se debe tener en cuenta que muchos compuestos que previenen la oxidación lipídica no lo hacen con la de proteínas o ADN, o incluso la potencian, como ocurre con el BHA, que oxida el ADN, aunque no a las concentraciones que se pueden ingerir habitualmente (Aruoma 1999; Aruoma, Bahorun et al. 2003). Así mismo, la vitamina E impide la oxidación inducida por iones metálicos o por peroxinitrito, pero no la inducida por hipoclorito ni la oxidación lipídica inducida por lipooxigenasa.

Por todas estas razones, un gran número de autores han planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* (Frankel and Meyer 2000; Sánchez-Moreno 2002; Aruoma 1999); (Prior, Wu et al. 2005).

En cualquier caso, todos los ensayos *in vitro* sobre capacidad antioxidante de extractos de alimentos, deben completarse con ensayos *in vivo*, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas (Frankel and Meyer 2000), ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante.

Finalmente, habrá que considerar si los compuestos responsables de esta capacidad antioxidante son o no biodisponibles en el tracto gastrointestinal y, por tanto, podrán ejercer de hecho ese efecto beneficiosos que potencialmente poseen, así como el grado de retención de ese compuesto en los tejidos. Esta biodisponibilidad vendrá determinada, entre otros factores, por la naturaleza química de estos compuestos, sus efectos dentro de la matriz alimentaria, la combinación de alimentos en la dieta y el estado general de salud (Aruoma 1999; Aruoma, Bahorun et al. 2003).

Otro aspecto a considerar en la determinación de capacidad antioxidante *in vitro* es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución, ya que pueden haber existido cambios en la manipulación, en la temperatura del ensayo, en la variedad de la muestra o sus condiciones de procesado, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (por ejemplo, tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos, etc.) , en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra:solvente, etc.). Así mismo, el hecho de que en el sistema a analizar haya una alta o una baja actividad de agua es también importante, ya que este factor afecta a la migración de compuestos, puede producir fenómenos de cristalización, coalescencia, complicación, colapsos de estructuras, etc. Además, se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los

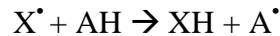
resultados para un mismo método se expresan de múltiples formas, lo que dificulta su comparación (Villaño, Fernández-Pachón et al. 2005).

### 1.3.2. Determinación de la actividad antioxidante en productos alimentarios.

#### 1.3.2.1 Reacciones SET y reacciones HAT

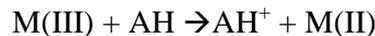
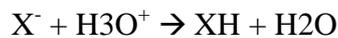
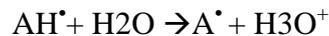
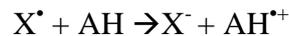
Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes alimentarios pueden ejercer su acción, entre aquellos compuestos que reaccionan directamente con los radicales libres, como pueden ser los polifenoles, deteniendo el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain- breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET) (Prior, Wu et al. 2005), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar varios métodos de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo  $X^\bullet$  el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo  $X^\bullet$  el radical libre y AH el antioxidante:



En principio, estas reacciones dependen mucho más del disolvente que las HAT; sin embargo, se ha visto que el disolvente puede ejercer una influencia clara en el ORAC y el ABTS, a pesar de ser métodos HAT (Fernández-Pachón, Villaño et al. 2005)

Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo

metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados.

Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que la tuviera baja facilitaría la abstracción del átomo de H. Así mismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización (Siquet, Paiva-Martins et al. 2006).

A continuación, se describen brevemente algunos de los principales métodos para la determinación de la capacidad antioxidante, según usen mecanismos de las reacciones HAT, SET, o ambas

### **1.3.2.2 Métodos de medida de capacidad antioxidante que utilizan mecanismos de reacciones HAT**

#### ***ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)***

Se trata de un mecanismo HAT. Mide la capacidad de captación de un radical específico, el peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica AAPH, que se trata de un iniciador de tipo -azo-. Estos radicales atacarán a la molécula de fluoresceína, produciendo fluoresceína oxidada, que ya no emite fluorescencia y, produciendo, por tanto, un descenso en la misma (longitud de onda de excitación 493 nm. y de emisión 515 nm.) En presencia de antioxidantes, éstos reaccionan con los radicales peroxilo y la fluoresceína mantendrá la misma emisión de fluorescencia. Por tanto, se lleva a cabo una comparación entre el descenso en la fluorescencia producido en presencia y en ausencia de un antioxidante (Ou, Hampsch-Woodill et al. 2001). A las concentraciones empleadas, el AAPH tiene una ratio respecto al antioxidante mucho mayor que el ABTS<sup>•+</sup> en el TEAC, con lo que se asegura que los radicales peroxilo interaccionarán con el antioxidante (Cao, Booth et al. 1998).

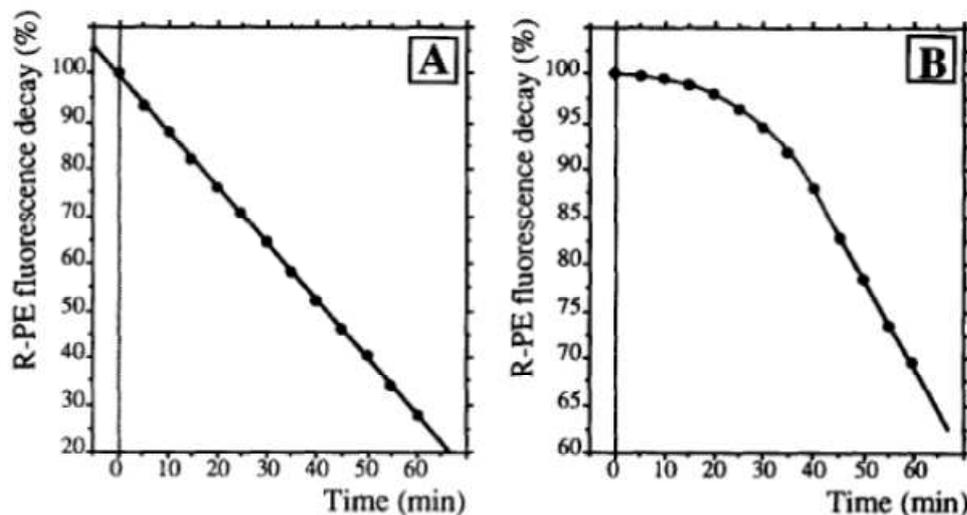
Inicialmente, la reacción se llevaba a cabo con beta-ficoeritrina ( $\beta$ -PE), una proteína aislada de *Porphyridium cruentum*, como fuente de radicales peroxilo. Sin embargo, la  $\beta$ -PE no proporciona resultados reproducibles y no es fotoestable, por lo que después de una cierta exposición a la luz se puede fotodegradar. Además, se ha visto que forma ciertos enlaces no específicos con polifenoles, que hacen que se subestime la capacidad antioxidante. Finalmente, la muestra comercial sólo tiene un 30 % de pureza. Por esta razón, se buscó una alternativa, que es la fluoresceína- 3,6'-dihydroxy-spiro [isobenzofuran-1 [3H], 9' [9H]-xanthen]-3-ona (Ou, Hampsch-Woodill et al. 2001).

No obstante, se debe recordar que el ORAC mide la capacidad de captación de un ROS en concreto (presente, en cualquier caso, en una molécula que no se encuentra en el organismo), pero en el cuerpo humano se forman muchos otros que se deberían

medir por otros métodos (Ou, Hampsch-Woodill et al. 2001). Otro inconvenientes de este método son que la cinética de la reacción puede variar en función de la concentración de antioxidante.

### ***TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)***

Determina la captación de radicales peroxilo, en este caso generados a partir del ABAP. La oxidación es inicialmente inhibida durante un periodo de tiempo –lag phase– por el antioxidante, y lo que se hace es comparar la duración de este periodo (T) para la muestra y para el Trolox. (Ghiselli, Serafini et al. 1995). La Figura 1.4 muestra el descenso en la fluorescencia frente al tiempo que se produce en ausencia del antioxidante (izquierda) y la lag-phase que se genera al añadir un antioxidante (derecha), retrasando el inicio de la pérdida de fluorescencia.



**Figura 1.4.** Evolución de la intensidad respecto al tiempo en el método TRAP (Ghiselli, Serafini et al. 1995)

Distintos autores han usado muchos puntos finales diferentes, lo que dificulta la comparación de los resultados. Además, no todos los antioxidantes poseen una lag-phase claramente establecida (Prior, Wu et al. 2005).

### ***TOSC (Total oxyradical scavenging capacity)***

Se basa en la oxidación del ácido alfa-ceto-gamma-metilbutírico a etileno por la acción de radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito generados a partir del 2,2'-azobisamidinopropano (ABAP). La formación de etileno, que es parcialmente inhibida por la presencia de antioxidantes, es monitorizada por el análisis del espacio de cabeza por GC (Gas Chromatography). El valor TOSC se halla comparando el área de la muestra con la de un patrón (Winston, Regoli et al. 1998).

Recientemente se propuso una modificación en este método para expresar los resultados en equivalentes Trolox, solucionando uno de los principales problemas del método original, que, aunque era una técnica muy rápida, no tenía una expresión clara de resultados.

No obstante, la reacción tiene una cinética que no hay una relación dosis-respuesta entre la cantidad de antioxidante y el porcentaje de inhibición, lo que dificulta la comparación entre distintos alimentos (Prior, Wu et al. 2005).

***PCL (Ensayo de fotoquimiluminiscencia, PHOTOCHEM)***

El ensayo engloba la generación fotoquímica de radicales libres superóxido  $O_2^{\bullet-}$  combinado con una detección CL. El ensayo se inicia por excitación óptica de un fotosensibilizador (S) resultante de la generación del anión radical superóxido



La reacción completa del mecanismo no se conoce. Hay dos tipos básicos de radicales presentes en el sistema de medida PCL:  $O_2^{\bullet-}$  y radicales lumínicos. Así, en el sentido estricto, la capacidad antioxidante representa la capacidad antiradical. Los radicales libres son detectados con un reactivo CL, luminol, el cual actúa a la vez como un fotosensibilizador y como un reactivo de detección de radicales de oxígeno. Los ACW y ACL son usados como medida de capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica, respectivamente, de muestras biológicas. La hidrofílica se evalúa por medias de la fase lag (L) en segundos

$$L = L_0 - L_1$$

Donde  $L_0$  y  $L_1$  son respectivamente los parámetros de blanco y muestra.

La medida de capacidad antioxidante lipofílica es evaluada por el grado de inhibición de PCL (I), de acuerdo con la fórmula

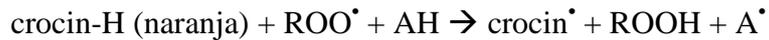
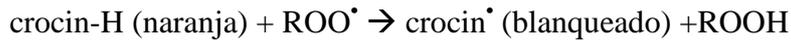
$$I = 1 - S/S_0$$

Donde  $S_0$  es la integral bajo la curva del blanco y  $S$  es la integral bajo la curva de la muestra.

El ácido ascórbico y Trolox se usan como reactivos de calibración para la hidrofílica y lipofílica respectivamente, en rangos de 0-2 nmol. En contraste con otras medidas de la capacidad antioxidante PHOTOCHEM no necesita un valor exacto de pH o temperatura (Prior, Wu et al. 2005).

***CBA (Crocín Bleaching Assay)***

Se trata de un mecanismo HAT, basado en la oxidación (decoloración) de la crocina, un derivado natural de carotenoides, por radicales peroxilo generados a partir del AAPH. Se mide la tasa de decoloración de la crocina en presencia y en ausencia de antioxidantes a 443 nm., donde la crocina presenta un máximo de absorbancia. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox.



Se han planteado diversas críticas a este método (Prior, Wu & Schaich, 2005), como que la relativamente baja longitud de onda a la que se mide coincide con muchos pigmentos alimentarios, como los propios carotenoides. Por otro lado, la crocina es una mezcla de pigmentos naturales extraídos del azafrán y que presenta una gran variabilidad entre distintos lotes, lo que limita su aplicación a gran escala. Además, los mecanismos de reacción de diferentes antioxidantes con la crocina pueden variar mucho, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

No obstante, y dada la variabilidad existente entre los distintos protocolos publicados para este método, un trabajo reciente (Ordoudi and Tsimidou 2006) analizaron paso a paso este método, solventando alguno de los problemas anteriormente indicados, como los productos que se pueden utilizar como fuente de crocina, y proponiendo la aplicación de nuevos parámetros.

### ***Oxidación de las LDL's***

Se trata de una reacción HAT. La oxidación de las lipoproteínas LDLs por los radicales libres es un proceso que ocurre en los seres vivos y es una de las primeras etapas en el proceso de la aterosclerosis. En este método se induce la oxidación de LDLs aisladas de distintos individuos mediante diferentes elementos y compuestos, como  $\text{Cu}^{2+}$  o AAPH y después se mide la absorbancia a 234 nm., a la cual absorben los dienos conjugados generados durante el proceso de oxidación de las LDLs.

La absorbancia se va modificando con el tiempo en tres fases: una lag-phase, en la que los dienos no se han comenzado a formar por la presencia de antioxidantes en la muestra y, por tanto, no aumenta; una fase de propagación, en la que aumenta de manera exponencial por la formación de dienos; y un fase de descomposición de los mismos, en la que la absorbancia tiende a bajar lentamente.

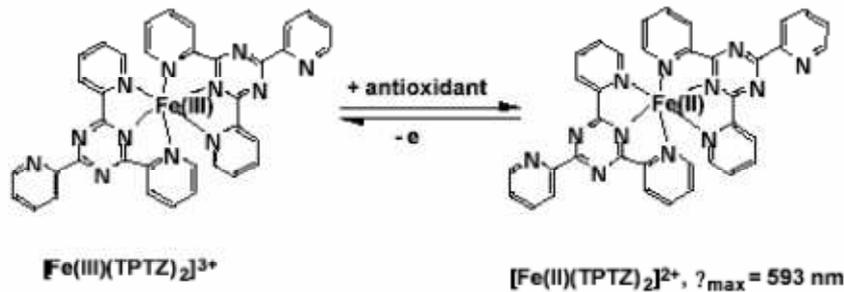
Se han propuesto una gran cantidad de parámetros que se pueden medir en este ensayo, desde la comparación de la duración de la lag-phase entre un blanco y una muestra con antioxidante (en la que esta fase será más larga), la cantidad inicial de dienos conjugados, la cantidad máxima de los mismos (Hurtado, Caldú et al. 1997) u otro parámetro, el CLT50, que mide la cantidad de antioxidante necesaria para aumentar la lag-phase en un 50 % respecto al control (Sánchez-Moreno 2002).

### **1.3.2.3 Métodos de medida de capacidad antioxidante que utilizan mecanismos de reacciones SET**

#### ***FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)***

Se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriaina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido (Benzie

and Strain 1996). Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000), ya que a los 4 minutos muchos compuestos todavía no habían acabado de reaccionar. Los resultados se expresan en equivalente Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/L}$ ), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.



**Figura 1.5** Mecanismo de reacción en el método FRAP

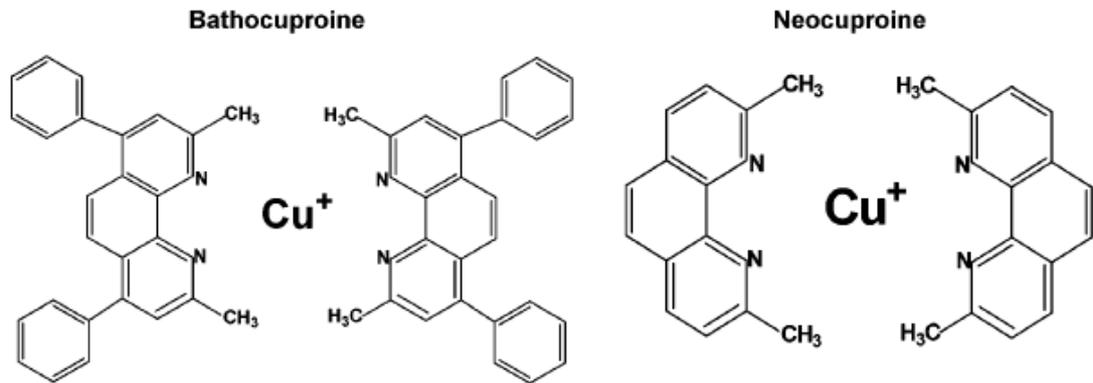
Se han planteado diversas críticas a este método:

- Se lleva a cabo a un pH no fisiológico (Prior and Cao 1999).
- Como el potencial de reducción del Fe (III) a Fe (II) es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior podría reducir al Fe (III), sobreestimando el valor de FRAP (Ou, Huang et al. 2002).
- A 593 nm pueden absorber otros compuestos, como la bilirrubina oxidada, que produce biliverdina, aumentando el valor de FRAP (Prior (Prior and Cao 1999); (Ou, Huang et al. 2002).
- Hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres (Cao, 1998) Por ejemplo, en fluidos biológicos, el Fe (II) puede interactuar con agua oxigenada para producir radical hidroxilo (Ou, Huang et al. 2002).
- Dado que el FRAP se define como una medida del poder antioxidante total, se trata como iguales a los reductores y a los antioxidantes. Sin embargo, el FRAP no implica a ningún prooxidante ni a ningún sustrato oxidable. Igual que no todos los reductores que transforman el ion ferroso en férrico no son antioxidantes, hay antioxidantes que no son capaces de llevar a cabo esta reacción, como es el caso del GSH, un importante antioxidante natural que da resultados negativos en el FRAP (Prior and Cao 1999)

### ***Copper Reduction Assay (CUPRAC, AOP-490)***

Recientemente se han estudiado variantes al FRAP usando Cu en vez de Fe como Bioxytech AOP-490 y CUPRAC (Apak, Guclu et al. 2004). Estos ensayos están basados en la reducción de Cu(II) a Cu(I) por la acción combinada de todos los

antioxidantes (agentes reductores) en una muestra. En el ensayo AOP-490, bathocuproine (2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) forma un complejo 2:1 con Cu(I), rindiendo a cromoforo con un máximo de absorbancia a 490 nm. El ensayo CUPRAC usa un compuesto relacionado neocuproine (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline), el complejo Cu(I) el cual absorbe a 450 nm. Una curva de la dilución generada por los estándares del ácido úrico se usó para convertir la absorbancia de la muestra a equivalentes de ácido úrico.



**Figura 1.6.** Estructuras de bathocuproine y neocuproine usadas en el ensayo de reducción de cobre

Los complejos phenanthroline tienen una solubilidad en agua muy limitada y por lo tanto debe ser disuelto en solventes orgánicos como el etanol 95 %. Sin embargo, el  $\beta$ -caroteno no reaccionará con el reactivo CUPRAC en etanol acuoso y requiere dicloroetano, lo que limita la miscibilidad. (Apak, Guclu et al. 2004). Los valores de CUPRAC son comparables a los de TEAC para polifenoles, mientras que los de FRAP son considerablemente más bajos.

El cobre, bien libre o en complejo phenanthroline, tiene un potencial redox más bajo que el hierro, así que las reacciones son más selectivas: azúcares y ácidos cítricos, que comúnmente interfieren con FRAP, no son oxidados en CUPRAC. Pero también hay que tener en cuenta que para bajos potenciales redox se incrementa el ciclo redox, así que la reducción de cobre puede ser un indicador incluso más sensible del potencial de la actividad pro-oxidante de los antioxidantes (Prior, Wu et al. 2005).

#### 1.3.2.4 Métodos de medida de capacidad antioxidante que utilizan mecanismos de reacciones HAT y SET

##### ***TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)***

Se trata de una reacción SET, basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), captura que produce un descenso en la absorbancia a 658 nm. El descenso producido por el Trolox es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando en el mismo tiempo.

El radical se puede generar enzimáticamente con mioglobina o peroxidasa de rábano; químicamente con Mn O<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> o radical peróxido; electroquímicamente (Villaño, Fernández-Pachón et al. 2005). En el método original se generaba el radical directamente en presencia del antioxidante, con metamioglobina y peróxido de hidrógeno; éste oxidaba la metamioglobina, que a su vez oxidaba el ABTS. Sin embargo, se vio que algunos polifenoles, como la quercetina, podían interactuar con los reactivos, impidiendo la formación del radical y dando un valor de capacidad antioxidante sobreestimado, por lo que se pasó a generar el radical previamente a la adición del antioxidante (Re, Pellegrini et al. 1999).

No obstante, se han planteado algunas críticas a esta modificación, en el sentido de que los polifenoles, además de reaccionar con el radical para dar lugar a la molécula original, pueden dar lugar a otros compuestos; esto generaría problemas a la hora de determinar la estequiometría de la reacción entre el ABTS y un compuesto o relaciones de estructura-actividad, ya que el cálculo no se podría basar en los moles de molécula no radicalica recuperados (Pinelo, Sineiro et al. 2006) También puede ocurrir que los compuestos polifenólicos formen aductos con el radical, por lo que no toda la pérdida de absorbancia se debería a que el radical volviera a su forma inicial; en este sentido, se ha observado la formación de estructuras de este tipo entre el radical catiónico y la catequina y el floroglucinol (Prior, Wu et al. 2005).

De hecho, la correlación entre los valores de ABTS y el contenido en polifenoles determinado por Folin es superior a los 2 min. de empezar la reacción que a los 15 min., lo que se podría deber a que en la primera parte de la reacción son los polifenoles los que reaccionan, mientras que en la segunda parte son otros metabolitos derivados (Villaño, Fernández-Pachón et al. 2005).

También se ha propuesto medir la absorbancia a 414 nm., donde el radical presenta otro máximo y el límite de detección es inferior, pero tienen lugar más interferencias que a 734 nm. Estas interferencias aumentan la coloración y llevan a una infravaloración de la capacidad antioxidante, porque se mide una reducción en el color inferior a la que realmente se produce (Arnao. 2001).

#### ***DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)***

En este método se sitúa el DPPH<sup>•</sup>, un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm (Brand-Williams, Cuvelier et al. 1995).

El mecanismo de reacción de este método no está aún totalmente claro. Se pensaba que era un mecanismo simultáneamente SET y HAT; sin embargo, un trabajo ha sugerido que el mecanismo fundamental es SET, y que la reacción de tipo HAT tendría una escasa contribución, dado que se produce lentamente en disolventes que son fuertes aceptadores de H, como el metanol o el etanol (Foti, Daquino et al. 2004).

Este método fue modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri et al. (1998), que introdujeron parámetros cinéticos: la EC50, que es la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50 % la cantidad inicial de radical; el tEC50, que es el tiempo necesario que necesita esa concentración para reducir en un 50 % la cantidad inicial de radical y la eficiencia antirradicálica (AE)= 1/(EC50\* tEC50), que tiene en cuenta los dos factores. Cuanto mayor sea AE, el antioxidante ejercerá su acción con menos concentración y en menos tiempo, lo que interesa en sistemas biológicos. Sin embargo, cuando los antioxidantes se usan como aditivos alimentarios, el objetivo puede ser que mantengan su acción durante un tiempo prolongado, por lo que habría que considerar independientemente los dos factores.

Así mismo, Torres, Lozano et al. (2002), añadieron dos nuevos parámetros: multiplicando la EC50 (expresada en mol compuesto/mol DPPH) por dos, se obtiene la estequiometría de la reacción entre patrones y el radical. El inverso de este valor representa los moles de radical reducidos por mol de antioxidante y da una idea de los átomos de H que intervienen en la reacción.

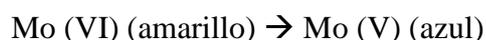
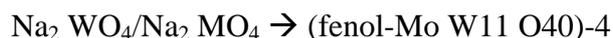
No obstante, se debe señalar que el DPPH• es un radical orgánico nitrogenado y estable, que no tiene nada que ver con los radicales peroxilo altamente reactivos implicados en reacciones *in vivo* (Wu, Beecher et al. 2004).

Por otro lado, la absorbancia a 515 nm puede interferir con la de otros compuestos, como los carotenoides, con lo que se subestimaría el DPPH• remanente y, por tanto, la capacidad antioxidante de la muestra (Prior, Wu et al. 2005). Así mismo, al ser una longitud de onda cerca de la franja visible, la capacidad antioxidante de la muestra se puede.

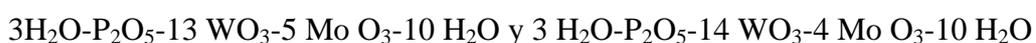
### ***Folin-Ciocalteu***

Se trata de una reacción simultánea HAT y SET. No es exactamente un método de medida de capacidad antioxidante, sino de contenido en polifenoles. Sin embargo, dado el importante papel de los polifenoles en la capacidad antioxidante de los alimentos, en muchos trabajos se ha acabado asimilando como un método de determinación de capacidad antioxidante. Se basa en la reacción de reducción de un heteropolianión que contiene Molibdeno (Singleton, Orthofer et al. 1998).

En el método original, se cuantificaban tirosina y triptófano, y la reacción que se medía a 745-750 nm era:



Pero en el método modificado el reactivo es un heteropolianión formado por



Los metales tienen un estado de oxidación de 6, pero durante la reacción, en medio básico, hay una reducción a un estado de oxidación entre 5 y 6 que se acompaña de un cambio en el color de amarillo a azul. Este cambio será mayor cuanto mayor sea el contenido en compuestos fenólicos. Los resultados se interpolan en una curva de calibrado de ácido gálico y se expresan en equivalentes de ácido gálico.

Se debe señalar que, a pesar de lo extendido que se encuentra, muy pocos artículos siguen exactamente el protocolo original de este método. Además, muchos, en vez de expresar los resultados en equivalentes de ácido gálico, lo hacen en catequina, ácido colorogénico, cafeico, protocatecuico, vanilínico o ferúlico, lo que dificulta la comparación de los resultados. Todo esto hace que, por ejemplo, los resultados de Folin en la bibliografía para los arándanos lleguen a oscilar entre 22 y 4.180 mg. equivalentes ácido gálico/100 g. (Prior, Wu et al. 2005).

Por otro lado, el hecho de que la medida se realice a 730 nm., que es una longitud de onda muy elevada, en la que pueden interferir muchos compuestos coloreadas, así como que el método se basa en una reacción de reducción muy genérica, hace que una gran cantidad de sustancias puedan interferir en este ensayo: azúcares, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, Fe (II), adenina, adenosina, alanina, anilina, ácido aminobenzoico, benzaldehido, creatinina, cisteína, cistidina, citosina, dimetilnilina, defenilamina, AEDT, fructosa, guanina, guanosina, glicina, hidroxilaminas, histamina, indol, metilamina, ácido nitriloacético, ácido oleico, feniltiourea, proteínas, purinas, piridoxina, sacarosa, ácido sulfanílico, tiourea, timina, timidina, trimetilamina, triptófano, uracilo, ácido úrico y xantina, entre las sustancias orgánicas. Entre las sustancias inorgánicas, interfieren: hidrazina, sulfato amónico de hierro, sulfato de hierro, sulfato de manganeso, nitrito de potasio, cianuro de sodio, metabisulfito de sodio, fosfato de sodio, sulfito de sodio, cloruro de zinc (Ikawa, Schaper et al. 2003); (Prior, Wu et al. 2005)

### **1.3.3. Determinación de la actividad antioxidante (Métodos DPPH, FRAP y Folin-Ciocalteu)**

#### **1.3.3.1 Medida de la actividad antioxidante por DPPH en productos alimentarios**

En la elaboración de aceite de calabaza, están presentes polisacáridos que últimamente han cobrado mucha importancia debido sus efectos beneficiosos. Estos compuestos muestran moderada actividad antioxidante, que se puede determinar por métodos colorimétricos como el DPPH. La capacidad de los polisacáridos para barrer los radicales libres fue medida por DPPH, mezclando 1 ml de muestra y 1 ml de reactivo. Tras reposar 1 hora se midió a 517 nm. La disminución en la concentración indicó la actividad de captación de radicales libres de la muestra

$$\text{RSA}(\%) = \frac{A_0 - A_{\text{test}}}{A_0 - A_{\text{ref}}} \times 100$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia inicial y  $A_{\text{test}}$  es la absorbancia de la muestra en la solución DPPH.  $A_{\text{ref}}$  es la absorbancia del ácido gálico (Kostalova, Hromadkova et al. 2013). Para medir las propiedades antioxidantes que tiene *Allium roseum* (variedad tunecina del ajo) se hizo un estudio en el que la determinación de dicha actividad se realizaba mediante el test de DPPH. En este caso se mezclaron 500  $\mu\text{l}$  de extracto metanólico a diferentes concentraciones y 375  $\mu\text{l}$  de metanol 99 % y 125  $\mu\text{l}$  de solución DPPH. La mezcla se incubó 60 minutos en oscuridad y finalmente se midió a 517 nm. En esta forma radical, el DPPH tiene una banda de absorción en la que desaparecen por reducción por un compuesto anti radical. Cuanto menos absorbancia, mayor es la actividad de captación de radicales libres.

$$\text{Radical - scavenging activity} (\%) = \left[ \frac{A_c - A_s}{A_c} \right] \times 100$$

Donde  $A_c$  y  $A_s$  son las absorbancia control y muestra respectivamente (Zouari, Ketata et al. 2013).

En Maryland se compararon diez variedades de harina de trigo con respecto a su composición fitoquímica, actividad antioxidante y actividad antiproliferativa. La capacidad de captación de radicales libres relativa se obtuvo usando un ensayo de alto rendimiento en laboratorio. El Trolox se usó como antioxidante estándar. La mezcla de reactivo consistía en 100  $\mu\text{l}$  de extracto de harina y 100  $\mu\text{l}$  de DPPH 0,2 mM. La medida de absorbancia fue a 515 nm cada minuto durante 40 minutos. La actividad antioxidante se calculó como el área bajo la curva y expresada en equivalente Trolox por gramo de muestra (Lv, Yu et al. 2012).

### **1.3.3.2 Medida de la actividad antioxidante por DPPH en uva y subproductos de la uva.**

En un estudio que tiene que ver con el anterior (Casazza, Aliakbarian et al. 2012), se analizó la actividad antioxidante en la piel de las uvas en las que se utilizaron técnicas no convencionales de extracción empleando altas presiones y altas temperaturas. La actividad antioxidante en este caso fue medida también con el test DPPH. Para cada extracto, fueron preparados 0.1 ml de nueve diluciones en metanol diferentes, mezclados con 3,9 ml de DPPH (0,0915 mM)

Una parte de los hollejos que no se ha estudiado en demasía son los tallos, un subproducto de la vinificación. En un estudio realizado con uvas griegas se analizaron los fenoles totales, cuantificación de polifenoles totales y una evaluación detallada de sus propiedades antioxidantes. Los resultados obtenidos indicaron que los tallos de las uvas son particularmente ricos en flavonoides y stilbenes, trans-reservatrol y  $\alpha$ -viniferin. Las propiedades antioxidantes fueron determinadas mediante DPPH mediante un

versión modificada del método propuesto por Brand-Williams, Cuvelier et al. (1995) y que fue convertido en un micro-método por (Anastasiadi, Pratsinis et al. 2010). Los resultados fueron expresados como Inhibitory Concentration, IC50 (la concentración en µg/ml de extracto requerido para reducir el 50 % de los radicales DPPH iniciales bajo las condiciones experimentales dadas) (Anastasiadi, Pratsinis et al. 2012).

En Polonia se hizo un estudio para medir la actividad antioxidante de tres tipos de uvas diferentes *Vitis californica*, *Vitis riparia* y *Vitis amurensis*. Las partes de la uva que se analizaron fueron los subproductos producidos tras la vinificación, es decir pieles, pepitas y tallos. En este estudio se preparó 0,1 ml de solución metanólica conteniendo entre 0,02-0,1 mg de extracto, y se mezcló con 2 ml de agua desionizada y luego se añadió a la solución metanólica de DPPH (1 mM, 0,25 ml). La mezcla fue agitada durante 1 minuto y se dejó reposar 20 minutos en oscuridad. La absorbancia de la solución fue medida a 517 nm. (Weidner, Powawska et al. 2012).

### **1.3.3.3 Medida de la actividad antioxidante por FRAP en productos alimentarios**

Los polisacáridos pépticos de algunas frutas y vegetales han atraído en los últimos años mucha atención debido a sus propiedades físicas, por ser beneficiosas para la salud y evitar algunas enfermedades potenciales. A la hora de analizar las propiedades antioxidantes de estas frutas y vegetales se mide mediante el test FRAP. Consiste en la reducción del complejo tripiridiltriazina férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a tripiridiltriazina ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) por un reductor a pH bajo se mide de acuerdo. En este estudio se mezclaron 0,2 ml de muestra (6 mg/ml) con 1,8 ml de reactivo FRAP. Tras incubarlo durante 4 minutos a 37 °C, se midió la absorbancia a 595 nm. El resultado final se expresó en µmol  $\text{Fe}^{2+}$ /g muestra (Kostalova, Hromadkova et al. 2013).

La patata dulce (*Ipomoea batatas*) está categorizada como el tercer tubérculo más consumido en el mundo, y fue identificado como una excelente fuente de compuestos biológicamente activos con importante valor médico como propiedades antioxidantes. El potencial antioxidante se midió mediante la metodología FRAP. Una alícuota de 200 µl se añadió a 3 ml de reactivo FRAP. Tras mezclarlo se mantuvo a 20 °C durante 4 minutos en oscuridad, y finalmente la absorbancia se midió a 593 nm. Los resultados se expresaron en µM de equivalentes Trolox por gramo de materia seca (Anastacio and Carvalho 2013)

Los subproductos de la industria del piñón (*Jatropha curcas*) son abundantes y a la vez tóxicos para la alimentación de animales, sin embargo con un tratamiento que está en fase de desarrollo en la sureste asiático, se está consiguiendo extraer compuestos con capacidad antioxidante para su posterior uso en la industria cosmética. Para medir la actividad antioxidante de estos compuestos se usó el método FRAP. En este caso se prepararon 900 µl de reactivo y se calentaron a 37 °C, entonces se mezcló con 90 µl de agua y 30 µl de muestra. Esta mezcla se mantuvo a 37 °C durante 30 minutos en un

baño de agua. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 593 nm (Nithiyantham, Siddhuraju et al. 2013).

#### **1.3.3.4 Medida de la actividad antioxidante por FRAP en uva y subproductos de la uva**

La piel y pepitas de uvas son conocidas por ser una rica fuente de compuestos fenólicos. Las concentraciones de estos compuestos dependen de la variedad de uva, de la viticultura de la zona y de factores medioambientales. Un estudio en Croacia evaluó la actividad antioxidante de 14 variedades diferentes de uvas, y las mediciones se hicieron con el ensayo FRAP. En este ensayo, los antioxidantes fueron evaluados como reductores de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , y quelado por TPTZ a  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, y medidos a 593 nm. Los resultados fueron corregidos por dilución y expresados en mmol equivalentes Trolox (TE). (Katalinic, Mocina et al. 2010)

Changjiang, 2003, empleó el ensayo FRAP para evaluar el poder antioxidante de pieles, pulpa y pepitas (semillas) de varias frutas comúnmente consumidas en China, entre las que se encontraba la uva. El estudio tenía como objetivo determinar la actividad antioxidante de cada fruta y saber que partes tenían más alta actividad antioxidante. se preparó el reactivo FRAP y se calentó a 37 °C. De la muestra se prepararon alícuotas de 40  $\mu\text{l}$  y se mezclaron con 0,2 ml de agua y 1,8 ml de FRAP. La absorbancia se midió a 593 nm tras haber dejado reposar la muestra 10 minutos a 37 °C y en oscuridad. El resultado final se expresó como la concentración de antioxidantes que tenían un poder reductor férrico equivalente a 1 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ .

De la cantidad total que se cosecha de uva en el mundo, cerca del 80 % es usado para la vinificación, pero cerca de la mitad del peso de la materia prima se desecha porque son hollejos. En el sur de Europa se está empezando a producir aceite de uva a partir de estos subproductos de la vinificación, debido a que poseen compuestos con gran actividad antioxidante (ácido gálico, catequina, epicatequina, etc. En el estudio realizado por Maier, Schieber et al. (2009), se analizan estas características usando el método FRAP, midiendo el incremento de la absorbancia a 593 nm debido a la formación de TPTZ-Fe(II) en presencia de un agente reductor. Para la determinación se mezcló 1,5 ml de FRAP con 100  $\mu\text{l}$  de agua y 100  $\mu\text{l}$  de muestra diluida. Lo dejaron reposar 4 minutos a oscuras y finalmente se midió la absorbancia

#### **1.3.3.5 TPC mediante el método Folin-Ciocalteu en productos alimentarios**

En un estudio en el que se analizaban los efectos beneficiosos de *Jatropha curcas* (Piñón), se descubrió que esta planta y sus derivados poseían numerosos compuestos fenólicos que eran beneficiosos para la salud, contribuían a la prevención de procesos degenerativos y además ayudaba reducir la mortalidad por cáncer y enfermedades cardíacas y cerebro-vasculares. El contenido total en fenoles fue determinado de acuerdo al método Folin-Ciocalteu, que mide la capacidad de reducción de la muestra y puede ser considerado como otro ensayo de capacidad antioxidante. Para el ensayo se preparaban

alícuotas de 100  $\mu$ l y se enrasaban hasta 1 ml en tubos. Después se añadían 0,5 ml de reactivo Folin (1:1 con agua) y 2,5 ml de carbonato sódico (20 %) y tras agitar y guardar 40 minutos en oscuridad se medía la absorbancia a 725 nm. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido tánico (Nithiyantham, Siddhuraju et al. 2013).

El trigo es un alimento mundialmente conocido y consumido. También es sabido por los investigadores que el consumo de este producto en sus posibles derivados contribuye a beneficios en la salud incluyendo la reducción del riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer y enfermedades coronarias. Por eso Lv, Yu et al. (2012), comparó diez tipos de harinas de Estados Unidos, para comparar sus composiciones fitoquímicas, propiedades antioxidantes y actividades antiproliferativa. El contenido en fenoles totales consistió en mezclar 50  $\mu$ l de extracto de harina de trigo, 250  $\mu$ l de reactivo Folin, 750  $\mu$ l de carbonato sódico al 20 % y 3 ml de agua ultra pura. Tras 2 horas de reacción en oscuridad, la absorbancia se midió a 765 nm. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de harina.

El exceso de producción de radicales libres incrementa la posibilidad de desarrollar enfermedades como aterosclerosis, diabetes carcinogénica, cataratas o puede acelerar el envejecimiento. Por tanto es importante hacer estudios sobre las dietas a la hora de prevenir enfermedades crónicas degenerativas. Algunas raíces y tubérculos fueron analizados para comprobar sus efectos beneficiosos en las dietas de personas que sufrían estas enfermedades. Para cuantificar los fenoles totales se usó el método Folin-Ciocalteu. Los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico. (Sreeramulu and Raghunath 2010)

### **1.3.3.6 TPC mediante el método Folin-Ciocalteu en uva**

Numerosos estudios epidemiológicos, *in vitro* y sobre animales sugieren que los fenoles alimentarios, especialmente flavonoides, pueden proteger frente a enfermedades cardiovasculares. Esto es debido a que captan los radicales libres y pueden prevenir la oxidación de colesterol de baja densidad. Las uvas contienen altos niveles de estos polifenoles y por tanto reducen el posible desarrollo de enfermedades coronarias. En el estudio realizado por Ruzic, Åkerget et al. (2011) para determinar la cantidad de fenoles y su actividad antioxidante de uvas destinadas a vino blanco, TPC se midió con el método Folin-Ciocalteu como sigue. Los vinos fueron diluidos 5 veces con agua y el reactivo Folin 10 veces, el carbonato sódico se preparó en una solución de 75 g/l. Finalmente había 2,5 ml de reactivo Folin y 2 ml de carbonato sódico más 0,5 ml de muestra. Tras mezclarlo se incubó durante 5 minutos a 50 °C. La absorbancia se midió a 760 nm. Los datos finales se expresaron como miligramos de equivalente ácido gálico por litro de vino.

Las pepitas de la uva son una gran fuente de compuestos fenólicos, y debido a esto muchos estudios se están centrando en poder encontrar la forma de extraer dichos compuestos consiguiendo el mayor rendimiento posible. En el estudio realizado por Krishnaswamy, Orsat et al. (2012), se usó la metodología de extracción mediante microondas. Para comprobar los resultados de fenoles obtenidos se usó la metodología

## 1. ANTECEDENTES

de Folin Ciocalteu de la forma siguiente. Se mezcló 1 ml de extracto de uva (habiendo preparado 1 mg de semilla/ml de etanol) con 7,5 ml de agua desionizada, más 0.5 ml de reactivo Folin y 1 ml de solución de carbonato sódico al 7,5 %. La muestra se incubó durante 30 minutos y después la absorbancia se midió a 765 nm. La concentración final se expresó en equivalente de ácido gálico.

## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo principal de este trabajo es el de conseguir una máxima extracción de los polifenoles con actividad antioxidante de la semillas de uva, usando técnicas rápidas y eficientes, para su posterior uso en la industria agroalimentaria

Para conseguir esta optimización de la extracción se plantean los siguientes objetivos específicos

Verificación de los aparatos y métodos a utilizar durante el estudio, por medio de los análisis de repetitividad y linealidad

Estudio del pretratamiento de la materia prima mediante una comparación entre muestras secadas por liofilización y muestras secadas en una estufa a vacío, y se comprobarán los resultados de la cantidad de fenoles totales y de su actividad antioxidante, tras realizar una extracción sólido-líquido.

Estudio de los parámetros que intervienen en la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos. A la hora de decidir las condiciones de extracción por ultrasonidos se realizará un diseño experimental de superficie de respuesta para saber los valores de los parámetros que maximizan esta extracción.

## 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

---

El diseño experimental que se explica a continuación se divide en dos partes diferenciadas, cada una de las cuales constituye uno de los dos objetivos planteados para este trabajo.

### 3.1 ESQUEMA DE TRABAJO PARA LA COMPARACIÓN DEL TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS

Se realiza una comparación entre los dos tipos de secado elegidos como tratamiento previo de las muestras, secado por estufa a vacío y secado por liofilización. Una vez secadas las muestras se extraen los polifenoles por medio de una extracción sólido-líquido y posteriormente se cuantifican los fenoles totales y la actividad antioxidante por medio de los métodos Folin-Ciocalteu y DPPH respectivamente

En la figura 3.1 se detalla el esquema de trabajo seguido para comparar la influencia de los dos tipos de secado en la extracción

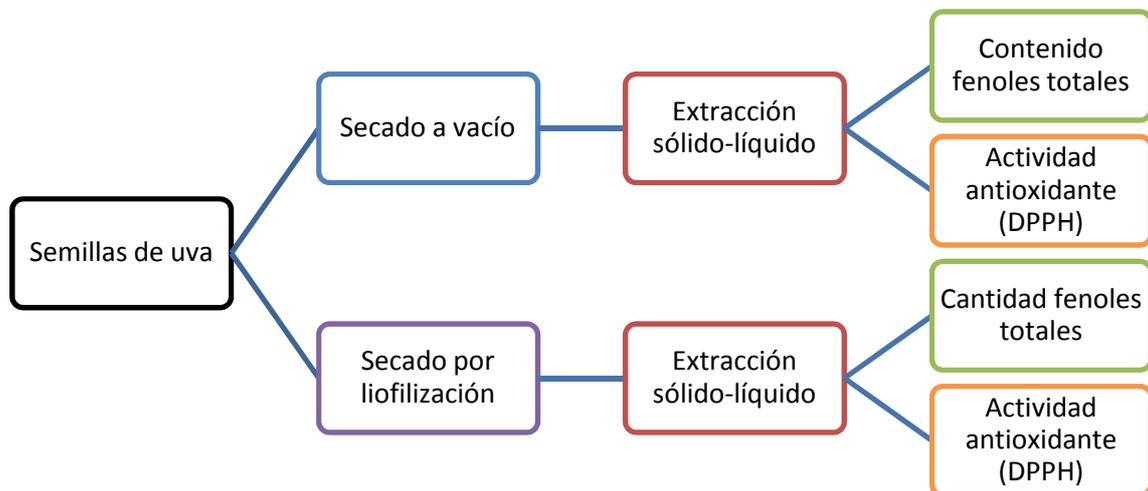


Figura 3.1. Esquema de trabajo para la comparación entre secados.

La tabla 3.1 muestra el diseño experimental seguido para la determinación de la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante

**Tabla 3.1.** Guión seguido para la comparativa entre secados

Temperatura (°C)	Muestra	Número de repeticiones
<b>20</b>	L20-1	3
	L20-2	3
	L20-3	3
	V20-1	3
	V20-2	3
	V20-3	3
<b>30</b>	L30-1	3
	L30-2	3
	L30-3	3
	V30-1	3
	V30-2	3
	V30-3	3
<b>40</b>	L40-1	3
	L40-2	3
	L40-3	3
	V40-1	3
	V40-2	3
	V40-3	3
<b>50</b>	L50-1	3
	L50-2	3
	L50-3	3
	V50-1	3
	V50-2	3
	V50-3	3

L: Muestras secadas por liofilización

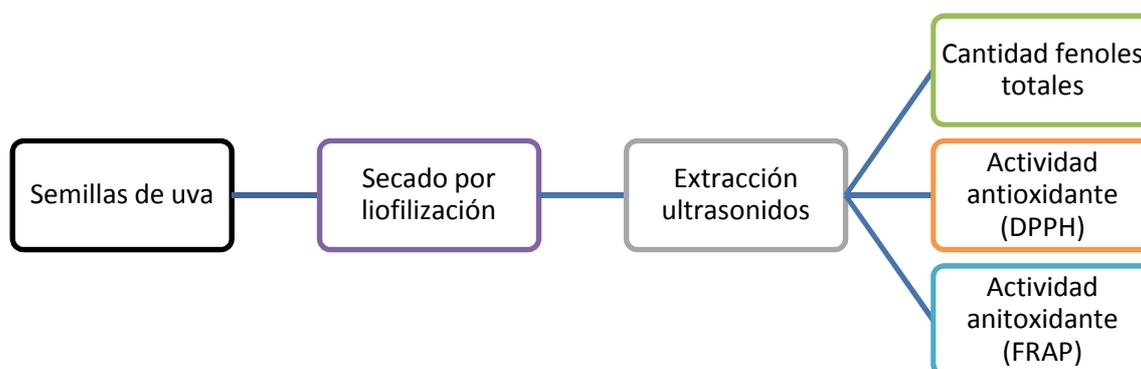
V: Muestras secadas por estufa a vacío

Para cada temperatura obtenida se analizaron tres muestras, y de cada muestra se realizaron tres repeticiones de las determinaciones analíticas, lo que supone un total de nueve análisis por muestra y parámetro experimental.

### 3.2 ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDOS

En el segundo de los objetivos se plantea optimizar la extracción sólido-líquido asistido por ultrasonidos por medio de sus tres parámetros más característicos, temperatura de extracción, tiempo de extracción e intensidad del ultrasonido. Se selecciona un diseño experimental por medio de una superficie respuesta, para saber determinar las condiciones y el número de ensayos a realizar, y una vez realizada la extracción analizar la cantidad en fenoles totales y la actividad antioxidante mediante el método Folin-Ciocalteu para TPC y DPPH y FRAP para la capacidad antioxidante

En la figura 3.2 se representa el esquema de trabajo que se siguió



**Figura 3.2.** Esquema de trabajo seguido para la optimización de la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos

Se llevaron a cabo un total de 69 experimentos utilizando un diseño central compuesto en estrella ( $2^2$  + estrella), con dos replicaciones, para el estudio de los efectos lineales, cuadráticos y las interacciones de primer orden, de los tres factores estudiados (temperatura de extracción, la intensidad de los ultrasonidos y el tiempo de tratamiento), a 5 niveles cada uno (Tabla 3.2).

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

**Tabla 3.2.** Guión seguido para la optimización de la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos

Prueba	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Intensidad (%)	Prueba	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Intensidad (%)
<b>1</b>	42	40:45	90	<b>35</b>	30	27:30	60
<b>2</b>	30	27:30	60	<b>36</b>	50	27:30	60
<b>3</b>	30	27:30	60	<b>37</b>	30	27:30	100
<b>4</b>	18	40:45	90	<b>38</b>	30	27:30	60
<b>5</b>	30	27:30	20	<b>39</b>	42	14:15	90
<b>6</b>	30	27:30	60	<b>40</b>	30	27:30	60
<b>7</b>	30	27:30	60	<b>41</b>	10	27:30	60
<b>8</b>	30	5	60	<b>42</b>	42	14:15	90
<b>9</b>	18	14:15	30	<b>43</b>	30	27:30	60
<b>10</b>	30	50	60	<b>44</b>	18	14:15	90
<b>11</b>	18	40:45	60	<b>45</b>	30	27:30	60
<b>12</b>	30	27:30	60	<b>46</b>	42	40:45	30
<b>13</b>	50	27:30	60	<b>47</b>	42	40:45	90
<b>14</b>	30	27:30	100	<b>48</b>	30	27:30	60
<b>15</b>	30	27:30	60	<b>49</b>	30	27:30	60
<b>16</b>	42	14:15	30	<b>50</b>	18	40:45	90
<b>17</b>	30	27:30	60	<b>51</b>	30	27:30	20
<b>18</b>	10	27:30	60	<b>52</b>	30	27:30	60
<b>19</b>	42	14:15	90	<b>53</b>	30	27:30	60
<b>20</b>	30	27:30	60	<b>54</b>	30	5	60
<b>21</b>	18	14:15	90	<b>55</b>	18	14:15	30
<b>22</b>	30	27:30	60	<b>56</b>	30	50	60
<b>23</b>	42	40:45	30	<b>57</b>	18	40:45	30
<b>24</b>	42	40:45	30	<b>58</b>	30	27:30	60
<b>25</b>	30	27:30	60	<b>59</b>	50	27:30	60
<b>26</b>	30	27:30	60	<b>60</b>	30	27:30	100
<b>27</b>	18	40:45	90	<b>61</b>	30	27:30	60
<b>28</b>	30	27:30	20	<b>62</b>	42	14:15	30
<b>29</b>	30	27:30	60	<b>63</b>	30	27:30	60
<b>30</b>	30	27:30	60	<b>64</b>	10	27:30	60
<b>31</b>	30	5	60	<b>65</b>	42	14:15	90
<b>32</b>	18	14:15	30	<b>66</b>	30	27:30	60
<b>33</b>	30	50	60	<b>67</b>	18	14:15	90
<b>34</b>	18	40:45	30	<b>68</b>	30	27:30	60

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para el experimento a realizar se usó uva Tempranillo

La uva Tempranillo es una uva tinta, de piel gruesa, que crece mejor en altitudes relativamente altas, pero puede también tolerar climas mucho más templados. Es muy segura en el cuajado, muy sensible a plagas y enfermedades, y poco resistente a la sequía y a temperaturas altas. De hecho es muy sensible a las inclemencias del tiempo, contrayéndose cuando hay sequía e hinchándose cuando hay demasiada humedad. La hinchazón tiene un efecto negativo en la calidad, pues afecta al color del vino.

Los efectos del tiempo se atenúan en lugares con piedra caliza debido al efecto de la arcilla y la humedad en las raíces; los efectos son peores en zonas arenosas, así como para viñas que tienen menos de doce años, pues las raíces son generalmente demasiado superficiales.

Los racimos tienen forma cilíndrica y son compactos. Las uvas son esféricas, de color negro púrpura con una pulpa incolora. A veces, en crecimientos a baja altitud, presenta poca acidez; el contenido en azúcar también suele ser bajo.

A continuación se presenta una radiografía de esta variedad.

- **Cepa.** Tempranillo.
- **Otros nombres.** Cencibel, Ull de Llebre, Tinto Fino, Valdepeñas, Tinta de Toro, Tinto del País.
- **Dónde se cultiva.** España, Portugal, Francia, California, Argentina, México.
- **Características.** Baya de tamaño medio de forma circular, con piel carnosa y gruesa, de color azul negruzco.
- **Coloración en el vino.** Rojos intensos hasta casi amaratados.
- **Aroma.** Frutos rojos y secos.
- **Sabor.** Vino con taninos muy presentes, acidez bien equilibrada.

### 4.1 OBTENCIÓN DE LA PEPITA

La obtención de la pepita fue manual, cogiendo las uvas aún en estado de congelación debido a que de esta manera la extracción de la pepita del interior de la uva fue mucho más simple. Una vez obtenidas las pepitas se hizo un primer secado con papel para quitarle el agua de la congelación y luego se introdujeron en una bolsa de congelación manteniéndolas en una atmósfera de nitrógeno. Una vez embolsadas se guardaron en congelador a -20 °C hasta su próxima utilización.

En la siguiente tabla se explican los pesos de las diferentes partes de la uva tras el pelado manual.

**Tabla 4.1.** Pesos tras el pelado de uvas

MÉTODO	PEPITAS (g)	PIELES (g)	RESTO (g)	MASA TOTAL (g)
<b>SECADO A VACÍO</b>	46,75	122,55	830,70	1000
<b>LIOFILIZACIÓN</b>	68,16	204,08	1236,76	1563,76

## 4.2 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Previamente a comenzar con los dos métodos de secado, se determinó la humedad con una balanza con cámara de desecación GRAM ST-H50. Tanto para las muestras que iban para secado a vacío como para las que iban a ser liofilizadas se usó la misma cantidad de muestra, 2 gramos, y la medida se hizo por duplicado. El resultado se expresó como la proporción de peso seco (%).

En la siguiente tabla vienen dados los resultados de humedad para cada tratamiento, antes y después de ser aplicado

**Tabla 4.2** Cantidad de humedad de las muestras

	MÉTODO	MEDIDA 1 (%)	MEDIDA 2 (%)	CONTENIDO EN HUMEDAD (%)
<b>ANTES DEL SECADO</b>	SECADO A VACÍO	32,57	33,95	33,26
	LIOFILIZACIÓN	31,33	30,12	30,73
<b>DESPUÉS DEL SECADO</b>	SECADO A VACÍO	4,75	4,11	4,43
	LIOFILIZACIÓN	4,26	3,84	4,05

## 4.3 SECADO

### 4.3.1 Secado a vacío:

Las pepitas destinadas al secado a vacío se molieron con un molinillo de café hasta dejar una masa uniforme. Para el secado se utilizó una secadora a vacío BINDER a las condiciones de 50 °C y a una presión de 200 mbar, ya que no se llega al vacío absoluto. El tiempo de espera no es un factor claro, ya que depende mucho de la

muestra introducida y de su peso, así que lo que se hizo fue poner la máquina a funcionar durante un tiempo ilimitado e ir sacando muestras cada cierto tiempo hasta llegar a una cantidad de humedad por debajo del 5 %.

**Tabla 4.3.** Humedad de la muestra en función del tiempo de secado

TIEMPO (min)	HUMEDAD (%)
30	24,45
90	11,54
120	4,43

Se obtuvieron 24,32 gramos de materia seca. Esta muestra se volvió a moler con un molinillo de café y se tamizó con un tamiz mecánico de 450  $\mu\text{m}$  de poro. Las condiciones del tamizado fueron 80 % de potencia durante 10 minutos. Al cabo de ese tiempo se volvió a moler y se tamizó otra vez bajo las mismas condiciones.

Las partículas mayores de 450  $\mu\text{m}$  se desecharon, y la cantidad de polvo menor de 450  $\mu\text{m}$  se embolsó en atmósfera de nitrógeno y se guardó en un congelador (-20 °C) hasta su próximo uso.

**Tabla 4.4.** Masa de la muestra tras tamizar a 450  $\mu\text{m}$

TAMAÑO ( $\mu\text{m}$ )	MASA (g)
<450	18,64
>450	5,44

#### 4.3.2 Secado por liofilización:

Las semillas fueron liofilizadas en un equipo semi-industrial LYOBETA-25 en las siguientes condiciones de liofilización:

- Tiempo total de proceso: 22 horas.
- Congelación: desde temperatura inicial a -45 °C en 30 minutos. Mantener a -45 °C durante 10 horas.
- Vacío: 0,250 mbar.
- Secado primario: de -45 °C a 0 °C en 30 minutos, a 0,250 mbar. Mantener a 0 °C y 0,250 mbar durante 11 horas.

La muestra obtenida (39,72 g) se volvió a moler con el molinillo y se introdujo en el tamiz mecánico en las mismas condiciones que en el caso anterior. Transcurridos 10 minutos se volvió a moler para obtener la máxima cantidad de muestra posible con tamaño de poro inferior a 450  $\mu\text{m}$ .

Las partículas superiores a 450  $\mu\text{m}$  se desestimaron, y el polvo de tamaño de grano inferior a 450  $\mu\text{m}$  se guardó en bolsas de congelación en atmósfera de nitrógeno, y se metió en un congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4.5.** Masa de la muestra tras tamizar a 450  $\mu\text{m}$

TAMAÑO ( $\mu\text{m}$ )	MASA (g)
<450	30,04
>450	9,68

## 4.4 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

### 4.4.1 Método de extracción

Para la extracción sólido-líquido, primero se prepararon muestras en concentraciones de 40 ml/g. Como la cantidad a extraer deseada era de 10 ml, se mezclaron 0,25 gramos de polvo de pepita y se le añadió una solución etanol: agua (50:50). Esta extracción se llevo a cabo a cuatro temperaturas diferentes con el objetivo de analizar a que temperatura se obtendrían los mejores rendimientos de extracción. Las temperaturas estudio fueron 20, 30, 40 y 50  $^{\circ}\text{C}$ . Para cada temperatura se prepararon tres muestras de 10 ml en tubos de ensayo de 20 ml. El objetivo de poner las muestras de 10 ml en tubos de 20 ml fue que de esta forma la extracción fuera más completa al haber mayor contacto entre el polvo y la solución

Las muestras correspondientes a secado por liofilización se marcaron con L, y las muestras secadas a vacío se marcaron con V, quedando los tubos marcados de esta manera: L20, L30, L40, L50, V20, V30, V40 y V50

Las muestras se introdujeron en la estufa (P-SELECTA) a la temperatura adecuada y se colocaban sobre una plataforma giratoria durante una hora.

Una vez finalizado el proceso de extracción, las seis muestras de cada tanda se centrifugaron. La centrifugación se realizaba con una centrífuga Sigma 3K30 bajo las siguientes condiciones:

- $T^{\circ} = 5^{\circ}\text{C}$
- Tiempo = 10 minutos
- Velocidad de centrifugación = 9.000 r.p.m.
- Rotor = Mod. 12156, 28611 G

Nada más acabar la centrifugación y mediante decantación el sobrenadante de la muestra se trasladó de los tubos de centrifuga a tubos ensayo con tapa. A la hora de guardar estos tubos antes de taparlos se introdujo una atmósfera de nitrógeno y se guardó en refrigeración a  $7^{\circ}\text{C}$  hasta su próximo uso.

## **4.5 Extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos**

### **4.5.1 Método de extracción**

Se utilizó un equipo de ultrasonidos de la marca Hielscher, modelo UP400S, con 400 W de potencia de ultrasonidos y 24 kHz. La sonda o sonotrodo que se usó era H3S, de 3 mm de diámetro adecuada para la muestra a analizar (5 ml).

Para la extracción propiamente dicha, primero hubo que solucionar el problema del sobrecalentamiento, ya que el ultrasonidos al sonicar calentaba la muestra muy por encima de los valores requeridos, y como un parámetro a vigilar era la temperatura, había que desarrollar una metodología que permitiese refrigerar a la vez que sonicaba. Finalmente se decidió montar el ultrasonido sobre un baño de refrigeración (Thermo Scientific A10B, Thermo Haake).

La muestra se preparó pesando 0,125 g de polvo de pepita (40 ml/g) y añadiéndolo a un matraz de vidrio junto con 2,5 ml de agua y 2,5 ml de etanol (etanol: agua 50:50). El matraz se sumergía en el baño a la temperatura indicada para cada sesión de ultrasonidos. Una vez sujeto el sonotrodo del ultrasonido se introdujo por la boquilla del matraz y se sumergió lo suficiente para conseguir una sonificación correcta.

La temperatura del baño se fijó para cada muestra en torno a unos  $10^{\circ}\text{C}$  por debajo de la temperatura de extracción. La boquilla del matraz se tapó con parafilm para así evitar la evaporación de solvente en los casos más extremos. Para el control de la temperatura se introdujo una sonda (Ahlborn/Almeno 2690) en el matraz y conectándola a un ordenador se grabó la evolución de la temperatura. En el Anejo 1 se incluyen las gráficas de control de la temperatura

Al igual que en la extracción sólido-líquido se hizo una centrifugación con las mismas condiciones que en el caso anterior:

- $T^{\circ} = 5^{\circ}\text{C}$
- Tiempo = 10 minutos
- Velocidad de centrifugación = 9.000 r.p.m.
- Rotor = Mod. 12.156, 28611 G

Una vez finalizada la centrifugación se midió la cantidad de extracto resultante, y se enrasaba la cantidad que faltaba hasta 5 ml (cantidad inicial) con solvente etanol:agua (50:50). La muestra final se guardó en tubos de ensayo con tapón introduciéndoles nitrógeno. Los tubos se guardaron en refrigeración a  $7^{\circ}\text{C}$ .

### **4.6 Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante**

#### **4.6.1 Contenido en fenoles totales (TPC). Método Folin-Ciocalteu**

Para la obtención del índice Folin se siguió el método Davidov (2007) con algunas modificaciones. Para las determinaciones realizadas sobre las muestras correspondientes a la comparación entre los dos pretratamientos de la materia prima la metodología a seguir fue la siguiente:

En un matraz aforado de 100 ml se introdujeron los siguientes componentes en este orden:

- 1 ml de extracto de pepita de uva
- 50 ml de agua destilada
- 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu
- 20 ml de solución de carbonato de sodio al 20 % (p/v)
- Se enrasó con agua destilada hasta llegar a 100 ml

Una vez mezclado todo el conjunto se agitó y se guardó en oscuridad y a temperatura ambiente durante media hora. Transcurrido ese tiempo se analizó la reacción con un espectrofotómetro Cintra 20 (GMBH, Alemania) de doble haz a 750 nm en una cubeta de 1 cm de paso de luz.

El resultado se expresó en mg de ácido gálico por gramo de muestra seca, a través de la realización de una curva patrón de este componente con concentraciones de 0 a 600 mg/l. ( $y = 0,0011x + 0.0338$ ,  $R^2 = 0.9979$ )

Para la determinación realizada sobre las muestras correspondientes a las extracciones sólido-líquido asistidas por ultrasonidos la metodología a seguir fue la siguiente:

En un matraz de 25 ml se introdujeron los siguientes componentes en el siguiente orden:

- 0,25 ml muestra
- 12,5 ml de agua destilada
- 1,25 ml de reactivo Folin-Ciocalteu
- 5 ml NaCO<sub>3</sub>
- Se enrasó con agua destilada hasta llegar a los 25 ml

Las medidas de cada uno de los 69 extractos se hicieron por triplicado. Las medidas de absorbancia se realizaron tras 30 minutos y a 750 nm. En este caso la absorbancia se mide con un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go, y la cantidad de muestra utilizada para cada medida fue de 200 µl. El resultado se expresó en mg ácido gálico por gramo de peso seco, a través de la realización de una curva patrón de este componente con concentraciones de 0 a 600 mg/l. ( $y = 0.0008x + 0.0564$ ,  $R^2 = 0.9987$ ).

#### **4.6.2 Determinación de actividad antioxidante (AA). Método DPPH**

En este método se sitúa el DPPH•, un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm. Es un método de medida de la capacidad antioxidante que combina reacciones HAT con reacciones SET

Al igual que en el caso anterior, la metodología para medir la actividad antioxidante según el método DPPH fue diferente para las muestras correspondientes a la primera parte del trabajo que para las muestras obtenidas mediante extracción asistida por ultrasonidos.

Para las determinaciones realizadas sobre las muestras correspondientes a la comparación entre los dos pretratamientos de la materia prima la metodología a seguir fue la siguiente:

El análisis se hizo según la técnica de Rivero-Pérez, et al, (2007) con algunas modificaciones. Primero se preparó el reactivo DPPH, pesando 0,0023 g de 2,2-difenil-1-picril-hidrácil y mezclándolo con 100 ml de metanol, para conseguir una concentración de 60 µM. Se agitó, y se esperó hasta que la mezcla estuviese totalmente disuelta. Una vez logrado esto se pipeteó en una cubeta de 1 cm 2.940 µl de reactivo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Cintra 20 (GMBH, Alemania) a 515 nm. Esta medida fue la de tiempo cero sin antioxidante. Nada más medir se pipeteó 60 µl de la muestra diluida 25 veces y se dejó reposar durante una hora en oscuridad y a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se volvió a medir la absorbancia y se anotó el valor. La resta de la medida a tiempo cero y esta última es el valor final que se utilizó para hacer los cálculos.

La actividad antioxidante se expresó como mmoles de Trolox por gramo de extracto seco, a través de una curva de calibración de Trolox en diferentes concentraciones (de 0 a 1 mM. ( $y = 0,2183x + 0,0127$ ,  $R2 = 0.9966$ ))

Para la determinación realizada sobre las muestras correspondientes a las extracciones sólido-líquido asistidas por ultrasonidos la metodología a seguir fue la siguiente:

La preparación del reactivo en este caso es igual que en el caso anterior. La muestra sin embargo se diluye en una proporción 1:10 en agua. La medida de la absorbancia se hace con el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific Multiskan Go). La medida de tiempo cero se hizo añadiendo 294  $\mu$ l, tras lo cual se añaden 6  $\mu$ l de la muestra diluida. Tras guardar la placa durante una hora en oscuridad y a temperatura ambiente se volvió a medir a 515 nm. El resultado final es la diferencia entre ambas medidas.

La actividad antioxidante se expresó como mmoles de Trolox por gramo de extracto seco, a través de una curva de calibración de Trolox en diferentes concentraciones (de 0 a 1 mM), ( $y = 0,3352x + 0,1602$ ,  $R2 = 0.9985$ ).

#### 4.6.3 Determinación de actividad antioxidante (AA). Método FRAP

Se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido (Benzie & Strain, 1996). Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm.

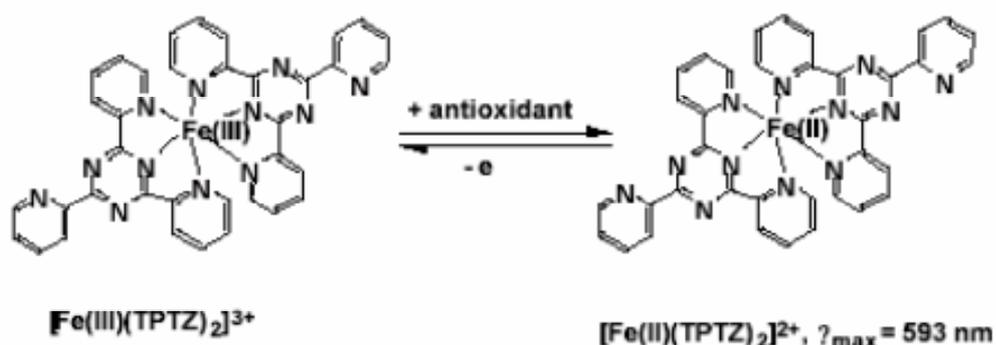


Figura 4.1. Reacción FRAP

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó según la metodología descrita en Benzie y Strain (1996), que consiste en los siguientes preparativos:

Tampón de acetato de sodio (150 ml, 300 mM, pH=3,6)

- Pesar 456 mg de acetato de sodio trihidratado
- Añadir 2,4 ml de ácido acético
- Añadir 147,6 ml de agua destilada

Solución TPTZ (2,4,6-tripiridyl-1,3,5-triazine) (10 ml, 10 mM)

- Pesar 31,2 mg de TPTZ (PM= 312,32 g/mol)
- Añadir 10 ml de ácido clorhídrico (40 mM, PM=36,45 g/mol)

Solución de cloruro de hierro hexahidratado (10 ml, 20 mM)

- Pesar 54 mg de cloruro de hierro hexahidratado (PM=270,29 g/mol)
- Añadir 10 ml de agua destilada

Reactivo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

- 10 volúmenes de tampón de acetato de sodio
- 1 volumen de TPTZ
- 1 volumen de solución de cloruro de hierro hexahidratado

Una vez que se obtuvo el reactivo FRAP, se calienta la mezcla a 37 °C y se añaden en este orden en la placa de 96 pocillos. 10 µl de muestra, 40 µl de agua y 300 µl de reactivo FRAP. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific Multiskan Go) nada más hacer la mezcla a 593 nm.

La recta patrón del método FRAP se hizo preparando la siguiente solución:

- Pesar 7.5 mg de sulfato de hierro heptahidratado (PM=278,01 g/mol, 2,7 mM)
- Añadir 10 ml de tampón de acetato de sodio
- Efectuar 5 diluciones sucesivas a 1/2

Con esas diluciones se consigue una recta patrón con concentraciones entre 0,75 y 0,02 mg/ml. ( $y = 2.1729x + 0.2413$ ,  $R^2 = 0.9995$ )

El resultado final se expresó como mg de sulfato de hierro heptahidratado por gramo de extracto seco

#### **4.7 Análisis estadístico**

Para analizar los resultados obtenidos se realiza un análisis estadístico ANOVA así como la aplicación y estudio de modelo de superficie de respuesta utilizando los software estadísticos STATGRAPHICS Centurion XVI.I y MINITAB 16. En donde se compararon las diferencias significativas entre las diferentes temperaturas y las diferencias entre los métodos de secado y se aplicó la metodología de superficie de respuesta.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

---

### 5.1 VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Como paso previo a la realización de los ensayos se ha llevado a cabo la verificación de los métodos de análisis utilizados mediante el estudio de la repetitividad y de la linealidad de los mismos

#### 5.1.1 Veracidad del método TPC

##### Repetitividad y linealidad usando el espectrofotómetro de doble haz (espectrofotómetro Cintra 20, GMBH)

La repetitividad estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (mismo analista, mismos aparatos y reactivos...), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

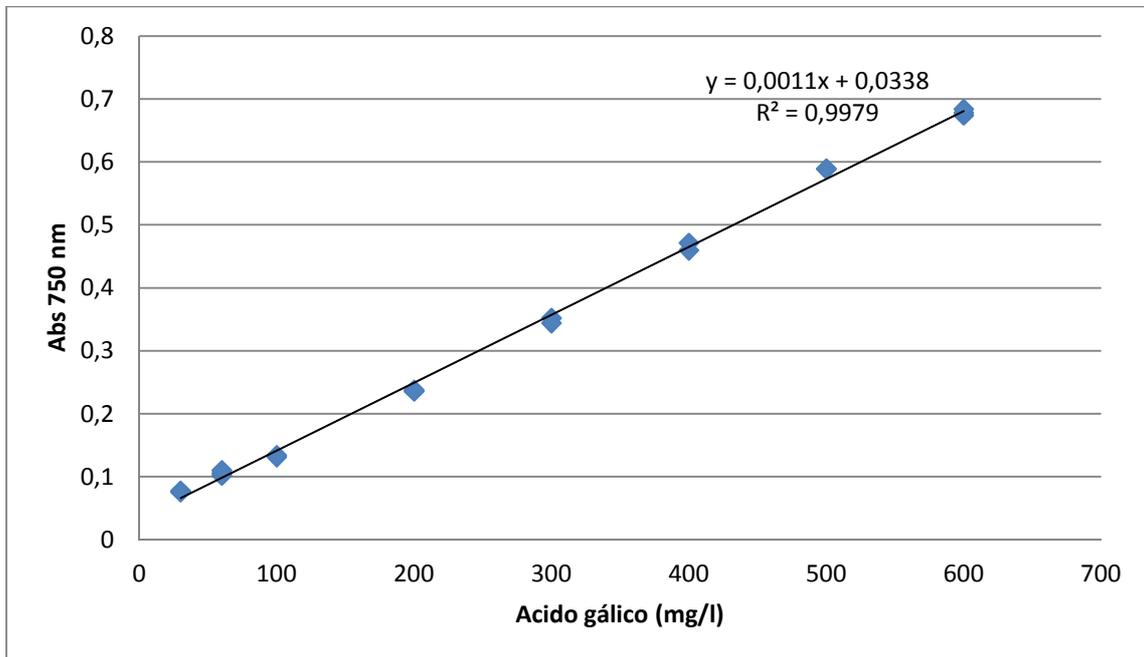
La repetitividad se determinó llevando a cabo 6 repeticiones del protocolo completo de análisis en condiciones de repetitividad, utilizando como muestra un extracto comercial de polifenoles. Se obtuvieron los siguientes resultados expresados en desviación estándar relativa (DER):

**Tabla 5.1.** Resultados del estudio de repetitividad del método TPC en espectrofotómetro de doble haz

Repetición	mg ác. Gálico/ g materia seca	Media	Desv. Estand	CV (%)
1.1	199,69	195,60	5,76	2,95
1.2	200,00			
2.1	185,44			
2.2	185,35			
3.1	198,76			
3.2	198,56			
4.1	192,79			
4.2	197,00			
5.1	199,29			
5.2	199,11			

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del rango establecido

Para comprobar la linealidad, se realizó una recta patrón para concentraciones de 0 a 600 mg/l de ácido gálico (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Recta patrón para el método TPC en espectrofotómetro de doble haz

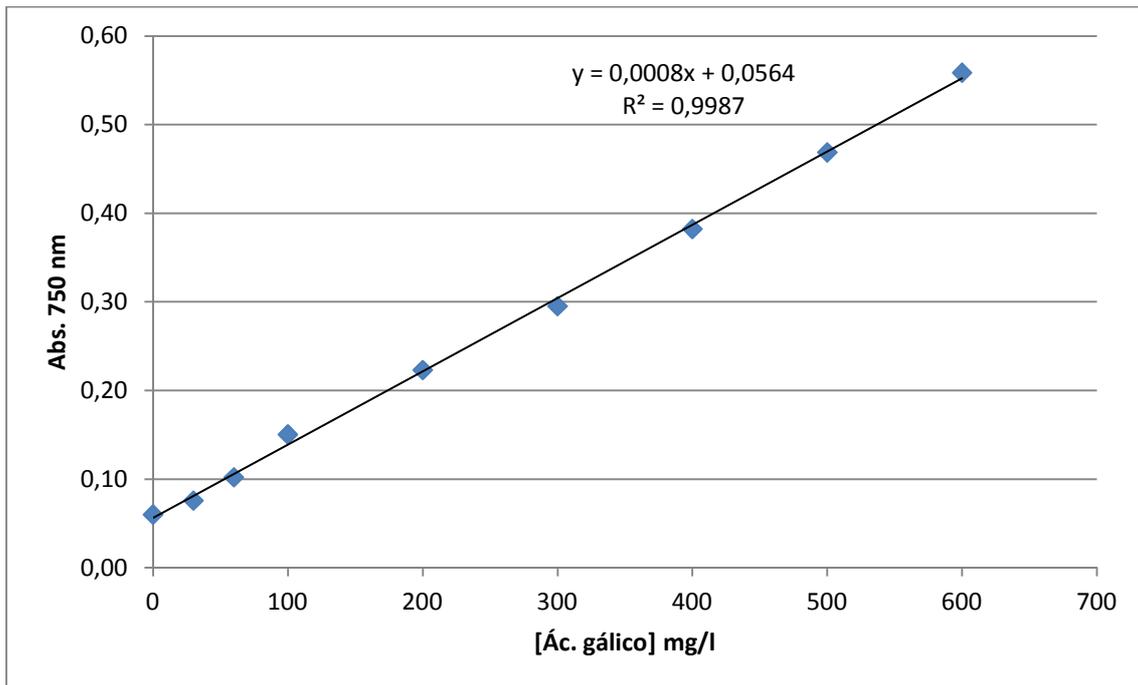
### **Repetitividad y linealidad usando el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific Multiskan Go)**

La repetitividad se determinó llevando a cabo 8 repeticiones del protocolo completo de análisis en condiciones de repetitividad, utilizando como muestra ácido gálico. Se obtuvieron los siguientes resultados expresados en desviación estándar relativa (DER):

**Tabla 5.2.** Resultados estudio repetitividad del método TPC en espectrofotómetro de placas

Repetición	[Ac. Gálico] (mg/l)	Media	Desv. Estand	CV (%)
1	206,50	208,63	5,41	2,59
2	204,00			
3	216,75			
4	201,75			
5	215,25			
6	209,75			
7	204,50			
8	210,50			

Para comprobar la linealidad se realizó una curva patrón para concentraciones de 0 a 600 mg/l de ácido gálico (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Recta patrón para el método TPC en espectrofotómetro de placas

Observando los datos de repetitividad obtenidos para los dos equipos utilizados, se obtiene que los coeficientes de variación están en torno al 3 %, por tanto estos valores son aceptables

En el caso de la linealidad se observa como las  $R^2$  son en ambos casos por encima del valor 0,99, así que se puede concluir que los métodos son lineales

### 5.1.2 Veracidad del método DPPH

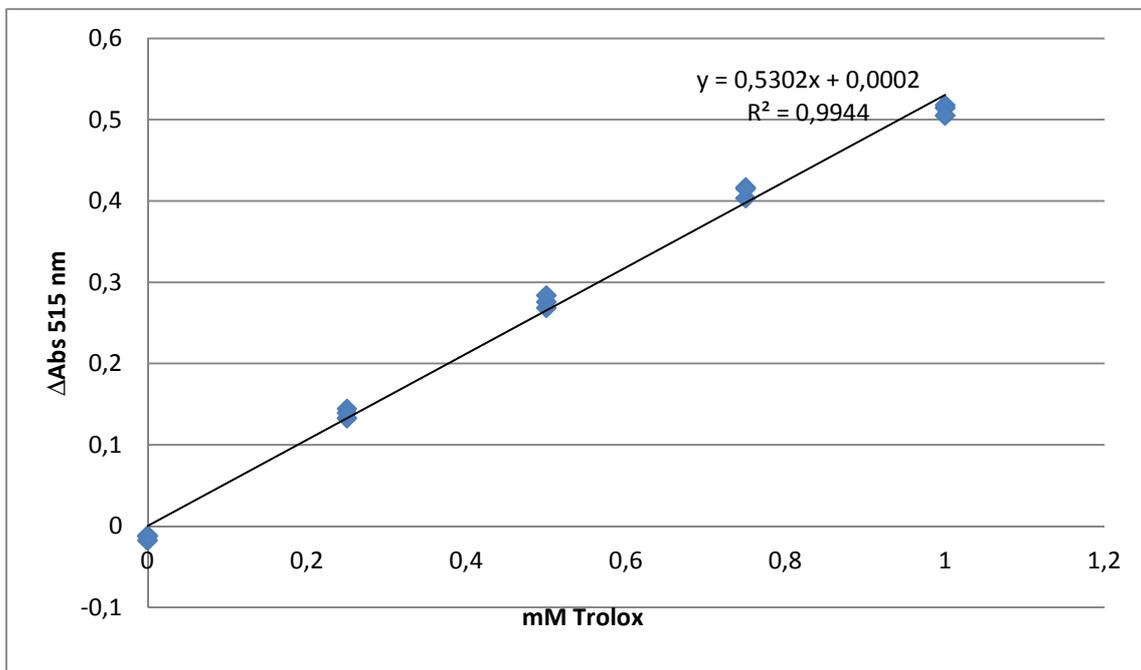
#### Repetitividad y linealidad usando el espectrofotómetro de doble haz (espectrofotómetro Cintra 20, GMBH)

La repetitividad se determinó llevando a cabo 6 repeticiones del protocolo completo de análisis en condiciones de repetitividad, utilizando como muestra un extracto comercial de polifenoles. Se obtuvieron los siguientes resultados expresados en desviación estándar relativa (DER):

**Tabla 5.3.** Resultados estudio repetitividad método DPPH en espectrofotómetro de doble haz

Repetición	mM Trolox/g materia seca	Media	Desv. Estand	CV (%)
1.1	1,9450	1,9196	0,0645	3,34
1.2	1,9400			
2.1	1,9500			
2.2	1,9450			
3.1	1,9575			
3.2	1,9550			
4.1	1,7850			
4.2	1,7800			
5.1	1,9550			
5.2	1,9525			
6.1	1,9350			
6.2	1,9350			

La linealidad se determinó realizando una curva de calibración con concentraciones de Trolox hasta 1 M, tomando como variable dependiente la diferencia de absorbancia a 515 nm después de una hora de reacción (Figura 5.3).

**Figura 5.3.** Recta patrón para el método DPPH en espectrofotómetro de doble haz

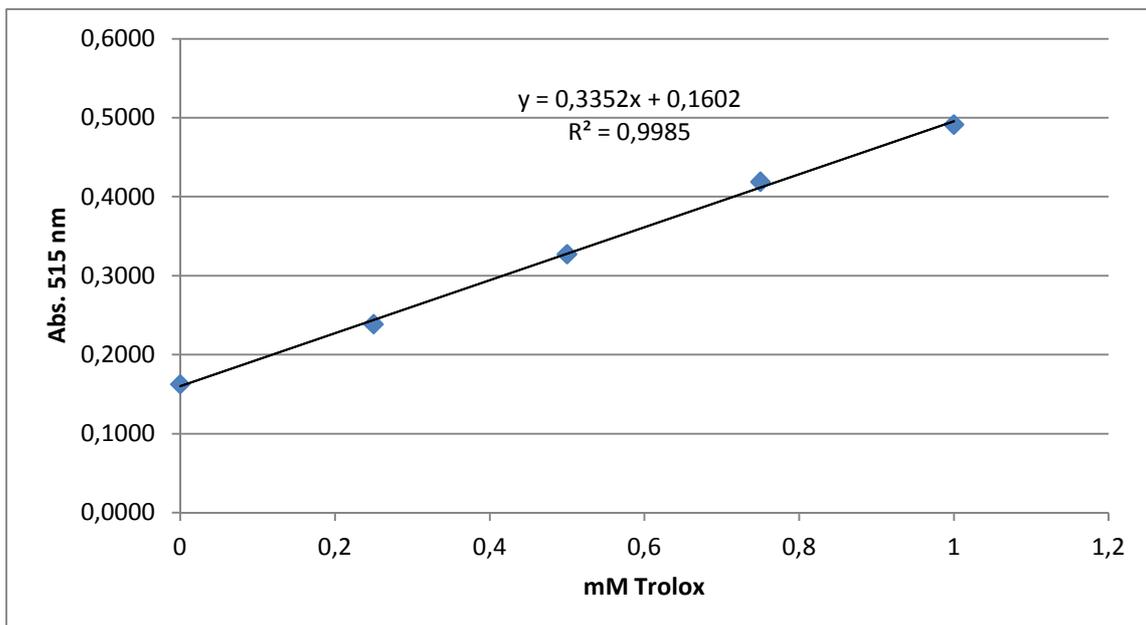
**Repetitividad y linealidad usando el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific Multiskan Go)**

La repetitividad se determinó llevando a cabo 8 repeticiones del protocolo completo de análisis en condiciones de repetitividad, utilizando como muestra Trolox. Se obtuvieron los siguientes resultados expresados en desviación estándar relativa (DER):

Tabla 5.4. Resultados estudio repetitividad del método DPPH en espectrofotómetro de placas

Repetición	mM Trolox	Media	Desv. Estand	CV (%)
1	0,5225	0,5319	0,0164	3,10
2	0,5175			
3	0,54			
4	0,53			
5	0,51			
6	0,5475			
7	0,56			
8	0,5275			

La linealidad se comprobó mediante la curva de calibración, en donde se añadieron concentraciones de Trolox hasta 1 M, tomando como variable dependiente la diferencia de absorbancia a 515 nm después de una hora de reacción (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Recta patrón para el método DPPH en espectrofotómetro de placas

Observando los datos de repetitividad, se obtiene que los coeficientes de variación están en torno al 3 %, por tanto estos valores son aceptables

En la linealidad se observa como las  $R^2$  son en ambos casos por encima del valor 0,99, así que se puede concluir que los métodos son lineales

### 5.1.3 Veracidad del método FRAP

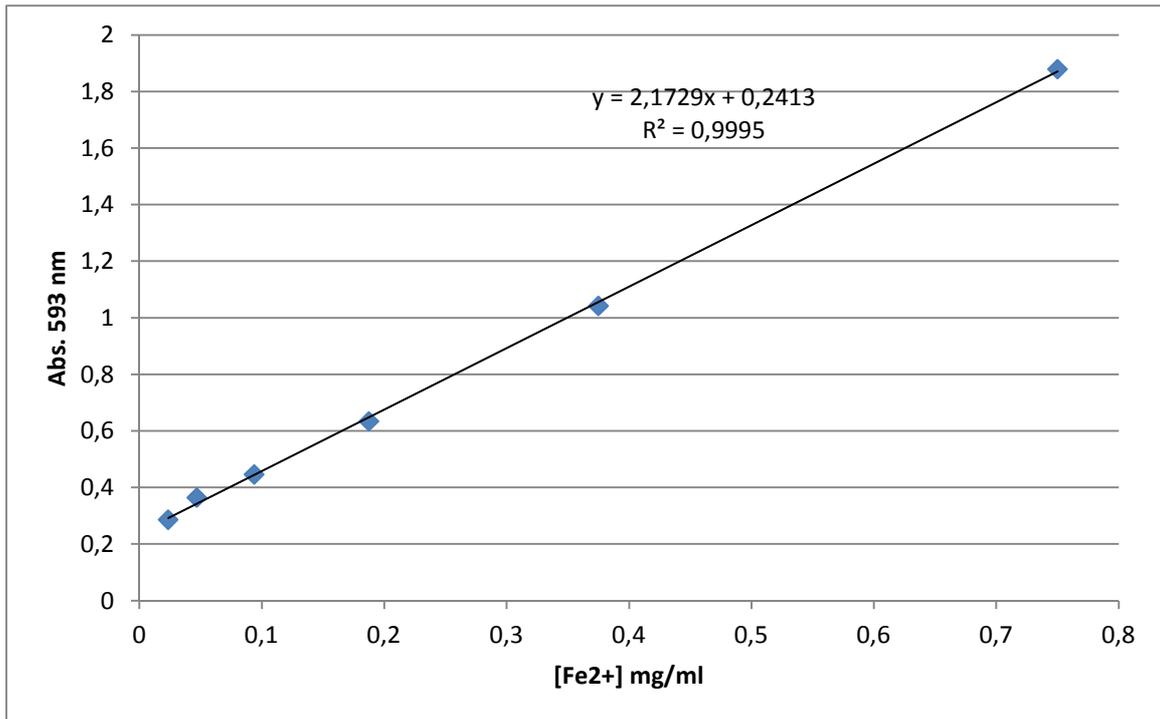
#### Repetitividad y linealidad usando el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific Multiskan Go)

La repetitividad se determinó llevando a cabo 8 repeticiones del protocolo completo de análisis en condiciones de repetitividad, utilizando como muestra sulfato de hierro heptahidratado. Se obtuvieron los siguientes resultados expresados en desviación estándar relativa (DER):

Tabla 5.5. Resultados estudio repetitividad del método FRAP en espectrofotómetro de placas

Repetición	mg Fe <sup>2+</sup> /g materia seca	Media	Desv. Estand	CV (%)
1	0,1943	0.2010	0,0064	3,18
2	0,1931			
3	0,1973			
4	0,2058			
5	0,1971			
6	0,2073			
7	0,2035			
8	0,2100			

La linealidad se comprobó mediante la realización del método a diferentes concentraciones de sulfato de hierro heptahidratado. Se empezó con 0.75 mg/ml, y se hicieron 5 diluciones sucesivas. (Figura 5.5)



**Figura 5.5.** Recta patrón para el método FRAP en espectrofotómetro de placas

El valor del coeficiente de variación es 3,18 %, por lo que se puede concluir que la repetitividad es totalmente aceptable

Como se puede observar las  $R^2$  de esta recta patrón dan por encima de 0.99 por lo tanto se puede considerar que existe una linealidad en el método

## 5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA ANTES DE LA EXTRACCIÓN

Los resultados obtenidos para los parámetros TPC y DPPH tras la extracción sólido-líquido a diferentes temperaturas de las muestras liofilizadas y secadas a vacío se muestran en la tabla 5.6. Para llegar a estos resultados se realizó un análisis ANOVA para los factores tratamiento (secado a vacío o liofilizado) y temperatura (20, 30, 40 y 50 °C)

**Tabla 5.6.** Análisis estadístico de la extracción sólido-líquido.

T° (°C)	TPC (Folin-Ciocalteu)		AA (DPPH)	
	LIOFILIZACIÓN (mg/g)	SECADO POR ESTUFA	LIOFILIZACIÓN (mMTrolox/g)	SECADO POR ESTUFA (mM)
20	22,92 ± 1,68 <sup>aA</sup>	22,55 ± 0,8 <sup>aA</sup>	0.1371 ± 0.0041 <sup>aA</sup>	0,1175 ± 0,0025 <sup>aB</sup>
30	22,98 ± 1,07 <sup>aA</sup>	23,21 ± 0,49 <sup>aA</sup>	0.1758 ± 0.0032 <sup>bA</sup>	0,1604 ± 0,0065 <sup>bB</sup>
40	23,68 ± 0,48 <sup>aA</sup>	23,65 ± 0,38 <sup>aA</sup>	0.1679 ± 0.0094 <sup>cA</sup>	0,1630 ± 0,0034 <sup>bA</sup>
50	30,93 ± 0,78 <sup>bA</sup>	26,30 ± 1,53 <sup>bB</sup>	0,2470 ± 0,0025 <sup>dA</sup>	0,2113 ± 0,0140 <sup>cB</sup>

Letras minúsculas indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) para las temperaturas de cada tratamiento. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) entre los métodos de secado previos para cada temperatura

Una vez obtenida la tabla con todos sus datos, el estudio de los resultados obtenidos se separan en dos grupos, TPC y DPPH.

### Polifenoles totales (TPC)

Desde el punto de vista del tratamiento y viendo los resultados obtenidos tras el análisis estadístico, se observa que a temperaturas de 20, 30 o 40 °C no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre los diferentes secados. Sin embargo para una extracción a 50 °C se obtuvieron diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) ya que hubo mayor concentración de polifenoles con un secado mediante liofilización frente a un secado a vacío. Además en todas las temperaturas la media de extracción de polifenoles era mayor en los casos de liofilización que en los de a vacío

Observando los datos de la tabla ANOVA para el factor temperatura se concluyó que para las temperaturas de 20, 30 y 40 °C no había diferencias significativas, pero sin embargo para una extracción a 50 °C si que existían esas diferencias, y que además los extractos obtenidos a esta temperatura presentan contenidos en polifenoles superiores. Parece que la temperatura de 50°C marca un punto de inflexión en la extracción independientemente del pretratamiento de la muestra.

Así pues en el estudio realizado por Bucic-Kojic, Planinic et al. (2007) se hacía una extracción sólido-líquido de pepitas de uvas con una concentración de 40 ml/g en un medio etanol acuoso (50:50) y a rangos de temperaturas de 25 a 80 °C, se obtuvieron valores de fenoles totales entre 66,81 y 23,91 mg AG/g materia seca. Estos valores variaban dependiendo del tamaño de partícula, ya que consiguieron reducir este tamaño hasta 120 µm. Cuando hacen el estudio para tamaños de partícula entre 400 y 600 µm y temperatura igual a 50 °C, los resultados rondan los 20 mg AG/g extracto seco, por tanto los valores obtenidos en nuestro estudio son algo mayores. Esta mejora podría ser debida al secado previo por liofilización, ya que en el estudio de Bucic-Kojic en vez de secar, lo que hace es moler la muestra y directamente envasarla al vacío y almacenarla en refrigeración (4 °C) hasta la extracción.

En el trabajo de Pinelo, Sineiro et al. (2006) se estudió la extracción sólido-líquido de subproductos de la vinificación. Las condiciones eran las mismas que para el trabajo presente, salvo que el secado se producía en un horno durante 48 horas con aire caliente recirculado. Los resultados que se obtuvieron en ese trabajo fueron de una cantidad de fenoles totales de 6,9 – 21,8 mg AG/g extracto seco (la variación se debe a la cantidad de muestra inicial). Por lo tanto en el mejor de sus casos no se llegaba al menor de los valores de este trabajo. Así pues se puede pensar que un posible factor clave a la hora de una mejor extracción puede ser el secado previo. Esto puede ser debido a la sobreexposición que sufren las muestras de Pinelo, ya que es posible que los polifenoles puedan sufrir degradaciones al estar tanto tiempo y en presencia de oxígeno

### **Actividad antioxidante**

Comparando los dos pretratamientos a las temperaturas de 20, 30 y 50 °C hubo diferencias significativas entre los métodos de secado, pero sin embargo a 40 °C estas diferencias no fueron lo suficientemente grandes como para ser significativas. Se puede hacer una evaluación global y pensar que en principio sí que existen diferencias entre los métodos de secado independientemente de la temperatura a la que se extraiga

Sin embargo analizando las temperaturas dentro de cada método de secado, se observa que para la liofilización cada una de las extracciones a una temperatura suponía un grupo independiente, es decir, que existían diferencias significativas entre todas, y que conforme aumentaba la temperatura la actividad antioxidante era mayor. Para el secado a vacío sin embargo se formaban tres grupos diferenciados, ya que para las extracciones a temperaturas de 30 y 40 °C no existían diferencias significativas, pero sí que se diferenciaban con respecto a las otras dos extracciones. Al igual que en el secado con liofilización cuanto mayor fue la temperatura de extracción mayor fueron los valores de actividad antioxidante

De forma general para la extracción analizando la actividad antioxidante se confirmó que los mayores valores se obtenían conforme aumentaba la temperatura de extracción, y que al comparar los métodos de secado previos, resultaba mejor actividad antioxidante cuando las semillas de uva se secaban mediante liofilización.

Makris, Boskou et al. (2007) hicieron un estudio para analizar la influencia del solvente (etanol) en rangos del 21 al 57 % respecto del agua. La extracción se realizaba tras haber secado las muestras en un horno, y con las muestras sin triturar. La concentración era de 5.5 ml/g, y no especificaba la temperatura de extracción. Los resultados que obtenía eran muy inferiores a los obtenidos en este trabajo, ya que en fenoles totales extraían entre 7,957 y 13,75 mgAG/g y en actividad antioxidante 0,0594 – 0,0855 mmol Trolox/g.

Haciendo una comparación global de la extracción sólido-líquido teniendo en cuenta la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante (medida por DPPH), se concluyó que los mejores valores se obtenían tras secar las muestras con un proceso de liofilización y una posterior extracción a una temperatura de 50 °C.

### **5.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS**

#### **5.1.1 Modelo de superficie de respuesta**

Se pretendía encontrar las condiciones de extracción que permitan obtener la mayor riqueza polifenólica y actividad antioxidante en los extractos.

Los factores experimentales a variar fueron la temperatura de extracción, la intensidad de los ultrasonidos y el tiempo de tratamiento. Con los datos de la bibliografía y los estudios previos realizados se fijó el dominio experimental de interés, para cada uno de los factores, del siguiente modo:

- Para la intensidad de los ultrasonidos interesaba estudiar el rango completo de intensidades proporcionadas por el equipo (20 - 100 %).
- Para la temperatura, Aunque es conocido que el rendimiento de la extracción aumenta de forma importante a partir de los 50 °C (Adjé, Lozano et al. 2010; Tabaraki and Nateghi 2011; Galvan D'Alessandro, Kriaa et al. 2012), el rango de temperaturas de extracción se fijó de forma que no se alcanzasen temperaturas que pudiesen producir degradaciones de los compuestos polifenólicos (10 - 50 °C).
- El tiempo de tratamiento se fijó a partir de los datos de la bibliografía, fijando como máximo 50 minutos, tiempo al que, en las referencias bibliográficas consultadas (Soria and Villamiel 2010; Viroto, Tomao et al. 2010) se tiene, con un margen de seguridad, un comportamiento asintótico en la respuesta del rendimiento de extracción (5 – 50 minutos).

Los niveles de los factores se muestran en la tabla 5.7, atendándose a su codificación

Como el interés es obtener extractos con una elevada capacidad antioxidante, las variables respuesta medidas fueron la actividad antioxidante mediante el método DPPH y mediante el método FRAP, y el contenido en polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Se llevaron a cabo un total de 69 experimentos utilizando un diseño central compuesto en estrella ( $2^2$  + estrella), con dos replicaciones, para el estudio de los efectos lineales, cuadráticos y las interacciones de primer orden, de los tres factores estudiados (temperatura de extracción, la intensidad de los ultrasonidos y el tiempo de tratamiento), a 5 niveles cada uno (Tabla 5.8).

**Tabla 5.7.** Niveles de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño central compuesto en estrella:  $2^2$  + estrella).

Valor	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Intensidad (%)
<b>1,68</b>	50	50	100
<b>1</b>	42	41	90
<b>0</b>	30	27,5	60
<b>-1</b>	18	14	30
<b>-1,68</b>	10	5	20

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES**Tabla 5.8.** Diseño experimental.

Prueba	T <sup>a</sup>	Tiempo	Intensidad	Prueba	T <sup>a</sup>	Tiempo	Intensidad
<b>1</b>	1,0	1,0	1,0	<b>36</b>	1,68	0,0	0,0
<b>2</b>	0,0	0,0	0,0	<b>37</b>	0,0	0,0	1,68
<b>3</b>	0,0	0,0	0,0	<b>38</b>	0,0	0,0	0,0
<b>4</b>	-1,0	1,0	1,0	<b>39</b>	1,0	-1,0	-1,0
<b>5</b>	0,0	0,0	-1,68	<b>40</b>	0,0	0,0	0,0
<b>6</b>	0,0	0,0	0,0	<b>41</b>	-1,68	0,0	0,0
<b>7</b>	0,0	0,0	0,0	<b>42</b>	1,0	-1,0	1,0
<b>8</b>	0,0	-1,68	0,0	<b>43</b>	0,0	0,0	0,0
<b>9</b>	-1,0	-1,0	-1,0	<b>44</b>	-1,0	-1,0	1,0
<b>10</b>	0,0	1,68	0,0	<b>45</b>	0,0	0,0	0,0
<b>11</b>	-1,0	1,0	0,0	<b>46</b>	1,0	1,0	-1,0
<b>12</b>	0,0	0,0	0,0	<b>47</b>	1,0	1,0	1,0
<b>13</b>	1,68	0,0	0,0	<b>48</b>	0,0	0,0	0,0
<b>14</b>	0,0	0,0	1,68	<b>49</b>	0,0	0,0	0,0
<b>15</b>	0,0	0,0	0,0	<b>50</b>	-1,0	1,0	1,0
<b>16</b>	1,0	-1,0	-1,0	<b>51</b>	0,0	0,0	-1,68
<b>17</b>	0,0	0,0	0,0	<b>52</b>	0,0	0,0	0,0
<b>18</b>	-1,68	0,0	0,0	<b>53</b>	0,0	0,0	0,0
<b>19</b>	1,0	-1,0	1,0	<b>54</b>	0,0	-1,68	0,0
<b>20</b>	0,0	0,0	0,0	<b>55</b>	-1,0	-1,0	-1,0
<b>21</b>	-1,0	-1,0	1,0	<b>56</b>	0,0	1,68	0,0
<b>22</b>	0,0	0,0	0,0	<b>57</b>	-1,0	1,0	-1,0
<b>23</b>	1,0	1,0	-1,0	<b>58</b>	0,0	0,0	0,0
<b>24</b>	1,0	1,0	1,0	<b>59</b>	1,68	0,0	0,0
<b>25</b>	0,0	0,0	0,0	<b>60</b>	0,0	0,0	1,68
<b>26</b>	0,0	0,0	0,0	<b>61</b>	0,0	0,0	0,0
<b>27</b>	-1,0	1,0	1,0	<b>62</b>	1,0	-1,0	-1,0
<b>28</b>	0,0	0,0	-1,68	<b>63</b>	0,0	0,0	0,0
<b>29</b>	0,0	0,0	0,0	<b>64</b>	-1,68	0,0	0,0
<b>30</b>	0,0	0,0	0,0	<b>65</b>	1,0	-1,0	1,0
<b>31</b>	0,0	-1,68	0,0	<b>66</b>	0,0	0,0	0,0
<b>32</b>	-1,0	-1,0	-1,0	<b>67</b>	-1,0	-1,0	1,0
<b>33</b>	0,0	1,68	0,0	<b>68</b>	0,0	0,0	0,0
<b>34</b>	-1,0	1,0	-1,0	<b>69</b>	1,0	1,0	-1,0
<b>35</b>	0,0	0,0	0,0				

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

**Tabla 5.9.** Cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante de las pruebas de superficie de respuesta

Prueba	Folin (mg AG/g materia seca)	DPPH (mM Trolox/g materia)	FRAP (mg Fe <sup>2+</sup> /g materia seca)
1	73,82 ± 2,35	0,8342 ± 0,0476	99,06 ± 7,74
2	81,40 ± 4,48	0,7824 ± 0,0477	73,20 ± 4,26
3	79,55 ± 2,48	0,7770 ± 0,0444	61,85 ± 2,66
4	90,36 ± 5,15	0,8439 ± 0,0567	60,92 ± 4,12
5	83,59 ± 3,79	0,7372 ± 0,0635	68,87 ± 4,01
6	75,52 ± 4,16	0,7559 ± 0,0304	74,39 ± 3,40
7	82,77 ± 2,70	0,6491 ± 0,0368	70,11 ± 4,54
8	79,96 ± 2,52	0,5911 ± 0,0319	107,95 ± 6,93
9	68,32 ± 1,21	0,5629 ± 0,0407	84,28 ± 5,02
10	82,26 ± 3,24	0,6342 ± 0,0433	74,57 ± 4,82
11	70,70 ± 6,48	0,5132 ± 0,0326	71,44 ± 3,67
12	83,71 ± 2,05	0,6151 ± 0,0371	62,66 ± 2,46
13	80,87 ± 1,69	0,7254 ± 0,0426	96,21 ± 5,39
14	71,02 ± 2,22	0,6286 ± 0,0221	86,20 ± 3,82
15	78,01 ± 6,87	0,6432 ± 0,0424	83,37 ± 2,91
16	82,64 ± 5,48	0,6534 ± 0,0374	76,07 ± 4,05
17	87,01 ± 1,32	0,6287 ± 0,0295	89,80 ± 3,79
18	80,99 ± 4,47	0,5032 ± 0,0387	80,96 ± 6,29
19	88,11 ± 16,61	0,5821 ± 0,0287	95,18 ± 4,77
20	73,08 ± 7,00	0,5749 ± 0,0305	90,92 ± 6,47
21	80,68 ± 3,70	0,6267 ± 0,0415	94,75 ± 5,98
22	84,49 ± 3,83	0,6492 ± 0,0444	95,21 ± 3,40
23	84,88 ± 2,15	0,5586 ± 0,0378	91,74 ± 7,99
24	87,44 ± 4,55	0,6846 ± 0,0321	92,87 ± 5,18
25	93,08 ± 3,04	0,6830 ± 0,0424	83,76 ± 4,02
26	80,78 ± 2,20	0,6604 ± 0,0434	80,63 ± 4,15
27	70,20 ± 2,74	0,6112 ± 0,0535	90,79 ± 3,94
28	75,41 ± 1,22	0,6704 ± 0,0507	89,77 ± 4,93
29	79,31 ± 3,68	0,6421 ± 0,0512	90,04 ± 5,71
30	82,20 ± 1,84	0,6802 ± 0,0381	82,43 ± 5,44
31	70,03 ± 2,55	0,6226 ± 0,0315	102,20 ± 4,77
32	67,82 ± 1,78	0,5767 ± 0,0336	56,79 ± 2,69
33	69,36 ± 2,97	0,6584 ± 0,0335	81,73 ± 4,03
34	81,90 ± 2,64	0,6329 ± 0,0229	85,08 ± 3,14
35	61,37 ± 2,21	0,6283 ± 0,0355	77,51 ± 4,29
36	75,83 ± 4,37	0,7349 ± 0,0527	86,48 ± 5,21
37	68,90 ± 4,28	0,6842 ± 0,0382	69,43 ± 7,58
38	70,79 ± 2,39	0,6051 ± 0,0204	79,73 ± 4,34
39	72,95 ± 3,39	0,6028 ± 0,0371	81,70 ± 4,88
40	69,18 ± 2,62	0,6304 ± 0,0290	76,90 ± 5,35
41	73,43 ± 2,52	0,3954 ± 0, 0275	69,78 ± 2,30
42	64,75 ± 3,79	0,5574 ± 0,0271	67,97 ± 3,08
43	71,74 ± 4,13	0,6114 ± 0,0310	65,64 ± 3,13
44	79,96 ± 1,72	0,7042 ± 0,0375	73,80 ± 3,94

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

45	80,10 ± 2,56	0,6971 ± 0,0294	88,11 ± 4,21
46	86,39 ± 3,19	0,6808 ± 0,0361	75,32 ± 6,75
47	88,73 ± 2,67	0,7053 ± 0,0397	88,13 ± 2,51
48	74,19 ± 3,07	0,6986 ± 0,0453	76,10 ± 5,60
49	81,54 ± 2,51	0,5769 ± 0,0386	70,96 ± 1,54
50	80,11 ± 3,37	0,5240 ± 0,0294	68,09 ± 2,90
51	72,47 ± 1,79	0,5849 ± 0,0299	65,83 ± 2,21
52	89,03 ± 2,77	0,6395 ± 0,0367	76,90 ± 3,12
53	86,67 ± 2,54	0,6016 ± 0,0282	77,89 ± 3,44
54	80,56 ± 2,33	0,5010 ± 0,0245	76,23 ± 2,02
55	80,12 ± 1,39	0,5851 ± 0,0336	82,67 ± 3,86
56	90,04 ± 2,43	0,5758 ± 0,0340	85,88 ± 2,60
57	73,98 ± 2,84	0,4451 ± 0,0211	72,20 ± 2,51
58	89,95 ± 2,73	0,6132 ± 0,0429	91,04 ± 5,82
59	89,89 ± 1,79	0,6249 ± 0,0086	80,68 ± 3,04
60	91,63 ± 2,66	0,6077 ± 0,0376	75,32 ± 4,73
61	83,62 ± 1,67	0,6217 ± 0,0337	83,72 ± 3,83
62	84,29 ± 2,95	0,6145 ± 0,0299	81,22 ± 2,93
63	87,19 ± 3,94	0,6463 ± 0,0247	74,32 ± 3,82
64	84,99 ± 2,68	0,6050 ± 0,0397	71,64 ± 4,34
65	83,19 ± 2,04	0,5766 ± 0,0188	78,71 ± 3,30
66	83,77 ± 2,50	0,6194 ± 0,0310	90,95 ± 5,81
67	87,12 ± 3,00	0,8640 ± 0,0192	82,89 ± 2,67
68	75,18 ± 2,03	0,6395 ± 0,0367	84,38 ± 4,44
69	87,82 ± 2,80	0,9075 ± 0,0297	82,40 ± 1,97

Se ajustaron los modelos de superficie de respuesta (RSM) para las tres variables (actividad antioxidante DPPH, actividad antioxidante FRAP e índice de polifenoles Folin-Ciocalteu).

El software estadístico MINITAB 16 se utilizó para ajustar un modelo de segundo orden a las variables independientes, utilizando la siguiente ecuación:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + e$$

Donde:

y = variable dependiente a modelizar (variable respuesta: actividad antioxidante DPPH, actividad antioxidante FRAP o polifenoles totales Folin-Ciocalteu).

$x_i$  y  $x_j$  = variables independientes (factores).

$b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$  = coeficientes de regresión.

e = error.

En la siguiente tabla se expresan los resultados finales de cada prueba para su contenido en fenoles totales y actividad antioxidante.

### 5.1.2 Análisis de regresión

El análisis de la varianza para los modelos obtenidos de las tres variables respuesta (TPC, DPPH y FRAP) bajo diferentes condiciones del tratamiento está presentada en la tabla 5.10.

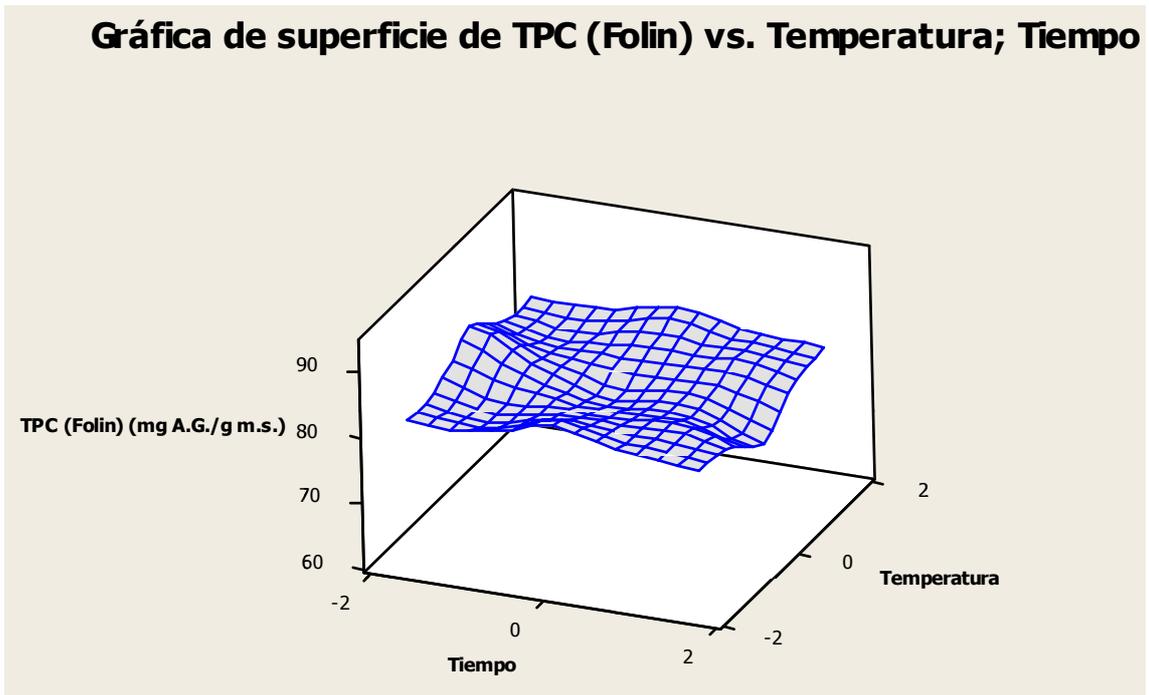
**Tabla 5.10.** Coeficientes de regresión,  $R^2$  y p-valores de las tres variables respuesta

Término	TPC		DPPH		FRAP	
	Coefficiente	p-valor	Coefficiente	p-valor	Coefficiente	p-valor
<b>Promedio</b>	78,1181	0,9936	0,6282	0,000	79,2657	0,9246
<b>A: Temperatura</b>	0,0084	0,4111	0,023266	0,077	-0,1548	0,0389
<b>B: Tiempo</b>	-0,8595	0,8328	-0,015779	0,227	-3,4449	0,6020
<b>C: Intensidad</b>	-0,2201	0,0681	0,025282	0,055	0,8547	0,4685
<b>AA</b>	1,7893	0,9410	0,020126	0,098	1,1024	0,1125
<b>AB</b>	0,8489	0,5080	-0,004440	0,712	0,5667	0,9599
<b>AC</b>	0,1099	0,3814	0,002796	0,816	-0,1127	0,7089
<b>BB</b>	-0,1008	0,4532	0,023029	0,178	3,4317	0,6992
<b>BC</b>	0,9033	0,9094	0,010304	0,544	-0,1075	0,9408
<b>CC</b>	1,0242	0,0003	0,038554	0,026	-0,8267	0,5408
<b><math>R^2</math></b>	7,33	0,855	24,36	0,043	12,32	0,514

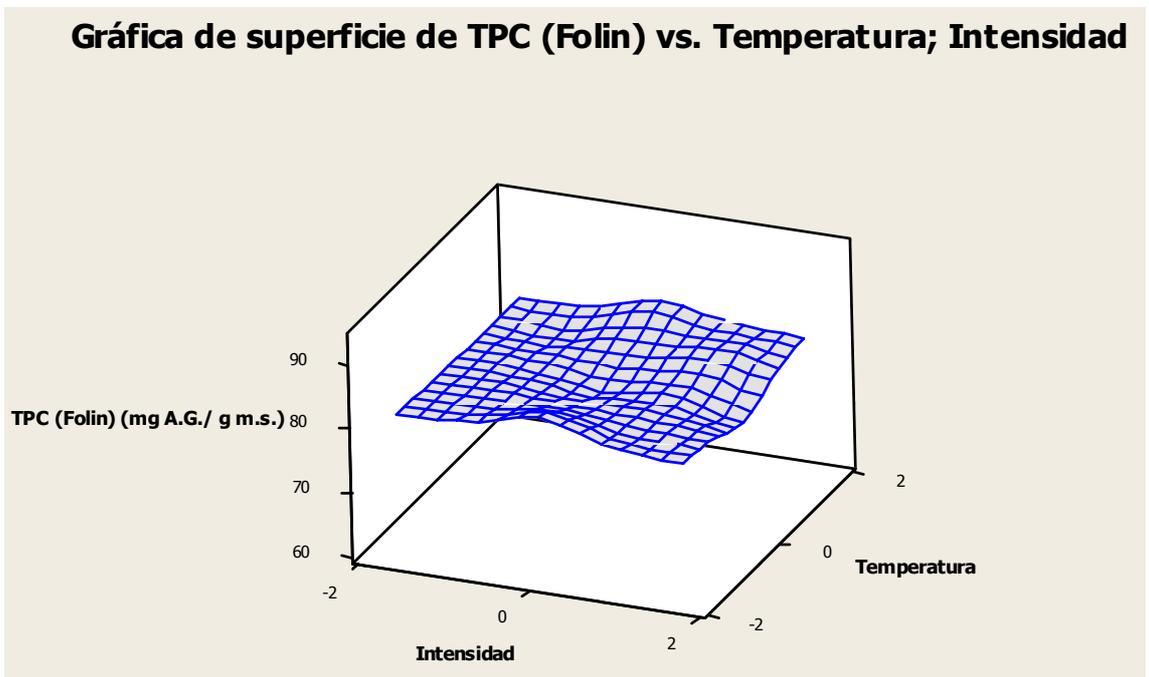
Analizando los resultados de la tabla, los valores de  $R^2$  indican que los modelos de superficie respuesta obtenidos para los tres variables respuesta (TPC, DPPH y FRAP) explican el bajo porcentaje de la variabilidad de los datos. Sin embargo aunque estos valores de  $R^2$  son bajos, se observa que en el ajuste encontrado para el método DPPH presenta una cierta significatividad.

A continuación se exponen las gráficas de las superficies de respuesta obtenidas para cada una de las variables respuesta. En cada una de las gráficas cada variable viene representada frente a dos de las condiciones del tratamiento. Las unidades de las condiciones de tratamiento en las gráficas están codificadas según se explica en la tabla 5.7

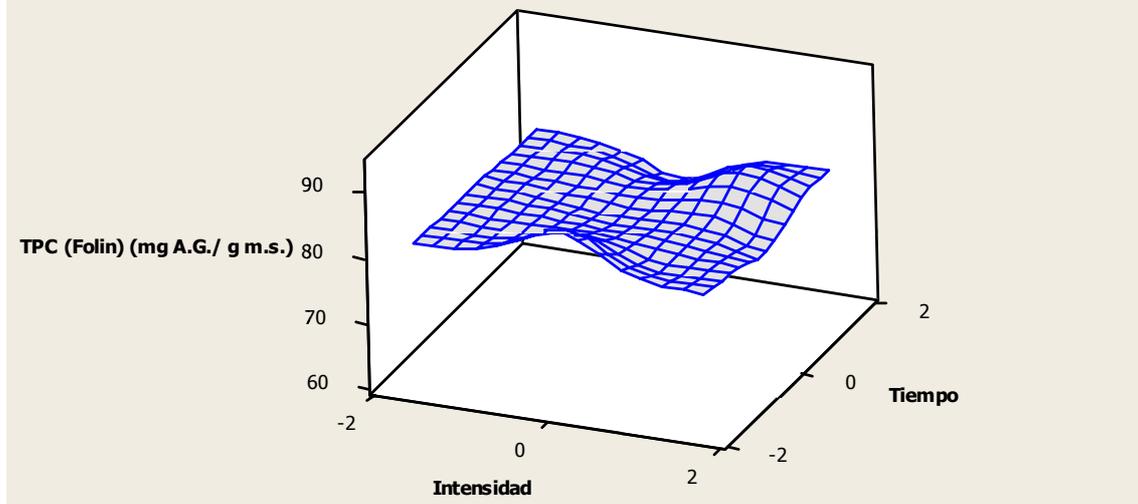
TPC



**Figura 5.6.** TPC frente a temperatura y tiempo



**Figura 5.7.** TPC frente a temperatura e intensidad

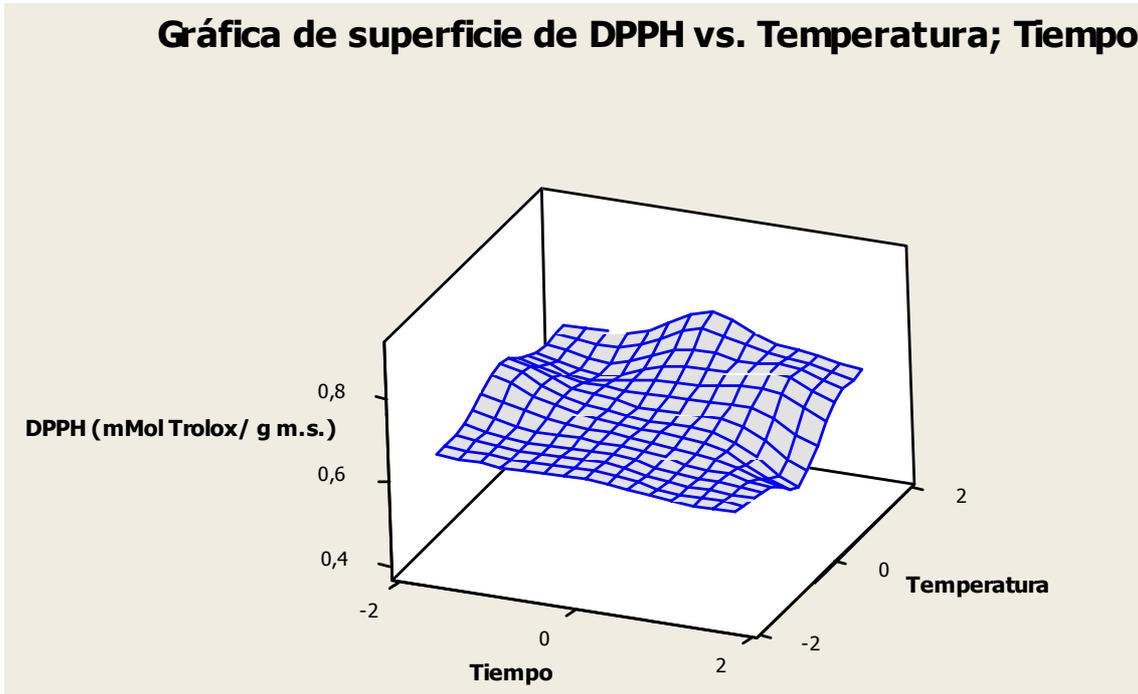
**Gráfica de superficie de TPC (Folin) vs. Tiempo; Intensidad****Figura 5.8.** TPC frente a tiempo e intensidad

En general no observamos una clara tendencia en los valores de TPC para ninguna de las combinaciones de los factores. Cuando se enfrentan tiempo con intensidad (Figura 5.8), se obtiene que conforme aumenta el tiempo a una intensidad media (valor 0), la cantidad total de polifenoles disminuye gradualmente. Sin embargo al máximo de intensidad de ultrasonido conforme aumenta el tiempo se obtiene mayor cantidad de polifenoles. Aunque no se observa claramente parece que los valores de TPC tienden a aumentar con la intensidad y el tiempo de extracción.

Al contrastar el tiempo con la temperatura (Figura 5.6) se obtiene que a una temperatura media, 30 °C, conforme aumenta el tiempo la cantidad de polifenoles disminuye, pero para las demás temperaturas en general a mayor temperatura y mayor tiempo este dato va incrementando.

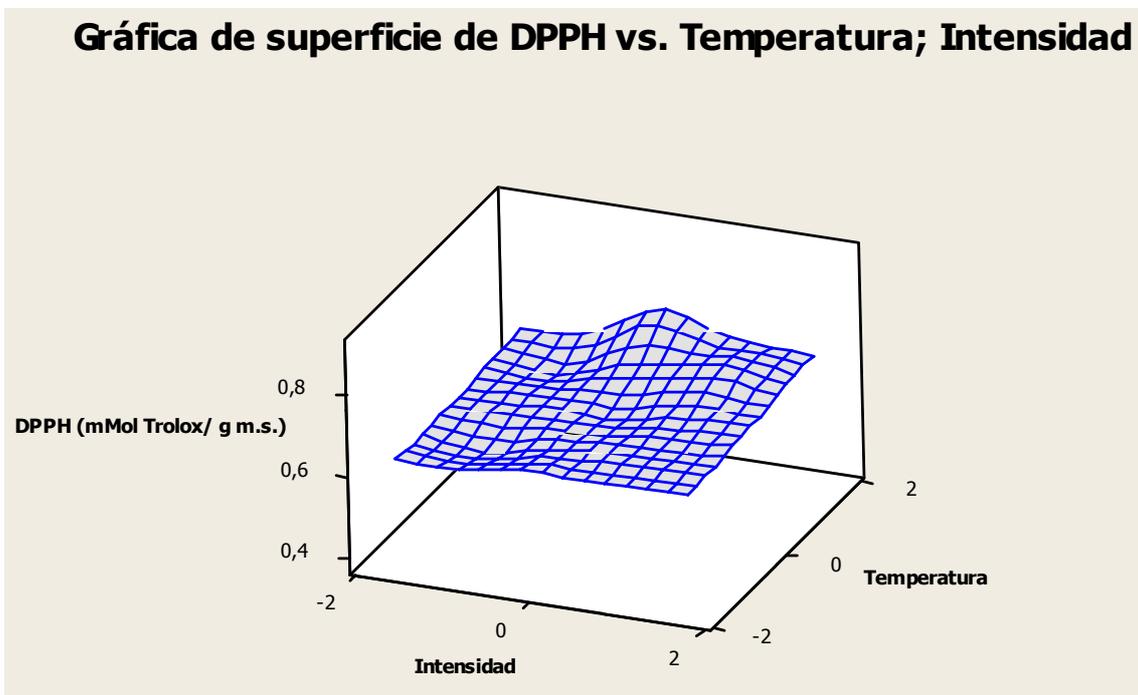
DPPH

**Gráfica de superficie de DPPH vs. Temperatura; Tiempo**

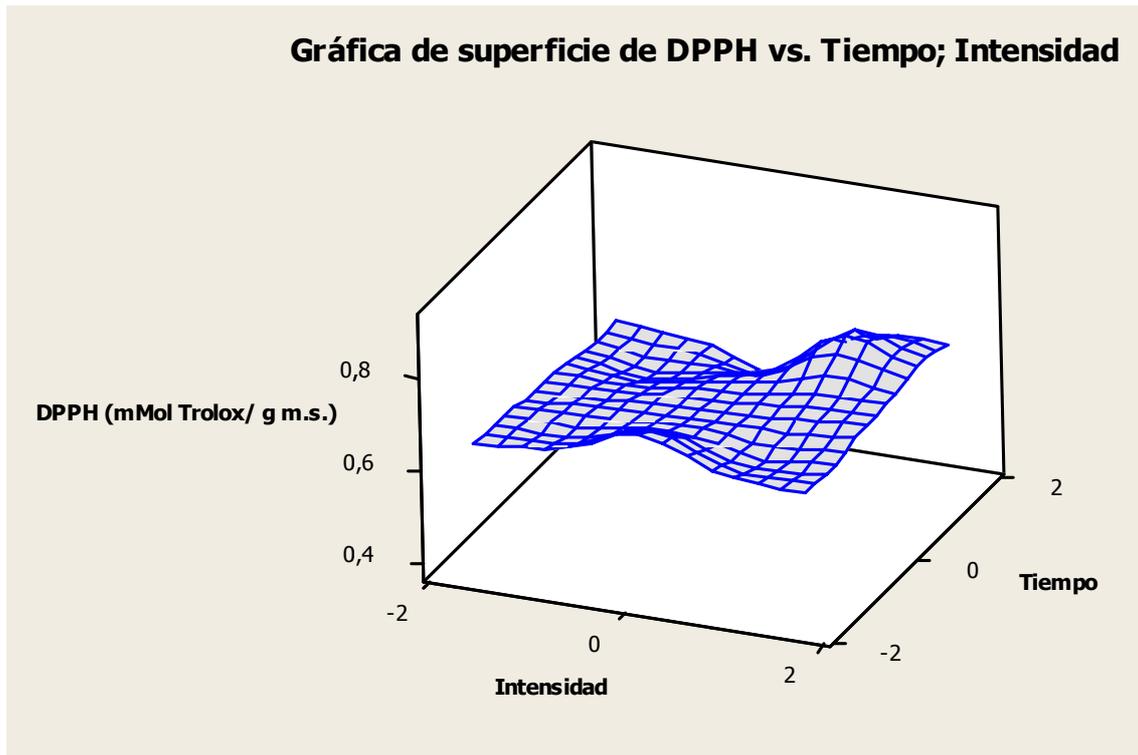


**Figura 5.9.** DPPH frente a temperatura y tiempo

**Gráfica de superficie de DPPH vs. Temperatura; Intensidad**



**Figura 5.10.** DPPH frente a temperatura e intensidad



**Figura 5.11.** DPPH frente a tiempo e intensidad

Las gráficas de las superficies respuesta para el método DPPH son bastante claras, ya que muestran una tendencia general a que el aumento de las condiciones del tratamiento produce un aumento en la actividad antioxidante. En las tres gráficas el punto de máxima actividad se encuentra cuando el tratamiento se realiza a máxima temperatura de extracción. Sin embargo tanto el tiempo de extracción como en intensidad de ultrasonido, los valores máximos se dan en el punto medio, aunque a valores máximos de intensidad también producen buenos resultados.

FRAP

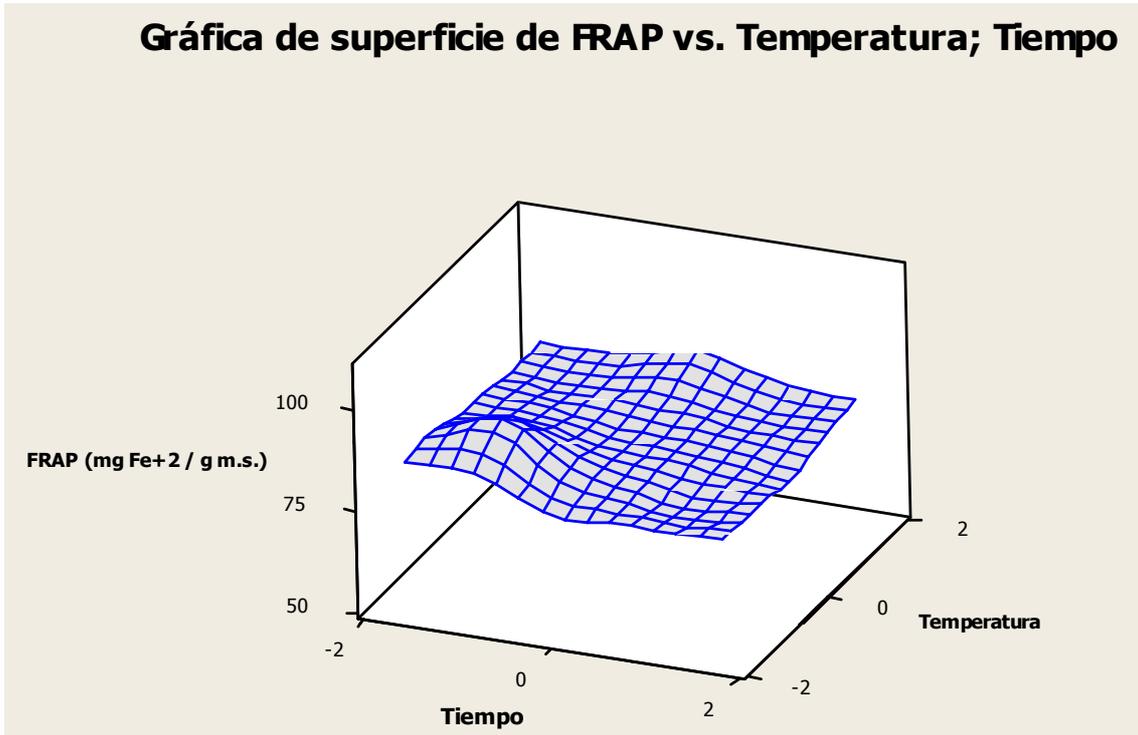


Figura 5.12. FRAP frente a temperatura y tiempo

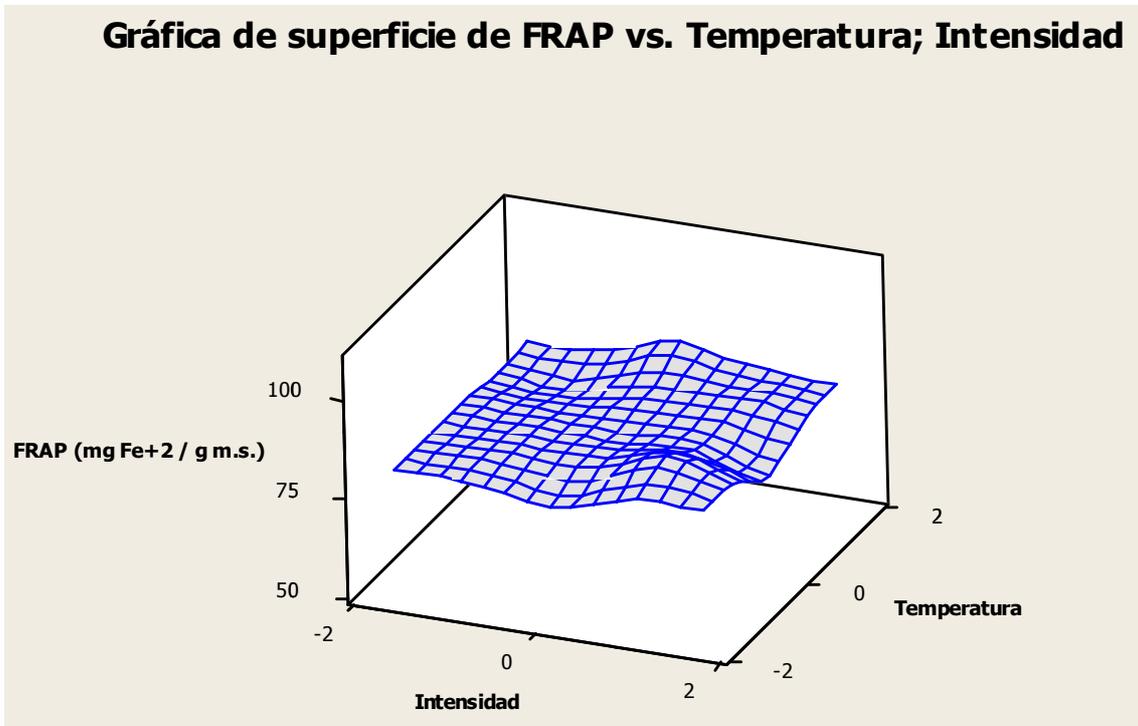
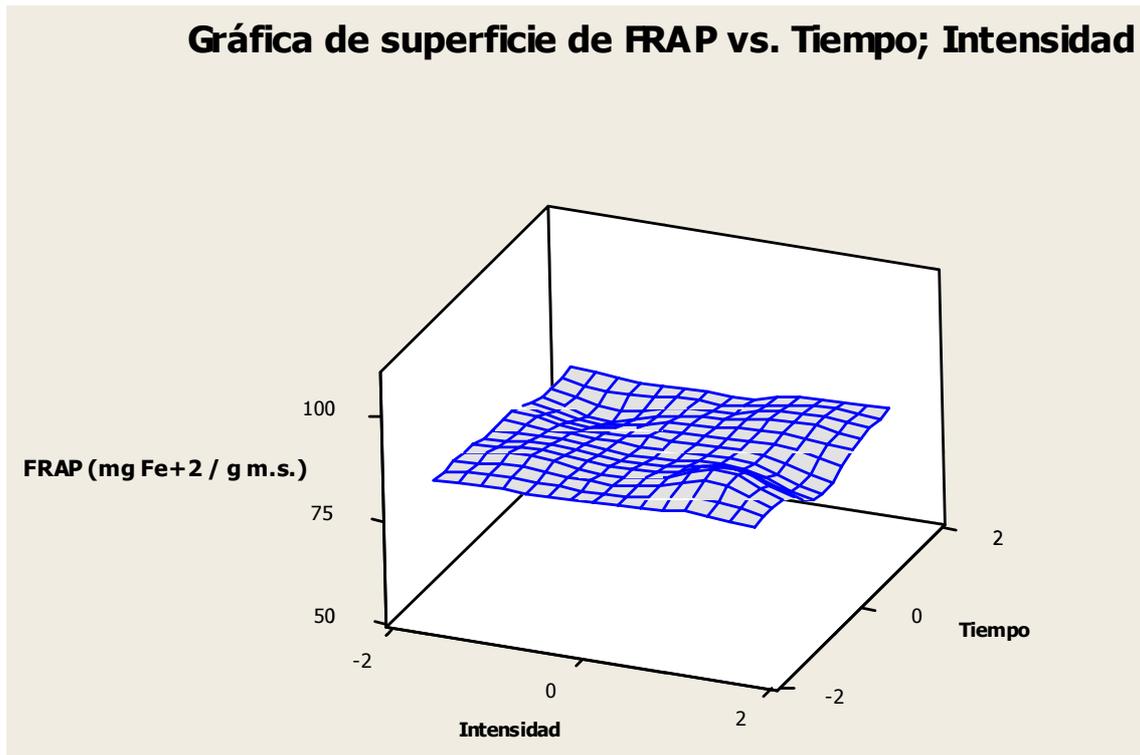


Figura 5.13. FRAP frente a temperatura e intensidad



**Figura 5.14.** FRAP frente a tiempo e intensidad

Para el método de análisis FRAP, los datos que se obtienen son bastante inconcluyentes, ya que las gráficas de superficie respuesta de las pruebas no muestran picos marcados. De las tres variables, la que a primera vista influye en mayor medida es la intensidad de ultrasonido (Figura 5.13 y 5.14), ya que a valores máximos de este parámetro es cuando se obtienen los valores máximos de actividad antioxidante.

### 5.1.3 Optimización de las condiciones de extracción

Una vez obtenidas los resultados del modelo de superficie de respuesta, se procede a optimizar la respuesta final maximizando los resultados de los tres parámetros a analizar, dando evidentemente mayor importancia en el análisis estadístico en este estudio a la actividad antioxidante mediante el método DPPH, puesto que en el estudio de regresión realizado anteriormente fue el único que presentó significatividad.

Así pues, el resultado obtenido nos indica que las mejores condiciones de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos son las siguientes

**Tabla 5.11.** Solución global de la optimización de respuesta

PARÁMETRO	VALORES CODIFICADOS	VALORES SIN CODIFICAR
<b>Temperatura de extracción</b>	1,68179	50 °C
<b>Tiempo de extracción</b>	1,68179	50 minutos
<b>Intensidad de ultrasonido</b>	1,68179	100 %

Teniendo en cuenta las condiciones óptimas para la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos, las respuestas pronosticadas para cada una de las variables serían las siguientes:

- TPC = 89,2560 mg AG/g materia seca
- DPPH = 89,2560 mmol Trolox/g materia seca
- FRAP = 90,7915 mg Fe<sup>2+</sup>/g materia seca

Casazza, Aliakbarian et al. (2012), realizan una extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos (60 W) usando metanol como solvente a 25 °C durante 60 minutos, y en el que obtiene valores máximos de 55,98 mg AG/g, se comprueba que utilizando las condiciones optimizadas antes pronosticadas, se obtendría una cantidad muy superior (89,256 mg AG/g) a la obtenida en el estudio de Casazza. Una explicación posible podría ser que en el artículo la intensidad del ultrasonido es hasta cuatro veces menor que la usada en el nuestro, y al fin y al cabo es un factor determinante en la extracción.

Ghafoor, Hui et al. en 2009, hicieron un trabajo que planteaba objetivos similares al aquí descrito. En este trabajo se pretendió optimizar las condiciones de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonido por medio de la metodología de superficie de respuesta para conseguir maximizar la obtención de antocianos en pieles de uva. Los parámetros a optimizar fueron temperatura y tiempo de extracción, y la concentración de metanol. En este estudio se obtuvo que los mejores rendimientos eran a tiempo de extracción = 25,58 minutos, y temperatura = 50,65 °C. Estos resultados concuerdan con los de este estudio ya que la temperatura es prácticamente la misma, y el tiempo, aunque es menor, también es verdad que en el estudio de Ghafoor, Hui et al, no hacían extracciones más extensas de 25 minutos. Por lo que en ambos estudios se obtiene que tras realizar una superficie de respuesta, las condiciones óptimas eran las máximas propuestas para cada trabajo. El hecho de que el tiempo de extracción óptimo en el estudio de Ghafoor sea inferior al nuestro puede ser debido a la mayor extractabilidad de los antocianos de las pieles y al hecho de la utilización de metanol como solvente.

## 6. CONCLUSIONES

---

1. Tras realizar la verificación de los métodos de análisis de cantidad de polifenoles totales y actividad antioxidante, se determina que, atendiendo a su repetitividad y linealidad, nos permitirán obtener unos resultados fiables.
2. Analizando los resultados de la ANOVA realizada para la extracción sólido-líquida dependiendo del pretratamiento de secado usado en la muestra, se obtiene que para observar diferencias significativas entre los pretratamientos para el contenido en polifenoles es necesario alcanzar una temperatura de 50°C.
3. Durante la extracción sólido-líquido de las muestras se observó que conforme aumentaba la temperatura del tratamiento, se aumentaba los valores de polifenoles totales y actividad antioxidante. Fue notable que hubo un aumento considerable del rendimiento cuando se pasa de 40 a 50 °C en la extracción sólido-líquida, tanto cuando las muestras se habían tratado con secado por liofilización o por estufa a vacío.
4. De forma general analizando la actividad antioxidante se confirmó que los mayores valores se obtenían conforme aumentaba la temperatura de extracción, y que al comparar los métodos de secado previos, resultaba mejor actividad antioxidante cuando las semillas de uva se secaban mediante liofilización.
5. Haciendo una comparación global de la extracción sólido-líquida teniendo en cuenta la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante, se concluyó que los mejores valores se obtenían tras secar la muestra con un proceso de liofilización y una posterior extracción a una temperatura de 50 °C
6. En la optimización de las condiciones de extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos, el parámetro que mejor responde al análisis estadístico es el DPPH, por lo que éste será el parámetro más indicado a seguir para futuros estudios, ya que es el que presenta un mejor ajuste al modelo.
7. La conclusión general que se obtiene de la optimización de las condiciones de la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos, es que los mejores rendimientos se produjeron cuando los valores de las condiciones fueron máximas (50 °C, 50 minutos, 100 % intensidad ultrasonido)

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Adjé, F., Y. F. Lozano, et al. (2010). "Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction." Industrial Crops and Products 32(3): 439-444.

Ahn, J., I. U. Grün, et al. (2002). "Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef." Journal of Food Science 67(4): 1364-1369.

Ahn, J. H., Y. P. Kim, et al. (2008). "Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil." Journal of Food Engineering 84(2): 327-334.

Al-Awwadi, N. A., A. Bornet, et al. (2004). "Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(18): 5593-5597.

Anastacio, A. and I. S. Carvalho (2013). "Phenolics extraction from sweet potato peels: Key factors screening through a Placket-Burman design." Industrial Crops and Products 43: 99-105.

Anastasiadi, M., H. Pratsinis, et al. (2010). "Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts." Food Research International 43(3): 805-813.

Anastasiadi, M., H. Pratsinis, et al. (2012). "Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties." LWT - Food Science and Technology 48(2): 316-322.

Apak, R., K. Guclu, et al. (2004). "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(26): 7970-7981.

Arnao, M. B. (2001). "Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case." Trends in Food Science and Technology 11(11): 419-421.

Arnous, A., D. P. Makris, et al. (2001). "Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(12): 5736-5742.

Aruoma, O. I. (1999). "Free radicals, antioxidants and international nutrition." Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 8(1): 53-63.

Aruoma, O. I., T. Bahorun, et al. (2003). "Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts." Mutation Research - Reviews in Mutation Research 544(2-3): 203-215.

Benzie, I. F. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay." Analytical Biochemistry 239(1): 70-76.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Bocco, A., M. E. Cuvelier, et al. (1998). "Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts." Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(6): 2123-2129.

Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, et al. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." LWT - Food Science and Technology 28(1): 25-30.

Bravo, L., R. Abia, et al. (1994). "Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties." Journal of Agricultural and Food Chemistry 42(7): 1481-1487.

Bucic-Kojic, A., M. PlaniniÄž, et al. (2007). "Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds." Journal of Food Engineering 81(1): 236-242.

Cao, G., S. L. Booth, et al. (1998). "Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables." American Journal of Clinical Nutrition 68(5): 1081-1087.

Carrera, C., A. Ruiz-Rodríguez, et al. (2012). "Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes." Analytica Chimica Acta 732: 100-104.

Casazza, A. A., B. Aliakbarian, et al. (2010). "Antioxidants from winemaking wastes: A study on extraction parameters using response surface methodology." Journal of Food Biochemistry 36(1): 28-37.

Casazza, A. A., B. Aliakbarian, et al. (2010). "Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques." Journal of Food Engineering 100(1): 50-55.

Casazza, A. A., B. Aliakbarian, et al. (2012). "High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins." International Journal of Food Science and Technology 47(2): 399-405.

Chen, G., Y. Wang, et al. (2012). "Rapid and selective quantification of l-theanine in ready-to-drink teas from Chinese market using SPE and UPLC-UV." Food Chemistry 135(2): 402-407.

Chira K, C. S., D. Guillaume and P.-L. Teissedre (2007). "Extraction optimisation of grape (Cabernet Sauvignon, Merlot) tannins and anthocyanins from different Bordeaux terroirs."

Deng, D., J. Zhang, et al. (2006). "Methylated polyphenols are poor "chemical" antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity." FEBS Letters 580(22): 5247-5250.

Donma, M. M. and O. Donma (2005). "Phytonutrients and children: The other side of the medallion." Food Research International 38(6): 681-692.

Ebeler, S. E., C. A. Brennehan, et al. (2002). "Dietary catechin delays tumor onset in a transgenic mouse model." American Journal of Clinical Nutrition 76(4): 865-872.

Estévez, M., P. Kylli, et al. (2008). "Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(22): 10933-10940.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Estévez, M., S. Ventanas, et al. (2007). "Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents." Food Chemistry 100(1): 55-63.

Estruch, R. (2000). "Wine and cardiovascular disease." Food Research International 33(3-4): 219-226.

Falleh, H., R. Ksouri, et al. (2012). "Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots." Tropical Journal of Pharmaceutical Research 11(2): 243-249.

Fernández-Pachón, M. S., D. Villaño, et al. (2005). "Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(12): 5024-5029.

Foti, M. C., C. Daquino, et al. (2004). "Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH. Radical in Alcoholic Solutions." Journal of Organic Chemistry 69(7): 2309-2314.

Frankel, E. N. and A. S. Meyer (2000). "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." Journal of the Science of Food and Agriculture 80(13): 1925-1941.

Frankel, E. N., A. L. Waterhouse, et al. (1995). "Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(4): 890-894.

Galvan D'Alessandro, L., K. Kriaa, et al. (2012). "Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry." Separation and Purification Technology 93: 42-47.

Ganhao, R., D. Morcuende, et al. (2010). "Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage." Meat Science 85(3): 402-409.

Garcia-Salas, P., A. Morales-Soto, et al. (2010). "Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples." Molecules 15(12): 8813-8826.

Ghafoor, K., T. Hui, et al. (2009). "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology." Journal of Food Biochemistry 35(3): 735-746.

Ghiselli, A., M. Serafini, et al. (1995). "A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability." Free Radical Biology and Medicine 18(1): 29-36.

Hagerman, A. E., K. M. Riedl, et al. (1998). "High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants." Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(5): 1887-1892.

Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, et al. (2002). "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships." Journal of Nutritional Biochemistry 13(10): 572-584.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Hossain, M. B., N. P. Brunton, et al. (2012). "Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology." Ultrasonics Sonochemistry 19(3): 582-590.

Hu, M., D. J. McClements, et al. (2004). "Antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich extract from grape seed in whey protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(16): 5272-5276.

Hurtado, I., P. Caldé, et al. (1997). "Antioxidative Capacity of Wine on Human LDL Oxidation *in vitro*: Effect of Skin Contact in Winemaking of White Wine." Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(4): 1283-1289.

Ikawa, M., T. D. Schaper, et al. (2003). "Utilization of folin-ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(7): 1811-1815.

Kähkönen, (1999). "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(10): 3954–3962.

Kanner, J., E. Frankel, et al. (1994). "Natural antioxidants in grapes and wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry 42(1): 64-69.

Karabegovic, I., M. Nikolova, et al. (2011). "Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the artemisia sp. recovered by different extraction techniques." Chinese Journal of Chemical Engineering 19(3): 504-511.

Katalinic, V., S. S. Mocina, et al. (2010). "Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia)." Food Chemistry 119(2): 715-723.

Kostalova, Z., Z. Hromadkova, et al. (2013). "Polysaccharides from the Styrian oil-pumpkin with antioxidant and complement-fixing activity." Industrial Crops and Products 41(1): 127-133.

Krishnan, R. and G. B. Maru (2006). "Isolation and analyses of polymeric polyphenol fractions from black tea." Food Chemistry 94(3): 331-340.

Krishnaswamy, K., V. Orsat, et al. (2012). "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (*Vitis vinifera*)." Food and Bioprocess Technology: 1-15.

Landrault, N., P. Poucheret, et al. (2001). "Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(7): 3341-3348.

Latoui, M., B. Aliakbarian, et al. (2012). "Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L." Food and Bioproducts Processing.

Lau, D. W. and A. J. King (2003). "Pre- and post-mortem use of grape seed extract in dark poultry meat to inhibit development of thiobarbituric acid reactive substances." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(6): 1602-1607.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Lemanska, K., H. Szymusiak, et al. (2001). "The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones." Free Radical Biology and Medicine 31(7): 869-881.

Lieu, L. N. and V. V. M. Le (2010). "Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing." Ultrasonics Sonochemistry 17(1): 273-279.

Lv, J., L. Yu, et al. (2012). "Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour." Food Chemistry 135(2): 325-331.

Maier, T., A. Schieber, et al. (2009). "Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants." Food Chemistry 112(3): 551-559.

Makris, D. P., G. Boskou, et al. (2007). "Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures." Bioresource Technology 98(15): 2963-2967.

Makris, D. P., E. Psarra, et al. (2003). "The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines." Food Research International 36(8): 805-814.

Mantle, D., J. G. Anderton, et al. (1998). "Comparison of methods for determination of total antioxidant status: Application to analysis of medicinal plant essential oils." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 121(4): 385-391.

Medina, I., S. Lois, et al. (2006). "Functional fatty fish supplemented with grape procyanidins. Antioxidant and proapoptotic properties on colon cell lines." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(10): 3598-3603.

Minussi, R. C., M. Rossi, et al. (2003). "Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines." Food Chemistry 82(3): 409-416.

Morelli, L. L. L. and M. A. Prado (2012). "Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology." Ultrasonics Sonochemistry 19(6): 1144-1149.

Murga, R., R. Ruiz, et al. (2000). "Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol." Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(8): 3408-3412.

Nithiyantham, S., P. Siddhuraju, et al. (2013). "A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts." Industrial Crops and Products 43: 261-269.

Ordoudi, S. A. and M. Z. Tsimidou (2006). "Crocic bleaching assay step by step: Observations and suggestions for an alternative validated protocol." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(5): 1663-1671.

Ou, B., M. Hampsch-Woodill, et al. (2001). "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(10): 4619-4626.

Ou, B., D. Huang, et al. (2002). "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study." Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(11): 3122-3128.

Ozoglu, H. and A. Bayndrl (2002). "Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents." Food Control 13(4-5): 213-221.

Palma, M. and C. G. Barroso (2002). "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products." Analytica Chimica Acta 458(1): 119-130.

Pan, Z., W. Qu, et al. (2012). "Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel." Ultrasonics Sonochemistry 19(2): 365-372.

Pinelo, M., J. Sineiro, et al. (2006). "Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts." Journal of Food Engineering 77(1): 57-63.

Pingret, D., A. S. Fabiano-Tixier, et al. (2012). "Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace." Journal of Food Engineering 111(1): 73-81.

Prior, R. L. and G. Cao (1999). "*In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods." Free Radical Biology and Medicine 27(11-12): 1173-1181.

Prior, R. L., X. Wu, et al. (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(10): 4290-4302.

Proestos, C., N. Chorianopoulos, et al. (2005). "RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(4): 1190-1195.

Re, R., N. Pellegrini, et al. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radical Biology and Medicine 26(9-10): 1231-1237.

Renaud, S. and M. De Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet 339(8808): 1523-1526.

Richelle, M., I. Tavazzi, et al. (2001). "Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(7): 3438-3442.

Rivero, D., S. Pérez-Magariño, et al. (2005). "Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(9): 3637-3642.

Robbins, R. J. (2003). "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(10): 2866-2887.

Roedig-Penman, A. and M. H. Gordon (1997). "Antioxidant Properties of Catechins and Green Tea Extracts in Model Food Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(11): 4267-4270.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Rojas-Barquera, D. and C. E. Narváez-Cuenca (2009). "Vitamin C, total phenolic compounds and antioxidant activity in guava (*Psidium guajava* L.) fruits from Colombia." Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia 32(9): 2336-2340.

Ruidavets, J. B., P. L. Teissedre, et al. (2000). "Catechin in the Mediterranean diet: Vegetable, fruit or wine?" Atherosclerosis 153(1): 107-117.

Ruzic, I., M. Åkerget, et al. (2011). "Phenolic content and antioxidant potential of macerated white wines." European Food Research and Technology 233(3): 465-472.

Sánchez-Escalante, A., D. Djenane, et al. (2001). "The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere." Meat Science 58(4): 421-429.

Sánchez-Moreno, C. (2002). "Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems." Food Science and Technology International 8(3): 121-137.

Sánchez-Moreno, C., J. A. Larrauri, et al. (1998). "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols." Journal of the Science of Food and Agriculture 76(2): 270-276.

Santos-Buelga, C. and A. Scalbert (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." Journal of the Science of Food and Agriculture 80(7): 1094-1117.

Saura-Calixto, F. and I. Goñi (2006). "Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet." Food Chemistry 94(3): 442-447.

Serrano, J., I. Goñi, et al. (2007). "Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity." Food Research International 40(1): 15-21.

Siddhuraju, P. and K. Becker (2003). "Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(8): 2144-2155.

Silva, E. M., H. Rogez, et al. (2007). "Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology." Separation and Purification Technology 55(3): 381-387.

Simonetti, P., P. Pietta, et al. (1997). "Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(4): 1152-1155.

Singleton, V. L., R. Orthofer, et al. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 299: 152-178.

Siquet, C., F. Paiva-Martins, et al. (2006). "Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids - A structure-activity relationship study." Free Radical Research 40(4): 433-442.

Soria, A. C. and M. Villamiel (2010). "Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review." Trends in Food Science and Technology 21(7): 323-331.

Sreeramulu, D. and M. Raghunath (2010). "Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India." Food Research International 43(4): 1017-1020.

Tabaraki, R. and A. Nateghi (2011). "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology." Ultrasonics Sonochemistry 18(6): 1279-1286.

Tanabe, H., M. Yoshida, et al. (2002). "Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat." Animal Science Journal 73(5): 389-393.

Torres, J. L., C. Lozano, et al. (2002). "Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties." Bioorganic and Medicinal Chemistry 10(8): 2497-2509.

Trichopoulou, A., T. Costacou, et al. (2003). "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population." New England Journal of Medicine 348(26): 2599-2608.

Velioglu, Y. S., G. Mazza, et al. (1998). "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products." Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(10): 4113-4117.

Villaño, D., M. S. Fernández-Pachón, et al. (2005). "Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*." Analytica Chimica Acta 538(1-2): 391-398.

Vinson, J. A. and B. A. Hontz (1995). "Phenol antioxidant index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(2): 401-403.

Virost, M., V. Tomao, et al. (2010). "Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction." Ultrasonics Sonochemistry 17(6): 1066-1074.

Vuorela, S., H. Salminen, et al. (2005). "Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(22): 8492-8497.

Weidner, S., A. Powawska, et al. (2012). "Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines-comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds." International Journal of Molecular Sciences 13(3): 3444-3457.

Wijngaard, H. H., M. Ballay, et al. (2012). "The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids." Food Chemistry 133(4): 1123-1130.

Winston, G. W., F. Regoli, et al. (1998). "A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids." Free Radical Biology and Medicine 24(3): 480-493.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Wu, X., G. R. Beecher, et al. (2004). "Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(12): 4026-4037.

Yilmaz, Y. and R. T. Toledo (2004). "Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(2): 255-260.

Yu, T. W. and C. N. Ong (1999). "Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): Rationale, application, and limitation." Analytical Biochemistry 275(2): 217-223.

Zheng, W. and S. Y. Wang (2001). "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(11): 5165-5170.

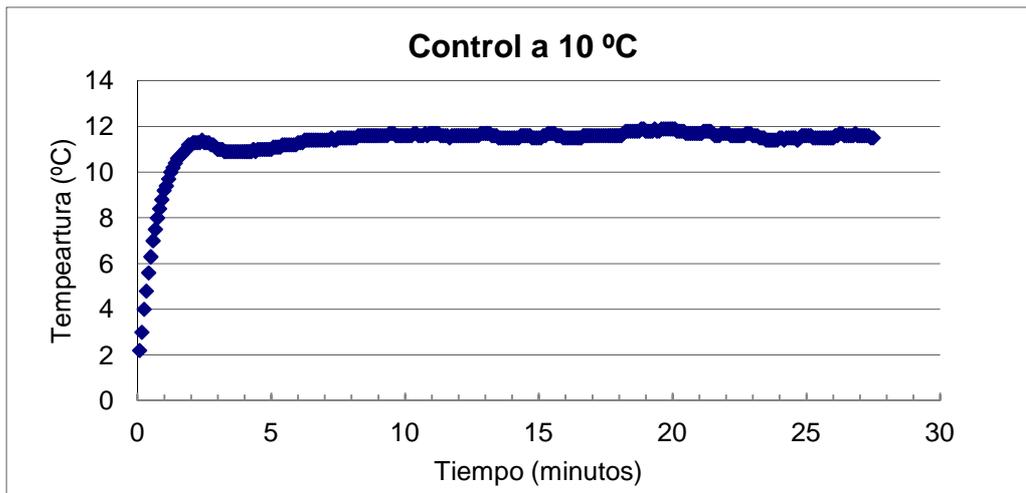
Zouari, S., M. Ketata, et al. (2013). "Allium roseum L. volatile compounds profile and antioxidant activity for chemotype discrimination - Case study of the wild plant of Sfax (Tunisia)." Industrial Crops and Products 41(1): 172-178.

# 8. ANEJOS

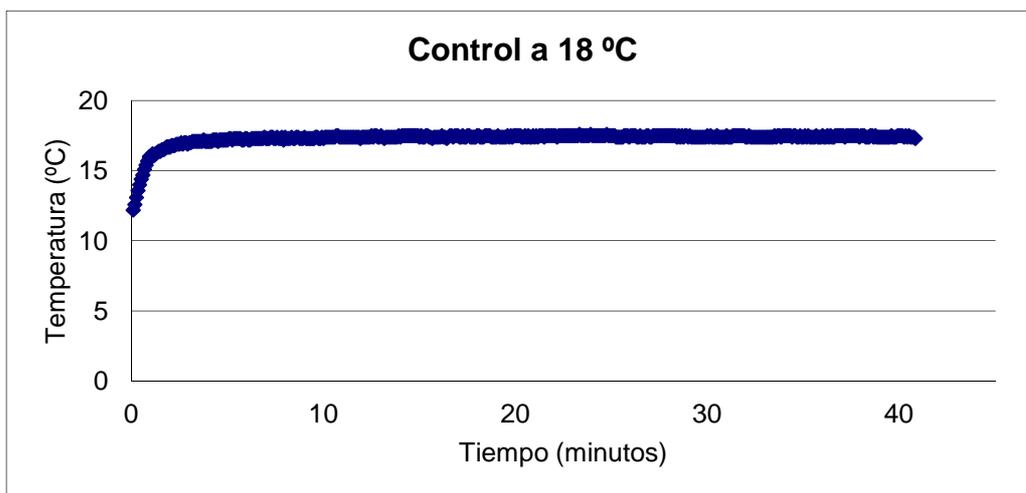
---

## ANEJO 1

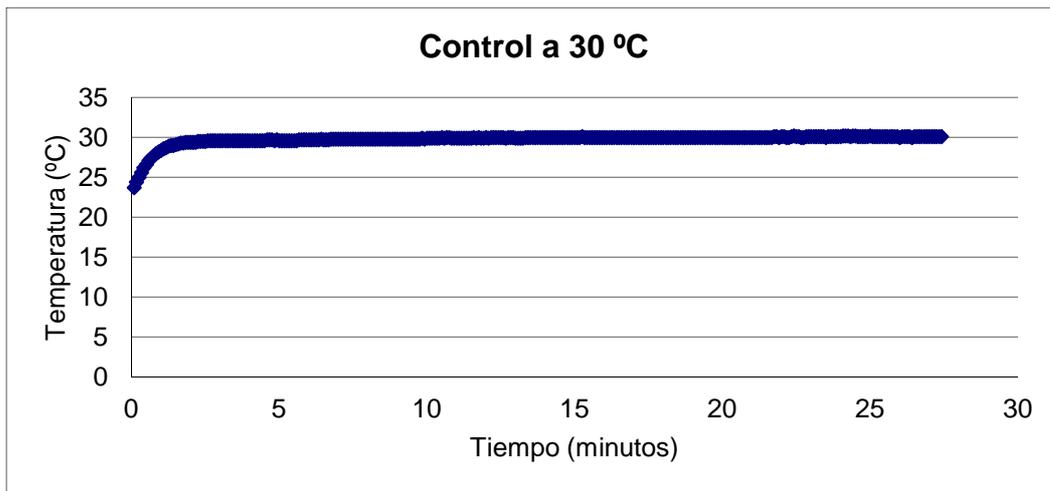
A continuación vienen expuestas las gráficas de control de temperatura de la muestra en la extracción sólido-líquida asistida por ultrasonidos. Cada una de las gráficas es un ejemplo de cada una de las diferentes temperaturas



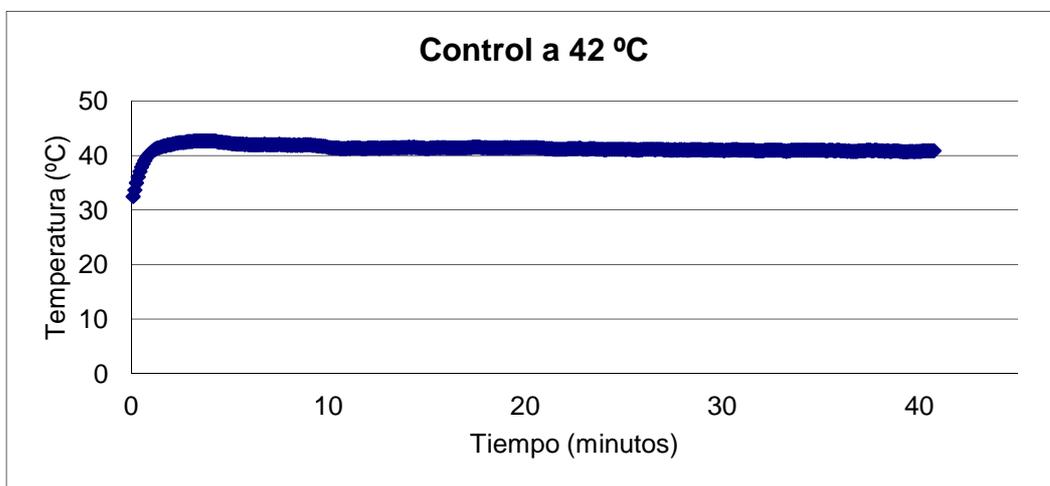
Gráfica 8.1. Control de temperatura a 10 °C



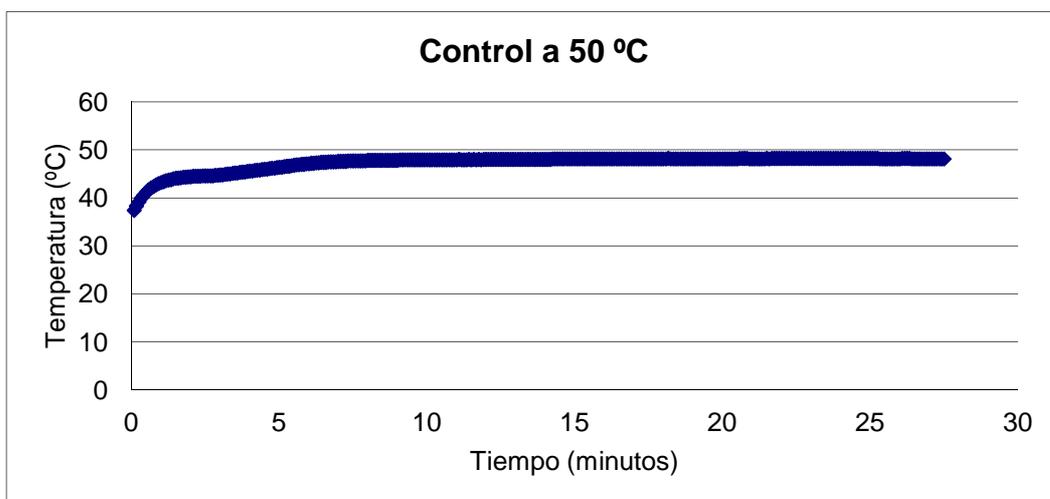
Gráfica 8.2. Control de temperatura a 18 °C



Gráfica 8.3. Control de temperatura a 30 °C



Gráfica 8.4. Control de temperatura a 42 °C



Gráfica 8.5. Control de temperatura a 50 °C