



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

"APLICACION DE LA TECNOLOGIA ENZIMATICA EN LA EXTRACCION DE
ANTIOXIDANTES FENOLICOS DESDE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES"

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900198754

Liza Eva Laroze Navarrete

Directora de Tesis: Dra. María Elvira Zúñiga Hansen.

Agosto, 2010

La tesis "Aplicación de tecnología enzimática en la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos agroindustriales " ha sido evaluada por el tribunal compuesto por:

Dr. Michael Seeger Pfeiffer de la Universidad Técnica Federico Santa María - Presidente de la comisión evaluadora.

Dr. Gonzalo Buono-Core Varas de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso - Profesor del Programa de Doctorado en Biotecnología.

Dra. Mónica Rubilar Díaz de la Universidad de la Frontera - Evaluador Externo.

Dr. Eduardo Agosin Trumper de la Pontificia Universidad Católica – Evaluador Externo.

A mi madre, profesora Sra. Patricia Navarrete Carvallo por ser mi modelo de vida a seguir.

A Pepe por su bondad y comprensión.

A Martín por la alegría de su llegada y

A mi padre, profesor Dr. Luciano Laroze Barrios, *in memoriam*

Con todo cariño

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido en mayor o menor grado a la realización de esta tesis doctoral, especialmente:

A mi directora de tesis, Dra. María Elvira Zúñiga Hansen, por depositar su confianza en mí y fomentar mi espíritu crítico, por su ayuda y provechosas sugerencias.

A Michael Seeger y Germán Aroca, por sus gestiones salvadoras para concretar la presentación de este trabajo.

A Carmen Soto por su disponibilidad y su inmensa generosidad al compartir los conocimientos y experiencias profesionales de manera desinteresada.

A los miembros de la querida salita de postgrado y no menos estimados asociados: Araceli, Carolina, Glenda, Jacqueline, Lorena, Paulina, Romina, Rosy, Silvana, Eduardo, Igor, Mauricio, Pedro y Ociel. Por recorrer este camino junto a mí y brindarme su amistad; francamente, sin su ayuda no estaría escribiendo estas líneas.

Mi agradecimiento más sincero a la Escuela de Ingeniería Bioquímica por el excelente trato y consideración que siempre he recibido. Al personal que forma parte de esta institución, a Maritza, Claudia, Catalina y a los guardias de la puerta de la Facultad.

Al CREAS y a quienes han sido parte de sus oficinas administrativas, en particular a Fabiola, Lina, Silvana, César y Pablo, por su estímulo positivo para la preparación final de este manuscrito.

Al grupo de trabajo liderado por la Dra. Herminia Domínguez, una bellísima persona e investigadora de alto nivel. Al Dr. Andrés Moure por su paciencia al enseñarme a utilizar el equipo supercrítico; a Bea, Chus, Emma y Noelia, por recibirme en el laboratorio mientras realizaba la pasantía en la Universidad de Vigo. A Male, quién durante ese período me acogió con los brazos abiertos e hizo de su hogar en Ponferrada un refugio para el espíritu.

A mi madre por su apoyo incondicional, por enseñarme a actuar de acuerdo a convicciones personales, a mantener la palabra empeñada, y a no dejarme abatir frente la adversidad. Mi gratitud es aún mayor desde el momento en que nació mi hijo, beneficiario de sus tiernos cuidados. A mi abuela Elisa y a mi padre, Luciano, aunque ya no me acompañan físicamente, de alguna manera otorgan su protección.

A mi hermano David por incentivar me a perseguir mis objetivos hasta concretar las metas propuestas, a Laura y Nicolás por llenar nuestro entorno de alegría.

A la señora Tina por el soporte técnico y afectivo que me ha entregado desde que contamos con su presencia en nuestra casa. A la tía Titi, por haber sido parte fundamental de mi crecimiento y por proporcionar a Pichuche gran júbilo con sus cantos y trucos.

A mis suegros Flor y Luis, a mi cuñada Yani por acogerme con cariño en su núcleo familiar.

A mi hermana del alma, Paula y a sus amadísimos padres Chely y Lalo por los gratos momentos compartidos en estas tres décadas de convivencia ininterrumpida. A los mellizos Amaro y Canela por la dicha de verlos crecer junto a Martín y compartir sus juegos.

A Cindy, Estefanía, Eva, Matilde, May-Lin, Mónica, Lorena, Luly y Verónica, mis amigas y compañeras de viaje, por su cercanía y múltiples atenciones.

A Pepe, por reconocer el valor de mi formación profesional, por comprender mis ausencias, por su entrega y dedicación, muchísimas gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO 1.....	5
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPITULO 2.....	8
HIPOTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	8
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
CAPITULO 3.....	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	10
3.1.1 Antioxidantes sintéticos.....	10
3.1.2 Antioxidantes naturales.....	12
3.1.2.1 Carotenoides, ácido ascórbico y tocoferoles.....	12
3.1.2.2 Compuestos fenólicos.....	13
3.1.2.2.1 Definición de los compuestos fenólicos.....	13
3.1.2.2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos.....	13
<i>Clasificación de los flavonoides.....</i>	15
3.2 ROL DE LOS ANTIOXIDANTES EN LOS PROCESOS DE OXIDACIÓN.....	18
3.3 FUENTES NATURALES DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	22
3.4 ANTIOXIDANTES FENÓLICOS OBTENIDOS A PARTIR DE DESECHOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA.....	23
3.4.1 Industria procesadora de frutas y hortalizas en Chile.....	23
3.4.2 Antioxidantes fenólicos obtenidos a partir de desechos agroindustriales.....	24
3.5 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DESDE FUENTES DE ORIGEN VEGETAL.....	26
3.6 APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN POR SOLVENTES.....	33
3.6.1 Aplicación de las enzimas en la industria alimenticia.....	33
3.6.2 Extracción por solventes de compuestos fenólicos asistida por enzimas.....	34
3.7 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	41
3.7.1 Métodos para evaluar la actividad secuestradora de radicales libres.....	42
3.7.1.1 Actividad secuestradora del radical 2,2 difenil-1- picril hidracilo o Método DPPH.....	42
3.7.1.2 Actividad secuestradora del radical catión 2,2,-3- etilbenzotiazolin-6-sulfonato o Método ABTS.....	44

3.7.1.3 Actividad secuestradora del radical catión N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilenediamina o	46
.....	
Método del DMPD.....	46
3.7.1.4 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	46
3.7.1.5 Método TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter).....	47
3.7.1.6 Método ORAC (Oxigen Radical Absorbance Capacity) o capacidad para absorber radicales de oxígeno.....	48
3.7.2 Métodos para evaluar la oxidación lipídica.....	49
3.7.2.1 Determinación de la oxidación lipídica en la etapa de iniciación.....	50
3.7.2.2 Determinación de la oxidación lipídica en la etapa de propagación.....	50
3.7.2.3 Determinación de la oxidación lipídica en la etapa de terminación.....	51
3.7.2.4 Otros métodos.....	53
CAPÍTULO 4.....	55
METODOLOGÍA.....	55
4.1 Materiales y equipos.....	55
4.1.1 Materias primas.....	55
4.1.2 Preparados enzimáticos.....	56
4.1.4 Equipos.....	58
4.2 Metodología analítica.....	58
4.2.1 Caracterización de los residuos agroindustriales.....	58
4.2.1.1 Proteínas.....	59
4.2.1.2 Cenizas.....	61
4.2.1.3 Humedad.....	61
4.2.1.4 Aceite total.....	62
Procedimiento:.....	63
4.2.1.6 Fibra Insoluble en Detergentes.....	63
4.2.1.6.1 Fibra Neutro Detergente.....	65
4.2.1.6.2 Fibra Ácido Detergente.....	66
4.2.1.6.3 Lignina.....	67
4.2.1.7 Pectinas.....	68
4.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales extraíbles.....	69
4.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	71
4.2.3.1 Método de captación del radical DPPH.....	71
Procedimiento:.....	72
4.2.3.2 Método de captación del radical ABTS.....	72
4.2.3.3 FRAP (Poder antioxidante o de reducción del hierro).....	74
4.2.4 Determinación del índice de peróxido.....	76

3.1 Efecto del tipo de biocatalizador sobre la recuperación enzimáticamente asistida de compuestos fenólicos con actividad antioxidante obtenidos a partir de residuos agroindustriales	84
CAPITULO 5.....	89
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES RESIDUALES PROVENIENTES DEL PROCESADO DE ARÁNDANO AZUL, ARÁNDANO ROJO, FRAMBUESA, DURAZNO, PERA, PERA DESPLUMADA, PERA TAMIZADA Y PIMENTÓN	89
5.1.1 Caracterización proximal de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	89
5.1.2 Composición de los principales polisacáridos de la pared celular de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.	92
5.2 Determinación de las condiciones estándar de extracción convencional sólido/líquido de compuestos fenólicos	95
5.2.1 Selección de los residuos agroindustriales	95
5.2.2 Efecto de la temperatura sobre las cinéticas de extracción de antioxidantes fenólicos obtenidos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa.	100
5.2.4 Efecto del pH en la extracción convencional de residuos agroindustriales de arándano azul, arándano rojo y frambuesa.....	105
5.2.5 Estudio de las interacciones entre parámetros en la extracción de antioxidantes fenólicos	108
5.3 Tratamiento enzimático durante la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.	119
5.3.1 Pre-selección de biocatalizadores comerciales para la extracción de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas desde residuos de frambuesa	119
5.3.2 Efecto de la temperatura sobre la extracción de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas a partir de residuos de frambuesa.....	122
5.3.3.2 Efecto de la concentración de enzima en el tratamiento enzimático durante la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de frambuesa	132
5.3.5 Estudio de las interacciones entre parámetros en la extracción acuosa enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa	136
5.4 Estabilidad oxidativa de aceite crudo de pepa de uva en presencia de distintos antioxidantes	139
5.5 CONSIDERACIONES FINALES	143
CAPITULO 6.....	145
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	145
6.1 CONCLUSIONES	145
6.2 RECOMENDACIONES.....	146
6.3 PROYECCIONES.....	147

CAPITULO 7.....	148
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1: Residuos agroindustriales sólidos en estudio.....	55
Tabla 4.2: Preparados Enzimáticos comerciales utilizados en este trabajo.....	56
Tabla 4.3: Lista de los principales reactivos.....	57
Tabla 4.4: Preparación de las soluciones para la determinación de proteínas por el método Kjeldahl.....	59
Tabla 4.5: Preparación de la solución neutro detergente.....	65
Tabla 4.6: Preparación de la solución ácido detergente.....	66
Tabla 4.7: Análisis realizados en materias primas para obtener antioxidantes fenólicos.....	79
Tabla 4.8: Matriz del diseño factorial para la extracción convencional por solvente de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa.....	83
Tabla 4.9: Matriz del diseño factorial para la extracción acuosa enzimáticamente asistida desde residuos de frambuesa.....	87
Tabla 5.1: Contenido en Fibras Neutro detergente y Ácido Detergente de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	92
Tabla 5.2: Resumen de los valores de la función objetiva en las condiciones del punto central de los modelos de superficie respuesta para la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa.....	117
Tabla 5.3: Recuperación enzimáticamente asistida de extractos fenólicos con propiedades antioxidantes desde residuos de frambuesa.....	119

INDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Antioxidantes sintéticos más empleados en la industria alimenticia.....	11
Figura 3.2: Estructura química de los principales ácidos fenólicos.....	14
Figura 3.3: Estructura química de los principales flavonoides	17
Figura 3.4: Estructura básica de los taninos.....	18
Figura 4.1: Curva de calibrado para la determinación del contenido total de fenoles extraíbles en equivalentes de ácido gálico.....	71
Figura 4.2: Curva de calibrado para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH en equivalentes Trolox.....	72
Figura 4.3: Curva de calibrado para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del ABTS en equivalentes Trolox	74
Figura 4.4: Curva de calibrado para la determinación del poder reductor del hierro en equivalentes de ácido ascórbico.....	75
Figura 4.5: Actividades desarrolladas en el estudio de la aplicación de la tecnología enzimática en la extracción de antioxidantes fenólicos a partir de residuos agroindustriales sólidos.....	78
Figura 4.6: Selección de un preparado enzimático comercial para aplicar en la extracción de antioxidantes fenólicos a partir de residuos agroindustriales sólidos.....	79
Figura 4.7: Esquema de la estrategia metodológica empleada para la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos agroindustriales.....	88
Figura 5.1: Caracterización proximal de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	90
Figura 5.2: Composición de los principales polisacáridos de la pared celular de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	93
Figura 5.3: Rendimiento de extracción de sólidos solubles de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	96
Figura 5.4: Contenido total de compuestos fenólicos extraíbles de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	97
Figura 5.5: Actividad antioxidante medida por el método DPPH de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.....	98

Figura 5.6: Efecto de la temperatura sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano azul.....	101
Figura 5.7: Efecto de la temperatura sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano rojo	102
Figura 5.8: Efecto de la temperatura sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano frambuesa	103
Figura 5.9: Efecto del pH sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano azul.....	105
Figura 5.10: Efecto del pH sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano rojo.....	106
Figura 5.11: Efecto del pH sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.....	107
Figura 5.12: Superficies respuesta para los rendimientos de solidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de arándano azul en etanol:agua (50:50% v _{H₂O} /v _{EtOH}) a cortos y largos tiempos de contacto.....	110
Figura 5.13: Superficies respuesta para los rendimientos de solidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de arándano rojo en etanol:agua (50:50% v _{H₂O} /v _{EtOH}) a cortos y largos tiempos de contacto.....	112
Figura 5.14: Superficies respuesta para los rendimientos de solidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de frambuesa en etanol:agua (50:50% v _{H₂O} /v _{EtOH}) a cortos y largos tiempos de contacto.....	114
Figura 5.15: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción hidroalcohólica (75%/25% v _{H₂O} /v _{EtOH}) desde residuos de frambuesa.....	123
Figura 5.16: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción hidroalcohólica (50%/50% v _{H₂O} /v _{EtOH}) desde residuos de frambuesa.....	125
Figura 5.17: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción hidroalcohólica (25%/75% v _{H₂O} /v _{EtOH}) desde residuos de frambuesa.....	126
Figura 5.18: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción etanólica desde residuos de frambuesa.....	127
Figura 5.19: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción acuosa desde residuos de frambuesa.....	128

Figura 5.20: Efecto de la concentración de Enzima en la extracción hidroalcohólica (75%/25% v_{H_2O}/v_{EtOH}) de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.....	130
Figura 5.21: Efecto de la concentración de enzima en la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.....	132
Figura 5.22: Efecto del tiempo de incubación en la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.....	134
Figura 5.23: Superficies respuesta para los rendimientos de solidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos acuosos de residuos de frambuesa en obtenidos enzimáticamente a cortos y largos tiempos de contacto.....	138
Figura 5.24: Estabilidad oxidativa del aceite crudo de pepa de uva en presencia de distintos antioxidantes naturales y sintéticos.....	140

RESUMEN

Las industrias procesadoras de frutas y hortalizas producen una gran cantidad de residuos sólidos (hojas, tallos, cáscaras, carozos, semillas, etc.). En general, los descartes del procesamiento de frutas y hortalizas han sido empleados para alimentación animal y/o compostaje. En los últimos años, una diversidad de estudios han propuesto algunos subproductos vegetales como fuente de compuestos fenólicos con actividad antioxidante; sin embargo, poco se sabe en relación a las variables que condicionan dicha actividad, la cual no es predecible a priori y requiere de un exhaustivo estudio de parámetros tales como tiempo, temperatura y razón solvente/residuo para cada tipo específico de residuo. Por otro lado, la aplicación de biocatalizadores en procesos de extracción de compuestos fenólicos por solventes desde muestras de origen vegetal no ha sido extensamente analizada y a la fecha son muy pocos los trabajos dirigidos a evaluar la hidrólisis enzimática durante el mismo proceso de recuperación de antioxidantes fenólicos. Por tanto, el propósito de esta tesis es obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con relevantes actividades antioxidante desde residuos agroindustriales provenientes del procesamiento de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, durazno, pera y pimentón. Se espera que la degradación enzimática de los principales polímeros de la pared celular vegetal facilite el acceso de los solventes a los compuestos fenólicos contenidos en la matriz vegetal y mejore el rendimiento de extracción de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos enzimáticamente con respecto a extractos producidos sin tratamiento enzimático. Los antioxidantes fenólicos extraídos podrían ser empleados como conservantes en alimentos y cosméticos o como suplementos dietarios para la prevención de determinadas enfermedades crónicas, otorgando valor agregado a los descartes y ayudando a solucionar el problema de disposición de los desechos sólidos de la industria hortofrutícola chilena.

En una primera etapa de este trabajo, se realizó la caracterización proximal de los materiales residuales derivados del procesamiento de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera y pimentón, valorando su contenido de proteínas, cenizas, aceite, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno. Asimismo, para cada uno de ellos, se determinó el contenido en fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, fibra ácido de lignina y pectinas. En una segunda etapa, se estandarizó el protocolo de extracción convencional sólido/líquido de antioxidantes fenólicos a partir de los residuos anteriormente mencionados, evaluando el rendimiento de sólidos solubles (g extracto/100g muestra seca), el contenido fenólico (mg ácido gálico/g muestra seca) y la actividad antioxidante de los extractos ensayada por el método del radical 2,2 difenil-1- picrilhidracilo o DPPH (mmoles trolox/100g muestra seca). Con el residuo que ofrecía la mayor recuperación de polifenoles mediante la extracción convencional se realizó el estudio de la recuperación de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas durante el proceso de extracción, empleando mezclas hidroetánolicas y agua como sistemas extractores; en estas condiciones se evaluó el efecto de la concentración enzima/sustrato, la temperatura y el tiempo de extracción. Finalmente, se midió el efecto de la adición del extracto que presentó la mayor capacidad antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de aceite crudo de pepa de uva.

Sobre la caracterización proximal, en general, se observó un bajo contenido de proteínas, aceite y cenizas, para todos los residuos. Los residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, los cuales consistían principalmente en pieles y semillas, presentaron un elevado contenido de fibra cruda (mayor al 35%). La composición de las fibras sugirió que para una efectiva acción de enzimas hidrolíticas sobre la pared celular vegetal se requería de una combinación de celulasas, hemicelulasas y pectinasas.

Por medio de las cinéticas de extracción convencional de antioxidantes fenólicos desde los 8 residuos estudiados con un único solvente orgánico (metanol) a una temperatura, velocidad de agitación y razón solvente/residuo fijas de 50°C, 150 rpm y 20:1, respectivamente, se seleccionaron aquellos derivados de arándano azul, arándano rojo y frambuesa como las materias primas más adecuadas para la recuperación de polifenoles con actividad antioxidante.

Con estos tres descartes, se realizaron cinéticas de extracción de antioxidantes fenólicos, para definir los valores de temperatura y tiempo a considerar en un posterior diseño factorial 2^3 con repeticiones en el punto central, evaluando la interacción e influencia de la temperatura, tiempo de extracción y razón solvente/residuo en la extracción ya mencionada usando diferentes sistemas extractores. El diseño factorial se efectuó para agua, metanol, etanol, acetato de etilo así como para las mezclas hidrometanólicas e hidroetanólicas a una proporción 50/50% v/v. Globalmente, luego de analizar los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, en sólidos solubles, polifenoles y actividad antioxidante medida por el método DPPH, se observó que los valores más altos de temperatura y razón solvente/residuo resultaban favorables, mientras que la influencia del tiempo fue variable, en algunas ocasiones tiempos cortos eran suficientes para una adecuada extracción. Los extractos producidos con la mezcla hidroetanólica y con metanol ofrecían un mejor comportamiento antioxidante; sin embargo, industrialmente es preferible emplear etanol en combinación con agua que metanol, por tanto se seleccionó el primero como solvente extractor.

De las materias primas estudiadas, la pomasa de frambuesa resultó ser la fuente más promisoría para obtener un extracto antioxidante debido a su elevado contenido en polifenoles, a su gran capacidad para captar radicales libres DPPH y ABTS (2,2-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) y para reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} ; seleccionándose este residuo para el estudio posterior que midió el efecto de la incorporación de un tratamiento enzimático durante el proceso de extracción de antioxidantes fenólicos.

El efecto de las condiciones del tratamiento enzimático se efectuó con dos preparados enzimáticos, Grindamyl de Danisco y Maxoliva de DSM, y con la mezcla de ambas formulaciones en igual proporción. Estos biocatalizadores fueron preseleccionados desde una batería de 12 enzimas comerciales las que fueron evaluadas a una razón enzima/sustrato de 10%, comparando el extracto enzimáticamente obtenido con el de un control sin enzima bajo condiciones antes definidas. La extracción asistida con enzimas se evaluó para distintas temperaturas, mezclas de etanol y agua en distintas proporciones y razones enzima/sustrato. No se observaron diferencias entre ambos biocatalizadores ni efecto sinérgico de la mezcla de ambos. Las extracciones acuosa e hidroetanólica (75/25 % v H₂O/v EtOH) a 50°C para razones enzima/sustrato de 5 y 10% generaron extractos con mayor contenido fenólico y actividad antioxidante en comparación a los respectivos controles no enzimáticos. La extracción acuosa asistida enzimáticamente con Grindamyl al 5% enzima/sustrato mejoró la eficiencia de extracción por sobre la extracción convencional con agua; la extracción acuosa asistida con enzima en 6 horas de operación mostro igual resultado que la extracción convencional con agua después de 24 horas. Pese a que la extracción acuosa mediada por enzimas no presentó mejores recuperaciones de antioxidantes fenólicos como la extracción convencional por solvente, tiene algunas ventajas operacionales y se puede considerar como una tecnología viable para extraer polifenoles desde residuos de frambuesa.

La efectividad del extracto hidroetanólico de residuos de frambuesa para estabilizar un aceite crudo de pepa de uva fue analizada midiendo la magnitud de la alteración oxidativa a través del índice de peróxidos. El aceite crudo de pepa de uva con extracto de residuos de frambuesa fue más eficaz que el aceite que contenía ácido ascórbico, su acción fue similar a la inhibición de la oxidación lipídica obtenida con catequina y levemente inferior a la protección del aceite otorgada por el ácido gálico; sin embargo, el aceite con extracto de residuos de frambuesa presentó menor efectividad que el aceite que estabilizado con los antioxidantes sintéticos comerciales BHA, BHT y TBHQ.

ABSTRACT

Vegetable and fruits processing industries produce large amounts of solid wastes (leaves, stems, skins, hulls, seeds, etc.). Generally, by-products from handling and commercialization of vegetable and fruits have been used as animal food or for compost production. In recent years, a number of studies have suggested some of these agro-industrial residues as a source of phenolic compounds with antioxidant activity; however, few is known regarding the variables that conduct such activity, which is non predictable and requires an extensive study of the parameters such as time, temperature and solvent/residue ratio for each type of waste. On the other hand, application of biocatalysts on solid/liquid extraction of phenolic compounds from vegetable matrices has not been widely studied and there is a scarce amount of researches towards evaluating the enzymatic hydrolysis during the phenolic antioxidant recuperation process. Therefore, the aim of this thesis is to obtain extracts rich in phenolic compounds with relevant antioxidant properties from blueberry, cranberry, raspberry, peach, pear and pepper residues. It is expected that enzymatic degradation of the main cell wall polymers enables the solvents access to the phenolic compounds contained in the vegetable matrix and improves not only the polyphenol extraction yield but the antioxidant activity of the enzymatically obtained extracts with respect to the extracts obtained without enzyme addition. The obtained phenolic antioxidants could be used as preservatives in the food and cosmetic industry or as dietary supplements for the prevention of certain chronic diseases, giving added value to the waste and solving environmental problems caused by solid waste disposal of the Chilean agro-industry.

In a first stage, the proximal characterization of raw materials from blueberry, cranberry, raspberry, peach, pear and pepper processing was performed, determining the protein, oil, ash, crude fiber and non-nitrogen extract contents. Also, neutral and acid detergent fiber, lignin and pectin were measured. Secondly, the conventional solid/liquid extraction of phenolic antioxidants from the waste above mentioned was standardized, evaluating the soluble solid yield (g of extract/100g dry sample), the phenolic content (mg gallic acid/g dry sample) and the antioxidant activity of the extracts tested by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl or DPPH method (mmol trolox/100g dry sample). The residue that shown the greatest polyphenol recovery by means of the conventional solid/liquid extraction was used for the subsequent study of the phenolic antioxidant extraction assisted by enzymes during the extraction process, using hydroethanolic mixtures and water as extracting systems. Under these conditions, the effect of the enzyme/substrate ratio, temperature and incubation time was evaluated. Finally, the effect of the extract that showed the highest antioxidant capacity was evaluated over the oxidative stability of crude grape seed oil.

Regarding proximal characterization, a low content of proteins, oil and ash was observed for all residues. Blueberry, cranberry and raspberry residues, which mainly contain skin and seeds, showed a considerably high content of crude fiber, greater than 35%. The fiber composition suggested that for an effective action of hydrolytic enzymes on vegetable cell wall, a combination of cellulases hemicellulases and pectinases was required.

Conventional extraction kinetics for phenolic antioxidants using a single organic solvent (methanol) in batch system at 50°C with a solvent/residue ratio of 20:1 and 150 rpm of stirring was performed for the 8 residues studied, selecting those derived from blueberry, cranberry and raspberry processing as the most suitable raw materials for the recovery of polyphenols with antioxidant activity. These three by-products were subjected to additional studies for analyzing the extraction temperature effect. As a global tendency, the phenolic antioxidants recovery was improved with increase of the temperature and time of extraction, no neglecting the quality/activity of the obtained extracts. A full factorial 2³ experimental design was developed to evaluate the interaction and influence of three variables: time, temperature and solvent /residue ratio for extracts obtained from blueberry, cranberry and raspberry wastes using 6 different solvents/mixtures (water, ethanol, methanol, ethyl acetate, water/ethanol (50:50, v/v) and water/methanol (50:50, v/v).

After measuring the soluble solid content, polyphenols and DPPH free radical-scavenging capacity of the resulting extracts, it was observed that the higher values of temperature and solvent/residue ratio were better, while the influence of the extraction time was variable; sometimes short times of contact were enough for a proper extraction. Total phenolics and antioxidant activity of methanolic and hydroethanolic extracts were similar. However, methanol is a harsh organic solvent whereas a mixture of water and ethanol is more acceptable for application in food industry. Thus, water/ethanol mixture was chosen as extracting solvent in all subsequent studies.

Raspberry pomace was the most promising source for obtaining antioxidant extracts due to its high phenolic compounds contents, its capacity to scavenge DPPH and ABTS free radicals and its ferric reducing ability, selecting it for the following study that measured the effect of the enzymatic treatment incorporation during the phenolic antioxidant extraction process.

The effect of an enzymatic treatment applied during the phenolic antioxidant extraction from raspberry residues was analyzed using 2 preparations, Grindamyl (Danisco) and Maxoliva (DMS), and with a mixture of both biocatalyst in the same proportion. These formulations were chosen from a screening of 12 commercial enzymes that were evaluated at a 10% enzyme/substrate ratio, comparing the enzyme-hydrolyzed extracts to the control extracts obtained under the conditions previously described.

Enzyme-aided extraction was evaluated at different conditions of temperature, ethanol/water mixture and enzyme/substrate ratio. Grindamyl and Maxoliva did not present differences in their action. No synergic effect was observed in the mixture of both biocatalysts. Just enzymatic treatment with water and water:ethanol (75/25 % v H₂O/v EtOH) at 50°C for 5 and 10% enzyme/substrate ratio enhanced the phenolic content and antioxidant activity of obtained extracts in comparison to the respective non-enzymatic controls. Aqueous extraction enzymatically aided with Grindamyl at 5% enzyme/substrate ratio increased the extraction efficiency making it better than the conventional extraction; aqueous extraction enzymatically aided with 6 hours of incubation showed the same result than the conventional extraction after 24 hours. Despite aqueous extraction enzymatically aided did not improve the recuperation of phenolic compounds as the conventional extraction did, it has some operational advantages and it can be considered as a viable technology to extract polyphenols from raspbeerry waste.

The effectiveness of the raspberry waste hydroethanolic extract towards the stabilization of grape seed oil was examined following the magnitude of oxidative alteration by the measurement of peroxide value. Addition of raspberry wastes hydroethanolic extract inhibited the oxidation of grape seeds oil significantly in comparison to the control oil (without antioxidants). The oil supplemented with raspberry waste hydroethanolic extract was more effective than the oil containing ascorbic acid, its action was similar to the inhibition of the lipid oxidation obtained with catechin and slightly lower than the oil protection given by gallic acid. However, oil whit raspberry extract was less effective than the oil stabilized with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo misceláneo de especies orgánicas que poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos a él. Son principalmente productos secundarios derivados del metabolismo de las plantas y están abundantemente distribuidos en el reino vegetal. Un gran número de compuestos fenólicos presentan propiedades antioxidantes, en particular otorgan protección frente a la oxidación lipídica.

El vasto interés en el empleo de antioxidantes provenientes de fuentes vegetales para incrementar la vida útil de alimentos se debe tanto al creciente requerimiento del consumidor en la seguridad de los aditivos alimenticios como a la toxicidad de los antioxidantes sintéticos. Indudablemente, esto ha contribuido a la abundante información sobre la actividad antioxidante de los compuestos naturales derivados de plantas que se ha publicado en la última década. Dado que diversos estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos fenólicos de vegetales presentan actividades antioxidantes que a menudo sobrepasan las de vitamina C, tocoferoles y carotenoides, es que los polifenoles se perfilan como la mejor alternativa natural para reemplazar antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, galato de propilo y butilhidroquinona terciaria, que son comúnmente usados en grasas y aceites por su efectividad y bajo costo.

Los residuos agroindustriales constituidos principalmente por pieles, cáscaras, cuescos o semillas, son fuentes especialmente atractivas para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos pues presentan un mayor contenido de polifenoles, potencialmente útiles como antioxidantes, que las fracciones internas correspondientes. La extracción de estas distintas sustancias revalorizaría una fracción de desecho, cuya eliminación suele suponer un problema de gestión para las empresas productoras, y originaría compuestos útiles en el campo alimentario, cosmético o farmacológico.

En Chile, la agroindustria genera miles de toneladas al año, de bagazo, pomasa y orujo, provenientes de los rubros, conservas, deshidratados, congelados y jugos. En general, poseen un alto contenido de material orgánico y pueden utilizarse como fertilizantes o como alimento para animales. La producción de compost a partir de descartes de frutas y

vegetales requiere un riguroso control de aireación, temperatura, pH y humedad para evitar la generación de ácidos orgánicos, muchos de los cuales causan olores desagradables; además, el compostaje de residuos agroindustriales demanda altos costos de inversión en la tecnología necesaria para el adecuado control del proceso. Mientras que el uso de residuos agroindustriales en alimentación animal puede estar restringida por consideraciones nutricionales, como altos niveles de lignina, celulosa, hemicelulosa y pectina, bajos niveles de proteína y presencia de factores antinutricionales para los animales como taninos o glucosinatos. Por tanto la alternativa de revalorizar estos residuos mediante la recuperación de compuestos fenólicos se convierte en una alternativa interesante de evaluar técnica y económicamente.

El proceso de extracción por solvente es el procedimiento más frecuentemente usado para recuperar antioxidantes fenólicos desde muestras vegetales. La selección de uno o más solventes que sean eficientes para extraer polifenoles, depende tanto de las diferentes características físicas y químicas de los vegetales sometidos a extracción como de las especies fenólicas que se desean aislar.

La extracción convencional sólido/líquido de antioxidantes fenólicos depende de factores ambientales, como solventes orgánicos, altas temperaturas, tiempos de operación, pH extremos, entre otros. Si bien el uso de una temperatura elevada en la extracción puede favorecer la extracción de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante del extracto resultante puede verse disminuida debido a la temperatura aplicada. Por lo tanto es necesario desarrollar procesos de extracción de antioxidantes naturales mediante condiciones suaves y efectivas, que favorezcan la extracción de los compuestos fenólicos sin perjudicar su actividad antioxidante.

La aplicación de enzimas de bajo costo para degradar polímeros como celulosa, hemicelulosa, pectina y mejorar tanto el rendimiento como la calidad de los productos, es común en la industria alimentaria. Gracias al avance biotecnológico, actualmente, es posible contar con productos enzimáticos de menor costo, mejor estabilidad y mayor versatilidad, incrementando su potencial de aplicación a los procesos productivos. Sumado a lo anterior, el costo casi despreciable de los descartes agroindustriales, podrían sustentar la factibilidad de su aplicación para la obtención de antioxidantes desde residuos agroindustriales, con el consecuente beneficio ambiental por su reutilización.

La degradación enzimática de los principales polímeros de la pared celular vegetal, facilitaría el acceso de los solventes a los compuestos fenólicos contenidos en esta matriz, mejorando el rendimiento de extracción sin usar condiciones denaturantes.

La degradación enzimática de los principales polímeros de la pared celular vegetal, facilitaría el acceso de los solventes a los compuestos fenólicos contenidos en la matriz vegetal, mejorando el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos mediante condiciones suaves y efectivas que no perjudiquen su actividad antioxidante.

La meta de este trabajo es obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con relevantes propiedades antioxidantes a partir de residuos agroindustriales de arándano rojo, arándano azul, frambuesa, durazno, pera y pimentón, mediante un proceso respetuoso con el medio ambiente, evaluándose el efecto de la incorporación de un tratamiento enzimático en el mismo proceso extractivo.

La aplicación de enzimas en procesos de extracción de compuestos fenólicos por solventes desde muestras de origen vegetal no ha sido extensamente estudiada. Meyer *et al*, (1998) y Lando y Meyer, (2001) reportan la adición de enzimas como un pretratamiento en extracción de antioxidantes asistida con enzimas desde orujo uva y orujo de grosella negra, respectivamente. Estos estudios demuestran la importancia de parámetros como el tamaño de partícula, tipo y concentración de enzima, temperatura, pH, tiempo de tratamiento enzimático y tipo de solvente. Li *et al*, (2006) analizan la incorporación de biocatalizadores en la extracción acuosa de residuos de cítricos. A la fecha, no se han encontrado estudios dirigidos a evaluar la hidrólisis enzimática durante el mismo proceso de extracción de antioxidantes fenólicos empleando mezclas hidroalcohólicas.

CAPITULO 2

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Los polifenoles están abundantemente distribuidos en frutas, verduras, semillas, hierbas y especies; sin embargo, merecen particular atención las materias primas de origen residual de procesos agroindustriales que puedan servir como fuentes de antioxidantes, tanto por su bajo costo como por la posibilidad de solucionar problemas ambientales causados por su disposición. Además, las fracciones externas de los vegetales (pieles, cáscaras, cuescos o semillas) son generalmente descartadas, aunque presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos potencialmente útiles como antioxidantes que sus fracciones internas correspondientes. Adicionalmente, la utilización de subproductos agroindustriales tiene incidencias en la preservación de la calidad del medio ambiente, al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales.

La hidrólisis enzimática de los polímeros de la paredes vegetales podría favorecer la extracción química de antioxidantes fenólicos y proveer una técnica extractiva más amigable con el medio ambiente.

HIPÓTESIS

La acción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar paredes celulares incrementa la extractibilidad de polifenoles contenidos en residuos agroindustriales, obteniéndose una mayor actividad antioxidante de los extractos, por sobre la extracción convencional con solvente sin aplicación de enzimas.

OBJETIVO GENERAL

Obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante a partir de residuos agroindustriales tales como arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera y pimentón, mediante un proceso respetuoso con el medio ambiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Definir la composición proximal y de fibras de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera y pimentón.
- 2.** Desarrollar e implementar un proceso de extracción estándar de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes desde los residuos previamente mencionados.
- 3.** Establecer las condiciones más adecuadas de extracción de antioxidantes fenólicos asistida por enzimas desde el residuo agroindustrial que presente el mayor potencial antioxidante en la etapa anterior.
- 4.** Validar el efecto del extracto fenólico que presente el mayor potencial antioxidante sobre la estabilidad oxidativa del aceite crudo de pepa de uva.

CAPITULO 3

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes pueden ser definidos como aquellas sustancias que al estar presentes a bajas concentraciones en un sustrato oxidable, retrasan considerablemente o inhiben la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutterdige, 1995).

En general, de acuerdo a su procedencia, se distinguen dos categorías básicas de antioxidantes: naturales y sintéticos.

3.1.1 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son los más ampliamente utilizados en la elaboración de una variedad de productos de las industrias farmacéutica, cosmética y alimenticia. Los antioxidantes más empleados son aquellos derivados de estructuras fenólicas o los que poseen una configuración fenólica dentro de sus estructura molecular. La presencia de anillos conjugados y grupos hidroxilos permite a los compuestos fenólicos secuestrar y estabilizar radicales libres (Shahidi *et al*, 1992). La presencia de grupos carbonílicos o carboxílicos en numerosos compuestos fenólicos puede también resultar en la inhibición de la rancidez oxidativa (Hudson y Lewis, 1983). Entre los antioxidantes sintéticos más frecuentemente empleados para preservar los alimentos se encuentran los ésteres de ácido gálico, el butilhidroxianisol, el butilhidroxitolueno y la butilhidroquinona terciaria. Estos antioxidantes sintéticos son altamente activos y de bajo costo (Zhang *et al*, 2004).

Los ésteres de ácido gálico tienden a formar complejos con trazas de hierro, originando sales de color azul oscuro, minimizándose su uso en aceites vegetales; además, son altamente sensibles al calor, especialmente en condiciones alcalinas, por lo cual su potencial antioxidante se pierde en el proceso de cocción de los aceites. El BHA y BHT tampoco son muy apropiados cuando el alimento se somete a altas temperaturas, pues generan un olor desagradable.

La butilhidroquinona terciaria (TBHQ) es más estable a altas temperaturas, y su uso está muy extendido en los países productores y exportadores de aceites vegetales (Valenzuela y Nieto, 1996), sin embargo, altas dosis de TBHQ promueven carcinogénesis renal y de vejiga en ratas (Peters *et al*, 1996), así como productos de la oxidación de TBHQ provocan daño en el DNA en la mucosa gastrointestinal de ratas (Morimoto *et al*, 1991). BHT y BHA también inducen la formación de tumores en ratas (Ito *et al*, 1983; Ito *et al*, 1986; Olsen *et al*, 1986). Yu *et al*, (2000) informan que BHA provoca apoptosis en hepatocitos frescos aislados de rata y que la inducción de apoptosis es mediada por la liberación del citocromo c y la activación de caspasas.

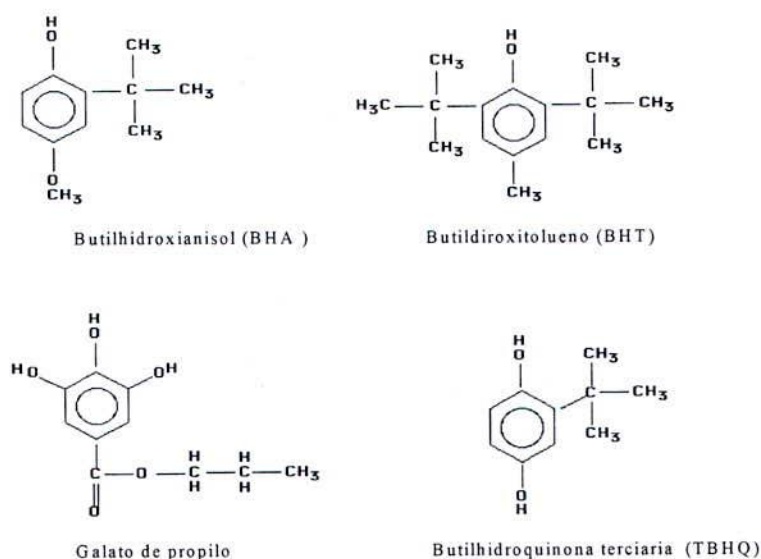


Figura 3.1: Antioxidantes sintéticos más empleados en la industria alimenticia.

Los antioxidantes naturales y sintéticos presentan idénticos mecanismos de actuación, pero existe interés en reemplazar antioxidantes sintéticos por otros de origen natural, debido a la toxicidad de los antioxidantes sintéticos y también al creciente interés del consumidor en la seguridad de los aditivos alimenticios. Ello ha creado la necesidad de identificar fuentes vegetales seguras de antioxidantes para los alimentos basado en las positivas acciones biológicas que los antioxidantes naturales desempeñan y adecuada la solubilidad de los mismos en agua, aceite y emulsiones (Madsen y Bertelsen, 1995; Wanasundra y Shahidi, 1998; Jeong *et al*, 2004; Rababah *et al*, 2004).

3.1.2 Antioxidantes naturales

Entre los antioxidantes naturales derivados de plantas se encuentran, los carotenoides, el ácido ascórbico, los tocoferoles, así como también compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Hall y Cuppet, 1997; Velioglu *et al*, 1998).

3.1.2.1 Carotenoides, ácido ascórbico y tocoferoles

Los carotenoides pertenecen a la familia de los tetraterpenos, que está representada por más de 600 estructuras naturales conocidas, siendo el β -caroteno y el licopeno son sus representantes más conocidos (Tapiero *et al*, 2004). Estos compuestos juegan un importante rol en la protección de membranas celulares y de lipoproteínas contra el daño oxidativo (Stahal y Sies, 2003). La efectividad de los carotenoides como antioxidante también depende de su interacción con otros antioxidantes como vitaminas C y E.

El ácido ascórbico o vitamina C, es una de las más importantes vitaminas solubles en agua. Por sus propiedades antioxidantes, el ácido ascórbico y sus ésteres de ácidos grasos se han utilizado como preservantes en la industria alimenticia. Además, el ácido ascórbico puede interaccionar con radicales tocoferoles para regenerar α - tocoferol, ayudando a prevenir las reacciones de peroxidación mediadas por los radicales tocoferoles (Davey *et al*, 2000).

Los tocoferoles son un conjunto de isómeros naturales α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol difieren en el grado de metilación del anillo dihidrocromanol. El orden de actividad antioxidante de estos compuestos es δ -tocoferol > γ -tocoferol > β -tocoferol > α -tocoferol. La mezcla de los isómeros de tocoferol junto con los isómeros de toctrienol (análogo al tocoferol, pero con una cadena lateral insaturada) es denominada colectivamente vitamina E (Bramley *et al*, 2000).

Los antioxidantes naturales anteriormente mencionados son sensibles a condiciones extremas de temperatura y a la presencia de metales de transición, pudiendo en algunos casos ejercer acción pro-oxidante al reducir esos iones metálicos y provocar efectos mutagénicos (Frankel, 1996; Halliwell, 2001; Young y Lowe, 2001; Naidu, 2003).

Dado que diversos estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos fenólicos de vegetales presentan actividades antioxidantes que a menudo sobrepasan las de vitamina C, tocoferoles y carotenoides, es que los polifenoles se perfilan como la mejor alternativa natural para reemplazar antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, galato de propilo y butulhidroquinona terciaria, comúnmente usados en grasas y aceites por su efectividad y bajo costo (Stadler y Guillot, 1997).

3.1.2.2 Compuestos fenólicos

3.1.2.2.1 Definición de los compuestos fenólicos

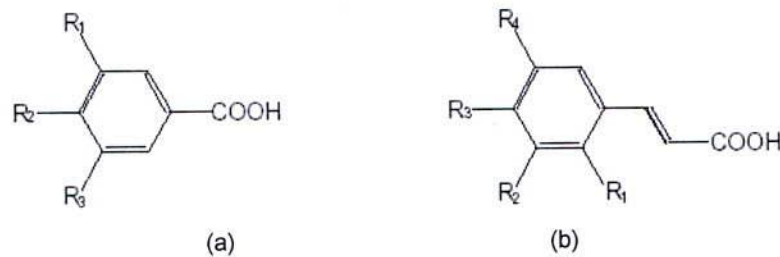
Los compuestos fenólicos constituyen un grupo misceláneo de especies orgánicas que poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos a él. Estos compuestos son principalmente productos secundarios derivados del metabolismo de las plantas; ellos están abundantemente distribuidos en el reino vegetal (Robards *et al*, 1999). Desempeñan diversas funciones fisiológicas, por ejemplo, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y protegen frente a organismos patógenos, predadores e incluso radiación ultravioleta. También contribuyen a las características organolépticas de los alimentos de origen vegetal, como el color natural y el sabor que éstos poseen. A los compuestos fenólicos se les atribuyen actividades biológicas beneficiosas para la salud. Entre éstas destacan sus efectos vasodilatadores, antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales, bactericidas y estimuladores de la respuesta inmune antioxidantes (Balasundram *et al*, 2006). Un amplio rango de compuestos fenólicos de las plantas presentan propiedades antioxidantes, en particular otorgan protección frente a la oxidación lipídica (Hagerman *et al*, 1998).

3.1.2.2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de acuerdo a su peso molecular en tres grandes categorías: compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como los ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos, compuestos fenólicos de peso molecular intermedio, como los flavonoides, y compuestos fenólicos de alto peso molecular, que incluyen los taninos (Escarpa y González, 2001).

- Compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Entre los ácidos hidroxibenzóicos los más representativos son los ácidos p-hidroxibenzóico, salicílico, vainílico, gálico y elágico. Por otra parte, los ácidos hidroxicinámicos (fenilpropanoides) más ampliamente distribuidos son los ácidos caféico, cumárico, ferúlico y sinápico. La mayoría de estas estructuras se encuentran en el reino vegetal asociadas a otros compuestos, un claro ejemplo de esto es la esterificación del ácido caféico con el ácido quínico para generar el ácido clorogénico (Escarpa y Gonzalez, 2001).



(a) Ácidos hidroxibenzóicos	R1	R2	R3	(b) Ácidos hidroxicinámicos	R1	R2	R3	R4
Ácido gálico	OH	OH	OH	Ácido cafeico	H	H	OH	OH
Ácido protocatéuico	H	OH	OH	Ácido ferúlico	H	H	OH	OCH ₃
Ácido vainílico	H	OH	OCH ₃	Ácido p-cumárico	H	H	H	OH
Ácido siríngico	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 3.2: Estructura química de los principales ácidos fenólicos.

- Compuestos fenólicos de peso molecular intermedio

Los flavonoides son el grupo más importante de los compuestos fenólicos por su alta diversidad en cuanto a estructura química y funciones biológicas (Robards y Antolovich, 1997). Los flavonoides comparten un esqueleto común de difenilpirano (C6-C3-C6), el que está compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde el 1' al 6' (Rice-Evans *et al*, 1996). La familia de los flavonoides incluye antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonoides.

Clasificación de los flavonoides

Previo a realizar una descripción de cada grupo de flavonoides, es conveniente indicar que el término *aglicona* se refiere a un flavonoide que no está unido a otra sustancia química y que el término *glicósido* se emplea para indicar que la estructura está unida a un azúcar.

Las antocianidinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos* que, azul) son pigmentos que confieren los colores rojo, violeta y azul a las frutas, aunque el color rojo de algunas frutas (naranja y tomate) es debido más bien a los carotenoides que a las antocianidinas. Antocianidinas no glicosiladas, agliconas, se encuentran presentes como cationes en medio ácido con numerosas formas isoméricas.

Las propiedades de pigmentación de ellas han sido explotadas en la industria alimenticia como aditivos en jugos y jaleas. Se han identificado seis especies de antocianidinas, ampliamente distribuidas en el reino vegetal, que son responsables de la pigmentación de la mayoría de las frutas. La cianidina es la más común de las antocianidinas en términos de abundancia. En orden decreciente de abundancia, cianidina es seguida por delfinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina y malvidina. Estas especies generalmente están presentes como monoglucósidos; la glicosilación de ellas casi siempre ocurre en la posición 3, siendo glucosa, arabinosa o galactosa las sustituciones más comunes. La cianidina glicosilada con glucosa es la más abundante de las antocianidinas en las frutas y otros órganos de las plantas. Además de las antocianidinas glicosiladas, también se han encontrado antocianidinas acetiladas (unidas químicamente a un ácido) en algunas frutas, particularmente en uvas; la composición química de las acetiladas es bastante compleja debido a la presencia de especies monoglucosiladas originadas a partir de cinco agliconas diferentes, que pueden estar acetiladas tanto por ácido acético como por ácido coumárico (Robards y Antolovich, 1997).

Los flavonoles están abundantemente distribuidos en el reino vegetal, ellos se encuentran generalmente como o-glicósidos en las hojas y partes aéreas de las plantas. Más de doscientas de sus agliconas han sido identificadas en las plantas, aunque sólo cuatro de ellas, quercetina, kaemferol, isoramnetina y miricitina están comúnmente en las frutas (Robards y Antolovich, 1997).

Los flavonoles se encuentran normalmente glicosilados en la posición 3, del anillo C y con menor frecuencia en la posición 7, del anillo A, siendo la D-glucosa el residuo más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa y también el ácido D-glucorónico (Martínez-Flórez *et al*, 2002).

Los flavanoles constituyen uno de los grupos de la familia de los flavonoides que también están abundantemente presentes en la naturaleza. Dentro de su configuración estructural, es conveniente distinguir las unidades monoméricas correspondientes a la catequina y la epicatequina y las organizaciones oligoméricas de las mismas, conocidas como proantocianinas. Estas organizaciones oligoméricas constituyen la base de los taninos condensados. Los flavanoles generalmente se encuentran como agliconas, o sea, ellos carecen de formas glicosiladas (Escarpa y Gonzalez, 2001).

Las flavanonas son un grupo minoritario de la familia de los flavonoides. Por ello están distribuidas en pequeñas cantidades en vegetales a excepción de los cítricos, en los cuales son los compuestos fenólicos mayoritarios. Con respecto a sus agliconas, las más frecuentes son la hesperidina, la naringenina y la narirutina. Mientras que en los cítricos las flavanonas se encuentran fundamentalmente como agliconas, en otras plantas las formas glicosiladas son las especies prevalentes (Robards y Antolovich, 1997).

Las flavonas son el grupo menos representativo de los flavonoides y entre sus agliconas más comunes se encuentran la apigenina y la luteonina. De manera similar a los otros flavonoides, las flavonas casi siempre aparecen como estructuras glicosiladas (Escarpa y Gonzalez, 2001). Los cítricos constituyen nuevamente un caso especial ya que éstos contienen flavonas polimetoxiladas como, por ejemplo, la nobiletina, la sinensetina y la tangeretina (Robards y Antolovich, 1997).

Los isoflavonoides, al igual que las flavanonas y las flavonas constituyen un grupo minoritario dentro de los flavonoides. Ellos generalmente aparecen como estructuras glicosiladas. Los isoflavonoides se encuentran principalmente en las leguminosas, en particular en la soja. Los isoflavonoides mayoritarios en la soja son glicósidos de genisteína y daidzeína (Hodgson *et al*, 1996).

Compuestos fenólicos de elevado peso molecular

En general, el término tanino se refiere a compuestos fenólicos que poseen un amplio grado de asociación con otros polímeros esenciales, tales como proteínas y carbohidratos, cuya característica más relevante es su alto peso molecular. En el reino vegetal, los taninos se encuentran en dos modalidades: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables, también conocidos como galotaninos, son estructuras construidas a partir de unidades de ácido gálico, las que pueden ser simples o esterificadas. Los taninos condensados, comúnmente denominados proantocianinas, son polímeros naturales compuestos de unidades de catequina o de epicatequina (Escarpa y Gonzalez, 2001).

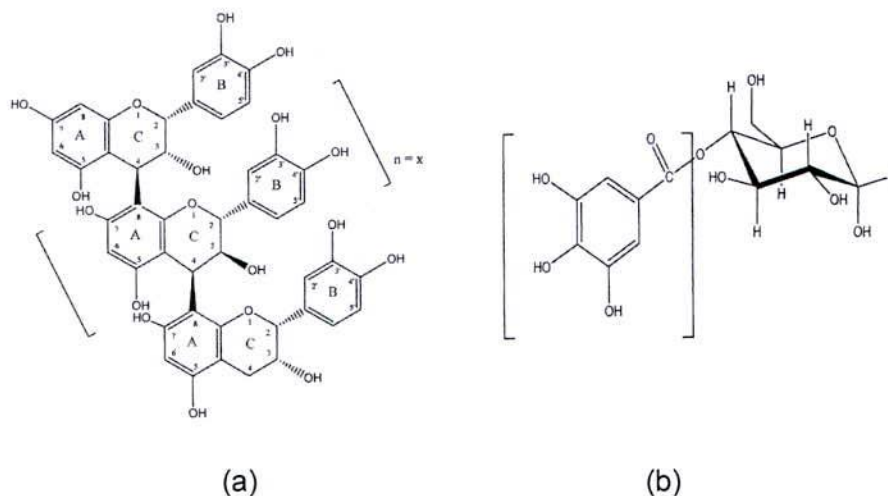


Figura 3.4: Estructura básica de los taninos (a) condensados (b) hidrolizables

3.2 ROL DE LOS ANTIOXIDANTES EN LOS PROCESOS DE OXIDACIÓN

La oxidación lipídica es una de las principales causas del deterioro de los alimentos, ya que afecta de manera importante el color, sabor y aroma de ellos. Además, el valor nutricional de los alimentos está relacionado con su habilidad para capturar radicales libres o proteger estructuras biológicas de los organismos vivos de su oxidación. Por ello, se requiere adicionar a los alimentos sustancias que retarden o eviten la oxidación, es decir, antioxidantes (Valenzuela y Nieto, 1996).

Un radical libre es una especie que contiene uno o más electrones desapareados y que es capaz de existir de manera independiente. Radicales libres como tricolorometil ($\text{CCl}_3\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), peróxido ($\text{ROO}\cdot$) y óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) son producidos metabólicamente en organismos vivos. Además, algunos derivados no radicalarios como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) pueden ser generados en sistemas alimentarios y biológicos. Todas estas especies reactivas de oxígeno pueden participar en reacciones en cadena de radicales libres (Halliwell *et al*, 1995).

La oxidación lipídica se desarrolla por un mecanismo de reacción en cadena de los radicales libres en un proceso que consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La oxidación comienza en presencia de un radical iniciador el cual sustrae un átomo de hidrógeno a una molécula sustrato, por ejemplo un lípido, para producir un radical alquilo, que es altamente reactivo. Subsiguientemente, la reacción procede a través de reacciones de propagación, donde el radical alquilo reacciona rápidamente con oxígeno para formar radicales peróxidos. Los radicales peróxidos pueden oxidar lípidos, generando hidroperóxidos lipídicos, los cuales, a su vez, se rompen formando una amplia gama de compuestos, que incluyen alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos y radicales alcóxidos ($\text{LO}\cdot$). La reacción termina cuando dos radicales libres se combinan para producir productos no radicalarios (Antolovich *et al*, 2002).

Los antioxidantes pueden retardar la etapa de iniciación, tanto al reaccionar con un radical lipídico como al inhibir la etapa de propagación por reaccionar con radicales peróxidos o alcóxidos. Los radicales libres de los antioxidantes formados son más estables y pueden inhibir las reacciones de propagación en cadena formando compuestos no radicalarios. Los antioxidantes naturales, además de mejorar la estabilidad de los alimentos que contienen lípidos, son reconocidos por ejercer propiedades benéficas para la salud humana (Schwarz *et al*, 2001).

Como está expuesto en el trabajo de Moure *et al* (2001), el stress oxidativo está implicado en patologías como cáncer, arterioesclerosis, artritis reumatoidea y también se asocia a enfermedades neurodegenerativas y procesos de envejecimiento. En sistemas vivos, los antioxidantes dietarios (por ejemplo α -tocoferoles, β -caroteno, ácido ascórbico) y las enzimas endógenas (como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) protegen contra el daño oxidativo.

Meyer *et al*, (1998a) demuestran que compuestos polifenólicos reducen *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), particularmente aquellos polifenoles con múltiples grupos hidroxilos son más efectivos en la prevención de la oxidación lipídica y de las LDL. El estudio de Saint-Cricq de Gaulejac *et al*, (1999) pone de manifiesto que los antioxidantes naturales son capaces de proteger a las células del daño de los radicales libres.

Se han descrito otras actividades fisiológicas de los antioxidantes naturales, como por ejemplo, actividades antibacteriana, antiviral y antimutagénica (Ikken *et al*, 1999), antialérgica (Noguchi *et al*, 1999), inhibición de la agregación plaquetaria y del incremento de la presión sanguínea (Ito *et al*, 1998). Se ha sugerido el uso de antioxidantes naturales como agentes quimioprotectores, ya que inhiben la generación de radicales libres (Miyake *et al*, 1999). Recientes estudios han mostrado que extractos de berries y sus compuestos bioactivos inhiben la proliferación celular, modulan la detención del ciclo celular e inducen apoptosis en células cancerígenas sin provocar efectos citotóxicos en células normales (Seerman, 2008).

Aunque los compuestos fenólicos de vegetales son reconocidos como potentes antioxidantes, debido a sus propiedades redox, las cuales les permiten actuar como agentes reductores, dadores de hidrógeno, secuestradores de oxígeno singulete y quelantes de metales (Rice-Evans *et al*, 1995), también se ha determinado que ellos tienen el potencial de actuar como pro-oxidantes bajo ciertas condiciones (Yen *et al*, 1997). Por ejemplo, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, en presencia de hierro u oxígeno pueden dañar el DNA, vía producción de radicales libres (Sakihama *et al*, 2002). Tal como lo observado en ácido gálico y sus derivados (Auroma *et al*, 1993), en extractos de té verde (Wanasudara y Shahidi, 1998) y en flavonoles (Roeding-Penman y Gordon, 1998) cuando están en presencia de sales de metales, los antioxidantes también pueden autooxidarse y generar sustancias reactivas y así, actuar como pro-oxidantes. von Gadow *et al*, (1997) observaron una acción pro-oxidante del ácido caféico en emulsión durante el blanqueamiento del β - caroteno, pero este compuesto mostraba una fuerte actividad secuestradora de radical DPPH e inhibía la oxidación lipídica en sistemas acuosos y oleosos.

Diferencias en la actividad debidas a diferencias en la partición relativa entre las fases en diversos sistemas lipídicos puede explicar porqué el té verde es activo en liposomas de aceite de maíz y de lecitina de soya y es pro-oxidante en emulsiones aceite en agua, debido a su mayor afinidad por la superficie polar de las bicapas de lecitina (Frankel *et al*, 1997).

Auroma *et al*, (1997) informaron sobre la capacidad de extractos de gengibre y del ajo para secuestrar radicales hidroxilos e indican que la interacción de ellos con quelatos de hierro facilita la generación de radicales hidroxilo y que el gengibre ejerce acción pro-oxidante. La actividad pro-oxidante resulta de la capacidad de reducir metales, tales como Fe^{3+} , a formas que reaccionan con O_2 o con H_2O_2 para formar iniciadores de oxidación. Wanasudara y Shahidi, (1998) determinaron que la presencia de clorofila era responsable del efecto pro-oxidante de los extractos de té en la oxidación de aceites marinos. Los metales de transición tienen efectos pro-oxidantes en té, ácido ascórbico y α -tocoferol, pero este efecto puede no ser importante *in vivo*, si es que los metales de transición son secuestrados, excepto en condiciones patológicas (Cao *et al*, 1996).

Como tendencia general, los antioxidantes extraídos desde materiales vegetales pueden mostrar actividad pro-oxidante a baja concentración y actividad antioxidante sobre ciertos valores críticos de ella (Yen *et al*, 1997; Wanasudara y Shahidi, 1998). Sin embargo, el efecto opuesto, es decir, efecto antioxidante a baja concentración y comportamiento pro-oxidante alta concentración también se ha informado (Przybylsky *et al*, 1998).

Se necesita mayor investigación para establecer en forma más precisa la actividad, biodisponibilidad y otros efectos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo* de antioxidantes naturales (Moure *et al*, 2001). Las técnicas de medición de antioxidantes como secuestradores de radicales libres son una herramienta muy adecuada para seleccionar aquellos extractos antioxidantes con mayor potencial para los posteriores estudios *in vivo*.

Manach *et al*, (2004), señalan que un mayor conocimiento de las cinéticas de absorción, acumulación y eliminación de los polifenoles en el organismo permitiría correlacionar el consumo de frutas y vegetales y de los polifenoles que contienen con la emergente evidencia de su rol en la prevención de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

3.3 FUENTES NATURALES DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Una gran variedad de antioxidantes naturales han sido aislados de diferentes tipos de materiales de plantas tales como frutas, vegetales, hojas, cereales, semillas oleaginosas, raíces, hierbas y especias (Ramarathnam *et al*, 1995). También presentan actividad antioxidante algunos aceites vegetales, bebidas refrescantes y alcohólicas. Son de particular interés, como fuente de antioxidantes, las plantas aromáticas y medicinales y las especias e igualmente se han considerado como fuentes potenciales de compuestos antioxidantes determinadas raíces, tallos, cortezas y hojas de árboles.

Estudios realizados sobre el fuerte potencial antioxidante encontrado en frutas producto de su contenido de polifenoles han sido publicados por Wang y Lin, (2000); Wang, *et al*, (1996), Kalt *et al*, (1999), García-Alonso *et al*, (2004), estos últimos analizan la actividad antioxidante de veintiocho frutas, resultando los berries, y en especial los arándanos, las frutas con mayor actividad antioxidante. Otros autores también muestran la importante actividad antioxidante de berries (Abuja *et al*, 1998; Heinonen *et al*, 1998; Hakkinen *et al*, 1999; Prior *et al*, 1998), de cerezas (Wang *et al*, 1999), manzanas (Bandoniene y Murkovic, 2002); de cítricos (Saleh, *et al*, 1998), kiwies (Dawes *et al*, 1999), ciruelas (Donovan *et al.*, 1998) y jugos de fruta (Chambers *et al*, 1996).

Existen diversos estudios que analizan el potencial antioxidante de una amplia gama de vegetales (Gazzani *et al*, 1998; Vinson, 1998; Ismail *et al*, 2004; Cao *et al*, 1996, Lin *et al*, 1998; Hertog *et al*, 1992; Vinson *et al*, 1998; Rodríguez de Sotillo *et al.*, 1998), entre otros. También se ha evaluado el potencial antioxidante de granos de cereales (Lehtinen y Laakso, 1998; Zielinski y Kozlowska, 2000; Baublis, *et al*, 2000; Adom y Liu, 2002). En semillas y oleaginosas como rosa mosqueta y avellana (Moure *et al*, 2000). Asimismo se ha analizado el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante en el vino (Katalinic *et al*, 2004; Fernández *et al*, 2004 y la cerveza (Vinson *et al*, 2003). Te verde y negro también han sido intensamente estudiados por sus propiedades antioxidantes, contienen hasta el 30% de su peso seco como compuestos fenólicos (Lin, *et al*, 1998).

3.4 ANTIOXIDANTES FENÓLICOS OBTENIDOS A PARTIR DE DESECHOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

3.4.1 Industria procesadora de frutas y hortalizas en Chile

En términos generales, la producción hortofrutícola destinada a la industrialización puede ser sometida a diversos procesos tales como la elaboración de conservas de frutas y hortalizas, la fabricación de mermeladas y pulpas de frutas y pastas de hortalizas, la preparación de jugos clarificados o concentrados de frutas, la deshidratación de frutas y hortalizas, y la congelación de frutas y hortalizas.

La agroindustria hortofrutícola en Chile es un sector exportador emergente, con notables índices de crecimiento de producción en los casos de jugo concentrado de manzanas, pasta de tomates, conservas de frutas, frambuesas congeladas y deshidratados en general. Este emergente sector genera gran cantidad de desechos, que sólo para el año 1997 consideraba 801798 toneladas, tal como los señala el catastro de residuos realizado ese año en el marco del proyecto de "Gestión de Residuos Agroindustriales", financiado por el Fondo de Desarrollo e Innovación de la Corporación de Fomento de la Producción.

Estos residuos proporcionan una gran cantidad de material que puede ser utilizado para alimentación animal o bien como fertilizantes, lo que suele implicar costos para la industria y un bajo valor agregado para los productos. Además, la disposición de los residuos actualmente, debe enfrentar el cumplimiento de restricciones legales cada vez más severas (Schieber *et al*, 2001).

Una alternativa para el manejo de los residuos agroindustriales sólidos es utilizarlos como fertilizantes luego del compostaje (Sancho *et al*, 2004). Como el proceso de compostaje genera olores desagradables, que no pueden ser eliminados completamente, la localización de estas plantas no debe estar cercana a barrios residenciales, comerciales u otras áreas públicas. Además, el compostaje de residuos agroindustriales demanda altos costos de inversión en la tecnología necesaria para el adecuado control del proceso (Schaub y Leonard, 1996).

Otra forma de utilizar residuos agroindustriales sólidos es en la producción de alimento animal (Sanchez *et al*, 2002). Sin embargo, el uso de desechos agrarios en la alimentación animal puede estar restringido por consideraciones nutricionales, por ejemplo, altos niveles de lignina, celulosa, hemicelulosa y pectina, bajos niveles de proteína, o la presencia en ellos de factores antinutricionales para los animales como glucosinatos o taninos (Ulloa *et al*, 2004); los glucosinatos son en sí relativamente inocuos, pero en condiciones de hidrólisis por la enzima mirosinasa, alta temperatura o bajo pH, ellos liberan varios productos que pueden ser peligrosos para los animales (Bell, 1993) y los taninos pueden interferir en los procesos digestivos, ya que al formar complejos con proteínas interfieren en las enzimas digestivas, especialmente las proteolíticas (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Además, costos de mano de obra y de transporte hasta la zona ganadera usualmente limitan el beneficio directo de la alimentación animal con desechos provenientes de subproductos agrícolas (Sánchez *et al*, 2002).

Puesto que la manera más efectiva de reducir el efecto ambientalmente negativo de la acumulación de residuos agroindustriales es incorporarlos en procesos productivos, se propone que otra alternativa más atractiva y conveniente para revalorizar descartes de frutas y hortalizas es emplearlos como materia prima en la elaboración de antioxidantes para alimentos.

3.4.2 Antioxidantes fenólicos obtenidos a partir de desechos agroindustriales

Muchos de los materiales residuales generados por las agroindustrias contienen polifenoles, así, un modo eficiente y ambientalmente amigable de otorgar valor agregado a estos sub-producto es utilizarlos como fuente para la producción de antioxidantes fenólicos (Schieber *et al*, 2001). Además, considerando que, en general, la mayor distribución de polifenoles con propiedades antioxidantes se encuentra en las fracciones externas de los vegetales, es también conveniente extraer antioxidantes de residuos agroindustriales como cáscaras pieles, semillas, orujo y bagazo (Cruz *et al*, 2004).

Diversos estudios han demostrado el potencial antioxidante de una variedad de residuos de vegetales, ejemplos de ello se discuten en los trabajos señalados a continuación.

Extractos de cáscaras de manzana y de peras presentan mayor actividad que los extractos de sus pulpas (Wolfe *et al*, 2003; Leontowicz *et al*, 2003). Semillas de cítricos tienen mayor actividad y contenido de compuestos fenólicos que sus cáscaras (Bocco *et al* 1998), similarmente a lo reportado para residuos de jugo de uva (Murthy, *et al*, 2002; Larrauri *et al*, 1997; Larrauri *et al*, 1998). Soong y Barlow, (2004) demuestran que extractos de hueso de palta poseen mayor actividad antioxidante y contenido de fenoles que extractos de su fracción comestible, similarmente a lo reportado por Al-farsi *et al*, (2007).

Extractos con una fuerte actividad antioxidante se han obtenido desde distintos residuos agroindustriales, como orujo de manzana (Lu y Foo, 2000), pieles y semillas de cítricos (Bocco *et al*, 1998), cáscaras de mango (Ajila *et al*, 2007) desechos industriales de alcachofa (Llorach *et al*, 2002), residuos de coliflor (Llorach *et al*, 2003); semillas de uva (Jayaprakasha *et al*, 2001; Murga *et al*. 2000), orujo de arándano (Vattem y Shetty, 2002), semillas de tamarindo (Tsuda *et al*, 1994), cáscaras de granada (Singh *et al*, 2002), cáscaras de papas (Rodríguez de Sotillo *et al*, 1994), cáscaras de almendras (Takeoka y Dao, 2003), cáscara de avellanas (Moure *et al*, 2000), cáscaras de maní (Yen y Duh, 1994) o harinas desgrasadas de raps (Thiyam *et al*, 2004).

La actividad antioxidante de algunos de estos extractos, ha sido comparable con la antioxidantes sintéticos, tal es el caso de los extractos de residuos de manzana (Leontowicz *et al*, 2003); extractos obtenidos desde bagazo de uva y manzana (Rubilar *et al*, 2003), de cáscaras papas (Rodríguez de Sotillo *et al*, 1994; Singh y Rajini, 2004). Takeoka y Dao, (2003) prueban que los extractos de cáscara de almendra tienen una actividad antioxidante más alta que la vitamina E y que se incrementa con la concentración del extracto. Moure *et al*, (2000) reportan que los extractos de cáscaras de avellanas presentan similar actividad con el antioxidante sintético BHT. Thiyam *et al*, (2004) demuestran que los extractos metanólicos de residuos de raps tienen similar potencial antioxidante con el ácido sinápico, siendo superior al del α -tocoferol. En extractos de pieles y semillas de uvas rojas, la quercetina es más activa como antioxidante que la quercetina 3-glucósido y que la quercetina 3-galactósido (Bonilla *et al*, 1999).

Adición de extractos obtenidos a partir de residuos agroindustriales incrementa la estabilidad oxidativa de aceite, tal como lo demuestran Abdalla *et al*, (2007) con cuescos de mango, Thiyam *et al*, (2004) con residuos del raps o Zandi y Gordon, (1999) para hojas de té añejas.

Larrosa *et al*, (2002) adicionan extractos ricos en polifenoles, obtenidos de desechos de alcachofa, zanahoria, apio y cebolla para "funcionalizar" el jugo de tomate. Análogamente, Al-farsi *et al*, (2007) demuestran que los desechos del procesamiento vegetales son una buena fuente de antioxidantes naturales potencialmente útil para funcionalizar alimentos.

Si bien existe información que afirma la presencia de polifenoles en los residuos agroindustriales, estas publicaciones son de carácter científico y no consideran el desarrollo de un proceso escalable y rentable para la obtención de extractos naturales de antioxidantes. Una excepción a lo anterior, es el trabajo de Peschel *et al*, (2006) que estudia con criterios productivos la obtención de antioxidantes desde 13 residuos agroindustriales de frutas y verduras, los autores seleccionan residuos de manzana, *Solidago virgaurea* y alcachofa, para los cuales desarrollan un proceso extractivo a escala piloto e incluyen aspectos económicos, demostrando que es posible obtener extractos con actividad antioxidante similar a la de los antioxidantes sintéticos, evaluados sobre crema cosmética.

3.5 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DESDE FUENTES DE ORIGEN VEGETAL

Debido a las relevantes propiedades de los compuestos fenólicos se han desarrollado métodos para liberarlos desde las matrices de una muestra de origen vegetal, donde ellos se encuentran. La obtención de compuestos fenólicos desde fuentes vegetales depende tanto del tipo y del estado físico de la muestra como de las especies fenólicas que se desean aislar. Por ejemplo, puede ser de interés aislar fenoles totales, clases específicas de fenoles o compuestos individuales; compuestos fenólicos libres o unidos; especies monoméricas, oligoméricas o poliméricas.

Respecto a la muestra, es importante considerar la clase de vegetal y la parte del vegetal que se quiere utilizar para el análisis, sea ésta hoja, cáscara, piel, pulpa o semilla. En relación al estado físico de la muestra, el análisis dependerá si ella se encuentra en fase líquida, semisólida o sólida (Tura y Robards, 2002).

La extracción con solventes en fase líquida es la técnica más ampliamente usada para separar compuestos solubles por difusión desde una matriz sólida, la extracción de compuestos fenólicos se reporta desde muestras frescas, liofilizadas (van der Sluis *et al* ,2001; Wang *et al*, 1999) o secadas (Ortuño *et al*, 1995; Conde *et al*, 1997), utilizando una variedad de solventes y a veces, de manera secuencial con solventes de polaridad creciente (Escribano y Santos-Buelga, 2003; Tura y Robards, 2002).

La cantidad y capacidad antioxidante de una materia prima está fuertemente influenciada por sus condiciones de extracción. Los factores que intervienen en el proceso de extracción son: tipo de solvente, pH, tiempo y temperatura de extracción, número de pasos de extracción y volumen de solvente utilizado en cada paso y, tamaño de las partículas del sólido. La elección del solvente es tan crítica como el tiempo y la temperatura de extracción existiendo un compromiso entre la solubilidad del analito y su degradación o inactivación (Fernández de Simón *et al*, 1992). La temperatura del proceso afecta la solubilización del compuesto antioxidante y también su capacidad antioxidante. (Ibáñez *et al*, 1999, Larrauri *et al*, 1997).

La elección del tipo de solvente depende de la polaridad del antioxidante a extraer, aunque ningún solvente proporcionará la recuperación óptima de todos los fenoles o incluso de una gama limitada de fenoles en una muestra dada. Los fenoles de vegetales exhiben una considerable diversidad en términos de acidez y polaridad, desde un carácter hidrofóbico a un carácter hidrofílico (Rodis *et al*, 2002). La situación de equilibrios dependientes del pH es especialmente compleja en el caso de la extracción de antocianinas (Lapidot *et al*, 1999).

Compuestos fenólicos solubles son usualmente extraídos usando agua, metanol, etanol, acetato de etilo o acetona. La presencia de azúcares unidos tiende a provocar que los compuestos fenólicos sean más solubles en agua y, por tanto, combinaciones de esos solventes con agua son mejores solventes para glicósidos (Bonvehi *et al*, 2001; Conde *et al*, 1997; He *et al*, 1997; Guyot *et al*, 1998). En contraste, agliconas menos polares como isoflavonas, flavanonas, flavonas polimetoxiladas y agliconas de flavonoles, tienden a ser más solubles en solventes no acuosos; metanol al 70 u 80% ha producido buenos rendimientos de extracción de derivados hidroxicinámicos, de flavonas, de flavonoles y de catequinas desde algunas frutas, legumbres, semillas de uva y de orujo de uva (Escribano y Santos-Buelga, 2003). Ciertos grupos de flavonoides como flavonas y flavonoles, no son generalmente extraídos como compuestos intactos sino que en forma de sus agliconas. Por esta razón, se requiere un procedimiento de hidrólisis que rompa enlaces glicosídicos previamente a la extracción o durante ella (Escribano y Santos-Buelga, 2003).

La extracción de flavanoles manzanas, uvas negras y habas es dependiente del tipo de solvente, etanol, metanol o acetona, y su concentración entre 40 y 100% en agua (Arts & Hollman, 1998). El mínimo resultante de 70% de metanol en el solvente extractor se atribuye a la necesidad de inactivar las polifenoloxidasas que presentan las plantas. Thiyam *et al*, (2004) utilizan diferentes solventes para obtener extractos fenólicos a partir de la torta prensada de raps, con metanol al 70% obtienen las mejores propiedades antioxidantes.

Una proporción variable de proantocianidinas es resistente a la extracción, particularmente en tejidos envejecidos u oxidados (Santos-Buelga & Scalbert, 2000). El rendimiento de extracción de proantocianidinas varía con el solvente y con su grado de polimerización. La reducción del tamaño de partículas favorece el proceso de extracción (Escribano y Santos-Buelga, 2003). Según Jayaprakasha *et al*, (2001), los rendimientos de extractos de semilla de uva como su composición en flavanoles totales, procianidinas y en flavanoles monoméricos varían considerablemente dependiendo del tipo de solvente extractor.

En vista a tales influencias, se requieren estudios comparativos para seleccionar el solvente óptimo que otorgue la máxima actividad antioxidante para cada sustrato. Mientras el solvente no esté saturado, a mayor razón solvente/residuo sería posible obtener un aumento en la extracción de polifenoles (Moure *et al*, 2000; Takeoka y Dao, 2003; Singh *et al*, 2004).

Generalmente, un incremento en la concentración del extracto produce una mejora en la actividad antioxidante, entonces sería recomendable concentrar el extracto siempre y cuando el antioxidante no sea lábil a las condiciones de concentración, provocando su pérdida de actividad. La concentración del extracto que proporciona el máximo de actividad depende del tipo de extracto y además para un mismo extracto, la actividad antioxidante depende del ensayo con que se evalúa (Yen y Wu, 1999).

Para una misma materia prima, el tipo de tipo de solvente influye en los compuestos extraídos y su combinación. Es muy común que el extracto resultante se evalúe por su contenido de fenoles totales (determinados por el método Folin-Ciocalteau, de acuerdo a Singleton y Rossi, 1965) y por su actividad antioxidante. La correlación entre estos dos valores se reporta muy variable, mientras que algunos autores afirman correlaciones positivas, otros muestran lo contrario.

Con extractos de cáscara y pulpa de manzana y pera, se obtienen buenas correlaciones entre el contenido de polifenoles y las actividades antioxidantes medidas por los métodos DPPH, blanqueamiento del β -caroteno y la actividad secuestradora del óxido nítrico (Leontowicz *et al*, 2003). Con extractos de residuos de alcachofa se logra una correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante ensayada por el método DPPH, mientras que la actividad antioxidante evaluada por el método ABTS no muestra buena correlación (Llorach *et al*, 2002). Con extractos de residuos de coliflor, se consiguen correlaciones positivas entre la capacidad antioxidante evaluada por los DPPH, ABTS, FRAP y tiocianato férrico y el contenido de fenoles totales (Llorach *et al*, 2003).

El contenido total de fenoles no se correlaciona con la actividad antioxidante en extractos de berries ni en licores de frutas, posiblemente debido a los altos niveles de antocianinas presentes en berries y vinos de fruta, las cuales tienen una baja respuesta en el ensayo Folin-Ciocalteu (Heinonen *et al*, 1998). Tampoco se consigue correlación significativa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico de extractos de diversas frutas, vegetales, hierbas y cereales dado que diferentes compuestos fenólicos tienen diferentes respuestas con el método de Folin-Ciocalteu y que la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos medida por el método del metilinooleato varía dependiendo de sus estructuras químicas (Kähkönen *et al*, 1999).

Bocco *et al*, (1998) no observan correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles en residuos de cítricos, mostrando que otros compuestos tales como tocoferoles, ácido ascórbico u otras sustancias no identificadas son también responsables de la eficiencia de esos extractos.

Se reportan acciones sinérgicas entre antioxidantes sintéticos, entre antioxidantes naturales y sintéticos, y entre antioxidantes naturales (Yi *et al*, 1991; Maillard y Berset, 1995; Cilliers y Singleton, 1990; Yamaguchi *et al*, 1999; Meyer *et al*, 1998a). Mezclas de antioxidantes que actúan de manera sinérgica son preferidas para prevenir enfermedades inducidas por radicales libres. Aún en extractos comerciales ampliamente utilizados, como extracto de romero, el comportamiento antioxidante y las acciones sinérgicas de la mayoría de los compuestos no son bien conocidas (Cuvelier *et al*, 1996).

Los antioxidantes son sensibles a la temperatura. Un aumento de la temperatura de extracción mejoraría la eficiencia del solvente extractor permeabilizando la pared celular, incrementando la solubilidad y los coeficientes de difusión de los compuestos a extraer, disminuyendo la viscosidad del solvente, facilitando su paso a través del sustrato sólido y el subsiguiente proceso de separación (filtración o sedimentación). Sin embargo, excesiva temperatura puede degradar los compuestos polifenólicos. Tiempo y temperatura afectan combinadamente la estabilidad de la capacidad antioxidante (Robards *et al*. 1999).

Azizah *et al*, (1999) estudian el efecto de la temperatura entre 30 y 90 °C sobre la actividad antioxidante de subproductos de cacao obteniendo extractos estables hasta los 50 °C, la extracción a mayor temperatura provoca una disminución en la actividad antioxidante. En extracción de antocianinas de berries los rendimientos de extracción se reducen (Cacace y Mazza, 2003) a temperaturas sobre 40°C, siendo los óptimos entre 30 y 35 °C, afirman que la solubilidad de las antocianinas y sus coeficientes de difusión aumentan con la temperatura, lo cual se traduce en una disminución en el tiempo de extracción, pero temperaturas de 40 y 74 °C causan la degradación de estos compuestos fenólicos.

Larraurri *et al*, (1997) obtienen que las temperaturas de secado de 100 y 140 °C de la pulpa de uva, afectan su posterior extracción de compuestos fenólicos, reduciendo significativamente su contenido total de polifenoles (19 y 33 %), de taninos condensados (11 y 17 %) y su capacidad antioxidante (28 y 50 %) respectivamente. El secado a 60° no afecta significativamente las características evaluadas en comparación con la muestra seca congelada, como control. En otro artículo, Larraurri *et al*, (1998) reportan que los extractos de antioxidantes de pulpa de uva blanca poseerían constituyentes bioactivos más resistentes a la temperatura que los de la uva roja.

Las modificaciones en la actividad antioxidante de extractos fenólicos en función del pH de extracción pueden ser provocadas por la liberación de los compuestos fenólicos o bien por una modificación estructural de los mismos. La actividad antioxidante de extractos acuosos de salvado de trigo se incrementa en condiciones ácidas que simulan el pH gastrointestinal (Baublis *et al*, 2000), sugieren que la acidez aumentaría la liberación de fenoles glicosilados presentes en el salvado de trigo. Lehtinen y Laakso, (1998) encuentran que la actividad antioxidante de extractos de avena es mayor cuando la extracción se efectúa a pH 10, siendo en estas fracciones mayor el contenido de proteínas y lípidos, los autores sugieren que el estado físico sería uno de los responsables de la alta actividad antioxidante. El efecto del pH sobre la estructura química de los compuestos fenólicos se ha investigado sobre una serie de hidroxiflavonas mostrando que ciertos pH afectan la deprotonación de la parte hidroxílica resultando en un incremento de la actividad secuestradora de radicales libres; además, indican que la donación de electrones es el mecanismo dominante de la acción de las hidroxiflavonas luego de la deprotonación (Lemanska *et al*, 2001).

Otras técnicas menos convencionales para la recuperación de extractos ricos en compuestos fenólicos son la extracción por solventes asistida por microondas, y la extracción con fluidos supercríticos.

En la extracción por solvente asistida por microondas se combina la energía microondas y la tradicional extracción con solventes. La capacidad para calentar rápidamente la mezcla de solvente-muestra es la principal ventaja de esta modalidad, reduciendo los tiempos de extracción y la cantidad del solvente (Sparr-Eskilsson y Björklund, 2000). La mejora del rendimiento de extracción está comprometida con la estabilidad del solvente a las temperatura que alcanza la muestra en el microondas (Escribano y Santos-Buelga, 2003).

La extracción con fluidos supercríticos combina las características de los gases y de los líquidos para la extracción. La baja viscosidad de los fluidos supercríticos, generalmente dióxido de carbono, confiere alta capacidad de difusión y mejora el acceso a los compuestos fenólicos unidos a la pared celular. Más aún, su relativamente alta densidad confiere un alto poder de solvatación, facilitando el proceso de extracción, gracias a la rapidez del proceso en ausencia de luz y aire minimiza degradación como oxidaciones o isomerizaciones (Palma y Taylor, 1999; Tena, *et al* 1998; Modey *et al*, 1996). El interés en la extracción con fluidos supercríticos de productos bioactivos es amplio, pero por su costo es alto y son pocos los procesos industriales que aplican esta técnica, especialmente en productos competitivos.

Como se aprecia de los párrafos precedentes, al usar una materia prima como fuente de antioxidantes, no es posible predecir a priori sobre la composición del extracto obtenido, sobre su actividad o su estabilidad, siendo necesario estudiar cada caso en particular: Este problema se acrecienta cuando la materia prima es un residuo agroindustrial, cuya composición generalmente no es constante. Mucha de la información sobre el contenido, caracterización y actividad antioxidante de frutas y verduras, no considera las distintas posibilidades de extracción como tampoco su efecto sobre el resultado final.

3.6 APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN POR SOLVENTES

Las enzimas son catalizadores biológicos altamente eficientes y específicos que ofrecen múltiples ventajas sobre los catalizadores químicos, ya que provienen de fuentes renovables, son biodegradables y trabajan a condiciones suaves de temperatura y pH. Por ello, el uso de enzimas en procesos industriales puede, a menudo, disminuir problemas debidos a tratamientos con altas temperaturas, solventes orgánicos y condiciones extremas de pH. Además, el uso de enzimas permite incrementar tanto la especificidad de la reacción como la pureza del producto y reducir el impacto ambiental (Cherry y Fidantsef, 2003).

3.6.1 Aplicación de las enzimas en la industria alimenticia

La mayoría de las enzimas comúnmente utilizadas en la industria alimenticia son de carácter hidrolítico y ellas catalizan una variedad de reacciones. Por ejemplo, se utilizan enzimas en procesos de transformación de alimentos tales como la conversión del almidón a jarabes de alta fructosa, la panificación, la elaboración de cervezas y vinos, la fabricación de quesos, la clarificación de jugos de fruta y en la extracción de aceites vegetales (Hamada, 1997). Su principal limitante para la aplicación en los procesos industriales ha sido su elevado costo, sin embargo con el avance de la biotecnología hoy es posible obtener formulaciones más económicas y de mejor calidad. (Zúñiga *et al*, 2003; Bhat, 2000).

La conversión enzimática del almidón en jarabe de alta fructosa constituye un significativo ejemplo de un bioproceso en el cual el uso consecutivo de diversas enzimas es necesario (Kirk *et al*, 2002). Durante muchos años se han empleado amilasas y proteasas en la panificación; en años recientes se han utilizado las hemicelulasas, especialmente las endo-xilanasas, para mejorar la calidad de diversos productos de panadería (Poutanen, 1997). La tecnología enzimática juega un rol central en los procesos de fabricación de cervezas y vinos. En el caso de la industria cervecera, se adicionan β -glucanasas y polisacaridasas durante el malteado y la fermentación. En la industria vitivinícola, pectinasas, β -glucanasas y hemicelulasas son ampliamente usadas para facilitar los procesos de clarificación y filtración e incrementar la calidad y estabilidad de los vinos.

En el procesamiento de jugos de frutas y de vegetales se utiliza una combinación de pectinasas, celulasas y hemicelulasas para facilitar la maceración, la licuefacción y la clarificación; ello permite reducir costos de producción y mejorar los rendimientos (Bhat, 2000). Tratamientos enzimáticos se han aplicado exitosamente en la extracción de algunos aceites de vegetales y de semillas oleaginosas (Domínguez *et al* 1993,1994; Rosenthal *et al*, 1996; Shankar *et al*, 1997; Shabati *et al*, 1998). Se han reportados incrementos en la extracción de aceites vegetales con el uso de enzimas que degradan las paredes celulares, facilitando así la liberación del aceite.

Las enzimas que contienen actividades celulolíticas, hemicelulolíticas y pectinolíticas son de ayuda en procesos de extracción con diferentes tipos de procedimientos: extracción con hexano, extracción por prensado en frío, extracción acuosa del aceite, o bien, mediante una extracción acuosa seguida de una extracción con otro solvente. Además, la extracción de aceites asistida por enzimas mejora la calidad nutritiva del producto en relación a controles no enzimáticos (Zúñiga *et al*, 2003).

3.6.2 Extracción por solventes de compuestos fenólicos asistida por enzimas

A la fecha, sólo unos pocos trabajos han analizado la aplicación de enzimas en procesos que emplean solventes orgánicos o agua para extraer compuestos fenólicos desde muestras de origen vegetal, en esos estudios se efectúa sólo un pre-tratamiento enzimático para favorecer la posterior extracción con solvente. Resultados relevantes obtenidos en trabajos sobre este tema se presentan y se analizan a continuación.

La extracción de antioxidantes ayudada por enzimas desde orujo de uva se ha reportado por Meyer *et al*, (1998b), mostrando un incremento en la extracción de compuestos fenólicos del orujo de uva mediante el empleo de enzimas que degradan las paredes celulares de vegetales. Los autores evaluaron parámetros como el tipo de enzima, el tiempo de hidrólisis enzimática y el tamaño de partícula del orujo de uva y la efectividad de los extractos obtenidos con enzimas en la inhibición de la oxidación de las LDL *in vitro*. Este estudio no evalúa la utilización de distintas variables de proceso, como temperatura, razón enzima/sustrato, tampoco considera que la actividad enzimática es una medida de la velocidad de reacción, usándose un diseño experimental poco acotado sin estudiar la acción combinada de acción enzimática y el tiempo de incubación.

Pardo *et al*, (1999) trabajan con vinos rojos elaborados con uva Moscatel y estudian el efecto de cuatro preparaciones enzimáticas comerciales sobre el contenido de antocianinas y fenoles totales, la calidad de color y también sobre el fraccionamiento de pigmentos. Los autores probaron que con todas las enzimas adicionadas (Endozym contact pelliculature, Biopectinasa, Ultrazym 100G y Rapidase excolor) se consigue un incremento en la cantidad de fenoles extraídos y de antocianinas con respecto al control no enzimático. Además, las enzimas mejoran la calidad del color obtenido (menores valores de tono y mayores proporciones de monómeros). Todos los tratamientos enzimáticos produjeron un incremento en la densidad del color con respecto al control durante la vinificación. Por otra parte, cuando se analizó la evolución de la densidad de color de los vinos durante nueve meses de conservación se apreció una menor decoloración en las muestras con tratamientos enzimáticos, especialmente en muestra tratada con Endozym contact pelliculature y Biopectinasa. Este trabajo muestra el efecto positivo de la acción enzimática sobre los fenoles recuperados en vino y su aporte a la calidad del mismo; sin embargo, no contempla el uso de biocatalizadores para recuperar extractos fenólicos ni tampoco estudia las condiciones de extracción.

Weinber *et al*, (1999), en conocimiento que romero y salvia poseen una fuerte actividad antioxidante, evalúan la eficiencia del ensilaje asistido por enzimas en la recuperación de polifenoles de estas hierbas. Enzimas que hidrolizan las paredes celulares de vegetales (celulasas, hemicelulasas y pectinasas) pueden ser aplicadas en el ensilaje de hierbas pobres en azúcares. Se obtuvo un incremento en la recuperación de polifenoles desde romero y salvia al emplear celulasas, hemicelulasas y pectinasas; el mejoramiento en la recuperación de polifenoles está asociado a la hidrólisis de la pared celular. Nuevamente, se trata de un estudio que si bien demuestra el efecto positivo de la acción enzimática sobre el contenido de fenoles, no pretende generar un extracto fenólico, no se evalúa la actividad antioxidante ni las variables que la afectan, sin ser un aporte científico desde este punto de vista.

Andreasen *et al*, (1999) estudian la liberación de ácidos hidroxicinámicos y de ácidos hidroxibenzóicos de granos de centeno pre-tratados con cuatro enzimas comerciales (Macer8 FJ, Grindamyl, Rapidase Be Super y Viscoyme); cada una ellas posee diferentes actividades enzimáticas que permiten degradar las paredes celulares de vegetales.

Concluyen que todos esos tratamientos enzimáticos incrementan significativamente la extracción de los ácidos hidroxicinámicos desde granos de centeno con respecto tanto a controles no enzimáticos como a tratamientos con NaOH. También encuentran que no hay diferencias significativas entre los efectos de la aplicación de Macer8 FJ, Grindamyl y Rapidase Be Super, pero que Viscoyme libera menos ácido ferúlico que las otras enzimas. Por tanto, proponen que uso de las enzimas analizadas se puede mejorar la calidad nutricional del pan de centeno al incrementar el contenido de ácidos fenólicos libres. Al igual que en el párrafo precedente, se trata de un reporte que muestra indirectamente el efecto positivo de la aplicación de enzimas sobre el contenido fenólico, pero es incompleto a lo que respecta a establecer las condiciones más adecuadas para lograr el proceso extractivo.

En cuanto al uso de enzimas para la recuperación de antioxidantes desde orujo de grosella negra, Landbo y Meyer, (2001) estudian el efecto de parámetros tales como tipo de enzima (Grindamyl y Macer8 FJ), tiempo de hidrólisis, presencia o no de semillas en el orujo, tamaño de partículas, temperatura y tipo de solvente en la extracción. Los rendimientos fluctuaron entre 62 y 383 mg/L de EAG para extractos metanólicos y entre los 58 y 247 mg/L de EAG para los acuosos. En los extractos metanólicos de orujo sin semilla el rendimiento de fenoles se incrementó entre 1.2 y 1.8 veces, comparado con el de los extractos de orujo con semilla. Análogamente, en los extractos acuosos el rendimiento de fenoles se incrementó entre 1.1 y 1.6 veces para los sustratos sin semillas versus el de los sustratos con semillas. Además determinaron que la reducción del tamaño de partícula incrementa significativamente el rendimiento de fenoles y de antocianinas para extractos acuosos y metanólicos, independientemente del tipo de sustrato (con y sin semillas). El nivel de respuesta a distintos parámetros y sus interacciones se mide mediante un diseño experimental con condiciones extremas de temperatura, concentración de enzima y tiempo, sin considerar que la acción enzimática se mide como velocidad de reacción.

Tobar *et al*, (2005) evalúan el potencial antioxidante de la harina desgrasada de pepa de uva. Para ello, obtienen extractos ricos en polifenoles empleando solventes de distintas polaridades (acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, así como las mezclas de metanol/agua en una proporción 7:3 y metanol/agua en una proporción 9:1).

Los autores determinan que el mayor rendimiento de extracción de sólidos solubles se obtuvo con metanol absoluto y se encontraron rendimientos de extracción similares al con metanol para mezcla de metanol/agua 9:1; en cambio con los otros solventes se obtuvieron rendimientos inferiores. Por otra parte, se obtuvo el más alto contenido de polifenoles totales extraíbles con la mezcla de metanol/agua 7:3; extracción con metanol absoluto produjo cantidades de polifenoles totales extraíbles similares, mientras que con los otros solventes ensayados se consigue una menor cantidad de ellos. Determinan además que en extracción sin pre-tratamiento enzimático, un aumento en la temperatura del proceso implica un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos extraíbles independientemente del tiempo de operación empleado.

En el trabajo reportado por Tobar *et al*, (2005), el contenido de polifenoles aumenta cuando la harina desgrasada ha sido pretratada enzimáticamente, sin embargo no se observa lo mismo en la actividad antioxidante, demostrándose que la acción enzimática podría también ejercer un efecto negativo o indiferente sobre la actividad antioxidante, Posiblemente los mismos compuestos fenólicos podrían inhibir la actividad enzimática, o bien el tiempo y temperatura de tratamiento enzimático podrían afectar la actividad.

De acuerdo a Lee y Wrolstad, (2004), la incorporación de enzimas en el procesado de jugos de berries, no permite obtener mejoras en cuanto a la extracción de antocianinas ni en la cantidad de compuestos fenólicos totales, más aún su contenido se reduce levemente cuando se utilizan enzimas y se trabaja sobre el fruto completo; sin embargo cuando las enzimas se aplican sobre pieles de berries se logran mejoras en la recuperación de polifenoles.

Sun *et al*, (2005) investigan la influencia de diversas pectinasas comerciales en el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de jugo de espárragos. El jugo de espárragos tratado con Viscozyme presentó el mayor contenido de quercetina, pero no exhibió un incremento significativo de la actividad antioxidante, mientras que la actividad antioxidante del jugo de espárragos se reduce considerablemente al incorporar con una pectinasa de *Aspergillus niger*. Nuevamente se muestra el efecto positivo de la acción enzimática sobre el contenido de fenoles pero no sobre su actividad antioxidante y los autores sólo evalúan pectinasas para este fin.

Kim *et al*, (2005), señalan que los estudios sobre aplicación de enzimas para despolimerizar los polisacáridos de la pared celular vegetal y mejorar el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y la composición de la fibra dietaria son escasos; razón por la cual evalúan el efecto de un pre-tratamiento enzimático en la extracción fenólica desde cáscaras de manzana utilizando celulasas de *Thermobifidia fusca*, encuentran una correlación positiva entre la liberación de fenoles y la reducción de azúcares debido al tratamiento enzimático. Demuestran, además, que la adición de pectinasas incrementa la reactividad de las celulasas de una manera dependiente del tiempo de incubación. Sin embargo, la determinación del contenido fenólico sólo se realiza a un tiempo de incubación (42 horas), requiriéndose una mayor investigación para la optimización de pre-tratamientos en reacciones enzimáticas con el fin de maximizar el rendimiento de compuestos fenólicos.

Li *et al*, (2006b) analizan la extracción acuosa enzimáticamente asistida desde cáscaras de diferentes cítricos (limón Yen Ben, limón Meyer, pomelo, mandarina y naranja). Determinan que los parámetros más importantes en el proceso extractivo son las especies de cítricos, las condiciones de las cáscaras, la temperatura de extracción, el tipo de enzimas y la concentración de los biocatalizadores. Las cáscaras de pomelo presentan el mayor contenido fenólico, seguido por las cáscaras de mandarina, limón Yen Ben, naranja y limón Meyer. La extracción asistida con Celluzyme MX a 50°C produce la mayor recuperación de polifenoles; una razón enzima/sustrato de 1.5% fue suficiente para lograr una elevada extractibilidad. Este estudio reviste gran originalidad pues es el primero encontrado en la literatura sobre el tema que se focaliza en extracción enzimáticamente asistida durante el mismo proceso de extracción; no obstante, sólo se emplea agua como extractante no evaluando la posibilidad de incorporar mezclas hidroalcohólicas durante la recuperación enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos.

Puupponen-Pimia *et al*, (2008) estudian el efecto de nueve enzimas capaces de degradar la pared celular vegetal sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana de arándano negro, determinan que tratamientos enzimáticos liberan los fenoles desde la pared celular vegetal, lo cual aumenta la actividad antimicrobiana del jugo de esta fruta y de su torta prensada, presentando un mayor efecto sobre *Salmonella entérica* sv que sobre *Staphylococcus*, dicho incremento se obtiene bajo condiciones ácidas, propias de productos derivados de berries.

Los autores indican, que debido a la liberación de los polifenoles de la pared celular vegetal la actividad antioxidante, medida como capacidad de secuestrar radicales libres, se incrementa alrededor de un 30% con el tratamiento enzimático, mientras que el contenido de compuestos fenólicos aumenta entre un 21 y un 43% dependiente del tipo de biocatalizador empleado. Efectos contrapuestos se obtienen en relación a los niveles de antiocianinas, si bien con algunas enzimas el contenido de estos compuestos se ve incrementado entre un 25 y un 68%, con otros catalizadores enzimáticos no hay incrementos con respecto al valor referencial. Este trabajo nos induce a evaluar el efecto de distintas formulaciones enzimáticas comerciales sobre la extracción de antioxidantes fenólicos, siendo que la mayoría de los estudios reportados sólo estudian a lo más cuatro productos enzimáticos comerciales.

Maier *et al*, (2008) utilizan enzimas capaces de degradar paredes celulares vegetales, como una alternativa al proceso de sulfitación para extraer pigmentos desde residuos de uva. Determinan que con una mezcla de preparaciones de carácter pectinolítico y celulolítico a razón 2:1 se consigue incrementar la cantidad de compuestos fenólicos luego de 2 horas de tratamiento enzimático a 40°C y pH 4.0, aplicando una dosis de 4.5 g la mezcla enzimática/Kg residuo (en base seca).

Kopponen *et al*, (2008) investigan el impacto del tratamiento enzimático en la extracción de flavonoles a partir arándano negro y grosella negra. Para ello emplean cuatro biocatalizadores comerciales (Econase CE, Biopectinase CCM, Pectinex Smash XXL y Pectines BE-3L). Determinan que el proceso asistido por enzimas afecta la extractibilidad de los flavonoles desde estas frutas, elevando los rendimientos de extracción en los jugos y disminuyéndolos en la torta prensada, en comparación a controles no enzimáticos. Muestran que para maximizar el efecto en la extractibilidad de los flavonoles, se requieren mayores dosis de enzimas en grosella negra que en arándano negro, dado el mayor contenido de pectinas en la pared celular de la primera.

Para la recuperación de compuestos fenólicos desde harina residual de borraja (Soto *et al*, 2008) realizada con tres solventes orgánicos distintos (metanol, etanol y acetato de etilo) y con agua. El metanol es el solvente que produce las mejores extracciones. Por otro lado, se observó que el rendimiento de extracción disminuye al disminuir la polaridad del solvente. Se observó, además, que el rendimiento de extracción aumenta con el tratamiento enzimático lo que puede ser atribuible a la degradación de diversas macromoléculas mediante la acción de las enzimas. Ello es consistente con los resultados publicados por otros investigadores como Meyer *et al*, (1998) y Landbo y Meyer, (2001). Los extractos metanólicos poseen un contenido de compuestos fenólicos casi tres o dos veces mayor en relación a lo obtenido con acetato de etilo y casi seis veces mayor a lo obtenido con etanol sin o con tratamiento enzimático, respectivamente. En cuanto a la actividad antioxidante el tratamiento enzimático afecta positivamente respecto a la del extracto sin tratamiento, obteniéndose un 50% de inhibición del radical DPPH con 1200 y 3900 ppm, respectivamente. En este trabajo sólo se evaluó la capacidad reductora del radical DPPH, no incluyendo otro tipo de método complementario para determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos enzimáticamente. Si bien este estudio presenta un aporte en la incorporación de enzimas, esta se efectúa previa a la extracción con solventes, en el cual sólo se midieron algunos parámetros operacionales.

Kapasakalidis *et al*, (2009) estudian el efecto de una celulasa comercial en la liberación de compuestos fenólicos desde residuos de grosella negra. El tratamiento enzimático incrementa la degradación de los polisacáridos de la pared celular, facilitando la subsiguiente extracción con metanol; la liberación de antocianinas y otros fenoles es dependiente de diversos parámetros de operación, tales como dosificación de la enzima, temperatura y tiempo de extracción. A 50°C, los rendimientos de antocianinas se incrementan en un 44% luego de 3 horas y en un 60% luego de 1.5 horas para la menor y mayor razón enzima/sustrato, respectivamente. Esta investigación fue conducida con un único biocatalizador que posee actividad celulolítica, no considerenado las ventajas de emplear pectinasas en conjunto con celulasas.

Más allá de la literatura existente, también es posible encontrar algunas pocas patentes que relacionan la recuperación de antioxidantes con la incorporación de enzimas ya sea desde hongos (JP2006271325), granos de café (WO2006103515), desde hojas de pequeños arbustos de la familia de myricaceae (JP9095672), mirobalán (JP2006057011), cebollas (KR20040041475), oliva, sus hojas y el residuo del prensado (ES2233208), pero ninguna de ellas busca mejorar la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos agroindustriales.

La revisión precedente muestra que se han efectuado algunos estudios tendientes a mejorar la extracción de antioxidantes fenólicos, sin embargo, ninguno de ellos emplea la aplicación del tratamiento enzimático durante la extracción con solventes distintos al agua. Además el análisis de las distintas variables que afectan el proceso extractivo es en su mayoría incompleto. Este hecho da pie al desarrollo de un proyecto de investigación que permita recuperar un extracto con capacidad antioxidante mediante un proceso biotecnológico, de manera eficaz y competitiva al mercado ya existente.

3.7 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Durante la oxidación lipídica, los antioxidantes actúan de varias maneras ya sea uniéndose a iones metálicos, secuestrando radicales o descomponiendo peróxidos. A menudo más de un mecanismo está involucrado, pudiendo causar sinergia entre ellos.

Esto conduce a la necesidad de desarrollar métodos que permitan comparar la efectividad antioxidante de diferentes compuestos.

Al presente, hay una gran variedad de métodos para determinar la actividad antioxidante de diversos compuestos presentes en sistemas alimentarios, pero desafortunadamente no existe un método estandarizado. La eficacia de los distintos métodos está determinada por las condiciones experimentales y el enfoque metodológico involucrado (Frankel y Meyer, 2000; Antolovich *et al*, 2002).

Previo a la selección de una o más técnicas de análisis de la capacidad antioxidante se debe responder a una serie de interrogantes. Por ejemplo, ¿cuáles son las reales propiedades de protección de los antioxidantes?, ¿contra qué protege el antioxidante?, ¿qué sustratos se oxidan?, ¿qué productos se inhiben?, ¿cuál es el efecto de la interacción con otros compuestos? y ¿qué condiciones son relevantes para una aplicación real? (Frankel y Meyer, 2000).

La mayoría de los métodos químicos desarrollados para evaluar la actividad antioxidante de diferentes compuestos fenólicos están basados en su habilidad para secuestrar diferentes radicales libres o para inhibir la peroxidación lipídica.

3.7.1 Métodos para evaluar la actividad secuestradora de radicales libres

A continuación se describen algunos de los principales procedimientos actualmente utilizados para evaluar actividad antioxidante de compuestos fenólicos.

3.7.1.1 Actividad secuestradora del radical 2,2 difenil-1- picril hidracilo o Método DPPH

El método DPPH está basado en la capacidad de los antioxidantes para secuestrar el radical estable 2,2 difenil-1- picril hidracilo, también conocido como 1,1 difenil-2- picril hidracilo o como α,α difenil- β - picril hidracilo. El DPPH es un radical estable debido a la deslocalización del electrón desapareado sobre la molécula completa. La deslocalización da lugar a un color violeta oscuro, caracterizado por una banda de absorción en solución de etanol, centrada alrededor de 520 nm. El DPPH es reducido a la correspondiente hidrazina cuando éste reacciona con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, produciéndose la decoloración de la molécula (Molyneaux, 2004).

La técnica más frecuente de medición es el ensayo de decoloración, el cual evalúa la disminución de la absorbancia en el rango 515-528 nm producida por la adición de un antioxidante a una solución de DPPH en etanol o metanol. Diferentes autores utilizan distintas concentraciones iniciales de radical y diferentes tiempos de medición de la reacción.

El ensayo DPPH es considerado un ensayo válido y fácil de realizar para evaluar la actividad secuestradora de antioxidantes, ya que el radical es un compuesto estable y que no debe ser generado como ocurre con otros ensayos de actividad secuestradora. Desde el punto de vista metodológico, el ensayo del DPPH es recomendado como adecuado para la medición de la actividad antioxidante de jugos de frutas y verduras o de extractos de origen vegetal. Los resultados son altamente reproducibles y son comparables con otros métodos de evaluación de la actividad secuestradora como el ABTS (Sánchez-Moreno, 2002).

Un parámetro que se ha introducido recientemente para la interpretación de los resultados del método DPPH, es la "concentración eficiente" o "valor de CE₅₀", que se define como la concentración de sustrato que causa la pérdida del 50 % de la actividad DPPH (color). Este parámetro fue introducido por Brand-Williams *et al*, (1995) y ha sido subsiguientemente utilizado por otros grupos de investigadores por ejemplo Sánchez-Moreno *et al*, (1998), Sánchez-Moreno *et al*, (1999), Lu y Fo, (2000) y Atoui *et al*, (2005), Llobera y Canellas, (2007), entre otros.

Numerosos trabajos sobre antioxidantes presentes en vegetales han sido realizados empleando el método del DPPH en frutas y verduras (Miller *et al*, 2000, Abdille *et al*, 2004; Kanatt *et al*, 2005; Thaipong *et al*, 2006; da Silva Pinto *et al*, 2008), plantas medicinales (Tanaka *et al*, 2003; Jang *et al*, 2007; Surveswaran *et al*, 2007; Loo *et al*, 2007), cereales y granos (Wang *et al*, 2007; Choi *et al*, 2007; Rocha-Guzman *et al*, 2007), hierbas y especias (Kulisic *et al*, 2006; Mata *et al*, 2007), té (Saito *et al*, 2007; Su *et al*, 2007) y en residuos agroindustriales como cáscaras de maní (Yen y Duh, 1994) orujo de uva (Larrauri *et al*, 1998; Murthy *et al*, 2002a; Rubilar *et al*, 2003; Llobera y Canellas, 2007), orujo de manzana (Lu y Fo, 2000; Rubilar *et al*, 2003), cáscaras de canola (Amarowicz *et al*, 2000), cáscaras de avellana (Moure *et al*, 2000), residuos de alcachofa, coliflor cebolla y zanahoria (Larrosa *et al*, 2002), descartes de alcachofa (Llorach *et al*, 2002), cáscaras y semillas de granada (Singh *et al*, 2002), orujo de arándano (Vattem y Shetty, 2002), descartes de coliflor (Llorach *et al*, 2003), cáscaras y pulpas de manzanas y peras (Leontowicz *et al*, 2003), cáscaras de arroz (Lee *et al*, 2003), descartes de lechuga y achicoria (Llorach *et al*, 2004), cáscaras de papa (Singh *et al*, 2004; Kanatt *et al*, 2005), residuos de tamarindo (Shui y Leong, 2006), cáscaras de mango (Alija *et al*, 2007), pericarpio de Litchi (Ruenroengklin *et al*, 2008).

3.7.1.2 Actividad secuestradora del radical catión 2,2'-azobis(2-amidino-6-etilbenzotiazolín-6-sulfonato) o Método ABTS

El método ABTS se basa en la inhibición de la producción del radical catión ABTS^{•+}, el cual posee un espectro de absorción característico que muestra un máximo principal a 414 nm y máximos secundarios en longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm (Antolovich *et al*, 2002).

El ensayo ABTS original (Miller *et al*, 1993) se fundamenta en la activación de metmioglobina, que actúa como peroxidasa, con peróxido de hidrógeno vía la formación del radical ferrimioglobina, el cual, reacciona (a una alta velocidad de reacción) con ABTS para producir el radical catión ABTS^{•+}. La acumulación de ABTS^{•+} puede ser inhibida por la presencia de antioxidantes en el medio de reacción; la magnitud y el lapso de inhibición dependen de la actividad del antioxidante.

La capacidad relativa de los antioxidantes para donar hidrógenos y secuestrar los ABTS^{•+} generados en fase acuosa, puede ser medida espectrofotométricamente en la región infrarroja cercana a 734 nm, lo cual minimiza interferencias debidas a otros compuestos que pueden absorber a otras longitudes de onda y a la turbidez de la muestra.

Miller y Rice- Evans, (1997) encontraron que los resultados del ensayo metmioglobina-ABTS y los resultados por reducción directa del radical catión ABTS^{•+} fueron muy similares, estableciendo así, que los antioxidantes estudiados actuaban vía secuestro del radical catión ABTS^{•+} y no por inhibición de su formación a través de la reducción de ferrimioglobina ni por reacción con peróxido de hidrógeno.

Los resultados de este ensayo son expresados por comparación con cantidades standard del antioxidante sintético trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua, para dar lugar al índice TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). El índice TEAC es igual a la concentración milimolar de una solución de trolox que tiene capacidad antioxidante equivalente a 1.0 mM de solución de sustrato bajo condiciones de investigación.

TEAC refleja la habilidad relativa de antioxidantes dadores de electrones o de protones para secuestrar el radical catión $ABTS^{\cdot+}$ comparado con trolox, tal como lo indican Rice-Evans y Miller, (1994).

Una estrategia apropiada para ensayo ABTS es la técnica de decoloración propuesta por Re *et al* (1999), en la que el radical es generado directamente en una forma estable previamente a la reacción con el antioxidante potencial. Esta técnica mejorada para la generación del $ABTS^{\cdot+}$, involucra la producción directa del cromóforo azul/verde del $ABTS^{\cdot+}$ a través de una reacción entre ABTS y persulfato potásico. La adición de antioxidantes al radical catión pre-formado reduce el ABTS, en magnitud y escala de tiempo dependientes tanto de la concentración y actividad del antioxidante como del tiempo de duración de la reacción. Así, el grado de la decoloración y el porcentaje de la inhibición del radical catión $ABTS^{\cdot+}$ es determinada como una función de la concentración y del tiempo y es calculada en valor relativo a la reactividad del trolox, como standard, bajo las mismas condiciones de experimentación. Esta modificación del método ABTS es aplicable al estudio de antioxidantes que sean solubles en agua o en lípidos y a compuestos puros o a extractos derivados de vegetales.

Este método ha sido aplicado para investigar la actividad antioxidante de frutas y vegetales (García-Alonso *et al*, 2004; Thaipong *et al*, 2006; Tachakittirungrod *et al*, 2007; Su *et al*, 2007), plantas medicinales (Surveswaran *et al*, 2007; Kawaree *et al*, 2008), cereales (Hu *et al*, 2007; Abdel-Aal, *et al*, 2008), aceites esenciales (Zha *et al*, 2008), vinos (Rivero-Perez *et al*, 2008), y residuos agroindustriales como orujo de uva (Alonso *et al*, 2002; Gonzalez-Paramás *et al*, 2004), residuos de alcachofa, coliflor cebolla y zanahoria (Larrosa *et al*, 2002), descartes de alcachofa (Llorach *et al*, 2002), descartes de coliflor (Llorach *et al*, 2003), descartes de lechuga y achicoria (Llorach *et al*, 2004), pulpas y semillas de palta mango, guayaba, tamarindo y longano (Soong y Barlow, 2004), pieles de maní (Yu *et al*, 2004), residuos de tamarindo (Shui y Leong, 2006).

3.7.1.3 Actividad secuestradora del radical catión N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina o

Método del DMPD

Este ensayo es similar a la modificación del método ABTS propuesta por Re *et al*, (1999), en el cual el radical catión ABTS^{•+} es pre-generado químicamente. La diferencia principal es el uso del compuesto hidrofílico N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina (DMPD). En presencia de una solución oxidante adecuada (cloruro férrico) y a un pH ácido, el DMPD es convertido a un radical catión estable y coloreado (DMPD^{•+}). El espectro de absorción en las regiones UV-visible de este compuesto muestra un máximo de absorbancia a 505 nm. Los compuestos antioxidantes capaces de transferir un átomo de hidrógeno al DMPD^{•+}, provocan decoloración de la solución de manera proporcional a su concentración. Esta reacción es relativamente rápida (menos de 10 minutos) y el punto final, el cual es estable, se toma como medida de la eficiencia del antioxidante. La capacidad de los antioxidantes está expresada como equivalentes de trolox usando una curva de calibración con diferentes cantidades de trolox (Sánchez-Moreno, 2002).

Este método es empleado para medir la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos. Es importante hacer notar que los valores de absorbancia se estabilizan en el transcurso del tiempo, por tanto, el tiempo fijado para la medición deja de ser una variable significativa, lo que permite una alta reproducibilidad inter-ensayos (Fogliano *et al*, 1999). Este método se ha usado, en particular, para evaluar la capacidad antioxidante de vinos (Fogliano *et al*, 1999) y de infusiones de té y jugo de granada (Gil *et al*, 2000).

La principal desventaja del método DMPD es la drástica disminución de su sensibilidad y reproducibilidad cuando se evalúan antioxidantes hidrofóbicos como α -tocoferol y BHT (Fogliano *et al*, 1999). Además, la presencia de ácidos orgánicos, especialmente ácido cítrico, en algunos extractos puede interferir en el ensayo de DMPD (Gil *et al*, 2000).

3.7.1.4 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El método FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (Fe⁺³-TPTZ) al complejo ferroso de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (Fe⁺²-TPTZ) en un ambiente de pH ácido, tal reducción se caracteriza por un color azul medido espectrofotométricamente a 593 nm.

La medición de la absorbancia a esa longitud de onda está linealmente relacionada a la capacidad reductora total de los antioxidantes dadores de electrones. Los autores del método FRAP (Benzie y Strain, 1996) destacan que el método es simple, rápido y económico, con alta reproducibilidad de los resultados y que además, permite tanto procedimientos manuales como automatizados. La principal desventaja de este procedimiento es que la medición de la capacidad reductora no siempre refleja la actividad antioxidante. Dado que el método no incluye un sustrato oxidable, no se puede obtener información de las propiedades protectoras de antioxidantes (Frankel y Meyer, 2000).

El ensayo del FRAP ha sido utilizado para determinar capacidad antioxidante de frutas y verduras (Slimestad *et al*, 2005; Abeysinghe *et al*, 2007; Allaith, 2008; Koca *et al*, 2008), cereales (Venneria *et al*, 2008), legumbres (Jonfia-Essien *et al*, 2008), plantas medicinales (Katalinic *et al*, 2006), aceites esenciales (Chizzola, *et al*, 2008) y residuos agroindustriales como descartes de coliflor (Llorach *et al*, 2003), descartes de lechuga y achicoria (Llorach *et al*, 2004), pulpas y semillas de palta mango, guayaba, tamarindo y longano (Soong y Barlow, 2004), cáscaras de cítricos (Li *et al*, 2006a; Li *et al*, 2006b), residuos de tamarindo (Shui y Leong, 2006).

3.7.1.5 Método TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter)

El método TRAP (Wayner *et al*, 1985) fue desarrollado originalmente para la determinación del estado antioxidante del plasma. Este ensayo usa radicales peroxilos generados a una velocidad controlada por la descomposición térmica del 2,2'azobis-2-amidinopropano o ABAP, un iniciador-azo soluble en agua. Luego de la adición de ABAP al plasma, la oxidación de sustratos oxidables es monitoreada por la medición del consumo de oxígeno durante la reacción. El lapso de inducción, en el cual la oxidación es inhibida por los antioxidantes del plasma, es comparado con el del trolox, empleado como referencia de antioxidante soluble en agua y luego es relacionado cuantitativamente con la capacidad antioxidante del plasma. El método de Wayner *et al*, (1985) fue modificado posteriormente por la adición de ácido linoléico como sustrato oxidable antes de la oxidación de ABAP.

La descomposición de ABAP mostró, en orden decreciente, el siguiente consumo de antioxidantes plasmáticos: ascorbato > tioles > bilirrubina > urato > vitamina E, pero el uso de ABAP no proporciona una estimación certera de las importantes actividades protectoras del urato como quelante de metales ni tampoco de las actividades protectoras de antioxidantes lipofílicos como la vitamina E (Wayner *et al*, 1987).

El método del TRAP puede ser aplicado *in vitro* para la evaluación de la actividad antioxidante de bebidas y alimentos. Por ejemplo, en estudios de té verde y vino rojo, donde los resultados son expresados como equivalentes trolox (Serafini *et al*, 1996; Serafini *et al*, 1997; Ghiselli *et al*, 1998; Pietta *et al*, 1998).

3.7.1.6 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) o capacidad para absorber radicales de oxígeno

En el método ORAC, la capacidad para absorber radicales de oxígeno se cuantifica calculando la protección neta durante cierto tiempo de una gráfica de la degradación de la fluorescencia de β -ficoeritrina en presencia de antioxidante. Se emplea AAPH como generador de radicales peroxilos ($\text{ORAC}_{\text{ROO}\cdot}$), Cu^{2+} - H_2O_2 como principal generador de radicales hidroxilos ($\text{ORAC}_{\text{OH}\cdot}$) o Cu^{2+} como metal de transición oxidante (ORAC_{Cu}). En el método ORAC se combina tanto el tiempo de inhibición como el porcentaje de inhibición de la acción de radicales libres por los antioxidantes usando "área bajo la curva" para la cuantificación. Este ensayo expresa los resultados de medición como unidades de equivalentes trolox (Cao *et al*, 1993; Cao *et al*, 1995). En el caso de que Cu^{2+} sea usado como oxidante en el ensayo, trolox no puede ser empleado como un antioxidante estándar debido a que él puede actuar como un pro-oxidante en presencia de Cu^{2+} . Por tanto, en ese caso la acción antioxidante es expresada en unidades antioxidantes (una unidad es igual a la actividad antioxidante que incrementa el área bajo la curva de decaimiento de β -ficoeritrina en un 100 %).

En muestras ricas en proteínas, puede ocurrir interferencia en la captura de radicales peroxilos por grupos tioles de las proteínas (Ghiselli *et al*, 1995). Por ello, Prior y Cao, (1999) introdujeron una modificación al ensayo ORAC para eliminar el contenido de proteínas con ácido tricloro acético.

Otra mejora en el método ORAC ha sido desarrollada por Ou *et al*, (2001), quienes utilizan fluoresceína como prueba de fluorescencia. Esta modificación otorga una medición directa de la capacidad de antioxidantes hidrofílicos primarios (que rompen la reacción en cadena) contra radicales peroxilos. Sin embargo, usualmente no es posible determinar directamente la contribución de fitonutrientes específicos a un valor total de ORAC.

El método ORAC se ha empleado, en particular, para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos puros como antocianidinas (Wang *et al*, 1997), flavonoides (Cao *et al*, 1997), frutas (Wang *et al*, 1996; Kalt *et al*, 1999; Ehlenfeldt y Prior, 2001; Wu *et al*, 2004; Atala *et al*, 2009), pieles y semillas de uvas (Yilmaz y Toledo, 2004), dátiles y sus subproductos (Al-Farsi *et al*, 2007). La principal desventaja del método ORAC es asumir que el deterioro oxidativo, el mecanismo antioxidativo y la protección de la proteína fluorescente β -ficoeritrina pueden imitar lo que sucede con sustratos biológicos (Frankel y Meyer, 2000).

3.7.2 Métodos para evaluar la oxidación lipídica

Los métodos para la determinación de la oxidación lipídica se suelen agrupar según los productos formados en las diferentes fases del proceso oxidativo de la siguiente forma: métodos que determinan la oxidación lipídica en la etapa de iniciación (medición del consumo de oxígeno), métodos que determinan la oxidación lipídica en la etapa de propagación (medición de los dienos conjugados y medición de peróxidos) y métodos que determinan la oxidación lipídica en la etapa de terminación (medición de los productos de descomposición de peróxidos lipídicos). Actualmente, el método de dienos conjugados y el método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico son los más empleados, a pesar de sus interferencias (Sánchez-Moreno y Larrauri, 1998).

3.7.2.1 Determinación de la oxidación lipídica en la etapa de iniciación

- **Medición del consumo de oxígeno**

La peroxidación se acompaña de la captación de oxígeno en la formación de radicales peroxilos durante la descomposición de peróxidos. Por tanto, el consumo de oxígeno disuelto es un índice que proporciona una idea del proceso de oxidación (Halliwell y Gutteridge, 1989). En general, los métodos que miden el consumo o captación de oxígeno tienen una sensibilidad limitada porque requieren altos niveles de oxidación para obtener resultados fiables (Frankel, 1993).

3.7.2.2 Determinación de la oxidación lipídica en la etapa de propagación

- **Métodos de los dienos conjugados**

Debido a que la oxidación de los lípidos está acompañada de la formación de dienos conjugados que absorben radiación electromagnética en el rango UV, a longitudes de onda entre 230 y 235 nm, la cantidad de dienos conjugados formados es un indicador de las etapas tempranas del proceso de oxidación de cualquier sustancia que contenga ácidos grasos insaturados. Por ello, el método de los dienos conjugados es uno de los más ampliamente utilizados para monitorear la oxidación lipídica. Este método es rápido y puede ser desarrollado fácilmente. Sin embargo, su principal desventaja es que no se puede determinar la presencia de dienos conjugados directamente en tejidos ni en fluidos corporales ya que sustancias como proteínas, clorofilas, purinas y pirimidinas absorben en la misma zona del espectro (Jialal y Devaraj, 1997).

- **Determinación del valor de peróxidos por liberación de yodo**

El valor de peróxidos evalúa el contenido total de oxígeno (peróxido e hidroperóxido) de lípidos o de materiales que contengan lípidos, mediante una titulación yodométrica con una solución de tiosulfato utilizando almidón como indicador de punto final de la reacción. El valor de peróxidos se calcula a partir del yodo liberado del yoduro de potasio, puesto que se considera que las sustancias que oxidan el yoduro de potasio son peróxidos u otros productos similares de la oxidación de los lípidos; entonces, el valor de peróxidos puede tomarse como una expresión cuantitativa de los peróxidos en los lípidos (Antolovich *et al*, 2002).

- Método del tiocianato férrico

Otra forma de determinar la oxidación lipídica en la etapa de propagación de la oxidación es el método del tiocianato férrico, el cual se basa en la incubación de una mezcla de extracto etanólico, tampón fosfato, agua destilada y ácido linoléico, a 40°C y en oscuridad. El valor de peróxido se determina por lectura de absorbancia a 500 nm a diferentes intervalos de tiempo durante la incubación (Sánchez-Moreno *et al*, 1999).

Este ensayo ha sido empleado para evaluar antioxidantes desde cáscaras de maní (Duh y Yen, 1995), cáscaras de naranja y lima (Larrauri *et al*, 1996), orujo de uva (Larrauri *et al*, 1997) También ha sido utilizado en combinación con otros métodos, tales como método del tiocianato férrico para semillas de uva (Jayasprakash *et al*, 2001), método del DPPH para té (Anesini *et al*, 2008), con DPPH y ABTS para residuos de alcachofa, coliflor, cebolla, zanahoria y apio (Larrosa *et al*, 2002), para descartes de alcachofa (Llorach *et al*, 2002), para aceites esenciales (Erkan *et al*, 2008) y con DPPH, ABTS y FRAP para descartes de coliflor (Llorach *et al*, 2003).

3.7.2.3 Determinación de la oxidación lipídica en la etapa de terminación

- Método Rancimat

En el método Rancimat, el aceite se calienta en presencia de la sustancia a examinar (en el rango de 90 a 120 °C) y se insufla aire (caudales en el rango de 5 a 25 l/h) produciendo sustancias volátiles. Estas sustancias volátiles, que contienen ácidos orgánicos, son absorbidas en agua bidestilada y se monitorea la conductividad eléctrica (de 0 a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) en función del tiempo. Como control, ese procedimiento se realiza sólo con aceite. Al comparar los ensayos con y sin la sustancia en estudio, si el tiempo requerido para que se registre un incremento significativo de la conductancia eléctrica (tiempo de inducción) es menor con aditivo que sin él, entonces hay un efecto prooxidativo y si ese tiempo es mayor, un efecto antioxidante está presente (Antolovich *et al*, 2002).

Con el método Rancimat, se ha evaluado la actividad antioxidante de los fenoles contenidos en extractos de pieles y semillas de uva (Bonilla *et al*, 1999) y de bagazo de uva (Gamez-Meza *et al*, 1999).

- Métodos de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Otro ensayo comúnmente empleado para la determinación de oxidación lipídica es el método TBARS, que determina la formación de malondialdehído (MDA) por la ruptura de ácidos grasos resultante de la oxidación de lípidos. Entre los sustratos empleados se pueden citar las LDL y el ácido linoléico y otros tipos de ácidos grasos. Los sustratos se oxidan por la adición de un metal de transición o por un iniciador azo, como AAPH. El método TBARS se basa en la reacción del malondialdehído con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico para formar aductos cromógenos de MDA-TBA, de color rosado y muy estables, que se pueden cuantificar en el visible a 532 nm. Una de las desventajas de este ensayo es su falta de especificidad ya que grupos amino libres presentes en el suero compiten con el MDA por su capacidad de unirse al TBA; otra es que existen fuentes no lipídicas en el suero, como carbohidratos y glicoproteínas, que producen aductos MDA-TBA, además, el TBA reacciona con pirimidinas, hemoglobina y bilirrubina presentes en la muestra (Estepa *et al*, 2001).

Este método se ha utilizado en la evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de frutas (García-Alonso *et al*, 2004), cáscaras de arroz (Lee *et al*, 2003), orujo de uva (Murthy *et al*, 2002a; González-Paramás *et al*, 2004) cáscaras de granada (Murthy *et al*, 2002b; Singh *et al*, 2002) y salvia (Kosar *et al*, 2008).

- Métodos de determinación de aldehídos citotóxicos

La descomposición de hidroperóxidos lipídicos está asociada a la formación de una gran cantidad de aldehídos. Los aldehídos de cadena corta y media son los responsables del desagradable sabor rancio producido durante la oxidación. Los aldehídos más abundantes (4-hidroxinonenal, hexanal, pentanal, propanal y malondialdehído) son los productos finales más reactivos y tóxicos formados durante la oxidación lipídica; para su determinación se han descrito varios métodos, los cuales se describen en la revisión de Sánchez-Moreno y Larraurri, (1998).

3.7.2.4 Otros métodos

Para evaluar la susceptibilidad a la oxidación, existen otros métodos difíciles de enmarcar dentro de la clasificación anterior pues se basan en principios diferentes; sus usos más importantes han sido para la evaluación de antioxidantes y para la predicción de la durabilidad de los alimentos. Entre ellos, se menciona el método del metil-linoleato y el método del blanqueamiento del β -caroteno.

- Método del metil-linoleato

El método del metil-linoleato se basa en la autooxidación acelerada de metil-linoleato en dodecano anhidroso, bajo fuertes condiciones de oxidación (110 °C y oxigenación intensa) durante varias horas. La cromatografía de gases se usa para determinar la desaparición del metil-linoleato. El método consiste en mezclar una disolución de dodecano anhidroso con eicosano como estándar interno y una cantidad de antioxidante en una celda de oxidación, a 110°C y con burbujeo de oxígeno en el medio de reacción. La actividad antioxidante de la muestra se determina de forma relativa mediante el incremento en el tiempo de vida media respecto a la del control sin ningún antioxidante adicionado (Sánchez-Moreno y Larraurri, 1998).

- Método del blanqueamiento del β -caroteno

El método original de Marco, (1968) utiliza la medición espectrofotométrica de la decoloración del β -caroteno para calificar la actividad antioxidante de diversos compuestos en un sistema de emulsión acuosa de β -caroteno/ácido linoléico. La reacción usualmente es iniciada por temperatura (50 °C). Aunque es un método simple y sensible, fue criticado por Frankel, (1993) debido a su falta de especificidad, ya que pueden presentarse interferencias por agentes oxidantes y reductores en extractos (Fukomoto y Mazza, 2000).

El método del blanqueamiento del β -caroteno ha sido utilizado para evaluar la actividad antioxidante de 42 flavonoides (Burda y Oleszek, 2001). También ha sido utilizado en combinación con otros métodos, tales como método del tiocianato férrico para semillas de uva (Jayasprakasha *et al*, 2001), método del DPPH para distintos polifenoles (Chaillou y Nazareno, 2006), para cáscaras de canola (Amarowicz *et al*, 2000), cáscaras de avellana (Moure *et al*, 2000), orujo de manzana (Lu y Foo, 2000) además de cáscaras y pulpas de manzanas y peras (Leontowicz *et al*, 2003).

Actualmente, uno de los tópicos más relevantes en el área de los alimentos y la agricultura es el estudio de los antioxidantes naturales. Consiguientemente, se han desarrollado una gran diversidad de métodos para investigar la actividad antioxidante de vegetales y sus componentes, la mayoría de los trabajos emplean ensayos espectrofotométricos como DPPH, ABTS, FRAP, método del tiocianato férrico, de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico, de los dienos conjugados o blanqueamiento del β -caroteno. Los estudios más recientes generalmente aplican dos o más diferentes métodos de captura de radicales libres como DPPH, ABTS o FRAP o bien combinan ensayos para evaluar la capacidad secuestradora de radicales libres con análisis de peroxidación de lípidos (Moon y Shibamoto, 2009).

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

A continuación se presentan los principales materiales y la metodología analítica y experimental, utilizada durante el desarrollo de este trabajo.

4.1 Materiales y equipos

4.1.1 Materias primas

Los residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa fueron provistos por BAYAS DEL SUR S.A., los descartes de pera y durazno por ACONCAGUA FOOD S.A. y los desechos de pimentón por SURFRUT S.A.

En la Tabla 4.1 se presentan los residuos agroindustriales en estudio y su composición

Tabla 4.1: Residuos agroindustriales sólidos en estudio

Residuo agroindustrial	Origen	Composición	Humedad Inicial (%)	Humedad Final (%)
Arándano azul <i>Vaccinium corymbosum</i>	Bayas del sur S.A. Purranque-Chile	Pieles y semillas	65.56	4.99
Arándano rojo <i>Vaccinium macrocarpon</i>	Bayas del sur S.A. Purranque-Chile	Pieles y semillas	67.23	3.92
Durazno <i>Prunus persica</i>	Aconcagua food S.A. Buin-Chile	Cáscaras restos de pulpa y de carozo	83.96	5.62
Frambuesa <i>Rubus idaeus</i>	Bayas del sur S.A. Purranque-Chile	Pieles y semillas	61.69	4.52
Pera* <i>Pyrus communis</i>	Aconcagua food S.A. Buin-Chile	Cáscaras	82.50	6.53
Pera Tamizada * <i>Pyrus communis</i>	Aconcagua food S.A. Buin-Chile	Cáscaras y restos de pulpa	68.81	6.02
Pera Desplumada* <i>Pyrus communis</i>	Aconcagua food S.A. Buin-Chile	Cáscaras, restos de pulpa y semillas	64.70	6.22
Pimentón <i>Capsicum annum</i>	Surfrut Ltda. Romeral-Chile	Pedúnculos y placenta	90.21	8.66

*Se hace notar que los residuos de pera, pera tamizada y pera desplumada corresponden a descartes de la misma fruta, pero provenientes de distintas líneas de producción: conservas, pulpa y jugos, respectivamente.

Todos los residuos analizados presentaban una elevada humedad inicial, sobre 60%, por lo cual debieron ser sometidos a secado con el fin de remover el agua para conservación de los descartes. Debido a que la deshidratación puede originar importantes modificaciones tanto en el ordenamiento estructural de los polisacáridos de la pared celular vegetal como en la actividad antioxidante de los desechos provenientes del procesamiento de frutas y hortalizas; dichas modificaciones se incrementan al utilizar largos tiempos de secado a bajas temperaturas o elevadas temperaturas de secado. Por tanto, el proceso de secado se realizó en un secador de bandejas con aire caliente a una temperatura inferior a 60°C, la cual promueve una menor desestabilización de los envoltorios celulares vegetales y previene la pérdida de compuestos bioactivos por oxidación térmica, de acuerdo a lo reportado por Larrauri *et al*, (1997) y Garau *et al*, (2007). Posteriormente, los residuos fueron triturados finamente, desgrasados con éter de petróleo, dispuestos en bolsas plásticas cerradas herméticamente y almacenados a temperatura ambiente en oscuridad hasta su empleo para los análisis.

4.1.2 Preparados enzimáticos

Se emplean diversos biocatalizadores, con carácter celulolítico, hemicelulolítico y pectinolítico. Sus características principales se muestran en la Tabla 4.2

Tabla 4.2: Preparados Enzimáticos comerciales utilizados en este trabajo

Nombre comercial	Estado	Actividad principal	Proveedor
Cellubrix	Líquido	Celulasa	Novozymes Bagsværd-Dinamarca
Granozyme PE	Sólido	Hemicelulasa	Granotec Santiago-Chile
Grindamyl CA 150	Líquido	Pectinasa	Danisco Grindsted- Dinamarca
Maxoliva	Líquido	pectinasa+hemicelulasa	DSM Delft-Holanda
Olivex	Líquido	Pectinasa	Novozymes Bagsværd-Dinamarca
Pectinex Ultra SPL	Líquido	Pectinasa	Novozymes Bagsværd-Dinamarca
Rohapect 10L	Líquido	Pectinasa	AB enzymes Darmstadt—Alemania
Rohapect DA6L	Líquido	pectinasa+arabanasa	AB enzymes Darmstadt- Alemania
Rohavin	Líquido	pectinasa+celulasa	AB enzymes Darmstadt- Alemania
Ultrazym 100G	Sólido	Pectinasa	Novozymes Bagsværd-Dinamarca
Viscozym	Líquido	celulasa+hemicelulasa	Novozymes Bagsværd-Dinamarca

4.1.3 Reactivos

En la Tabla 4.3 se presenta la lista de los principales reactivos utilizados durante el transcurso de esta investigación.

Tabla N°4.3: Lista de los principales reactivos

Nombre reactivo	Fórmula química	Utilización
hidróxido de sodio	NaOH	determinación de proteínas método Kjeldahl
tiosulfato de sSodio pentahidratado	Na ₂ S ₂ O ₃ *5 H ₂ O	determinación de proteínas método Kjeldahl
ácido bórico	H ₃ BO ₃	determinación de proteínas método Kjeldahl
azul de metileno	Indicador	determinación de proteínas método Kjeldahl
rojo de metilo	indicador	determinación de proteínas método Kjeldahl
sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	determinación de proteínas método Kjeldahl
ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	determinación de proteínas método Kjeldahl
óxido de mercurio	HgO	determinación de proteínas método Kjeldahl
ácido clorhídrico	HCl	determinación de proteínas método Kjeldahl
ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	determinación de fibra cruda
hidróxido de sodio	NaOH	determinación de fibra cruda
ácidoetilendiaminotetraacético (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ /((HOOCCH ₂) ₂ NCH ₂) ₂	determinación de FND
Borax	Na ₂ B ₄ O ₇ *10 H ₂ O	determinación de FND
lauril sulfato sódico	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	determinación de FND
2-etoxietanol		
éter monoetilico de etilenglicol	C ₄ H ₁₀ O ₂ /CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	determinación de FND
fosfato ácido de sodio	Na ₂ HPO ₄	determinación de FND
ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	determinación de FND
Decahidronaftaleno	C ₁₀ H ₁₈	determinación de FND
sulfito sódico	Na ₂ SO ₃	determinación de FND
bromuro de cetrilamonio		determinación de FAD
ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	determinación de FAD
Decahidronaftaleno	C ₁₀ H ₁₈	determinación de FAD
Acetona	CH ₃ COCH ₃	determinación de FAD
ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	determinación de lignina
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	determinación de pectina
Benceno	C ₆ H ₆	determinación de pectina
oxalato de amonio	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	determinación de pectina
reactivo folin-Ciocalteau		determinación fenoles totales extraíbles
Metanol	CH ₃ OH	determinación fenoles totales extraíbles
carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	determinación fenoles totales extraíbles
ácido gálico	C ₆ H ₂ (OH) ₃ COOH	determinación fenoles totales extraíbles
2,2-difenil - 1 - picri hidracilo DPPH	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	determinación AO método DPPH
Metanol	CH ₃ OH	determinación AO método DPPH
2,2'azinobis(3etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) ABTS	C ₁₈ M ₁₆ N ₄ O ₆ S ₄ - (NH ₄) ₂	determinación AO método ABTS
persulfato de potasio	K ₂ S ₂ O ₆	determinación AO método ABTS
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	determinación AO método ABTS
acetato de sodio trihidrato		determinación AO método FRAP
ácido acético	CH ₃ COOH	determinación AO método FRAP
2,4,6-tripiridil-s-triazina TPTZ	C ₁₈ H ₁₂ N ₆	determinación AO método FRAP
Ácido clorhídrico	HCl	determinación AO método FRAP
Cloruro férrico hexahidrato	FeCl ₃ *6 H ₂ O	determinación AO método FRAP
cloroformo	CHCl ₃	determinación del VP
ácido acético	CH ₃ COOH	determinación del VP
yoduro de potasio	KI	determinación del VP
tiosulfato sódico	Na ₂ S ₂ O ₃	determinación del VP
Almidón	indicador	determinación del VP

4.1.4 Equipos

Agitador de tubos Vortex Mixer VM-300.

Balanza analítica Chyo JS-100

Balanza digital Denver Instrument Co. Model 300

Baño termostático Selecta Tectron BIO

Equipo Kjeldahl

Equipo Soxhlet

Espectrofotómetro Jenway ,6505 UV/VIS

Estufa Memmert

Estufa a vacío Jeio Tech VO-20X

Mufla Naber D-2804 Model N3 R

Placa Magnética Thermoline nuova

Placa agitadora IKA RO 15

pHmetro Hanna Instrumed HI 8520

4.2 Metodología analítica.

La metodología analítica utilizada en el proyecto, considera la caracterización de los residuos agroindustriales, la determinación de compuestos fenólicos totales extraíbles en los extractos crudos y la evaluación de la actividad antioxidante de los mismos por tres diferentes métodos. Adicionalmente, se realizan experiencias para monitorear la estabilidad oxidativa de aceites crudos.

4.2.1 Caracterización de los residuos agroindustriales

Se realiza la caracterización proximal de los materiales residuales seleccionados (desechos de arándano azul, arándano rojo, durazno, frambuesa, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón), evaluando su contenido de proteínas, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (por diferencia). Asimismo, para cada uno de ellos, se determina el contenido en fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, fibra ácido de lignina y pectinas con el propósito de analizar, posteriormente, tanto el efecto del proceso de extracción como el efecto del tratamiento enzimático sobre el contenido total de compuestos fenólicos extraíbles y capacidad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos.

4.2.1.1 Proteínas

El método de Kjeldahl es la técnica más usada para determinar el contenido de proteínas en alimentos, se basa en la medición del nitrógeno orgánico total. La técnica consiste en digerir la muestra con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador, que puede ser sulfato de cobre; durante la digestión el nitrógeno orgánico presente se transforma en sulfato de amonio, el cual es destilado en ambiente básico, liberándose el amonio que se recibe en una solución ácida. El amonio se determina por titulación (Treibol y Aurand, 1963).

La determinación de proteínas por esta técnica asume que todo el nitrógeno orgánico proviene del material proteico; esta suposición puede acercarse a la realidad en el caso de semillas con alto contenido proteico, que presentan mayor proporción de nitrógeno proteico en comparación con otras fuentes de nitrógeno orgánico como los ácidos nucleicos. Para convertir la cantidad de nitrógeno, N, en cantidad de proteínas se requiere conocer el contenido de este elemento en la proteína; generalmente, se asume que la proteína contiene un 16% de nitrógeno, por lo que se multiplica el valor obtenido de N por un factor de 6.25.

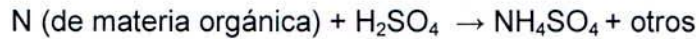
El protocolo para la determinación de proteínas se basa en el procedimiento 960.52 descrito por AOAC (AOAC, 1990a).

Para seguir el protocolo de análisis se necesita preparar las soluciones que se detallan en la Tabla 4.4.

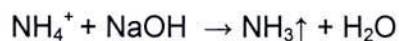
Tabla 4.4: Preparación de las soluciones para la determinación de proteínas por el método Kjeldahl

Solución	Disolver bien
Solución NaOH-Na ₂ S ₂ O ₃	60 g NaOH + 5 g Na ₂ S ₂ O ₃ *5 H ₂ O y aforar a 100 mL
Solución saturada de ácido bórico	7.5 g en 100 mL
Solución indicadora	1 mL de azul de metileno en alcohol al 0.2 % + 2 mL de rojo de metilo al 0.2%

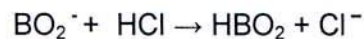
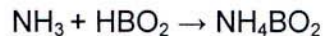
Digestión: En un matraz Kjeldahl se digieren 0.5 g de muestra la a analizar en presencia de 2 g de K_2SO_4 , de 5 mL de ácido sulfúrico y de 50 mg de HgO. La muestra se digiere a hasta que la solución se pone de color verde cristalino. Luego de enfriar, se agrega un volumen mínimo de agua para disolver los sólidos y se agrega vaselina al cuello del frasco.



Destilación: La muestra digerida se transfiere al equipo de destilación Kjeldahl, lavando previamente el matraz unas 5 veces con 2 mL de agua. En el extremo del condensador se pone un erlenmeyer con la solución saturada de ácido bórico y 2-4 gotas de indicador. A la muestra se agregan 10 mL de la solución NaOH $-Na_2S_2O_3$, se recolectan 15 mL de destilado y se diluyen hasta un volumen de 50 mL.



Titulación: Se titula con HCl 0.01 N.



Se hace un blanco y se calcula el porcentaje de N según:

$$\%N = \frac{[(M - B) * N * 14.007]}{mg \text{ de muestra}} * 100$$

Donde:

B = mL de HCl 0.01 N en el blanco.

M = mL de HCl 0.01 N en la muestra.

N = Normalidad del HCl.

Entonces, $\% \text{ Proteínas} = 6.25 * \% N$

4.2.1.2 Cenizas

El contenido de cenizas de una muestra se determina por incineración según el método 923.03 (AOAC, 1990b). En una cápsula de porcelana (previamente pesada) se coloca una cantidad muestra molida de peso conocido (entre 4 y 6 g), se calcina en horno a 550°C hasta alcanzar peso constante. Se calcula el contenido en cenizas como el peso del residuo calcinado (peso final) respecto al peso de muestra inicial, en porcentaje:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

4.2.1.3 Humedad

El contenido de humedad de una muestra se mide por el secado de la muestra hasta que se alcance peso constante. Dado que se ha determinado que diferentes muestras molidas de entre 3 y 5 g alcanzan peso constante con tiempos de secados variables desde 4 horas hasta 5 días, se requiere estandarizar el tiempo de secado, este se elegirá entre 12 y 24 horas. Debido a la hidrosopicidad de las muestras secas, éstas se dejan enfriar en desecadora por 3 min. Se considera como peso seco al promedio de 3 pesadas realizadas entre 3 y 10 minutos desde que son retiradas de la estufa. Este procedimiento ha sido validado midiendo la humedad a muestras control por la técnica de Karl Fisher, método 934.20 (AOAC, 1990c).

El contenido de humedad se expresa en términos de porcentaje:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

Entonces, $\% \text{ Peso seco} = 100 - \% \text{ Humedad}$

4.2.1.4 Aceite total

El contenido de aceite de los residuos agroindustriales, denominado extracto etéreo, se determina por extracción con éter de petróleo en contracorriente en un equipo soxhlet. El procedimiento usado es el recomendado por la norma chilena Nch 485

Procedimiento:

1. Se cortan dos circunferencias de papel filtro Whatman N°2 de alrededor de 15 cm de diámetro y se ponen a secar junto con un capacho de celulosa, en estufa a 105°C por 2 horas.
2. Se pesan aproximadamente 8g de residuo molido (con un contenido de humedad (H) inferior al 9%) y se registra ese valor como M_1
3. Se pesa una circunferencia de papel filtro Whatman N°2 seco y frío y se envuelve en él la muestra. Este paquete se cubre con la otra circunferencia de papel en diferente sentido.
4. Se pesa el capacho de celulosa y se introduce la muestra en su interior.
5. Se pesa el balón del equipo Soxhlet previamente secado
6. Se instala el capacho de celulosa en el sifón del equipo Soxhlet. En el balón se deposita el solvente (éter de petróleo en cantidad 1.5 veces el volumen del sifón)
7. Se somete a ebullición moderada del solvente por un período de 6 horas y se deja enfriar.
8. Se extrae el solvente en el mismo equipo de extracción.
9. Se eliminan las últimas trazas de solvente calentando el balón en una estufa a 105°C por un tiempo de al menos 30 minutos.
10. Se deja enfriar el balón en la desecadora a temperatura ambiente y se pesa. Se calienta nuevamente el balón durante 10 minutos en las mismas condiciones, se deja enfriar en la desecadora y se vuelve a pesar, hasta que la diferencia entre las dos pesadas no exceda los 10 mg. Se registra la masa final del balón como M_2

Entonces, se expresa el contenido de aceite de los residuos en base seca como

$$\% \text{ aceite} = \frac{M_2 * 100}{M_1 * (1 - H)}$$

4.2.1.5 Fibra Cruda

La fracción de fibra cruda de una muestra se determina según el procedimiento AOCS-AOAC 962.09 (AOAC 1990 d), que consiste en la digestión secuencial de la muestra con ácido sulfúrico y luego con álcali (NaOH) y finalmente un lavado con alcohol para remover proteínas, azúcares y lípidos hasta quedar con un residuo que está constituido por los polisacáridos estructurales de la pared celular (celulosa, lignina, hemicelulosa, etc) y por cenizas. La técnica utiliza un método gravimétrico, en que las cenizas por calcinación se restan al residuo fibroso.

Procedimiento:

1. Se pesan 2 g de muestra seca y desgrasada.
2. Se adicionan 200 mL de H₂SO₄ al 1.25% p/v.
3. Se hierve durante 30 min.
4. Se filtra a vacío en un embudo Büchner y se lava con agua hirviendo hasta que el filtrado no tenga ácido.
5. Se hierve el residuo durante 30 min con 200 mL de NaOH al 1.25% p/v, en un sistema de condensación con reflujo.
6. Se filtra el residuo y se lava con agua hirviendo hasta que el filtrado no tenga álcali.
7. Se calcina el residuo a 550 °C, hasta peso constante. Se registra el peso P₂ en gramos.

Entonces, se expresa el contenido de fibra cruda como:

$$\% \text{ Fibra Cruda} = \frac{(P_1 - P_2)}{2 \text{ gramos}} * 100$$

4.2.1.6 Fibra Insoluble en Detergentes

Algunos métodos para determinar el contenido de fibra en muestras de origen vegetal se basan en la diferente solubilidad de los distintos componentes de la célula vegetal en presencia de ciertos detergentes. Esa determinación puede efectuarse siguiendo los procedimientos desarrollados por Van Soest y Wine, (1968); Goering y Van Soest, (1970) y Van Soest *et al*, (1991).

Una de las grandes ventajas de estas técnicas basadas en la solubilidad selectiva por los componentes de la célula vegetal en presencia de ciertos detergentes, es que por un procedimiento relativamente simple y secuencial se pueden estimar las proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina en una muestra dada. La fibra neutro detergente (FND) corresponde a un primer residuo fibroso que contiene celulosa, lignina y hemicelulosa, la fibra ácido detergente (FAD) está formada por el complejo ligno-celulósico y cuando este residuo se digiere con ácido sulfúrico al 72%, se separa la celulosa quedando un remanente que es fundamentalmente lignina y cenizas; el contenido de cenizas se valúa por calcinación.

La diferencia entre los pesos del residuo final y las cenizas permite obtener el contenido de lignina (FAL), entonces se pueden estimar estos tres componentes de acuerdo a:

$$\text{Hemicelulosa} = \text{FND} - \text{FAD}$$

$$\text{Celulosa} = \text{FAD} - \text{FAL}$$

$$\text{Lignina} = \text{FAL}$$

Este método es fácil de realizar y presenta menos interferencias que otras técnicas. Se ha encontrado que las interferencias dependen de la composición de la muestra en estudio; en la FND se presentan interferencias por el contenido de almidón y por proteínas que si no se solubilizan totalmente, incrementan el valor de la FND. En la FAD, si parte de la lignina es solubilizada por la digestión en detergente ácido se producirá una disminución en el contenido real de lignina; la mayor interferencia en el valor de FAD es provocada por la presencia de pectinas, que se precipitan y que por tanto aumentan este valor, reduciendo la estimación de hemicelulosa. La determinación del valor de FAL también puede alterarse por presencia de cutina, que no es solubilizada por el ácido sulfúrico, permaneciendo en el residuo fibroso de lignina, ello implicaría un incremento en el contenido de lignina y una reducción en el contenido de celulosa.

4.2.1.6.1 Fibra Neutro Detergente

En presencia de lauril sulfato sódico a pH neutro se solubilizan, principalmente, el material citoplasmático (proteínas, gomas, mucílagos, lípidos, azúcares, almidón, sílica amorfa) y las sustancias pécticas, quedando un residuo que contiene componentes de la pared celular, mayoritariamente celulosa, hemicelulosa y lignina; este residuo corresponde a la "fibra neutro detergente".

Para seguir el protocolo de análisis se necesita preparar la solución neutro detergente de acuerdo a la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Preparación de la solución neutro detergente

Paso	Disolver bien
1	1.86g EDTA + 0.68g Na ₂ B ₄ O ₇ *10 H ₂ O = Solución A
2	3g de lauril sulfato sódico + 1g de 2-etoxtanol + 70 mL de H ₂ O = Solución B
3	Solución A + Solución B = Solución C
4	0.456g Na ₂ HPO ₄ + 15 mL H ₂ O (caliente) = Solución D
5	Solución C + Solución D, se ajusta pH a 6.9-7.0 con H ₃ PO ₄
6	Se precipita y se calienta suavemente para redissolver

Procedimiento:

1. Se pesa 1 g de muestra en un erlenmeyer de 200 mL.
2. Se añaden 100 mL de la solución neutro detergente, 2 mL de decahidronaftaleno y 0.5 mL de Na₂SO₃.
3. Se coloca en autoclave durante 15 min a 121°C.
4. Se filtra en caliente a través de un crisol de vidrio poroso N° 2 (previamente lavado con ácido, secado y pesado).
5. Se lava bien el residuo con 500 mL de agua caliente y luego con agua destilada.
6. Se lava con acetona para eliminar los pigmentos y el agua.
7. Se seca a 105 °C durante 4 h, se deja enfriar y se pesa.

Entonces, el contenido en fibra neutro detergente se calcula como porcentaje en base seca de la muestra original.

$$\%FND = \frac{(P_2 - P_1)}{P_{MS}} * 100$$

Donde:

P_1 = peso del crisol de vidrio poroso N°2

P_2 = peso del crisol de vidrio poroso N°2 más la muestra seca

P_{MS} = peso de la muestra original en base seca.

4.2.1.6.2 Fibra Ácido Detergente

La muestra en presencia de bromuro de cetilmetilamonio en medio ácido solubiliza el contenido hemicelulósico y parte de las proteínas de la pared, además del material protoplasmático, quedando un residuo insoluble que contiene principalmente celulosa y lignina.

Para seguir el protocolo de análisis se necesita preparar la solución ácido detergente de acuerdo a la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Preparación de la solución ácido detergente

Paso	Disolver bien
1	2 g Bromuro de cetrilamonio + 100 mL H ₂ SO ₄ 1N

Procedimiento:

1. Se pesa 1 g de muestra en un matraz y se añaden 100 mL de la solución ácido detergente y 2 mL de decahidronaftaleno
2. Se coloca en autoclave durante 15 min a 121°C.
3. Se filtra en caliente a través de un crisol de vidrio poroso N° 2 (previamente lavado, seco y pesado).
4. Se lavar muy bien el residuo con 500 mL de agua caliente y finalmente con agua destilada.
5. Se lava con acetona para eliminar los pigmentos y el agua.
6. Se seca a 105 °C durante 4 h, se deja enfriar y se pesa.

Entonces, el contenido en fibra ácido detergente se calcula como porcentaje en base seca de la muestra original.

$$\%FAD = \frac{(P_2 - P_1)}{P_{MS}} * 100$$

Donde:

P_1 = peso del crisol de vidrio poroso N°2

P_2 = peso del crisol de vidrio poroso N°2 más la muestra seca

P_{MS} = peso de la muestra original en base seca

Con lo cual, el contenido de hemicelulosa se expresa como:

hemicelulosa = FND – FAD

4.2.1.6.3 Lignina

El residuo lignocelulósico del FAD, se trata con ácido sulfúrico al 72 % para disolver el material celulósico, quedando un residuo sólido que es principalmente lignina y cenizas

Procedimiento:

1. Se obtiene el residuo en el crisol de vidrio poroso por el procedimiento para determinar FAD.
2. Se lava con H_2SO_4 al 72% hasta cubrir el material y se remueve la mezcla cada cierto tiempo.
3. Se repite cada hora el lavado anterior, por 3 veces.
4. Se filtra con agua caliente y luego con agua destilada.
5. Se seca a $105^\circ C$, hasta peso constante. Se registra su peso como P_1 .
6. Se calcina la muestra por 3 h a $550^\circ C$. Se registra su como P_2 .

Entonces, se calcula el contenido de lignina como $P_1 - P_2$

El contenido de lignina se expresa como porcentaje en base seca de la muestra original. Se estima el contenido de celulosa, expresándolo como:

celulosa = FAD – lignina.

4.2.1.7 Pectinas

Se han propuesto distintos métodos para la determinación de pectinas que, por lo general, requieren de una extracción previa. Entre ellos se encuentran métodos gravimétricos, volumétricos, colorimétricos, cromatográficos y electroforéticos. Sin duda los métodos colorimétricos son los más recomendados por su selectividad y sencillez; éstos se basan en hacer reaccionar los ácido urónicos con el ácido sulfúrico caliente formando el ácido 5- formil -2-furanocarboxílico, el cual se hace reaccionar selectivamente con algunos reactivos cromogénicos para formar un compuesto coloreado (Carbonell *et al*, 1990).

Procedimiento:

1. Se pesan 2 g de muestra seca y se diluyen con 300 mL de agua destilada.
2. Se incuba con agitación por 3 h a 40°C, el residuo se seca (a 80 -100°C) hasta peso constante.
3. El residuo seco se somete a extracción en soxlet con una solución de alcohol/benceno (1:2) durante 6 h, y con al menos 5 lavados por hora; los sólidos sin extraer se secan nuevamente hasta peso constante, para someterlo a extracción con oxalato de amonio.
4. El sólido remanente (de peso S_1 en gramos) se mezcla con 200 mL de una solución de oxalato de amonio 0.5 % p/v.
5. Se incuba a 50°C por 1h.
6. Se filtra sobre papel filtro y se lava con agua destilada caliente.
7. El nuevo residuo sólido se seca hasta peso constante (de peso S_2 en gramos).

El contenido de pectinas corresponde a la fracción solubilizada con oxalato de amonio, calculándose de acuerdo a:

$$\% \text{ Pectinas} = \frac{(S_1 - S_2)}{2 \text{ gramos}} * 100$$

4.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales extraíbles

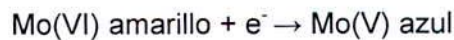
Los métodos tradicionales para la determinación del contenido total de fenoles se basan en la medición directa de la absorción de radiación electromagnética ya sea en la región ultravioleta o en la región visible-infraroja cercana. Entre estos últimos, el más comúnmente empleado es el ensayo colorimétrico que utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folin- Ciocalteau, el cual está formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$):



Que se reduce, por acción de fenoles, en una mezcla de óxido azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}).

Se cree que es más fácil que sea reducido el complejo el molibdeno y la reacción de transferencia de electrones ocurre entre los agentes reductores (compuestos antioxidantes) y el Mo (VI):



La coloración azul produce una absorbancia máxima de 765 nm. (neutralización con Na_2CO_3 hasta pH 6-6.5)

Los fenoles son enérgicamente oxidados en medio básico dando por resultado la formación de O_2^- , que alternadamente reacciona con el molibdeno con la formación del óxido de molibdeno.

Para calcular el contenido total de fenoles, se usan curvas de calibración obtenidas con la elección de un determinado compuesto fenólico como estándar. Los resultados son expresados en términos de equivalentes molares del compuesto fenólico que es el más abundante en la muestra de origen vegetal analizada (Antolovich *et al*, 2000).

El ácido gálico o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico ($C_7H_6O_5$), ha sido extensamente usado como estándar en la determinación de compuestos fenólicos de diversas muestras de origen vegetal.

Con el objeto de facilitar la comparación del contenido de fenoles en distintas muestras de residuos agroindustriales sólidos se emplea el ácido gálico, como único estándar, por ser éste un compuesto monomérico abundantemente distribuido en el reino el vegetal. Además, esta elección se justifica por la elevada pureza, la satisfactoria solubilidad, la adecuada estabilidad y el bajo precio del ácido gálico (Chun y Kim, 2004).

Procedimiento:

1. Se colocan 3.75 mL de agua destilada en un tubo de ensayo
2. Se adicionan 0.5 mL de la muestra que contiene el compuesto fenólico, previamente diluido en metanol (o en solvente en que se encuentra la muestra).
3. Se agregan 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteau diluido 2 veces con agua destilada
4. Se homogeniza y se adicionan 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio al 10% p/v
5. Se espera 1 hora a temperatura ambiente
6. Se realiza un blanco mediante el mismo procedimiento, reemplazando la muestra por el solvente
7. Se mide la absorbancia de las muestras a 765 nm.

Entonces, el contenido de fenoles totales en la muestra se determina interpolando el resultado en la curva patrón de absorbancia en función de la concentración de ácido gálico.

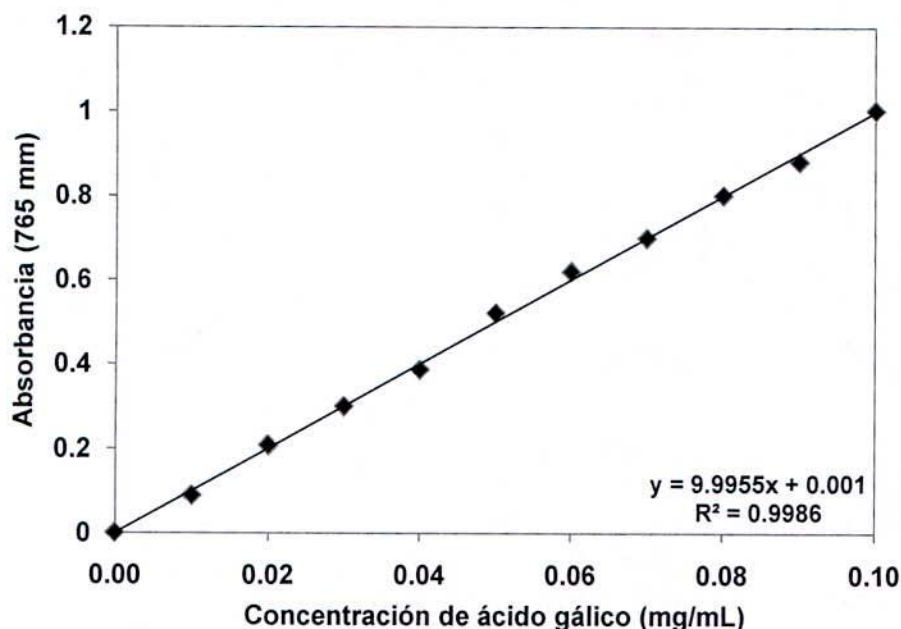


Figura 4.1: Curva de calibrado para la determinación del contenido total de fenoles extraíbles en equivalentes de ácido gálico

4.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante

Dado que la actividad antioxidante depende de múltiples factores, un protocolo confiable para su determinación, tanto en sistemas alimentarios como en sistemas biológicos, demanda la medición de más de una propiedad relevante, Por tanto, la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de desechos agroindustriales se evaluará por tres diferentes métodos complementarios; dos destinados a evaluar la capacidad secuestradora de radicales libres (ABTS y DPPH y uno que analiza el poder antioxidante o de reducción del hierro (FRAP).

4.2.3.1 Método de captación del radical DPPH

La actividad antioxidante se determina utilizando el método basado en la reducción del radical libre estable 2,2-difenilo - 1 - picriclo hidracilo.

El DPPH es un radical libre estable en solución acuosa o alcohólica y acepta un electrón o un radical de hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable.

Las sustancias antioxidantes reaccionan con el DPPH y la reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia a 515 nm (decoloración del reactivo).

Según el protocolo de análisis propuesto por *von Gadow et al, 1997*.

Procedimiento:

1. Se prepara una disolución del radical DPPH a concentración $3,6 \cdot 10^{-5}$ M en metanol.
2. Se mide su absorbancia a 515 nm ($A_{t=0}$)
3. Se coloca en un tubo de ensayo una alícuota de 2 mL de esa solución.
4. Se añaden 50 μ L de una disolución en metanol de la muestra a analizar (extracto antioxidante) y se homogeniza bien la mezcla.
5. Se mide la absorbancia luego de 16 minutos ($A_{t=16}$), contra blanco del solvente orgánico

El descenso de la absorbancia después de los 16 minutos se emplea para calcular el valor TEAC.

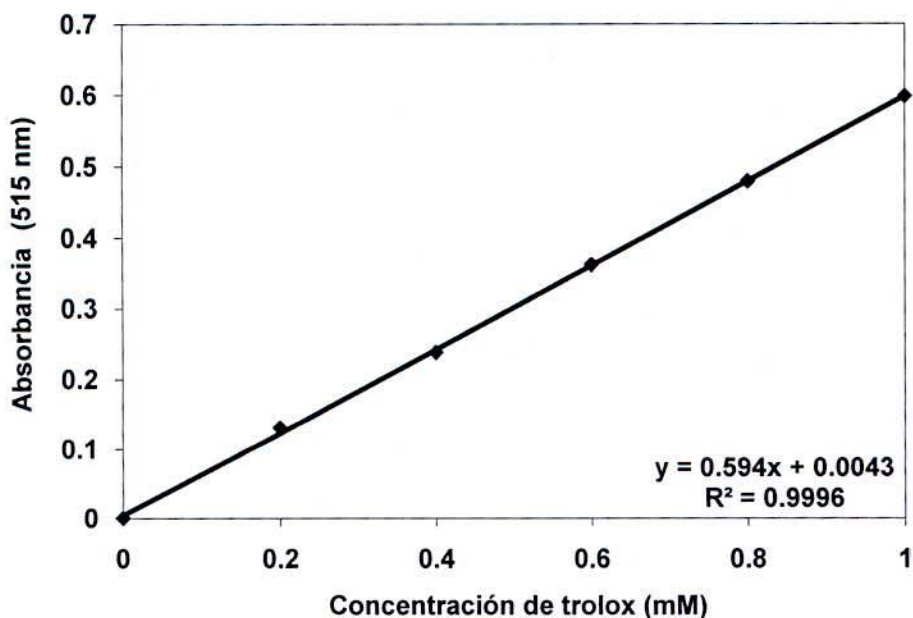


Figura 4.2: Curva de calibrado para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH en equivalentes Trolox

4.3.2.2 Método de captación del radical ABTS

Actualmente el método ABTS es ampliamente utilizado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica.

El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical $ABTS^+$ una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP (2,2 azinobis-(2-amidinopropeno)HCl), pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm.

Para determinar la actividad antioxidante de la muestra se utiliza el radical $ABTS^+$ formado tras la reacción (oxidación) de 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS 7 mM) con persulfato potásico 2.45 mM, incubados a temperatura ambiente y oscuridad durante 16 horas. El radical $ABTS^+$ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734 nm) reduciendo las posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de una reacción secundaria.

De acuerdo al protocolo de análisis propuesto por Re *et al*, (1999).

Procedimiento:

1. Se prepara una solución stock de ABTS a una concentración de 7 mM.
2. Se genera el radical catión ABTS ($ABTS^{++}$) por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio a una concentración de 2.45 mM.
3. Se mantiene la mezcla a temperatura ambiente y protegida de la luz por 12–16 h antes de usarla.
4. Se diluye la solución de $ABTS^{++}$ con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 (± 0.020) a 734 nm y se equilibra a 30°C.
5. Se mezcla 1 mL de solución de $ABTS^{++}$ diluida ($A_{734nm} = 0.700 \pm 0.020$) con 10 μ l de muestra a analizar.
6. Se monitorea la absorbancia durante 10 minutos.

El descenso de la absorbancia después de los 10 minutos se emplea para calcular el valor TEAC.

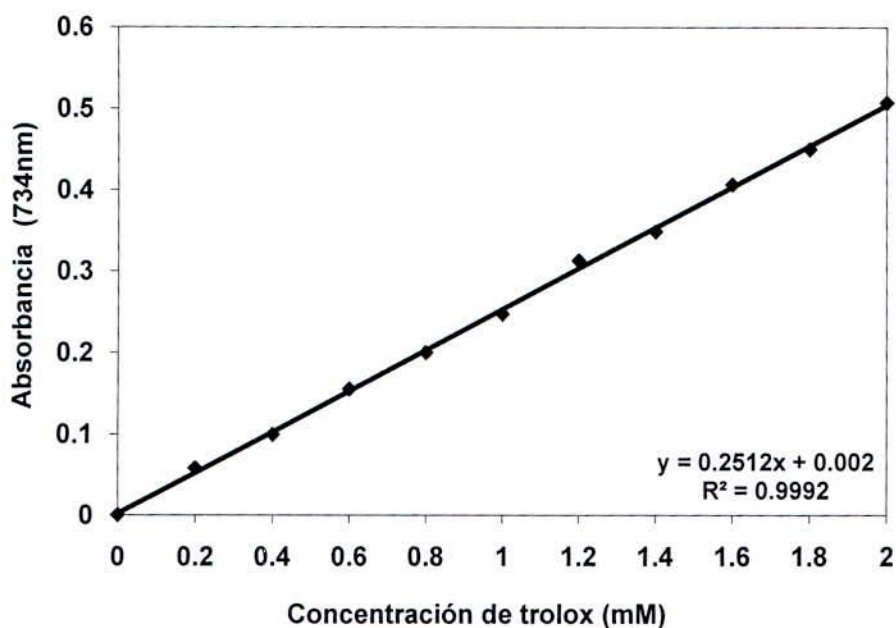


Figura 4.3: Curva de calibrado para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del ABTS en equivalentes Trolox

4.2.3.3 FRAP (Poder antioxidante o de reducción del hierro)

Este método se basa en reacciones de transferencia de electrones. En él se usa como reactivo una sal férrica, $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ = 2,4,6-trripiril-s-triazina). El poder reductor de esta sal de Fe(III) (0.7 V) es comparable al radical ABTS (= 0.68 V)

Por lo tanto, esencialmente, no hay muchas diferencias entre el análisis ABTS y el FRAP, excepto que el ABTS se realiza a pH neutro y el FRAP en condiciones de pH ácido (pH 3.6), para mantener la solubilidad iónica (la reacción a pH ácido reduce el potencial de ionización que conduce la transferencia electrónica e incrementa el potencial redox, causando un cambio en el mecanismo dominante de la reacción).

El reactivo FRAP se prepara con una mezcla de TPTZ en HCl, tampón acetato y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La solución final tiene 1.67 mM de Fe (III) y 0.83 mM de TPTZ. La concentración de TPTZ es deficiente ya que la reacción estequiométrica ideal entre Fe (III) y TPTZ es 1 a 2. Las sustancias antioxidantes sufren una reacción de oxidación en medio ácido, durante la cual el Fe^{+3} se reduce a Fe^{+2} . El complejo $(\text{Fe(II)TPTZ}_2)^{+2}$ es de color azul intenso y se determina colorimétricamente a 593 nm.

Realizando el protocolo de análisis propuesto por Benzie y Strain, (1996)

Procedimiento:

1. Se prepara tampón acetato 300 mM pH 3.6
2. Se prepara una disolución 10 mM de TPTZ en 40 mM de HCl
3. Se prepara una disolución 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
4. Se combinan el tampón acetato y las disoluciones 10 mM de TPTZ en 40 mM de HCl y 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en proporción 10:1:1 para obtener el reactivo FRAP.
5. Se mide la absorbancia inicial del reactivo a 593 nm.
6. Se colocan 3.0 mL del reactivo FRAP en un tubo de ensayo.
7. Se adicionan 0.1 mL de la muestra que contiene el compuesto fenólico, previamente diluida en metanol (o en solvente en que se encuentra la muestra).
7. Se realiza un blanco mediante el mismo procedimiento, reemplazando la muestra por agua
8. Se lee la absorbancia de las muestras luego de 6 minutos a temperatura ambiente a 593 nm.

Entonces, el poder antioxidante o de reducción del hierro de las muestras se determina interpolando el resultado en la curva patrón de absorbancia en función de la concentración de ácido ascórbico.

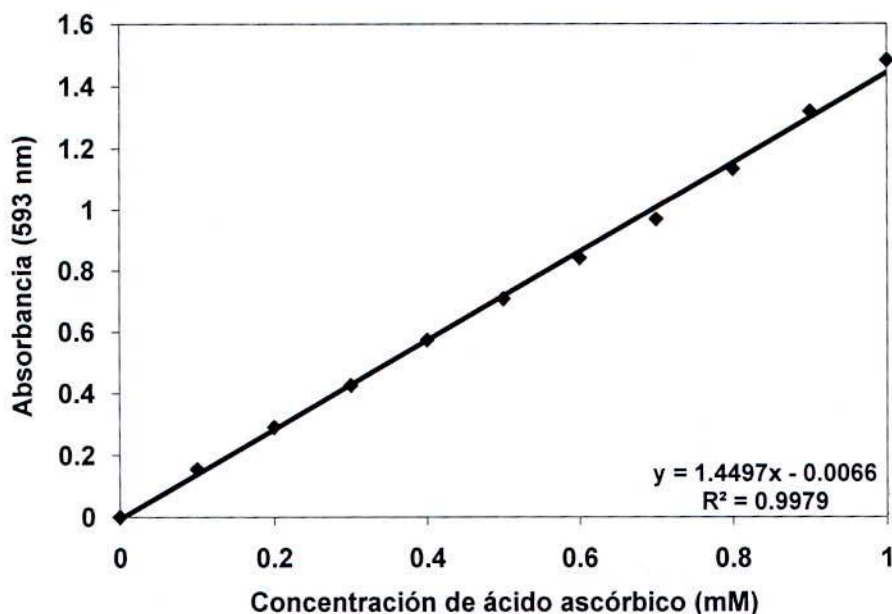


Figura N° 4.4 Curva de calibrado para la determinación del poder reductor del hierro en equivalentes de ácido ascórbico

4.2.4 Determinación del índice de peróxido

Los peróxidos son los primeros compuestos que aparecen en el proceso de rancidez, se forman por acción del oxígeno sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos en presencia de luz.

El índice de peróxidos se calcula a partir del yodo liberado del yoduro de potasio en las condiciones en las que se realiza el ensayo. Las sustancias que oxidan el yoduro de potasio se suponen que son peróxidos u otros productos similares de la oxidación de la grasa, por lo que el índice obtenido puede tomarse, en una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa o aceite.

Se seguirá el procedimiento 965.33 descrito en AOAC, (AOAC, 1990e)

Procedimiento:

1. Se toma un erlenmeyer de 250 mL, previamente seco, y se llena con un gas inerte, puro y seco (nitrógeno, helio, etc) para desplazar el oxígeno presente que pudiese reaccionar con el yoduro de potasio usado para la reacción con los peróxidos producto de la oxidación del aceite.
2. Se introducen 5g de la muestra de aceite a ensayar
3. Se añade un volumen de 10 mL de cloroformo, en el cual se disuelve rápidamente el aceite por agitación
4. Se adicionan 15 mL de ácido acético y 1 mL de disolución saturada y fresca de yoduro de potasio.
5. Se cierra el matraz y se mantiene en agitación durante un minuto, imprimiéndole un suave movimiento de rotación.
6. Se conserva en la oscuridad durante 5 minutos; transcurrido ese tiempo, se añaden 75 ml de agua destilada y se agita vigorosamente.
7. Se valora el yodo liberado con una disolución de tiosulfato sódico 0,1 N con agitación vigorosa hasta que el color amarillo haya desaparecido casi completamente.
8. Se agregan 0.5 mL de solución de almidón al 1%

9. Se continúa titulado para liberar el yodo hasta justo antes que el color azul desaparece.
10. Si se ocupa menos de 0.5 mL de disolución de tiosulfato sódico 0,1 N , se repite la titulación con una disolución de tiosulfato sódico 0,01 N
11. Se prepara un blanco

Entonces, la inhibición de la oxidación del aceite será expresada de la siguiente manera:

$$VP = \frac{(M - B) * N * 1000}{g \text{ de muestra}} \left(mmol H_2O_2 / kg \text{ aceite} \right)$$

donde:

- B = mL de Na_2SO_3 0.1 N en blanco
- M = mL de Na_2SO_3 0.1 N en muestra
- N = Normalidad del Na_2SO_3

4.3 Metodología experimental

El plan de trabajo desarrollado para alcanzar los objetivos propuestos (presentado en las Figuras 4.5 y 4.6 y en la Tabla 4.7) contempló la ejecución de las siguientes etapas:

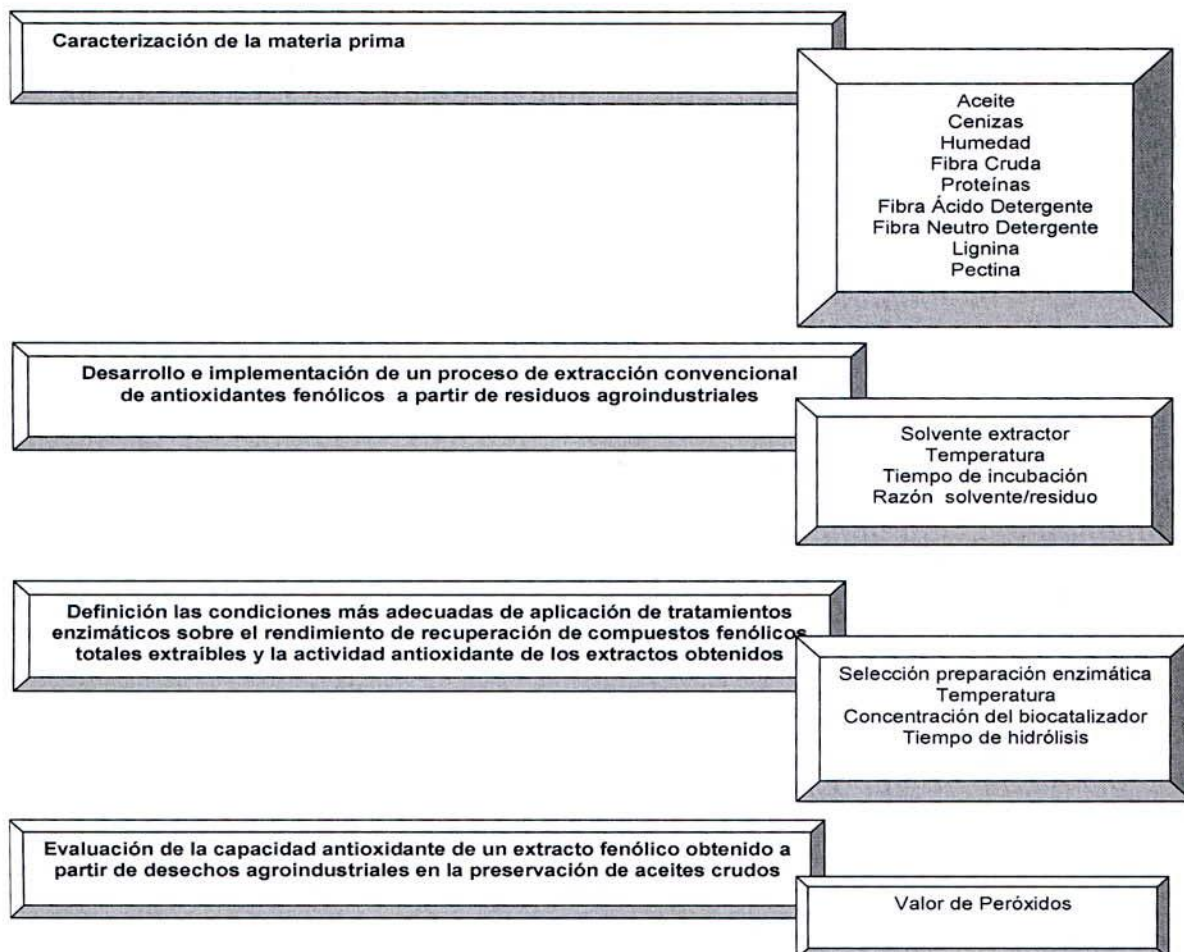


Figura 4.5: Actividades desarrolladas en el estudio de la aplicación de la tecnología enzimática en la extracción de antioxidantes fenólicos a partir de residuos agroindustriales

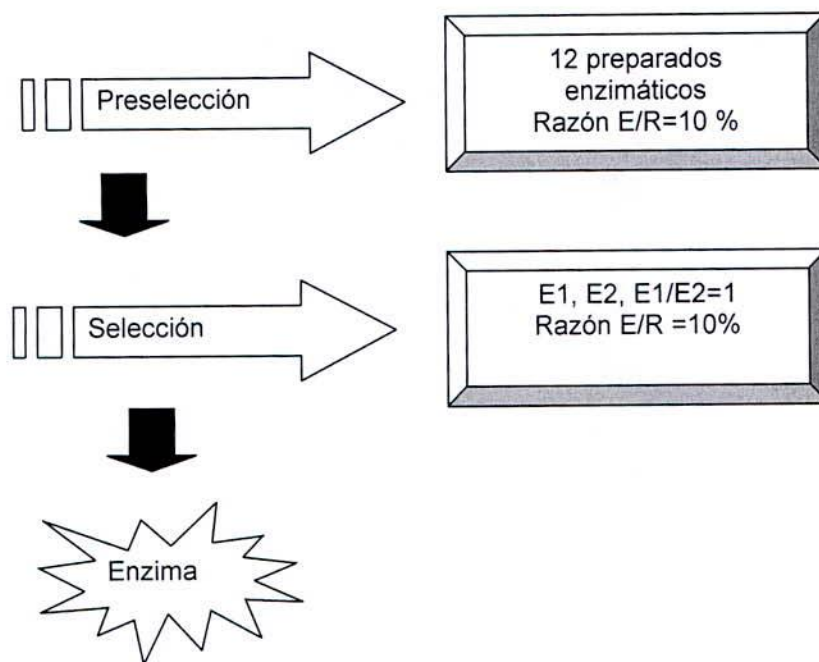


Figura 4.6: Selección de un preparado enzimático comercial para aplicar en la extracción de antioxidantes fenólicos a partir de residuos agroindustriales

Tabla 4.7: Análisis realizados en materia primas para obtener antioxidantes fenólicos

Análisis	Residuos de arándano azul	Residuos de arándano rojo	Residuos de Frambuesa	Residuos de Durazno	Residuos de Pera	Residuos de Pera Tamizada	Residuos de Pera Desplumada	Residuos de Pimentón
Proteínas	X	X	X	X	X	X	X	X
Cenizas	X	X	X	X	X	X	X	X
Humedad	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibra Cruda	X	X	X	X	X	X	X	X
Aceite total	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibra Neutro Detergente	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibra Acido Detergente	X	X	X	X	X	X	X	X
Lignina Acido Detergente	X	X	X	X	X	X	X	X
Pectinas	X	X	X	X	X	X	X	X
Fenoles totales extraíbles	X	X	X	X	X	X	X	X
DPPH	X	X	X	X	X	X	X	X
ABTS			X					
FRAP			X					
Valor de peróxidos			X					

Etapa 1. Caracterización de cada uno de los residuos agroindustriales: arándano azul, arándano rojo, durazno, frambuesa, pera, pera tamizada, pera desplumada y pimentón.

1.1 Caracterización proximal de la materia prima

Se realizó un análisis proximal a cada uno de los residuos agroindustriales en estudio, determinando su contenido de Cenizas, Proteínas, Fibra Cruda, Aceite y Extracto No Nitrogenado (por diferencia).

1.2 Caracterización de fibras de la materia prima

Se evaluó el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina de los residuos agroindustriales. Esta caracterización se realizó para estimar que tipo de preparados enzimáticos podrían incrementar los rendimientos de extracción de antioxidantes fenólicos.

Etapa 2. Desarrollo e implementación de un proceso de extracción convencional de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes a partir de residuos agroindustriales

2.1 Acondicionamiento de la materia prima.

Para los estudios de recuperación de antioxidantes fenólicos, es preferible utilizar la materia prima sin lípidos. Con este fin los residuos agroindustriales provenientes del procesamiento de arándano azul, arándano rojo, frambues, durazno, pera y pimentón secos y triturados finamente, fueron desgrasados con éter de petróleo, dispuestos en bolsas plásticas herméticamente cerradas y almacenados a temperatura ambiente hasta su empleo para los análisis.

2.2 Selección de los residuos agroindustriales

La selección de los residuos más adecuados para la recuperación de compuestos fenólicos con buena actividad antioxidante se realizó mediante un proceso extractivo que consideraba el contacto directo del solvente con el residuo en un sistema por lotes agitados. Muestras de 1.0 g de material vegetal triturado finamente, seco y desgrasado, fueron extraídas con un único solvente (metanol), usando agitación magnética (150 rpm) a condiciones de operación fijas para temperatura y razón solvente/residuo de 50°C, y 20:1, respectivamente, mediante la realización de cinéticas entre 1 y 36 horas en las que

cada punto significaba una experiencia diferente y el valor reportado era la media de tres experimentos. La extracción se detuvo con la separación de las fases líquidas y sólidas por filtración a vacío con papel de microfibra de vidrio una vez alcanzada la temperatura ambiente y se evaporó el solvente de los extractos hasta sequedad en rotavapor a 40°C. Los extractos obtenidos fueron refrigerados a 4°C hasta su análisis. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto /100g de muestra) así como su contenido fenólico (mg ácido gálico/g de muestra). Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando el método basado en la reducción de los radicales DPPH. La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de trolox (mmoles trolox/100g muestra).

2.3 Efecto de la temperatura de extracción sobre el rendimiento de recuperación de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos agroindustriales

Luego de seleccionar los tres residuos más adecuados para la recuperación de compuestos fenólicos con buena actividad antioxidante (arándano azul, arándano rojo y frambuesa), se evaluó el efecto de la temperatura de trabajo sobre las cinéticas de extracción de antioxidantes fenólicos entre 1 y 36 horas en las que cada punto significaba una experiencia diferente y el valor reportado era la media de tres experimentos. Se utilizaron tres temperaturas (40, 50 y 60°C), un solo tipo de solvente (metanol), condiciones de agitación de 150 rpm y razón solvente/residuo de 20:1. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles (g extracto /100g de muestra) así como su contenido fenólico (mg ácido gálico/g de muestra). Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando el método basado en la reducción de los radicales DPPH. La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de trolox (mmoles trolox/100g muestra).

2.4 Efecto del pH sobre el rendimiento de recuperación de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos agroindustriales

En esta actividad se desarrollaron cinéticas de extracción convencional de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, utilizando agua destilada y acidulada con una solución de HCl 1 M, manteniendo una temperatura de 60°C, una razón solvente/residuo de 20:1 y una agitación de 150 rpm. El pH se varió

entre 3 y 6. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto /100g de muestra) así como su contenido fenólico (mg ácido gálico/g de muestra). Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando el método basado en la reducción de los radicales DPPH. La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de trolox (mmoles trolox/100g muestra).

2.5 Estudio de las interacciones entre parámetros sobre el rendimiento de recuperación de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos agroindustriales

Con los residuos provenientes del procesamiento de arándano azul, arándano rojo y frambuesa se analizó el efecto de las interacciones entre tiempo de extracción (t), temperatura (T) y razón solvente/residuo (S/R) se desarrolló un diseño factorial 2^3 completo. La temperatura se varió entre 40°C y 60°C, los tiempos de extracción entre 3 y 30 horas y la razón solvente/residuo entre 10:1 y 20:1. Las variables fueron codificadas por medio de los signos algebraicos +1 y -1, tomando como punto central el valor cero. Se utilizaron seis sistemas extractores de diversa polaridad: acetato de etilo, etanol, metanol, y agua así como las mezclas hidroalcohólicas de etanol:agua y metanol:agua al 50:50% v/v. La agitación se mantuvo constante en 150 rpm. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles (g extracto /100g de muestra) así como su contenido fenólico (mg ácido gálico/g de muestra). Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando el método basado en la reducción de los radicales DPPH. La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de trolox (mmoles trolox/100g muestra).

La Tabla 4.8 muestra la matriz del diseño factorial, con las variables en sus formas no codificadas y codificadas, para una mejor comprensión.

Tabla 4.8: Matriz del diseño factorial para la extracción convencional por solvente de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa

Experimento	Tiempo	Temperatura	Razón	tiempo	Temperatura	Razón
N°	(h)	(°C)	S/R	(h)	(°C)	S/R
				x1	X2	X3
1	3	40	10	-	-	-
2	30	40	10	+	-	-
3	3	60	10	-	+	-
4	30	60	10	+	+	-
5	3	40	20	-	-	+
6	30	40	20	+	-	+
7	3	60	20	-	+	+
8	30	60	20	+	+	+
9	13,5	50	15	0	0	0
10	13,5	50	15	0	0	0
11	13,5	50	15	0	0	0
12	13,5	50	15	0	0	0

Los datos son ajustados a la siguiente superficie de respuesta:

$$R = a_0 + a_1 * t + a_2 * T + a_3 * R/S + a_{12} * tT + a_{13} * T R/S + a_{23} * TR/S + a_{123} * tTR/S$$

Donde a_0 es el valor de la función objetiva en las condiciones de punto central, a_1 , a_2 y a_3 representan los efectos principales asociados a cada variable y las otras constantes representan los efectos cruzados entre las variables.

Se seleccionó el residuo y solvente extractor que permitían una mayor recuperación de compuestos fenólicos y aquel que permitía una mayor capacidad antioxidante para la siguiente etapa.

Etapa 3 Definición las condiciones más adecuadas de aplicación de tratamientos enzimáticos sobre el rendimiento de recuperación de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos agroindustriales

3.1 Efecto del tipo de biocatalizador sobre la recuperación enzimáticamente asistida de compuestos fenólicos con actividad antioxidante obtenidos a partir de residuos agroindustriales

Dado que la composición de la pared celular es específica para cada vegetal, la selección de un sistema enzimático es crítica para la eficiente extracción. Por ello, se analizaron diversas preparaciones enzimáticas comerciales con el objetivo de evaluar su capacidad para degradar los componentes insolubles de la pared celular de los residuos de frambuesa. En particular, se usaron biocatalizadores que contenían una combinación de actividades enzimáticas tales como celulasa, hemicelulasa y pectinasa.

Luego de establecer un proceso estandarizado de recuperación de antioxidantes fenólicos, se realizaron experiencias con 12 preparados enzimáticos, bajo condiciones establecidas de operación recomendadas por los proveedores, con una mezcla agua/etanol (75/25% vH₂O/vEtOH) a una razón enzima/sustrato inicial del 10%. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles, expresado como g extracto /100g de muestra así como su contenido de fenoles totales extraídos, expresado como mg ácido gálico/g de muestra. Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando tres diferentes métodos. La capacidad antioxidante evaluada por los métodos DPPH y ABTS se expresó como mmol trolox/ 100g muestra, mientras que la capacidad antioxidante evaluada por el método del FRAP se expresó como mmol ácido ascórbico/ 100g muestra.

3.2 Estudio del efecto de la temperatura sobre la recuperación enzimáticamente asistida de compuestos fenólicos con actividad antioxidante obtenidos a partir de residuos agroindustriales

Luego de seleccionar 2 biocatalizadores, los cuales se analizaron separadamente y como su mezcla en igual proporción, se efectuó la evaluación del efecto de la temperatura sobre la extracción enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos obtenidos a partir de residuos de frambuesa.

Dado que la temperatura es una variable de compromiso entre la reactividad y la estabilidad enzimática, se estudiaron temperaturas entre 40 y 60°C, considerando que menores temperaturas conducen a bajos rendimientos de extracción y que temperaturas más elevadas afectan la estabilidad de las enzimas. Se trabajó a una razón enzima/sustrato inicial del 10%. Se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles, expresado como g extracto /100g de muestra así como su contenido de fenoles totales extraídos, expresado como mg ácido gálico/g de muestra. Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando tres diferentes métodos. La capacidad antioxidante evaluada por los métodos DPPH y ABTS se expresó como mmol trolox/ 100g muestra, mientras que la capacidad antioxidante evaluada por el método del FRAP se expresó como mmol ácido ascórbico/ 100g muestra.

3.3 Estudio del efecto de la concentración de enzima en el tratamiento enzimático

Un parámetro de importancia para la optimización del tratamiento enzimático es determinar la concentración que permita una hidrólisis adecuada de las paredes celulares de vegetales. La concentración de enzima se expresó como un cociente de la cantidad de enzima (volumen en mL o masa en mg, dependiendo de la naturaleza del preparado, sólido o líquido, respectivamente) por cada 100 gramos de muestra (residuos). Las razones enzima/sustrato se variaron entre 0.75 y 10%. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles, expresado como g extracto /100 g de muestra así como su contenido de fenoles totales extraídos, expresado como mg ácido gálico/ g de muestra. Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando tres diferentes métodos. La capacidad antioxidante evaluada por los métodos DPPH y ABTS se expresó como mmol trolox/ 100 g muestra, mientras que la capacidad antioxidante evaluada por el método del FRAP se expresó como mmol ácido ascórbico/ 100 g muestra.

3.5 Estudio del efecto del tiempo de la hidrólisis enzimática

Se examinó la dependencia del tiempo de la hidrólisis enzimática en el proceso de extracción de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de frambuesa. Los tratamientos enzimáticos se realizaron durante 24 horas tomando muestras a 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas y 24 horas.

Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles, expresado como g extracto /100 g de muestra así como su contenido de fenoles totales extraídos, expresado como mg ácido gálico/g de muestra. Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando tres diferentes métodos. La capacidad antioxidante evaluada por los métodos DPPH y ABTS se expresó como mmol trolox/ 100 g muestra, mientras que la capacidad antioxidante evaluada por el método del FRAP se expresó como mmol ácido ascórbico/ 100g muestra.

3.4 Estudio de las interacciones entre parámetros en la extracción enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa

En esta actividad se evaluó el efecto de de las interacciones entre parámetros en la extracción acuosa enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa en base a un diseño factorial 2^3 con repeticiones en el punto central. El proceso extractivo se realizó en discontinuo a 150 rpm de agitación y una razón agua/residuo de 20. La temperatura se varió entre 40 y 60°C, los tiempos de extracción entre 4,5 y 7,5 horas y la razón enzima/sustrato entre 2,5 y 7,5%. Para cada condición estudiada, se determinó el rendimiento de extracción sobre el contenido de sólidos solubles (g extracto /100 g de muestra) así como su contenido fenólico (mg ácido gálico /g de muestra). Además, se evalúa la capacidad antioxidante de los extractos, utilizando tres diferentes métodos. La capacidad antioxidante evaluada por los métodos DPPH y ABTS se expresó como mmol trolox/ 100 g muestra, mientras que la capacidad antioxidante evaluada por el método del FRAP se expresó como mmol ácido ascórbico/ 100 g muestra.

La Tabla 4.9 muestra la matriz del diseño factorial.

Tabla 4.9: Matriz del diseño factorial para la extracción acuosa enzimáticamente asistida desde residuos de frambuesa

Experimento N°	tiempo (h)	Temperatura (°C)	Razón E/S	tiempo (h) x1	Temperatura (°C) X2	Razón S/R X3
1	4,5	40	2,5%	-	-	-
2	7,5	40	2,5%	+	-	-
3	4,5	60	2,5%	-	+	-
4	7,5	60	2,5%	+	+	-
5	4,5	40	7,5%	-	-	+
6	7,5	40	7,5%	+	-	+
7	4,5	60	7,5%	-	+	+
8	7,5	60	7,5%	+	+	+
9	6	50	5%	0	0	0
10	6	50	5%	0	0	0
11	6	50	5%	0	0	0
12	6	50	5%	0	0	0

Los datos son ajustados a la siguiente superficie de respuesta:

$$R = a_0 + a_1 * t + a_2 * T + a_3 * R/S + a_{12} * tT + a_{13} * T R/S + a_{23} * TR/S + a_{123} * tTR/S$$

Donde a_0 es el valor de la función objetiva en las condiciones de punto central, a_1 , a_2 y a_3 representan los efectos principales asociados a cada variable y las otras constantes representan los efectos cruzados entre las variables.

Etapa 4. Validación de la capacidad antioxidante de un extracto fenólico obtenido a partir de desechos agroindustriales en la preservación de aceites crudos

Se evaluó la capacidad antioxidante de un extracto hidroetanólico obtenido a partir de residuos de frambuesa en la preservación de aceite crudo de pepa de uva, determinando el grado de oxidación lipídica por la cuantificación del índice de peróxidos.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar ($n=3$) y las presentaciones gráficas se realizaron empleando Microsoft Office Excel 2007. Se incluyó, además, análisis de varianza (ANOVA) aplicando el programa GraphPad InStat 3.

La Figura 4.7 ilustra el esquema de la estrategia metodológica empleada para la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos agroindustriales.

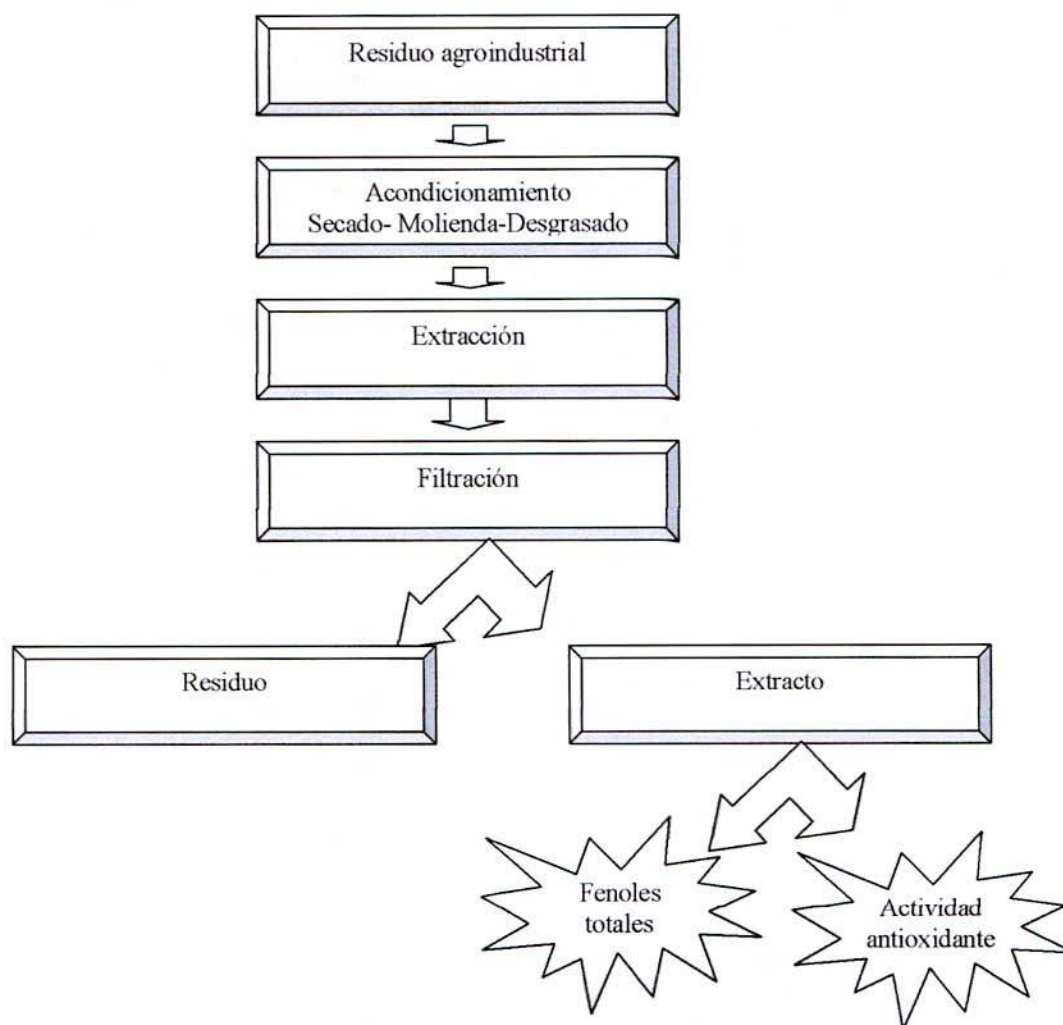


Figura 4.7 Esquema de la estrategia metodológica empleada para la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos agroindustriales.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES RESIDUALES PROVENIENTES DEL PROCESADO DE ARÁNDANO AZUL, ARÁNDANO ROJO, FRAMBUESA, DURAZNO, PERA, PERA DESPLUMADA, PERA TAMIZADA Y PIMENTÓN

5.1.1 Caracterización proximal de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón

Con el propósito de obtener información sobre los atributos nutricionales y la potencial utilización de los residuos agroindustriales de arándano azul, arándano rojo, durazno, frambuesa, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón, se realiza la caracterización proximal de cada uno de ellos, de acuerdo a los ensayos oficiales establecidos por la AOAC; introduciendo, en algunos casos, leves modificaciones a los mismos. Los análisis corresponden a contenido de proteínas, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (por diferencia).

En la Figura N°5.1 se presentan los resultados del análisis químico proximal de los residuos agroindustriales en estudio. La composición proximal varía notablemente de acuerdo al tipo de residuo; el contenido total de fibra cruda fluctúa entre 19,03 y 59,76 %, el extracto etéreo está en el rango entre 0,27 y 6,97 %, los niveles de proteínas se encuentran entre 1,62 y 10,34 %, mientras que los de cenizas entre 0,10 y 10,76 % y el extracto libre de nitrógeno fluctúa entre 31,02 y 73,78 %.

Los residuos compuestos mayoritariamente por pieles y semillas, como arándano azul, arándano rojo y frambuesa, presentan un elevado contenido de fibra cruda (mayor al 35%) en comparación con aquellos principalmente compuestos por cáscaras como durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón (alrededor de un 20% de fibra cruda). El elevado contenido de fibra cruda en los residuos de la familia de los berries sugiere que ellos poseen un mayor potencial como fuente de antioxidantes fenólicos, probablemente porque en esa fracción lignocelulósica se concentran compuestos con función protectora en la planta (Yen y Duh 1994).

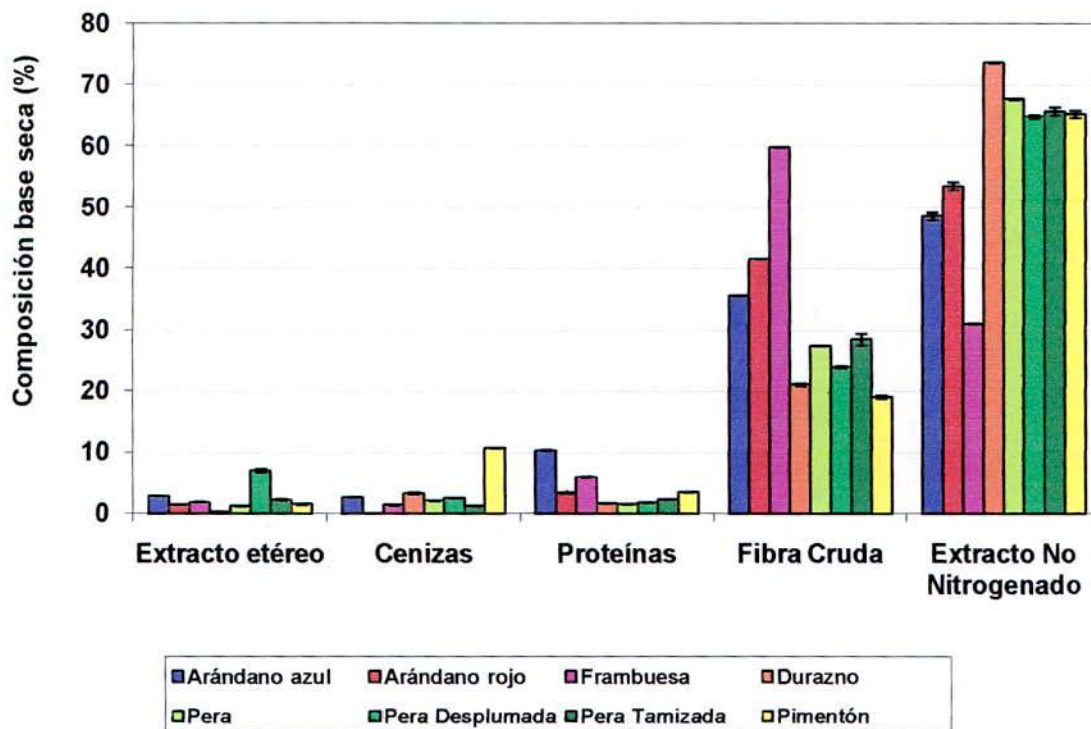


Figura 5.1: Caracterización proximal de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.
 Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

La fibra cruda consiste en una mezcla heterogénea de polisacáridos no almidonosos, los que incluyen celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina (Figuerola *et al*, 2005); esta fibra contiene, frecuentemente, polifenoles asociados con polisacáridos estructurales no almidonosos, que pueden ser liberados de la matriz vegetal confiriendo actividad antioxidante (Sáyago-Ayerdi *et al*, 2007).

Todos los residuos evaluados presentan un alto nivel de extracto libre de nitrógeno (carbohidratos), lo que indica una mayor capacidad energética que proteica. Ello sumado al alto contenido de fibra cruda sugiere que luego de la extracción de antioxidantes fenólicos los residuos remanentes podrían ser empleados para la obtención de oligosacáridos no digeribles, los cuales producen diversos efectos sobre la salud humana en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas, particularmente por su actividad prebiótica al incrementar la cantidad de bacterias benignas de la microflora intestinal e inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas (Quiang *et al*, 2009).

Los descartes agroindustriales analizados presentan un bajo nivel de proteínas, menor al 10 % en todos los casos a excepción del residuo de arándano azul. Los polifenoles tienden a complejarse con proteínas a través de diferentes mecanismos, tales como interacciones iónicas, hidrofóbicas o puentes de hidrógeno; estas interacciones pueden disminuir la concentración de compuestos fenólicos libres, lo que conllevaría a una reducción de su eficacia antioxidante (Labuckas *et al*, 2008). En consecuencia, bajos niveles de proteínas podrían promover una mayor recuperación de antioxidantes fenólicos desde los materiales residuales en estudio.

El contenido de lípidos de los residuos agroindustriales en estudio es escaso (menor al 7 %); ello limita su potencial como fuente de aceites esenciales restringiendo las técnicas convencionales de extracción y destinándolo a extracción con CO₂ supercrítico, como una respuesta a la reducción del uso de solventes orgánicos en la industria cosmética, tal es el caso del aceite obtenido a partir de semillas de granada (Abassi *et al*, 2008); sin embargo, en el diseño de un proceso de recuperación de antioxidantes fenólicos, el bajo nivel lipídico presenta la ventaja de no requerir su eliminación previa, aunque en este estudio la muestra será desgrasada para evitar el deterioro oxidativo de las materias primas durante la investigación.

Los valores de cenizas que se muestran en la Figura 5.1, son concordantes con los determinados por Figuerola *et al*, (2005) para residuos de cítricos, manzanas y uvas, por Park y Zhao, (2006) para pomasa de arándano rojo, por Al-Farsi *et al*, 2007 para residuos de dátiles y Helbig *et al*, 2008 para residuos de grosella negra. El bajo contenido de cenizas podría influir positivamente sobre las propiedades antioxidantes de los extractos de estos residuos puesto que las cenizas poseen minerales y metales pesados, incluyendo hierro, que pueden actuar como pro-oxidantes (Maisuthisakul *et al*, 2006; Maisuthisakul *et al*, 2008). Asimismo, el bajo contenido de cenizas podría ser beneficioso al disminuir el riesgo de inhibición de la acción enzimática, cuando se apliquen biocatalizadores para mejorar la extracción de antioxidantes fenólicos.

5.1.2 Composición de los principales polisacáridos de la pared celular de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

Se realiza la caracterización de las fibras como una manera de estimar qué preparados enzimáticos presentarán el mejor efecto degradativo sobre los envoltorios celulares de los materiales residuales en estudio.

La Tabla 5.1 muestra la composición de las fibras de los residuos agroindustriales en estudio.

Tabla 5.1: Contenido en Fibras Neutro detergente y Ácido Detergente de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

Residuo agroindustrial	Fibra neutro detergente (%)	Fibra ácido detergente (%)	Fibra ácido de lignina (%)
Arándano azul	65,09 ± 1,70	56,62 ± 0,26	35,15 ± 0,22
Arándano rojo	72,86 ± 0,21	64,32 ± 0,70	36,12 ± 1,78
Frambuesa	83,40 ± 1,17	68,52 ± 0,64	63,16 ± 1,52
Durazno	26,68 ± 1,80	21,42 ± 0,37	17,25 ± 0,67
Pera	44,68 ± 1,65	20,17 ± 0,56	9,76 ± 0,66
Pera Desplumada	69,25 ± 1,09	44,91 ± 1,00	33,57 ± 2,02
Pera Tamizada	41,60 ± 1,98	36,00 ± 0,22	15,57 ± 0,10
Pimentón	27,61 ± 0,27	19,06 ± 1,50	3,37 ± 0,11

En la Tabla 5.1 se destaca el alto contenido de polisacáridos estructurales de los residuos pertenecientes a la familia de los berries. Comparada con las referencias bibliográficas respecto a la composición química de pomáceas de cítricos, manzanas y uvas (Bravo y Saura-Calixto, (1998); Figuerola *et al*, (2005); Park y Zhao, (2006); Llobera y Cañejas, 2007, entre otros), la información sobre la composición de los principales polisacáridos de las paredes celulares de berries es escasa, encontrándose incluso datos divergentes. Por ejemplo, Helbig *et al*, (2008) reportan un contenido de lignina 73.8% para residuos de grosella negra, mientras que Nawirska y Kwasniewska (2005), cuantifican la lignina de ese mismo fruto en 8,2 g/100 g de muestra seca.

En la Figura 5.2 se ilustra el contenido de los principales polisacáridos de la pared celular vegetal de los residuos agroindustriales en estudio.

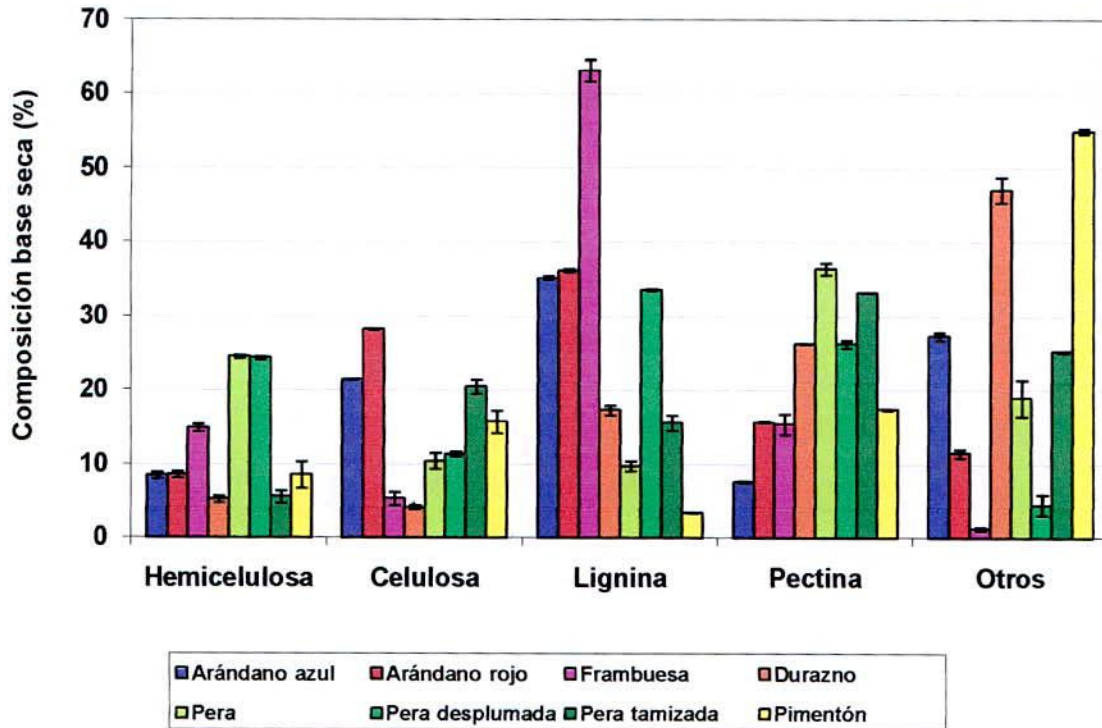


Figura 5.2: Composición de los principales polisacáridos de la pared celular de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

Tal como se aprecia en la Figura 5.2, los residuos de arándano rojo y arándano azul presentan un perfil similar en cuanto a la composición de los principales polisacáridos de la pared celular, aunque el descarte de arándano rojo contiene aproximadamente el doble de pectina que el residuo de arándano azul. Holmes y Chokyum, (1978), determinan para pomasa de arándano rojo un contenido de pectina y celulosa de 15,8 y 18,1 %, respectivamente, valores similares a lo obtenido en este trabajo (15,7 y 28,2 %, respectivamente). Los tres descartes de pera estudiados, presentan variaciones en relación a la composición de los principales polímeros de la pared celular. Con respecto a los niveles de lignina, era esperable que el mayor contenido de sustancias pécticas se encontrara en el descarte denominado pera desplumada, pues éste contiene esencialmente semillas, a diferencia del residuo de pera tamizada, compuesto por cáscaras y restos de pulpa y del residuo de pera, que posee esencialmente cáscaras (Tabla 4.1), confiriéndole al residuo de pera desplumada un mayor potencial como fuente de antioxidantes fenólicos que los otros dos subproductos.

Por otro lado, el residuo de frambuesa presenta características únicas que lo diferencian del resto de los materiales estudiados. Esto es, su elevado porcentaje de lignina, posiblemente dado por su alto contenido de semillas. Otros componentes importantes en este residuo son hemicelulosa y pectina, mientras celulosa es menos relevante. El alto contenido de lignina del residuo de frambuesa (63,7 %) indicaría una mayor presencia de componentes fenólicos, aunque aquello no necesariamente concluya en una mayor extracción de los mismos.

En base al contenido en fibras de los residuos agroindustriales evaluados, se estima que para una mayor efectividad en la degradación enzimática de las paredes celulares, se requieren biocatalizadores con actividades pectinolíticas, hemicelulolíticas y celolíticas combinadas. Ben Shalom, (1986) demostró que el tratamiento de las paredes celulares de vegetales es más efectivo al utilizar biocatalizadores comerciales que contienen una combinación de actividades, que al aplicar enzimas puras, ya que se produce un efecto sinérgico. Bien conocido es el hecho que la pectina se presenta en la capa externa de la célula, recubriendo estéricamente a las microfibrillas de celulosa, que están cohesionadas con polímeros hemicelulósicos (Voragen y Pilnik, 1989; Mansfield *et al*, 1999). Además, debido a que la degradación de la pared celular depende de la hidrólisis secuencial de los constituyentes de los envoltorios celulares, la adición de pectinasas y la consecuente degradación de las polímeros pécticos, permite una mayor exposición de celulosa y hemicelulosa para la acción enzimática de celulasas y hemicelulasas (Maissot ,1989).

5.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN CONVENCIONAL SÓLIDO/LÍQUIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En esta etapa se busca establecer un proceso de extracción convencional líquido/ sólido de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes contenidos en los residuos caracterizados.

5.2.1 Selección de los residuos agroindustriales

La selección de las materias primas residuales se efectúa empleando metanol como extractor, debido a su polaridad y a su reconocida capacidad para extraer compuestos fenólicos desde vegetales, basándose en los buenos resultados conseguidos con este solvente en la literatura sobre el tema (Velioglu *et al*, 1998; Przybylski *et al*, 1998; Pinelo *et al*, 2004; Lapornik *et al* 2005, Thaipong *et al*, 2006).

Para cada residuo agroindustrial se evalúa el efecto del tiempo de extracción a condiciones de operación fijas para temperatura, agitación y razón líquido/sólido de 50°C, 150 rpm y 20:1, respectivamente, mediante la realización de cinéticas entre 1 y 36 horas en las que cada punto significa una experiencia diferente y el valor reportado es la media de tres experimentos. Los resultados presentados a continuación corresponden a sólidos solubles recuperados, compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante evaluada por el método DPPH.

La Figura 5.3 muestra los rendimientos de extracción de sólidos solubles de los de los extractos obtenidos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

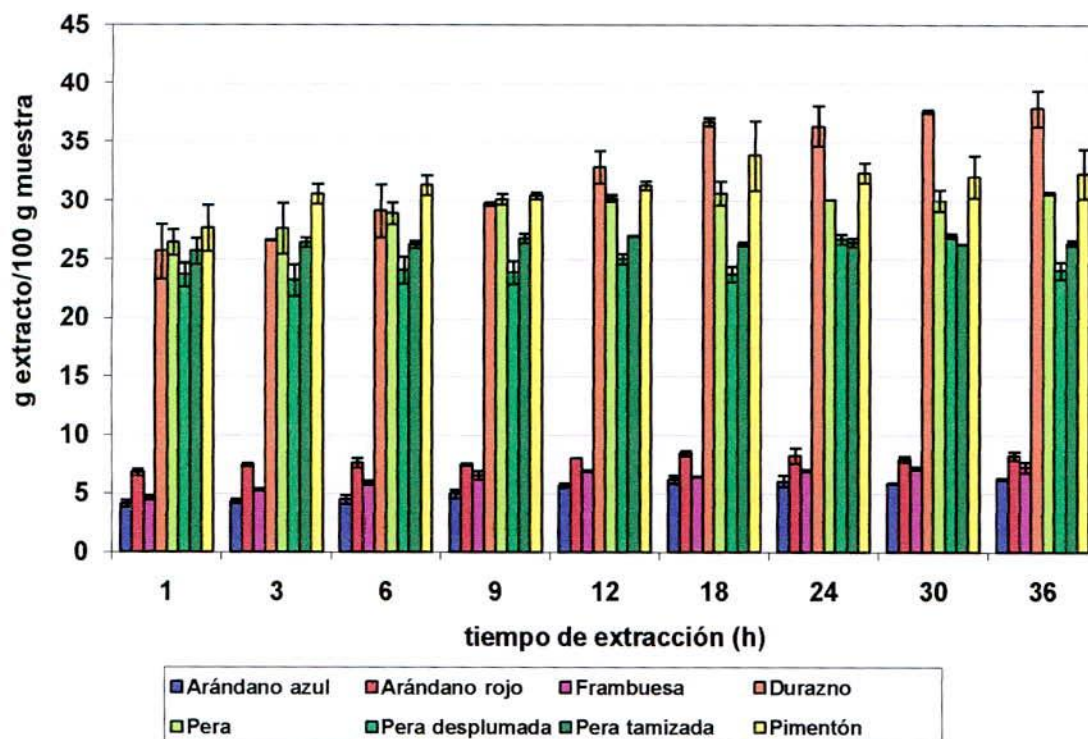


Figura 5.3: Rendimiento de extracción de sólidos solubles de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, 150 rpm; razón L/S, 20:1; 50°C.

Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

Tal como se aprecia en la Figura 5.3, los rendimientos de recuperación de sólidos solubles de residuos de durazno se incrementan con el tiempo de incubación llegando a un valor cercano al 37 % a partir de las 18 horas. No se observan grandes variaciones en el contenido de extractables de los residuos de pimentón, manteniéndose en 32 g extracto/100 g muestra luego de 6 horas de extracción. La recuperación de sólidos solubles desde residuos de pera, pera tamizada y pera desplumada es prácticamente invariable con el tiempo de operación, obteniéndose valores de 30, 26 y 27 %, respectivamente. La extractibilidad de los residuos de la familia de los berries se incrementa al aumentar del tiempo hasta estabilizarse a las 18 horas de tratamiento. Estas variaciones en el rendimiento de sólidos solubles de los extractos obtenidos a partir de los diferentes residuos analizados, pueden atribuirse a la disponibilidad de los diversos componentes extractables, definidos por la composición química del material vegetal original (Hsu *et al*, 2006). Asimismo, la eficacia del solvente extractor para disolver compuestos endógenos puede ser también un factor relevante en la recuperación de sólidos solubles (Sultana, *et al* 2008).

En la Figura 5.4 se presenta el contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón

Como es posible observar en la Figura 5.4, los extractos obtenidos con residuos de frambuesa presentan un elevado contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles, el cual tiende a aumentar con el tiempo de incubación hasta alcanzar los 21 mg de ácido gálico/g muestra a las 24 horas de extracción. De igual manera, mayores tiempos de contacto favorecen la recuperación de polifenoles desde residuos de arándano azul con un máximo de 14 mg de ácido gálico/g muestra a las 36 horas. La recuperación de polifenoles desde residuos de arándano rojo se ve favorecida con el tiempo de incubación, obteniéndose valores cercanos a 10 mg ácido gálico/g de muestra a partir de las 24 horas de extracción.

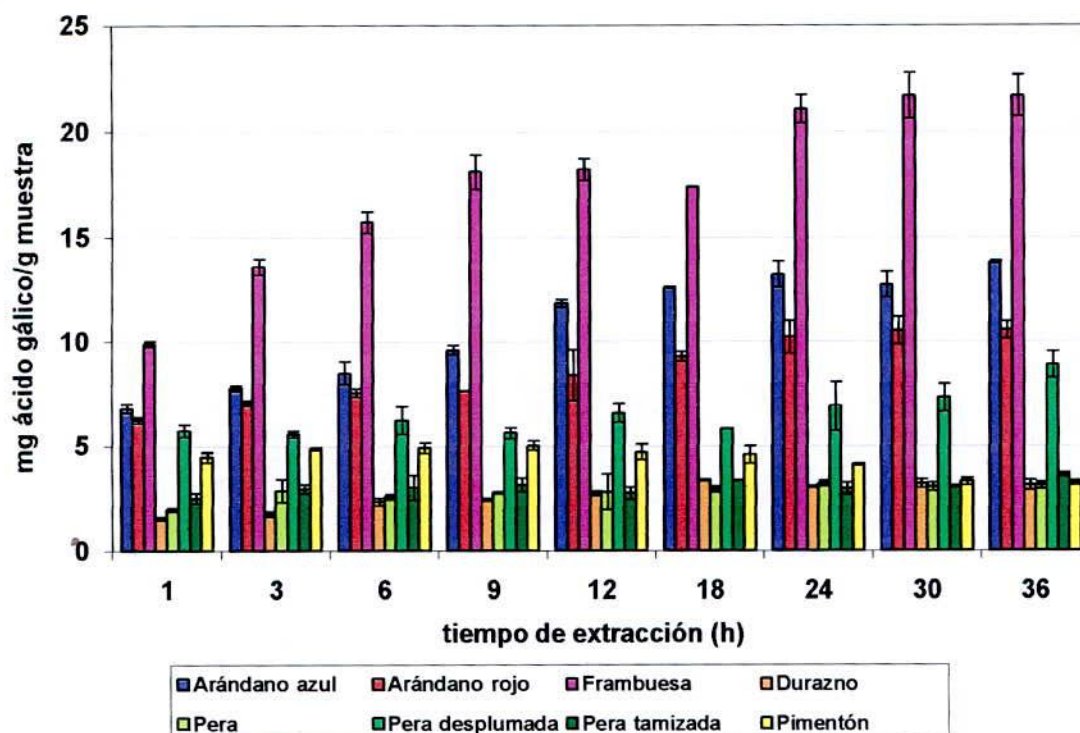


Figura N°5.4: Contenido total de compuestos fenólicos extraíbles de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, 150 rpm; razón L/S, 20:1; 50°C.
Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

El contenido de polifenoles totales de los extractos obtenidos a partir de residuos de pera desplumada, muestra un ligero incremento en los extractables a tiempos largos de extracción, llegando a 8 mg ácido gálico/g de muestra a las 36 horas de incubación. Los residuos de durazno, pera, pera tamizada y pimentón presentan un bajo contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles, mostrando la escasa potencialidad de los mismos para estudios posteriores, con ellos sólo se consiguen aproximadamente 3 mg de ácido gálico/g de muestra. En el caso de la extracción metanólica de los residuos de pimentón, la extractibilidad de los compuestos fenólicos disminuye a partir de las 24 horas de incubación.

La Figura 5.5 ilustra la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

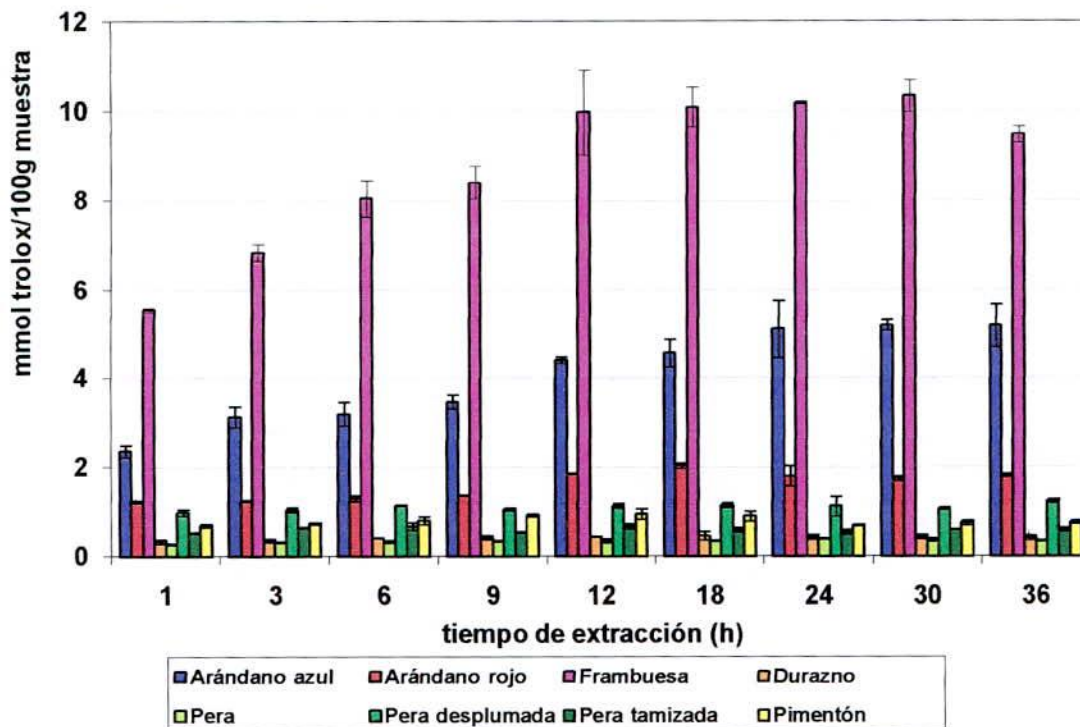


Figura 5.5: Actividad antioxidante medida por el método DPPH de los extractos obtenidos a partir de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa, durazno, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón.

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, 150 rpm; razón L/S, 20:1; 50°C. Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

De la Figura 5.5 se desprende que los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa presentan una elevada actividad antioxidante, por sobre los demás residuos analizados, llegando a los 10 mmoles trolox/100 g muestra luego de 12 horas de extracción. Mayores tiempos de contacto favorecen la capacidad antioxidante de los extractos de residuos de arándano azul, hasta alcanzar los 5 mmoles trolox/100 g muestra a partir de las 24 horas de extracción. Un leve incremento en la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos desde residuos de arándano rojo se observa con el tiempo de incubación (2 mmoles trolox/100 g muestra a las 18 horas de extracción). La actividad antioxidante de los extractos de residuos de pera desplumada aumenta ligeramente en la medida que aumenta el tiempo de contacto; sin embargo, los valores de equivalentes de trolox son menores a los obtenidos con extractos de la familia de los berries. Los residuos de durazno, pera y pera tamizada presentan una exigua capacidad antioxidante con valores respectivos de equivalentes de trolox de 0.3, 0.3 y 0.6 mmoles trolox/100 g de muestra. Los extractos metanólicos de residuos de pimentón presentan bajos valores de equivalentes trolox y, por tanto, una leve capacidad antioxidante, la cual disminuye al aumentar el tiempo de extracción; ello es coincidente con el comportamiento obtenido para fenoles totales, sugiriéndose que los compuestos extraídos desde residuos de pimentón son mayoritariamente fenoles simples de bajo grado de polimerización y con menor actividad antioxidante (Haggerman *et al*, 1998).

Globalmente, el rendimiento de extracción de sólidos solubles varía notablemente dependiendo del tipo de residuo. En particular, los residuos que presentan altos rendimientos de extracción de sólidos solubles contienen bajos niveles de polifenoles totales y poseen escasa actividad antioxidante, mientras que los extractos metanólicos de frambuesa, arándano azul y arándano rojo, cuyos rendimientos de extracción de sólidos solubles son menores, presentan un alto contenido de compuestos fenólicos y una elevada actividad antioxidante. Por tanto, un alto rendimiento de extracción no se correlaciona con un alto contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Esto es consistente con lo reportado previamente por Kahkonenn *et al*, (1999) y Maishuhisakul *et al*, 2008, quienes indican que los extractos pueden contener compuestos inactivos, incluyendo azúcares remanentes.

Por el contrario, el contenido de polifenoles totales extraíbles sí se correlaciona con actividad antioxidante, tal como lo han demostrado previamente por Velioglu *et al*, (1998), Zheng y Wang, (2001); Llorach *et al*, (2002); Lee *et al*, (2003); Leontowicz *et al*, (2003); Llorach *et al*, (2003); Llorach *et al*, (2004), Lapornik *et al*, (2005) Kim *et al*, 2008, entre otros.

En base a los resultados expuestos en esta sección, considerando el bajo contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y la escasa capacidad antioxidante los extractos obtenidos a partir de descartes de durazno, pera, pera tamizada, pera desplumada y pimentón, y de acuerdo al plan de trabajo original, se procede a seleccionar los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa. Con estas tres materias primas, se procede a estudiar el efecto de temperatura sobre las cinéticas de extracción de antioxidantes fenólicos.

5.2.2 Efecto de la temperatura sobre las cinéticas de extracción de antioxidantes fenólicos obtenidos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa.

Como un paso necesario para entender el comportamiento antioxidante de los polifenoles presentes en los residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, se desarrollan cinéticas de extracción convencional, utilizando metanol como solvente, empleando razón solvente/residuo de 20:1 y una velocidad de agitación de 150 rpm para tres temperaturas diferentes (40, 50 y 60°C) donde cada punto significa una experiencia diferente y el valor reportado es la media de tres experimentos. No se emplean temperaturas superiores para evitar procedimientos de extracción más complejos que implicarían sistemas de enfriamiento con el fin de evitar pérdidas de solvente por evaporación y mantener la calidad de los extractos. Los resultados presentados a continuación corresponden a sólidos solubles recuperados, compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante evaluada por el método DPPH.

En las Figuras 5.6, 5.7 y 5.8 se presentan la recuperación de sólidos solubles, el contenido total de fenoles extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos a temperaturas de 40°C, 50°C y 60°C desde residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, respectivamente.

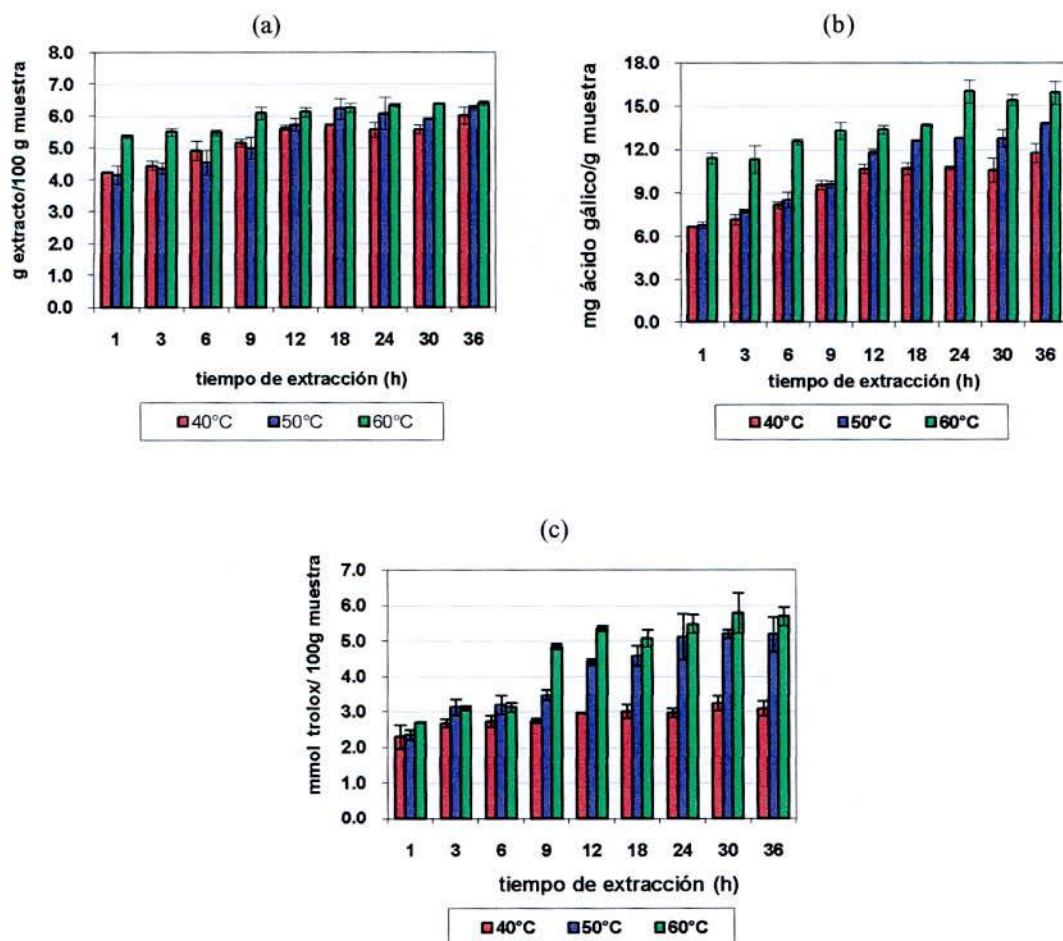


Figura 5.6: Efecto de la temperatura sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano azul
 (a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto/100 g muestra); (b) Contenido total de fenoles extraíbles (mg ácido gálico/g muestra); (c) actividad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH (mmol trolox/100 g muestra).
 Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, razón L/S, 20:1; 150 rpm.
 Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

Tal como se aprecia en la Figura 5.6, el rendimiento de extracción de sólidos solubles aumenta al incrementarse el tiempo de extracción para las tres temperaturas empleadas en este estudio. Los resultados demuestran que a mayor temperatura de extracción mayor es el contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles para cada uno de los tiempos de extracción analizados. A menores tiempos de extracción se obtienen menores valores de equivalentes trolox, es decir, los extractos obtenidos a tiempos cortos poseen una menor capacidad antioxidante que aquellos obtenidos a tiempos de extracción más largos.

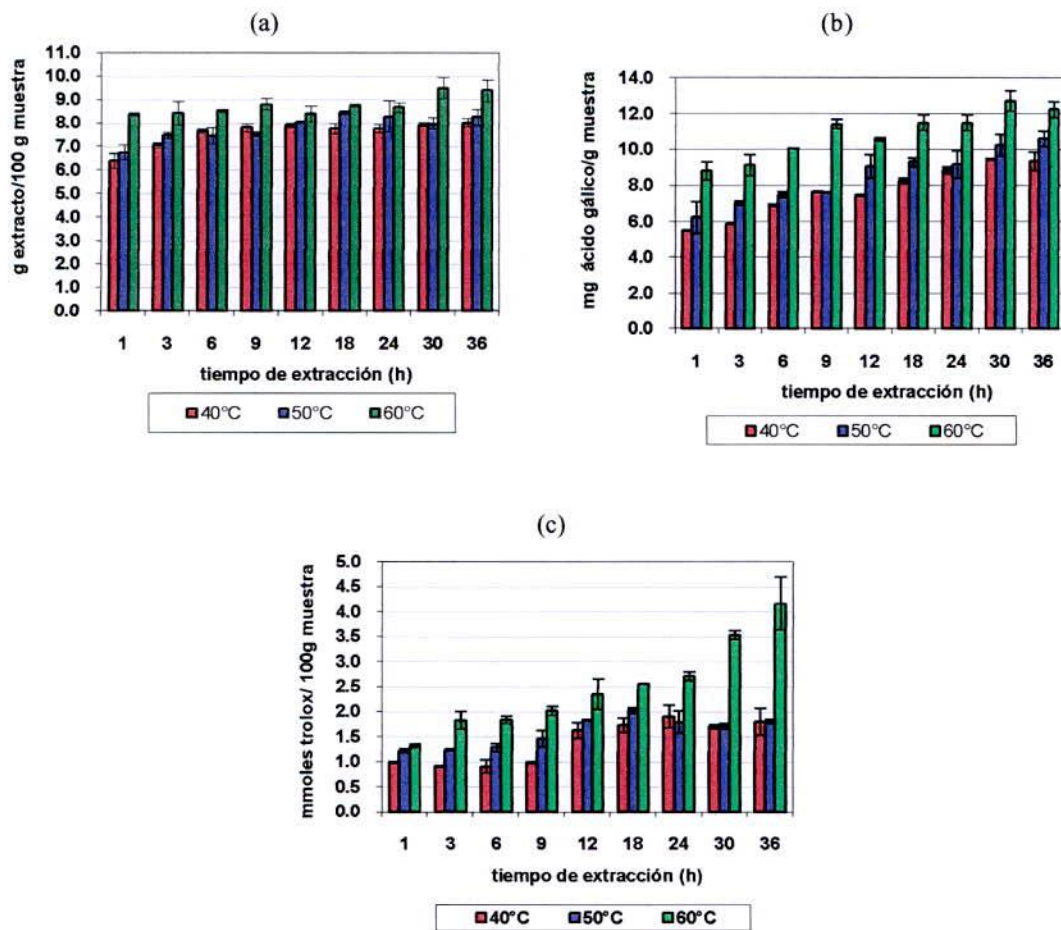


Figura 5.7: Efecto de la temperatura sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano rojo

(a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto/100 g muestra); (b) Contenido total de fenoles extraíbles (mg ácido gálico/g muestra); (c) actividad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH (mmol trolox/100 g muestra).

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, razón L/S, 20:1; 150 rpm.

Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

La Figura 5.7 muestra el efecto del incremento en la recuperación de polifenoles desde residuos de arándano rojo que se produce al realizar la extracción a una temperatura de 60°C. De igual modo, independiente del tiempo de extracción, a temperatura de 60°C se obtiene un mayor contenido fenólico y una superior capacidad antioxidante de los extractos.

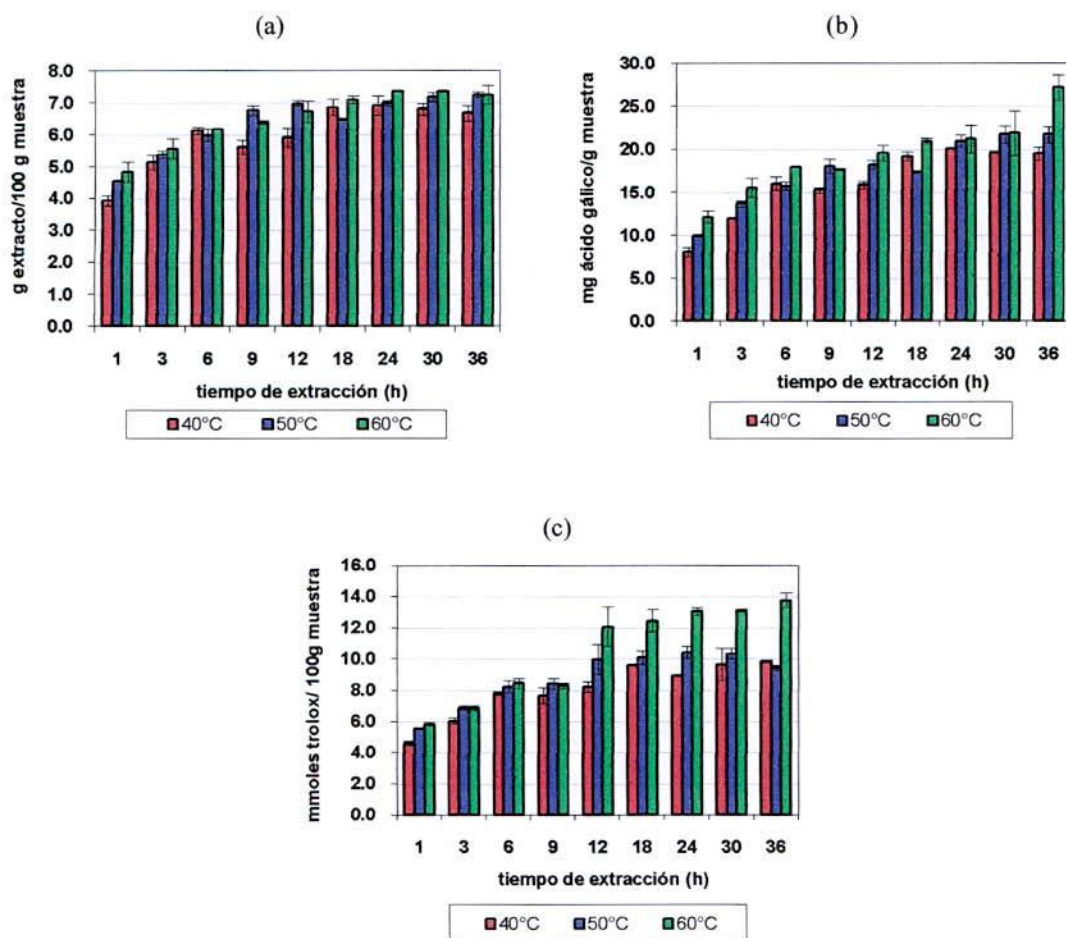


Figura 5.7: Efecto de la temperatura sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano rojo

(a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto/100 g muestra); (b) Contenido total de fenoles extraíbles (mg ácido gálico/g muestra); (c) actividad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH (mmol trolox/100 g muestra).

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, razón L/S, 20:1; 150 rpm.

Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

La Figura 5.8, muestra que para el caso de la recuperación de sólidos solubles desde residuos de frambuesa, se visualizan leves incrementos a menores tiempos de operación (hasta 12 horas) mientras que posteriormente, la extracción se sitúa en torno al 7 %. Se observa, además, un incremento del contenido total de compuestos fenólicos extraíbles con el aumento del tiempo y la temperatura de extracción y una mayor actividad antioxidante para temperatura de 60°C a los más largos tiempos de operación de 12, 18, 24 y 36 horas.

Lapornik *et al*, (2005) examinan el efecto del tiempo de extracción en residuos de uva, grosella roja y negra, comparan el contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos metanólicos al 70% obtenidos con estos residuos a tres diferentes tiempos y determinan una tendencia al incremento en la extractibilidad de los polifenoles y una mayor actividad antioxidante al aumentar el tiempo de extracción desde 1 a 24 horas de incubación; el rendimiento de polifenoles de los extractos obtenidos con residuos de uva es 6-7 veces superior al mayor tiempo ensayado. Spingo *et al*, (2007) estudian la extracción etanólica de compuestos fenólicos desde descartes de uva mediante cinéticas entre 1 y 24 horas a temperaturas fijas de 45 y 60°C. Establecen que la extracción es un proceso lento con rendimientos superiores a 60°C y con aparente degradación térmica luego de 20 horas.

Tiempo y temperatura de extracción son importantes parámetros a optimizar para reducir el costo energético del proceso extractivo. Diversos autores convienen en el hecho de que un aumento en la temperatura de trabajo incrementa tanto la solubilidad del soluto como el coeficiente de difusión, pero hasta sobre cierto valor crítico ya que más allá de él los compuestos fenólicos pueden degradarse térmicamente (Pinelo *et al*, 2005; Yilmaz y Toledo, 2006; Spingo *et al*, 2007). De acuerdo a Wettasinghe y Shahidi, (1999), altas temperaturas pueden movilizar desde la matriz vegetal ciertos antioxidantes fenólicos y promover la descomposición de otros compuestos que ya han sido movilizados a menores temperaturas; sin embargo, la velocidad de extracción de antioxidantes térmicamente estables a elevadas temperaturas es mayor que la velocidad de degradación de compuestos menos solubles. Por otro lado, un incremento en la temperatura podría aumentar la velocidad de difusión de antioxidantes fenólicos y con ello disminuir los tiempos extracción (Cacace y Mazza, 2002). Datos contradictorios sobre el tiempo de extracción pueden encontrarse en la literatura mientras algunos autores obtienen buenos resultados a tiempos cortos de contacto (Bonilla, *et al*, 1999; Pinelo *et al*., 2005; Yilmaz y Toledo, (2006) y otros determinan que se requieren largos períodos de operación (Jayaprakasha *et al*, 2001; Lapornik *et al*, 2005).

5.2.4 Efecto del pH en la extracción convencional de residuos agroindustriales de arándano azul, arándano rojo y frambuesa.

En esta actividad se desarrollan cinéticas de extracción convencional, utilizando agua destilada y acidulada con una solución de HCl 1 M a 60°C para una razón solvente/residuo de 20:1 y una velocidad de agitación de 150 rpm.

En las Figuras 5.9, 5.10 y 5.11 se presentan la recuperación de sólidos solubles, el contenido total de fenoles extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos acuosos obtenidos a pH 3, pH 4, pH 5 y pH 6 desde residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, respectivamente

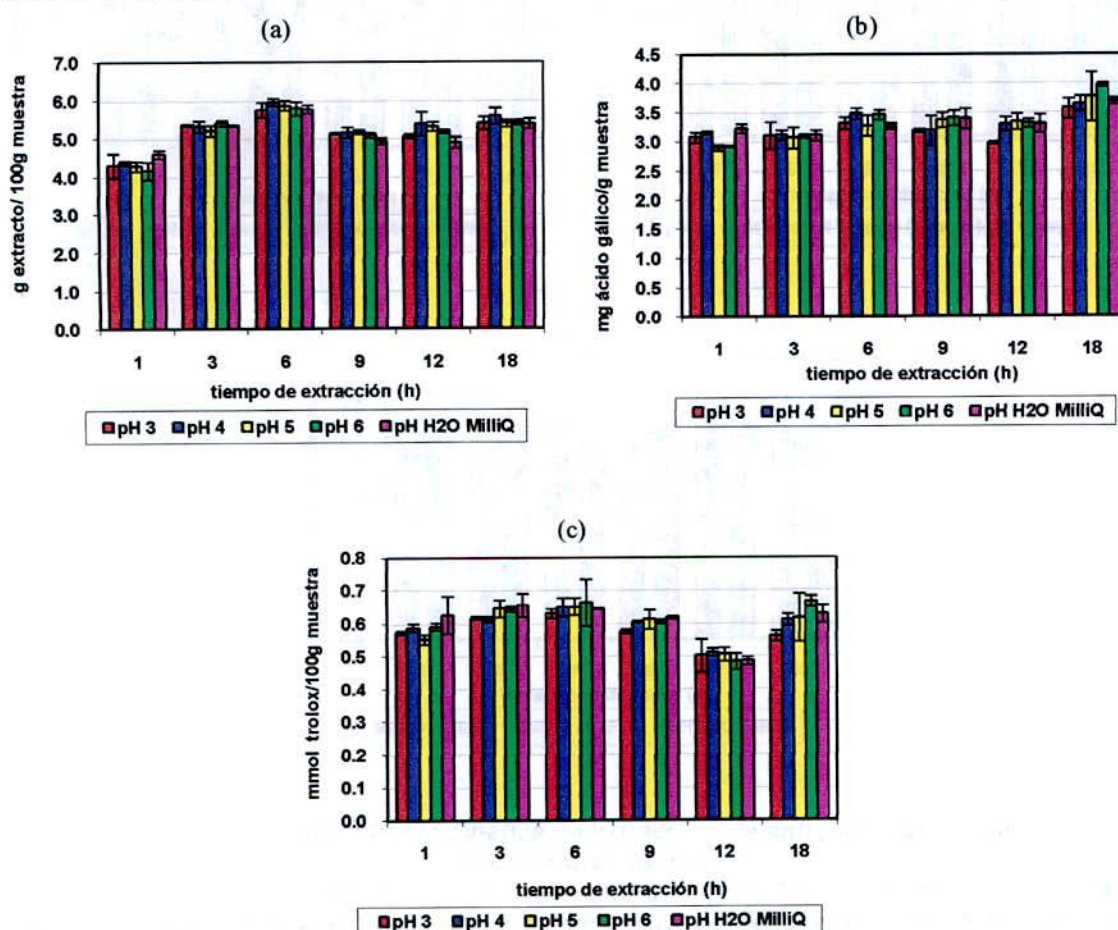


Figura 5.9: Efecto del pH sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano azul

(a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto/100 g muestra); (b) Contenido total de fenoles extraíbles (mg ácido gálico/g muestra); (c) actividad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH (mmol Trolox/100 g muestra).

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, razón L/S, 20:1; 150 rpm. Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

En la Figura 5.9 se observa que los rendimientos de recuperación de sólidos solubles no se ven notoriamente afectados por el cambio de pH de la solución acuosa empleada para la extracción. Asimismo, la extractibilidad de los polifenoles contenidos no varía considerablemente con el cambio de pH de la solución acuosa empleada para la extracción. La actividad antioxidante medida por el método del DPPH se mantiene relativamente estable a valores de pH entre 3 y 6.

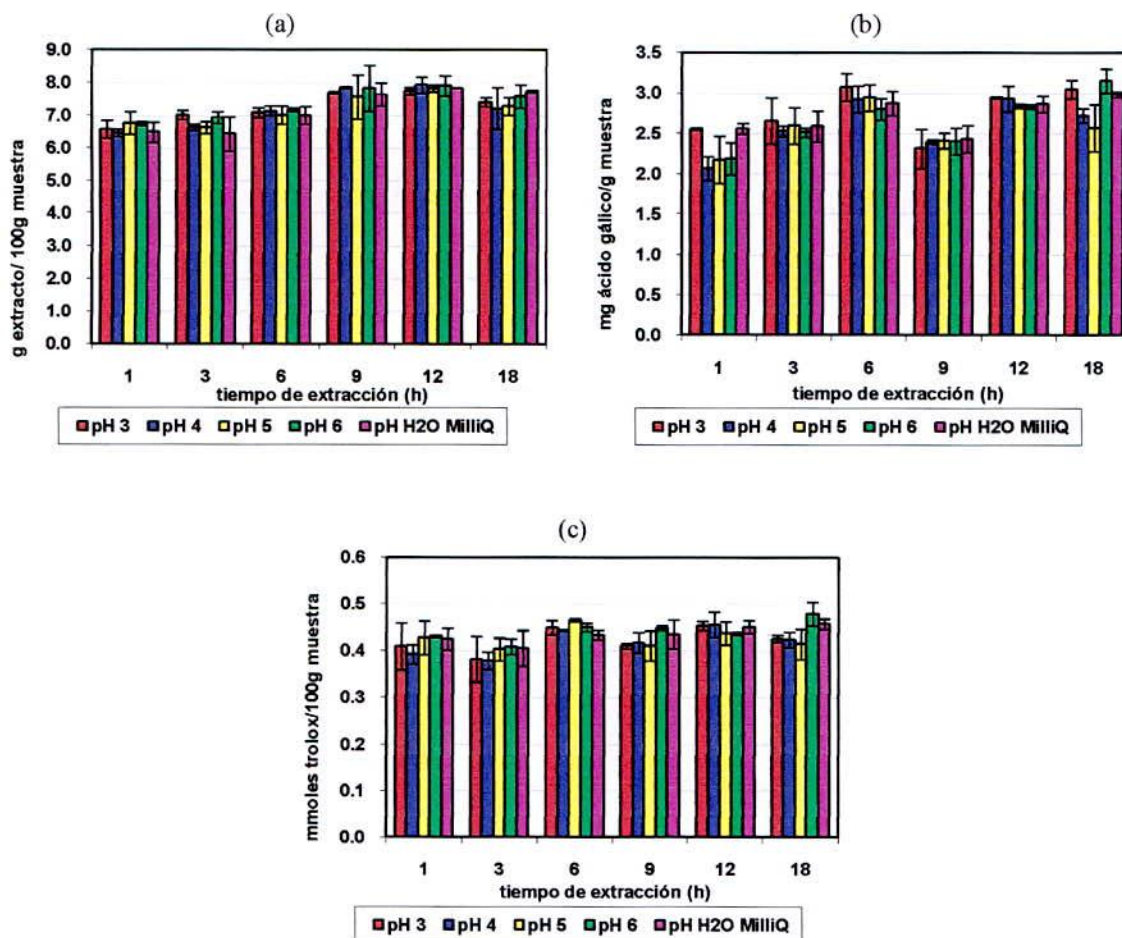


Figura 5.10: Efecto del pH sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano rojo

(a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto/100 g muestra); (b) Contenido total de fenoles extraíbles (mg ácido gálico/g muestra); (c) actividad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH (mmol trolox/100 g muestra).

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, razón L/S, 20:1; 150 rpm. Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

En la Figura 5.10 se observa que los rendimientos de recuperación de sólidos solubles no se ven notoriamente afectados por el cambio de pH de la solución acuosa empleada para la extracción. Asimismo, la extractibilidad de los polifenoles contenidos no varía considerablemente con el cambio de pH de la solución acuosa empleada para la extracción. La actividad antioxidante medida por el método del DPPH se mantiene relativamente estable a valores de pH entre 3 y 6.

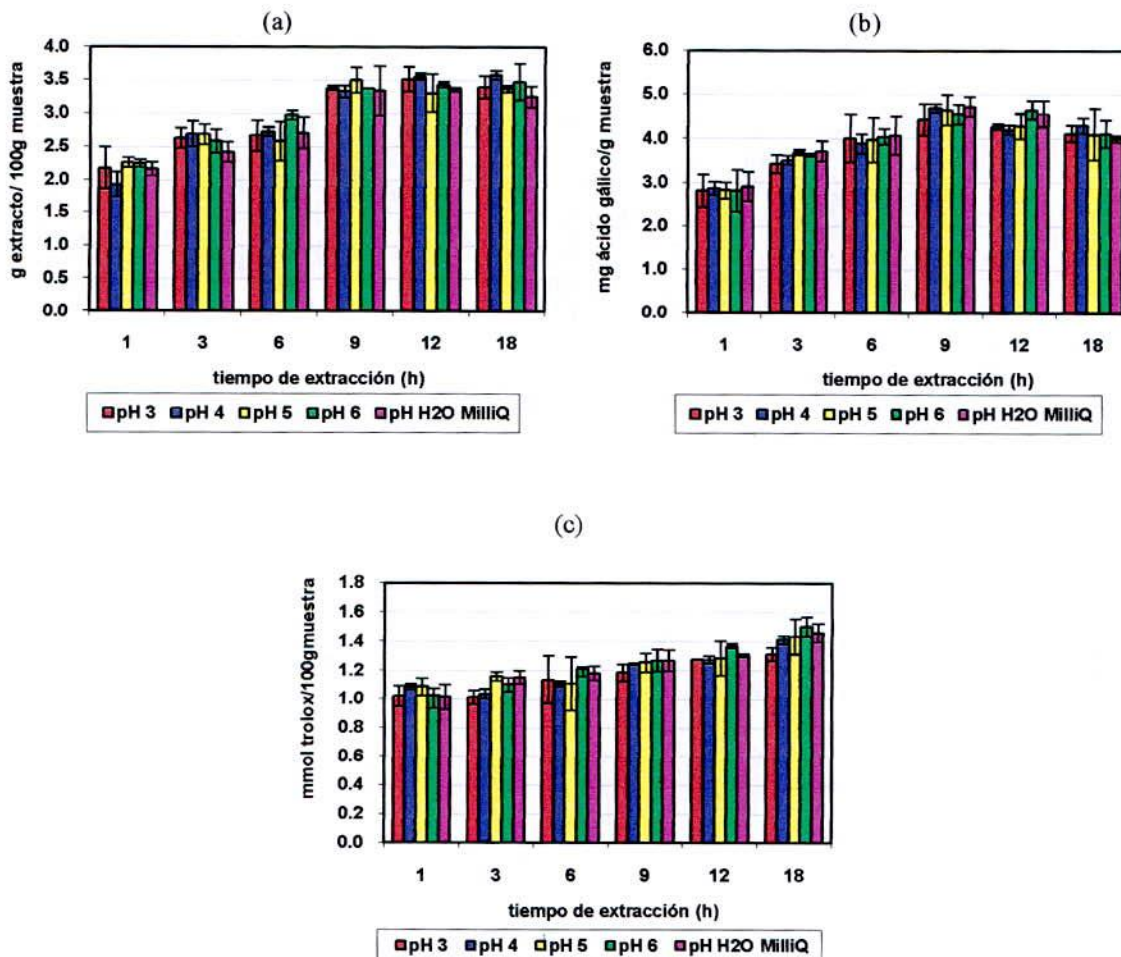


Figura 5.11: Efecto del pH sobre la cinética de extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa

(a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles (g extracto/100 g muestra); (b) Contenido total de fenoles extraíbles (mg ácido gálico/g muestra); (c) actividad antioxidante de los extractos medida por el método DPPH (mmol trolox/100 g muestra).

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; metanol, razón L/S, 20:1; 150 rpm.

Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

En la Figura 5.11 se observa que los rendimientos de recuperación de sólidos solubles no se ven notoriamente afectados por el cambio de pH de la solución acuosa empleada para la extracción. Asimismo, la extractibilidad de los polifenoles contenidos no varía considerablemente con el cambio de pH de la solución acuosa empleada para la extracción. La actividad antioxidante medida por el método del DPPH se mantiene relativamente estable a valores de pH entre 3 y 6.

Los resultados indican que los antioxidantes fenólicos de los residuos de arándano azul, arándano rojo, frambuesa son estables bajo las condiciones de pH estudiadas; el pH de la solución acuosa empleada en la extracción no afecta significativamente los rendimientos de recuperación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante en comparación con otros factores como temperatura, tiempo y razón solvente/residuo, posiblemente debido a que a pH ácidos se inhibe la oxidación enzimática de los polifenoles y/o bien se mantiene la estabilidad de las antocianinas presentes en los extractos, tal como lo han referenciado previamente Zhang *et al*, (2001) y Ruenroengklin *et al*, (2008).

La mantención de la extractibilidad en agua de los antioxidantes fenólicos obtenidos desde los residuos de berries, en el rango de pH estudiado, resulta ventajosa para la aplicación de un tratamiento enzimático que degrade los principales componentes de la pared celular y facilite la liberación de polifenoles al líquido extractante, pues la mayoría de los biocatalizadores comerciales empleados en clarificación de jugos exhiben gran estabilidad en el rango de pH 3 a pH 6 y una actividad enzimática óptima a pHs cercanos a 4.5, considerando además, una posible aplicación industrial es aconsejable trabajar a pHs bajos para minimizar el riesgo de contaminación microbiana.

5.2.5 Estudio de las interacciones entre parámetros en la extracción de antioxidantes fenólicos

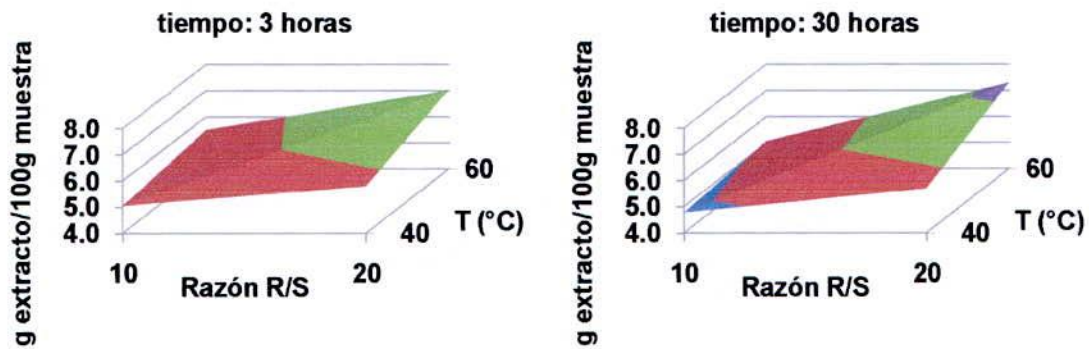
En general, la *optimización* de un proceso puede ser lograda a través de métodos empíricos o estadísticos. El enfoque tradicional de un factor a un tiempo para optimización de procesos requiere mucho tiempo. Además, las interacciones entre varios factores son ignoradas, asumiendo que la variable respuesta es una función directa de un único parámetro; sin embargo, la respuesta real de un proceso resulta de la influencia interactiva de las distintas condiciones de operación. A diferencia de la optimización convencional, los procesos de optimización estadística permiten evaluar diversos parámetros de proceso y sus interacciones sobre una variable respuesta.

La metodología de superficie respuesta se ha utilizado con éxito para modelar y optimizar procesos de extracción de compuestos fenólicos desde cáscaras de maravilla (Gao y Mazza, 1996), torta prensada de primula (Wettasinghe y Shahidi, 1999), antocianinas desde grosella negra (Cacace y Mazza, 2003), bagazos de manzana y uva (Rubilar *et al*, 2003), residuos lignocelulósicos de pino y cáscaras de almendra (Pinelo *et al*, 2004), entre otros.

Dado que factores como tipo de solvente, tiempo de extracción, temperatura de extracción (Wettasinghe y Shahidi, 1999) y razón solvente/residuo (Cacace y Mazza, 2003), pueden influir significativamente en la eficiencia de extracción de antioxidantes fenólicos, se evalúa, a continuación, el efecto de tales parámetros sobre los rendimientos de sólidos solubles, el contenido de fenoles totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa mediante un diseño factorial 2^3 con repeticiones en el punto central, variando la temperatura entre 40°C y 60°C, el tiempo de extracción entre 3 y 30 horas y la razón solvente/residuo entre 10:1 y 20:1.

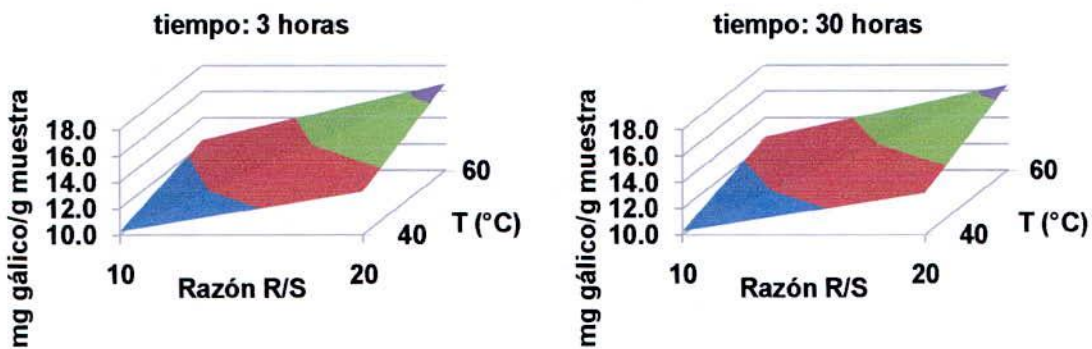
Se emplearon seis distintos sistemas extractores: acetato de etilo, etanol, metanol, agua, así como las mezclas etanol:agua (50:50% vH₂O/vEtOH) y metanol:agua (50:50% vH₂O/vMeOH). Para ejemplificar, en la Figuras 5.12 a 5.14 se presentan los resultados obtenidos con cada uno de los extractos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa utilizados en el diseño experimental, empleando la mezcla etanol:agua (50:50% vH₂O/vEtOH), el sistema extractor que ofrece la mayor recuperación de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante más elevada.

En la Figura 5.12 se presentan los resultados obtenidos con cada uno de los extractos de residuos de arándano azul en etanol:agua (50/50% v/v) utilizados en el diseño experimental.



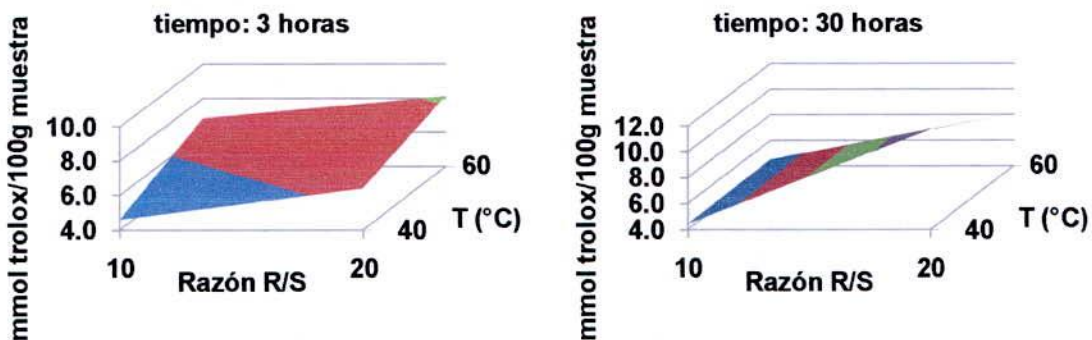
Rendimiento de Sólidos solubles

$$R=5.893-0.079t+0.465T+0.663S/R+0.040tT+0.097tS/R+0.274TS/R+0.082tTS/R$$



Contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles

$$R=13.165+0.017t+1.532T+1.771S/R+0.1633tT-0.044tS/R+0.428TS/R+0.120tTS/R$$



Actividad antioxidante medida por el método DPPH

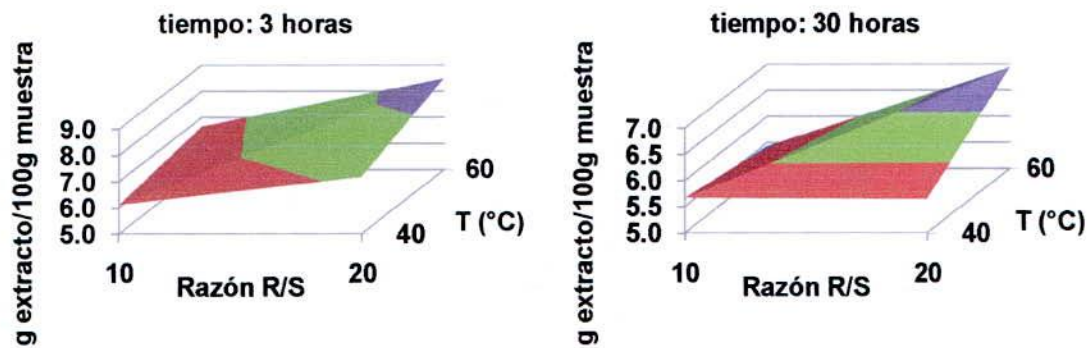
$$R=6.039+0.362t+0.061T+1.754S/R-0.944tT+0.966tS/R-0.530TS/R-0.394tTS/R$$

Figura 5.12 : Superficies respuesta para los rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de arándano azul en etanol:agua (50:50% vH₂O/vEtOH) a cortos y largos tiempos de contacto.

En la Figura 5.12, puede apreciarse que tanto la razón solvente/ residuo como la temperatura y la interacción entre ambas variables afectan el rendimiento de recuperación de sólidos solubles de los extractos hidroetanólicos de residuos de arándano azul; las dos variables principales anteriormente mencionadas ejercen la mayor influencia en la recuperación de compuestos fenólicos y en el caso de la actividad antioxidante de los extractos hidroetanólicos de arándano azul, la razón solvente/ residuo es la variable de mayor relevancia, la interacción entre tiempo y temperatura provoca un efecto negativo en la capacidad de captación de radicales libres DPPH, mientras que la interacción entre tiempo y razón solvente/residuo provoca el efecto contrario.

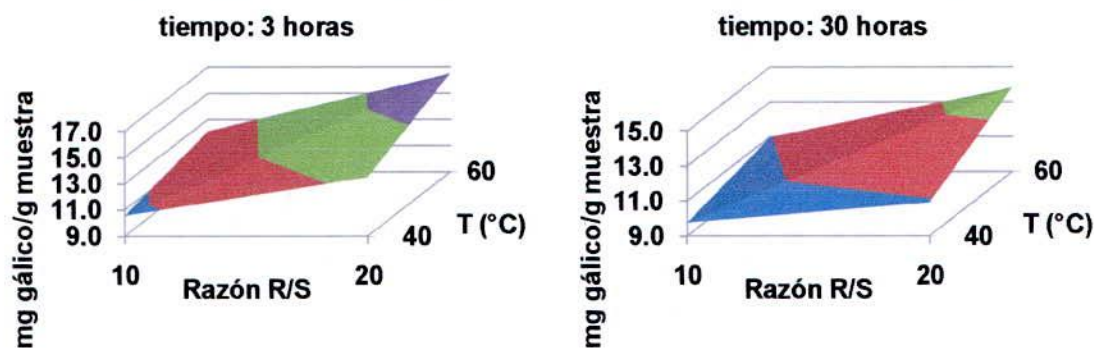
Los residuos de arándano azul en la mezcla hidroetanólica presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (7,3 g extracto/100g muestra), mientras que a valores bajos de temperatura y razón residuo solvente para tiempos de extracción largos se obtiene el mínimo de extraíbles (4,8 g extracto/100g muestra). En el caso del contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (16,6 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros principales se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (10,3 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, y razón solvente/residuo para la menor temperatura de extracción, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (11,7 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el tiempo de extracción es alto (4,4 mmol trolox/100g muestra).

En la Figura 5.13 se presentan los resultados obtenidos con cada uno de los extractos de residuos de arándano rojo en etanol:agua (50/50% v/v) utilizados en el diseño experimental.



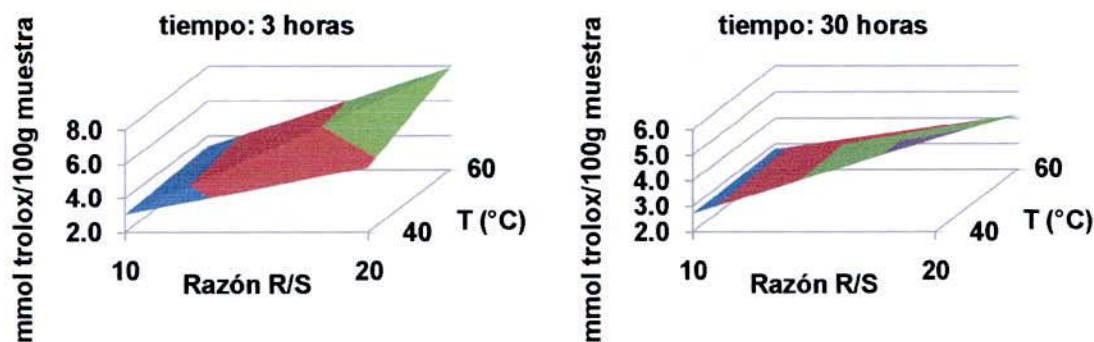
Rendimiento de Sólidos solubles

$$R=6.571-0.523t+0.297T+0.622S/R-0.174tT-0.103tS/R+0.213TS/R+0.019tTS/R$$



Contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles

$$R=12.449-0.897t+1.091T+1.149S/R-0.060tT-0.422tS/R+0.404TS/R+0.032tTS/R$$



Actividad antioxidante medida por el método DPPH

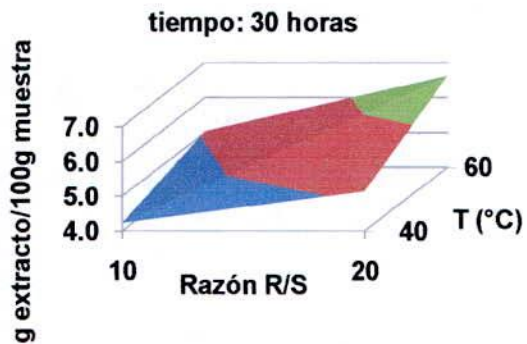
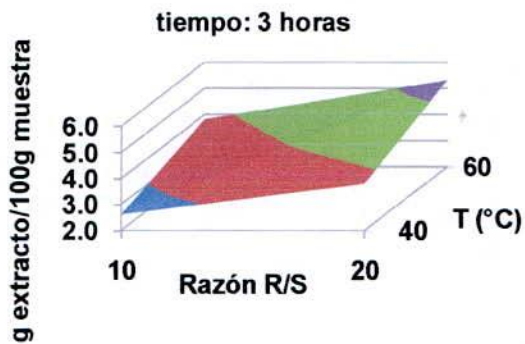
$$R=4.719-0.612t+0.140T+1.444S/R-0.491tT-0.376tS/R+0.022TS/R-0.418tTS/R$$

Figura 5.13 :Superficies respuesta para los rendimientos de solidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de arándano rojo en etanol:agua (50:50% vH₂O/vEtOH) a cortos y largos tiempos de contacto.

En cuanto a las experiencias realizadas con la mezcla hidrometanólica sobre residuos de arándano rojo, en la Figura 5.13, se observa que la recuperación de sólidos solubles se ve mayoritariamente afectada por la razón solvente/residuo, el tiempo ejerce un efecto negativo en el proceso extractivo mientras que la temperatura lo favorece. En el contenido total de compuestos fenólicos influyen positivamente la razón solvente/residuo y la temperatura, el tiempo de incubación perjudica la extractibilidad de los polifenoles. Para el método del DPPH, la variable más importante es la razón solvente/residuo.

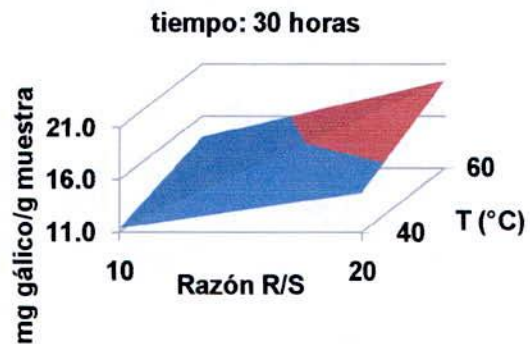
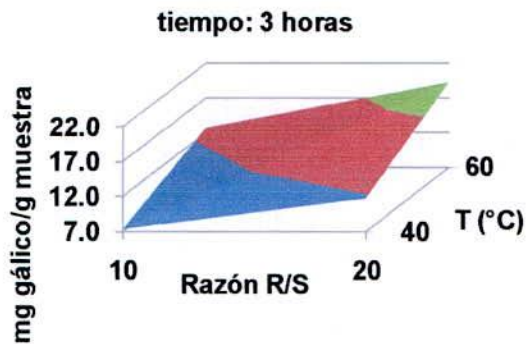
La mayor recuperación de sólidos solubles desde residuos de arándano rojo extraídos con la mezcla hidroetanólica (50:50% vH₂O/vEtOH) se consigue a altos valores de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (8,5 g extracto/100g muestra), mientras que a valores bajos de razón solvente/residuo y temperatura para tiempos de extracción largos se obtiene el mínimo de extraíbles (5,4 g extracto/100g muestra). El mayor contenido de fenoles totales extraíbles se logra a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (16,5 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de razón solvente/residuo y temperatura para el tiempo de extracción máximo se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (9,8 mg ácido gálico/g muestra). A valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (7.9 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra cuando se aplican valores bajos de temperatura y razón solvente/residuo para el mayor tiempo de extracción (2,7 mmol trolox/100g muestra).

En la Figura 5.14 se presentan los resultados obtenidos con cada uno de los extractos de residuos de frambuesa en etanol:agua (50/50% v/v) utilizados en el diseño experimental.



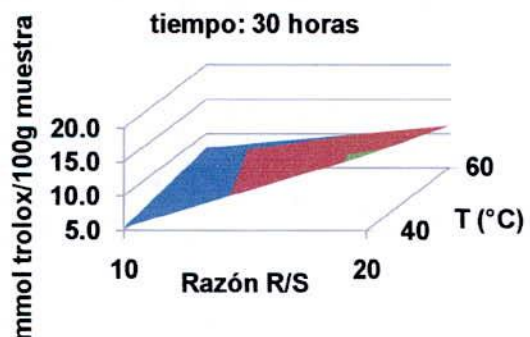
Rendimiento de Sólidos solubles

$$R=4.447+0.689t+0.634T+0.649S/R-0.058tT-0.025tS/R+0.120TS/R+0.048tTS/R$$



Contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles

$$R=14.174+1.063t+2.528T+2.476S/R-0.695tT-0.266tS/R+0.526TS/R-0.011tTS/R$$



Actividad antioxidante medida por el método DPPH

$$R=10.141+0.149t+0.431T+4.309S/R-0.817tT-0.677tS/R-0.701TS/R-0.966tTS/R$$

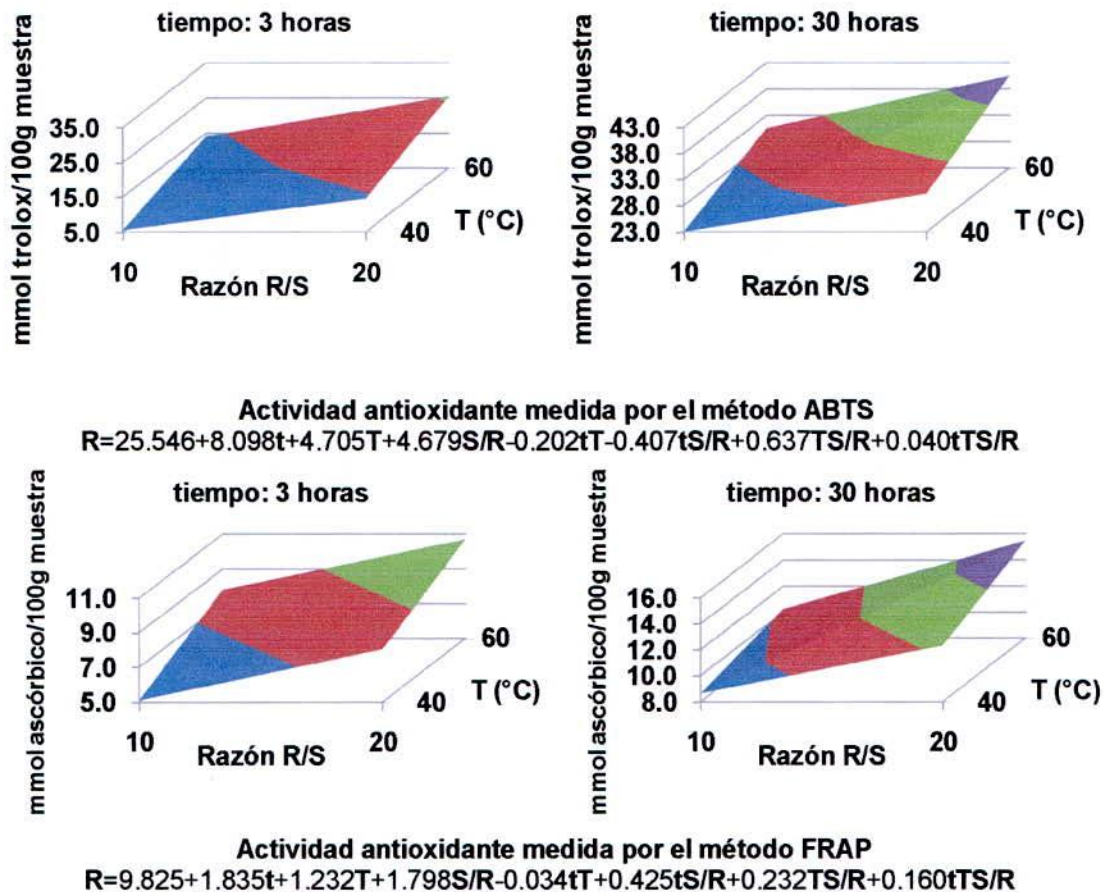


Figura 5.14: Superficies respuesta para los rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de frambuesa en etanol:agua (50:50% v/v) a cortos y largos tiempos de contacto

La Figura 5.14 muestra que el rendimiento de extracción hidroetanólica de sólidos solubles desde residuos de frambuesa se ve influenciado mayoritariamente por las tres variables principales (temperatura, tiempo de extracción y razón solvente/residuo). Asimismo, estos tres parámetros afectan mayoritariamente la recuperación de polifenoles y la actividad antioxidante medida por los métodos ABTS y FRAP, mientras que la razón residuo/solvente es el parámetro más importante en la capacidad antioxidante de los extractos hidroetanólicos de residuos de frambuesa medida por el método DPPH.

La extracción hidroetanólica de los residuos de frambuesa en la mezcla hidroetanólica presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (6,6 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (2,6 g extracto/100g muestra).

Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (19,5 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (7,3 mg ácido gálico/g muestra). A valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH en los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de residuos de frambuesa (16,5 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra a valores bajos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (4,0 mmol trolox/100g muestra). La mayor actividad antioxidante de los extractos hidroetanolicos obtenidos desde residuos de frambuesa medida por el método ABTS se registra bajo condiciones máximas de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (40,6 mmol trolox/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (5,5 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de los tres parámetros principales en estudio (15,5 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de los mismos se obtiene el menor efecto reductor (5,0 mmol ascórbico/100g muestra).

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa, es evaluada por tres métodos diferentes, pues se sabe que los antioxidantes fenólicos pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o de la fuente radicalaria u oxidante (Prior *et al*, 2005). Los resultados son expresados en equivalentes Trolox (TEAC) y equivalentes de ácido ascórbico (AEAC). De esta manera, altos valores TEAC y/o AEAC representan una actividad antioxidante superior; indicando respectivamente, mayor capacidad para captar radicales libres mediante transferencia de hidrógeno, y/o para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Todos los extractos de residuos de frambuesa obtenidos presentan mayores valores de equivalentes de trolox con la técnica ABTS en comparación a los obtenidos empleando el método DPPH, debido a la menor selectividad del ABTS $^{++}$, que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real (Roginsky *et al*, 2005).

Por otro lado, si la capacidad antioxidante de los extractos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides u otro tipo de polifenoles, se debe tener en cuenta que el DPPH es más selectivo que el ABTS^{•+}, que a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Roginsky et al, 2005). Este hecho explica los valores TEAC inferiores en el método DPPH con respecto al ABTS.

Como se aprecia en la Tabla 5.2, el tipo de solvente es quizás el factor más influyente en la extracción de antioxidantes fenólicos.

Tabla 5.2 Resumen de los valores de la función objetivo en las condiciones del punto central de los modelos de superficie respuesta para la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa

Solvente		Agua	Etanol	Etanol:Agua (50:50% v/v)	Metanol	Metanol:Agua (50:50% v/v)	Acetato de etilo
Residuo							
Arándano azul	SS	4,3	4,2	5,9	6,1	4,4	2,2
	FTE	2,6	4,7	13,2	12,5	10,3	0,7
	DPPH	0,4	1,2	6,0	4,2	4,4	0,1
Arándano rojo	SS	4,7	6,7	6,5	8,3	5,7	3,8
	FTE	2,9	5,2	12,5	9,4	11,1	2,5
	DPPH	0,4	1,0	4,7	2,4	4,8	0,7
Frambuesa	SS	2,4	4,9	4,4	5,4	4,0	3,5
	FTE	2,8	9,0	14,2	14,7	12,7	1,6
	DPPH	1,3	6,8	10,1	10,4	8,1	0,4
	ABTS	4,1	12,8	25,5	22,7	23,2	1,8
	FRAP	2,2	5,1	9,8	9,6	6,4	0,9

Para los tres residuos estudiados, el solvente menos polar (acetato de etilo) extrae muy poca cantidad de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, lo que indica una baja solubilidad de los constituyentes bioactivos en este sistema extractor; sin embargo este solvente ofrece buenos resultados en la extracción de polifenoles desde pepitas de uva, ya que es capaz de extraer selectivamente taninos condensados (Pekic *et al*, 1998). Los desfavorables resultados obtenidos con este solvente en residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa indicarían que otro tipo de compuestos son responsables de la actividad antioxidante de sus extractos, ello es consistente con el elevado contenido de antocianidinas y otros flavonoides como kaempferol y quercetina o fenoles simples como los ácidos p-cumárico, caféico y ferúlico (ácidos hidroxicinnámicos) y ácido ferulico, p-hidroxibenzóico, gálico y elágico (ácidos hidroxibenzóicos), presentes en la familia de los berries (Hakkinen *et al*, 1999).

Un mayor contenido de fenoles totales extraíbles y una actividad antioxidante más elevada se obtiene con los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos en comparación con los extractos acuosos, consistentemente con lo reportado previamente por Nepote *et al*, (2005) para pieles de maní. Ello puede atribuirse a que estos solventes son menos polares que el agua y por tanto son más eficientes en la liberación de los polifenoles desde los materiales vegetales luego de la degradación de las membranas celulares de las semillas, que tienen carácter apolar (Lapornik *et al*, 2005). Otra razón de la menor efectividad de los extractos acuosos en relación a los alcohólicos puede ser la presencia de microorganismos porque el agua es un mejor medio para su existencia en relación etanol y metanol, pero según la literatura (Nychas, 1995; Rahua *et al*, 2000; Abdalla *et al*, 2007) los compuestos fenólicos tienen efecto antimicrobiano, así que esta noción es menos probable. Una explicación más útil para la menor efectividad de los extractos acuosos en relación a los alcohólicos se atribuye a la enzima polifenoloxidasas, que degrada polifenoles en extractos acuosos, mientras que en metanol y etanol se inactiva (Zhang *et al*, 2001).

Interesantemente, la mezcla etanol:agua (50/50%v/v) ha revelado ser más eficiente como sistema extractivo que el propio solvente; este mismo efecto fue reportado por previamente por Pinelo *et al*, (2005) y Yilmaz y Toledo, (2006). De hecho, etanol es un solvente polar capaz de extraer flavonoides y sus glicósidos desde materiales vegetales (Bazykina *et al*, 2002), pero la solubilidad de estos compuestos puede ser incrementada usando la mezcla hidroalcohólica.

El efecto de la razón solvente/muestra ha sido investigado por autores como Herodez *et al*, (2003); Cacace y Mazza, (2003); Pinelo *et al*, (2005) y, consistentemente con lo aquí obtenido e independiente del solvente usado, mientras mayor es la razón solvente/residuo mayor es la difusividad de los compuestos fenólicos desde la matriz vegetal hacia el seno de la solución, de acuerdo a principios de transferencia de masa.

5.3 Tratamiento enzimático durante la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.

Se examina el efecto de un tratamiento enzimático aplicado durante la extracción de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa como un proceso alternativo a la extracción convencional líquido/sólido. Con el propósito de incrementar la recuperación de polifenoles, diferentes parámetros como tipo de biocatalizador, temperatura de extracción, concentración de la enzima, concentración de etanol en la mezcla de extracción y tiempo de extracción son estudiados y comparados con controles sin adición de enzimas.

5.3.1 Pre-selección de biocatalizadores comerciales para la extracción de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas desde residuos de frambuesa

Se evalúan 12 formulaciones comerciales que poseen una combinación de actividades enzimáticas que permiten la degradación de las paredes celulares vegetales. Las experiencias se realizan con una mezcla hidroetanólica en proporción (75/25 % vH₂O/v EtOH) a un tiempo, temperatura, agitación razón líquido/sólido y razón enzima/sustrato E/S fijos, correspondientes a 18 horas, 50°C, 150 rpm, 20:1 y 10%, respectivamente. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Recuperación enzimáticamente asistida de extractos fenólicos con propiedades antioxidantes desde residuos de frambuesa

Formulación Enzimática	Sólidos Solubles g extracto/ 100g muestra	Compuestos Fenolicos mg ácido gálico/g muestra	Actividad Antioxidante DPPH mmol trolox/ 100g muestra	Actividad Antioxidante ABTS mmol trolox/ 100g muestra	Actividad Antioxidante FRAP mmol ascórbico/ 100g muestra
CNE	3,86 ± 0,14	11,35 ± 0,27	3,76 ± 0,11	13,73 ± 0,27	5,31 ± 0,23
Cellubrix	9,47 ± 0,70	9,75 ± 0,39	3,34 ± 0,03	13,02 ± 1,12	4,34 ± 0,20
Granozyme	5,41 ± 0,24	9,59 ± 0,16	3,48 ± 0,02	12,14 ± 0,51	4,89 ± 0,45
Grindamyl CA 150	5,97 ± 0,05	15,79 ± 0,43	5,88 ± 0,39	15,95 ± 0,81	6,96 ± 0,16
Maxoliva	8,56 ± 0,24	15,40 ± 0,91	5,70 ± 0,47	15,02 ± 1,77	7,06 ± 0,48
Olivex	7,81 ± 0,51	11,10 ± 0,36	3,74 ± 0,12	13,86 ± 0,61	5,10 ± 0,22
Pectinex Ultra SPL	7,89 ± 0,11	11,09 ± 0,6	3,71 ± 0,25	13,63 ± 0,09	5,09 ± 0,03
Rohapect 10L	5,44 ± 0,24	10,48 ± 0,84	4,07 ± 0,19	13,28 ± 0,41	5,41 ± 0,27
Rohapect DA6L	6,09 ± 0,50	10,70 ± 0,29	3,74 ± 0,10	12,79 ± 0,79	4,91 ± 0,30
Rohapect Max	5,58 ± 0,32	12,17 ± 0,31	4,02 ± 0,11	14,36 ± 0,14	5,36 ± 0,04
Rohavin	4,17 ± 0,32	11,06 ± 0,09	3,67 ± 0,02	13,81 ± 0,20	5,35 ± 0,43
Ultrazym 100G	12,19 ± 0,60	10,21 ± 0,19	3,79 ± 0,14	13,76 ± 0,24	5,40 ± 0,28
Viscozym	7,7 ± 0,17	10,11 ± 0,18	3,44 ± 0,12	13,73 ± 0,47	4,79 ± 0,19

La Tabla 5.3 muestra que todos los biocatalizadores evaluados incrementan los rendimientos de extracción de sólidos solubles con respecto al control no enzimático; dicho incremento puede explicarse en términos de la capacidad hidrolítica de las enzimas para degradar los principales componentes de la pared celular, liberando azúcares desde macromoléculas como celulosa, hemicelulosa, pectina. Un comportamiento similar ha sido referenciado previamente por Barzana *et al*, (2002) para la extracción de carotenoides a partir de las flores de *Tagetes erecta*.

Bajo las condiciones experimentales aplicadas en este estudio, tanto la celulasa Cellubrix como la xilanas Granozyme, disminuyen el contenido de compuestos fenólicos totales extraídos desde residuos de frambuesa, posiblemente debido a que en su formulación contienen como actividades secundarias β -glucosidasas o β -galactosidasas, las cuales pueden causar la hidrólisis de antocianos desde jugos de arándano, tal como lo demuestran Versari *et al*, 1997, quienes determinan que el uso de pectinasas comerciales modifica la composición fenólica de jugos de berries, disminuyendo el contenido de antocianinas en un 20 % cuando las pectinasas comerciales Pectinex BE, Rohapect B1L, Rohament MAX, Pectinex 3XL fueron usadas durante 6 horas, confirmando la presencia de actividad β -glucosidasa en sus formulaciones. Celluclast, una formulación similar a Cellubrix, no fue capaz de degradar los polisacáridos de la pared celular de pomasa de uva para facilitar la liberación de fenoles (Meyer *et al*, 1998b).

En cuanto al efecto de enzimas sobre el contenido de compuestos fenólicos, en procesos de extracción de aceite, García *et al*, (2001) reporta que al aplicar las formulaciones Olivex, Novoferm 12 y Glucanexm durante la malaxación de las olivas previo a la extracción de su aceite es posible observar un leve incremento en los compuestos fenólicos, como ácido vainillínico, vainillina, pinoresinol y luteolina, presentes en el aceite. Sin embargo, Olivex no exhibió ventajas comparativas con respecto al control no enzimático. Ultrazym 100G es una preparación con actividad pectinasa altamente concentrada, que presenta actividades secundarias de hemicelulasas y celulasas. Aunque Ultrazym 100G es altamente efectiva en la despectinización de jugos de uva y vinos y ha demostrado incrementar el contenido total de compuestos fenólicos desde harinas residuales provenientes de la extracción de aceite de primula (Collao *et al*, 2007), ésta no favorece la extracción de compuestos fenólicos desde residuos de frambuesa.

Andreasen *et al*, (1999) estudian la liberación de ácidos hidroxicinámicos y de ácidos hidroxibenzóicos de granos de centeno (*Secale cereale* L) pre-tratados con cuatro diferentes enzimas comerciales (Macer8 FJ, Grindamyl, Rapidase Be Super y Viscozym); cada una ellas poseen diferentes actividades enzimáticas que permiten degradar las paredes celulares de vegetales. Concluyen que todos esos tratamientos enzimáticos incrementan significativamente la extracción de los ácidos hidroxicinámicos desde granos de centeno con respecto tanto a controles no enzimáticos como a tratamientos con NaOH. También encuentran que no hay diferencias significativas entre los efectos de la aplicación de Macer8 FJ, Grindamyl y Rapidase Be Super, pero que Viscozym libera menos ácido ferúlico que las otras enzimas. Viscozym, una preparación enzimática que contiene múltiples actividades hidrolíticas tales como arabanasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulasa y xilanasas, entre otras, no resulta efectiva en la recuperación de polifenoles a partir de pomasa de frambuesa. Tampoco ofrecen ventajas en cuanto a la extractibilidad de polifenoles las pectinasas Rohapect, 10L, Rohapect DA6L y Rohapect Max, usadas principalmente en la despectinación de jugos de manzana, frutos cítricos como arándano o grosella negra o de uvas ni Rohavin, una mezcla de pectinasa y celulasa especialmente útil para macerar uvas destinadas a elaboración de vinos, todas ellas provistas por AB enzymes.

Es bien sabido que en la pared celular vegetal, la lignina y la celulosa se combinan para producir un material muy resistente a la degradación química y biológica. Aún más, la presencia de lignina fortalece los enlaces de hidrógeno en la red celulosa-hemicelulosa y la celulosa por sí sola es una estructura cristalina altamente ordenada, que puede ser resistente a la degradación enzimática (Brett y Waldron, 1996).

Considerando el elevado porcentaje de lignina en los residuos de frambuesa (63%), otro de los factores que podrían explicar la baja efectividad de los biocatalizadores anteriormente mencionados sobre la extracción de antioxidantes fenólicos es el impedimento que puede provocar la presencia de lignina a la accesibilidad de dichas enzimas hidrolíticas y a las absorciones no productivas de las enzimas con la lignina u otros polisacáridos de la matriz de la pared celular, que retardan la hidrólisis enzimática de las paredes celulares, tal como es reportado por Meyer *et al*, (1998b).

Se ha demostrado que Grindamyl es una eficiente pectinasa en la liberación de ácido ferúlico libre y esterificado desde pulpa de betarraga (Micard *et al*, 1994), en la liberación de compuestos fenólicos desde orujo de uva (Meyer *et al*, 1998b) y la recuperación de antocianinas desde extracto de grosella negra (Lanbdo y Meyer, 2001); por esta razón fue incluida en este trabajo. De acuerdo a su proveedor, Grindamyl contiene actividades pectinolíticas, pero también exhibe actividades celulolíticas y hemicelulolíticas, una combinación adecuada para extraer polifenoles desde residuos de frambuesa. Presumiblemente, estas dos pectinasas son capaces de degradar los principales polisacáridos de la pared celular que retienen los compuestos fenólicos en la compleja red matriz vegetal mediante enlaces de hidrógenos o hidrofóbicos. Otro mecanismo puede ser la ruptura de los enlaces éter y/o éster entre fenoles y polisacáridos de la pared celular (Pinelo *et al*, 2007).

En concordancia con lo obtenido para recuperación de compuestos fenólicos desde residuos de frambuesa, sólo con los biocatalizadores Grindamyl y Maxoliva se produce un incremento de la actividad antioxidante, medida por los métodos del DPPH, ABTS y FRAP.

De acuerdo a los resultados anteriormente vistos, se seleccionan para el subsiguiente estudio del efecto de la temperatura sobre la extracción enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de frambuesa las dos formulaciones comerciales con los mayores incrementos en la recuperación de antioxidantes fenólicos, Grindamyl CA 150 de Danisco y Maxoliva de DSM, así como una mezcla de ambas en igual proporción.

5.3.2 Efecto de la temperatura sobre la extracción de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas a partir de residuos de frambuesa.

La temperatura es un parámetro provoca efectos contrapuestos sobre los biocatalizadores, uno de reactividad y uno de inactivación térmica (Illanes, 1999). En concordancia con ello, un incremento de temperatura de 40°C a 50°C mejora tanto la extractibilidad de los polifenoles como su actividad antioxidante, evaluada por tres diferentes métodos.

Sin embargo, un incremento en la temperatura de 50°C a 60°C disminuye el rendimiento de sólidos solubles, el contenido de polifenoles y el poder antioxidante evaluado por tres diferentes métodos, evidenciando una posible inactivación térmica de las enzimas a 60°C, ya que el control no enzimático a 60°C es mayor que a 50°C, en todos los análisis. Lo anterior se ilustra en la Figura 5.12.

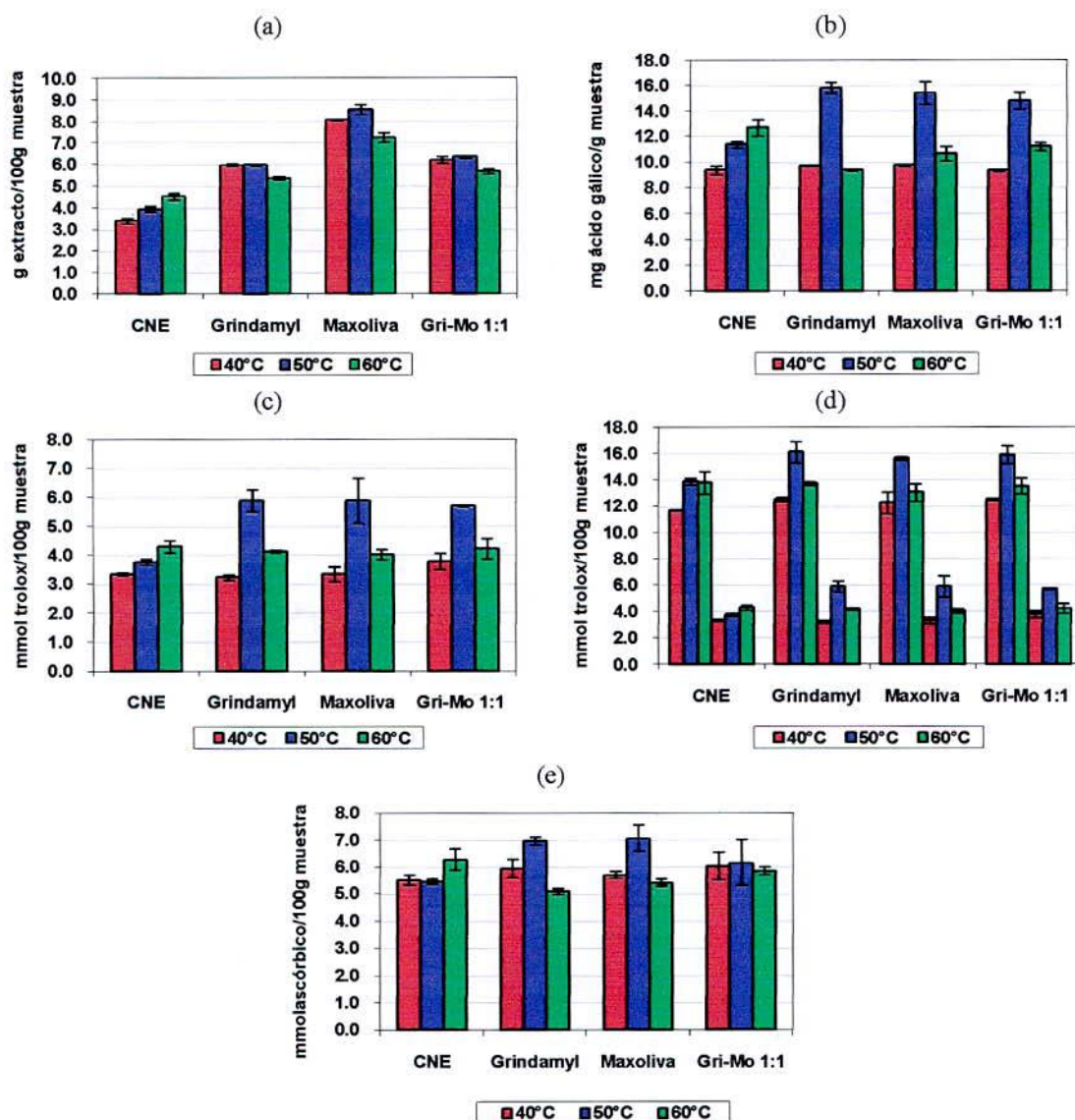


Figura 5.15: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción hidroalcohólica (75%/25% v H₂O/v EtOH) desde residuos de frambuesa. Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón E/S, 10%; razón L/S, 20:1; 18 horas. Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

En la Figura N°5.15 se aprecia que los dos biocatalizadores comerciales evaluados así como su mezcla en igual proporción, aplicados a una razón enzima/sustrato de 10 %, incrementan el contenido de sólidos solubles con respecto a controles no enzimáticos, independiente de la temperatura de trabajo; este incremento puede ser explicado en términos de la capacidad hidrolítica de las enzimas para degradar los principales componentes de la pared celular vegetal, liberando azúcares desde macromoléculas como celulosa, hemicelulosa y lignina (Meyer *et al*, 1998).

Con un tratamiento enzimático a 50°C, se consigue un aumento en el contenido fenólico superior al 35% (de 11.3 a 15.8 mg ácido gálico/g muestra seca). La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de muestras tratadas con enzimas, en comparación con los extractos no enzimáticos, aumenta alrededor de 50% (de 3.8 a 5.9 mmol trolox/100g muestra seca), cerca de 15% (de 13.8 to 16.1 mmol trolox/100g muestra seca) y aproximadamente 30% (de 5.4 to 7.0 mmol ácido ascórbico/100g muestra seca) para los métodos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Cabe destacar que no existen diferencias significativas en la aplicación de las dos pectinasas comerciales ni efecto sinérgico entre ellas en ninguno de los ensayos realizados.

La Figura 5.16 muestra el efecto de la temperatura en la recuperación hidroetanólica (50/50% vH₂O/vEtOH) asistida con enzimas de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.

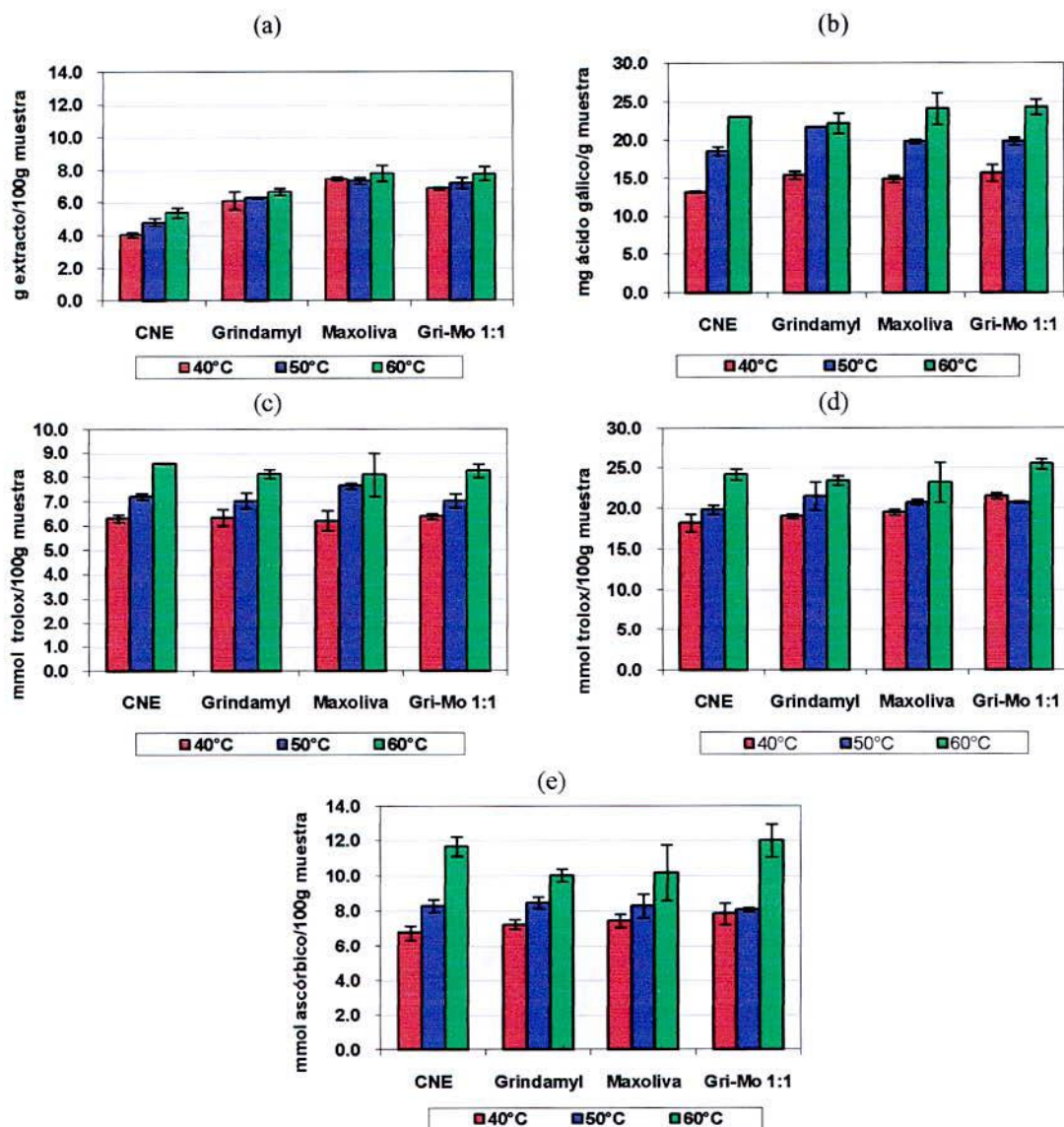


Figura 5.16: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción hidroalcohólica (50/50% vH₂O/vEtOH) desde residuos de frambuesa.
 Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón E/S, 10%; razón L/S, 20:1; 18 horas.
 Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

Como es posible apreciar en la Figura 5.16, la recuperación de compuestos fenólicos de los controles no enzimáticos aumenta con la temperatura y con la concentración de etanol solución hidroalcohólica (50/50% vH₂O/vEtOH), coincidentemente con lo reportado por Li *et al.* (2006a) para residuos de cítricos. A igual concentración de agua y etanol en la mezcla extractora no es posible observar el efecto del tratamiento enzimático sobre la recuperación de antioxidantes fenólicos.

Becerra y Dias, (2005) indican que cuando la concentración de etanol se incrementa, la enzima se denatura y que etanol interfiere en la adsorción de la enzima sobre celulosa y además de modificar el efecto cooperativo entre celobiohidrolasas y endoglucanasas, con lo cual se puede explicar el comportamiento observado en la Figura 5.13.

La Figura 5.17 muestra el efecto de la temperatura en la recuperación hidroetánolica (25/75% vH₂O/vEtOH) asistida con enzimas de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa

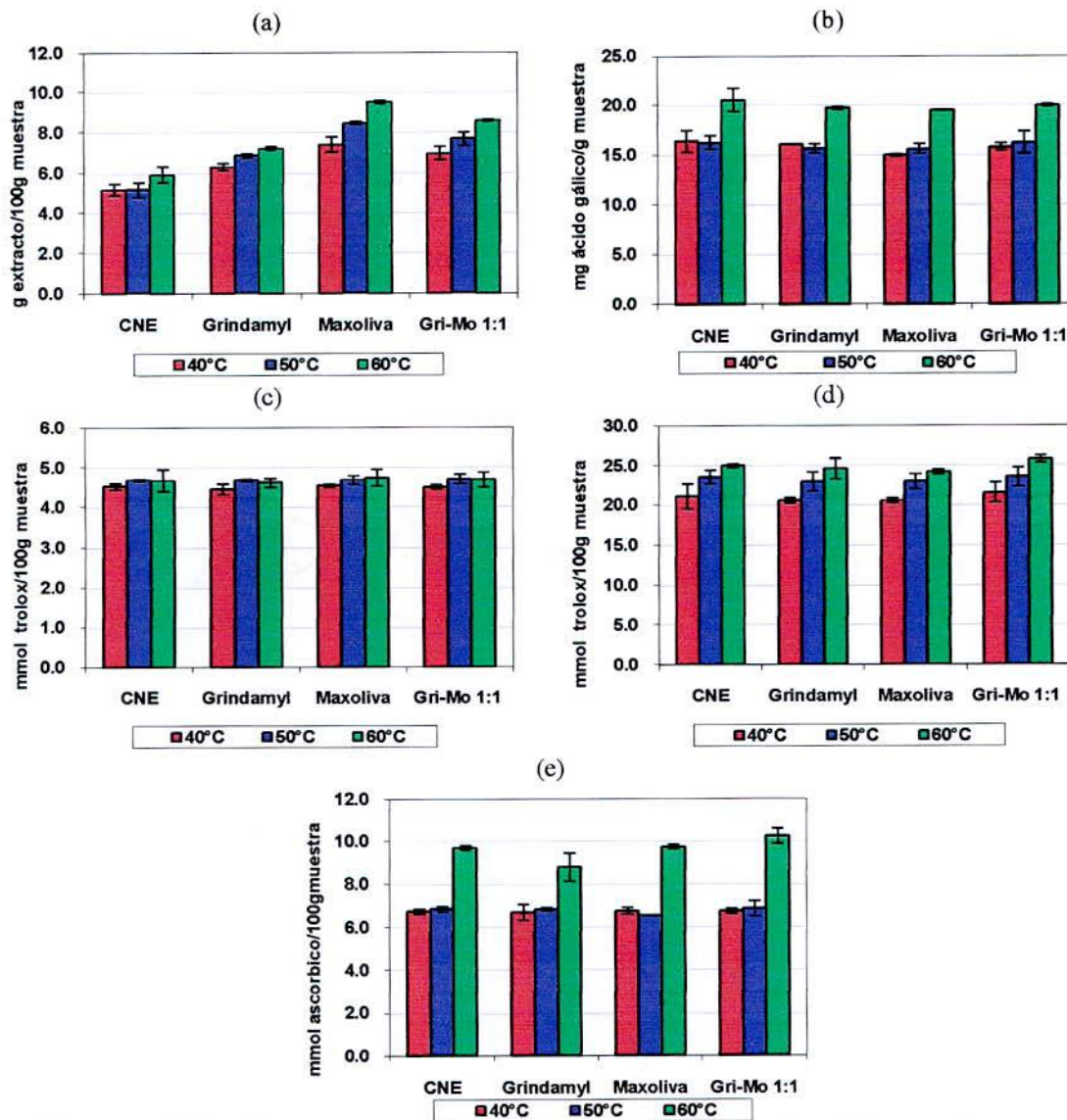


Figura 5.17: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción hidroalcohólica (25%/75% vH₂O/vEtOH) desde residuos de frambuesa.

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón E/S, 10%; razón L/S, 20:1; 18 horas. Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

Al igual que lo observado en la Figura 5.16, la Figura 5.17 muestra que al emplear una solución hidroalcohólica (25/75% vH₂O/vEtOH), el efecto del tratamiento enzimático en la extracción no puede ser distinguido del comportamiento de los extractos obtenidos con dicha mezcla, sugiriendo que la enzima es inactiva en ese medio y que el comportamiento se debe exclusivamente al sistema extractor empleado.

La Figura 5.18 muestra el efecto de la temperatura en la recuperación etanólica asistida con enzimas de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.

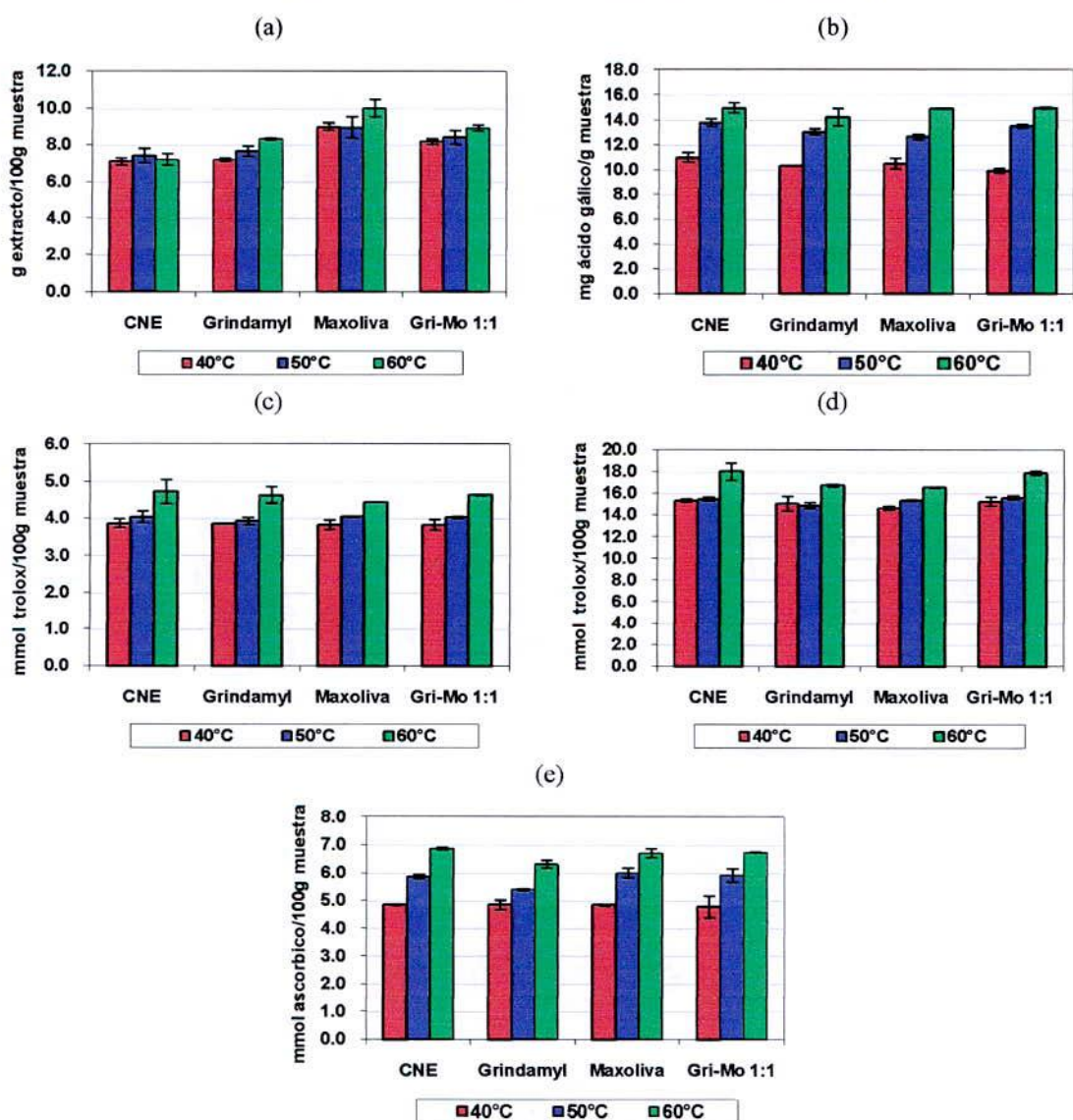


Figura 5.18 Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción etanólica desde residuos de frambuesa.

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón E/S, 10%; razón L/S, 20:1; 18 horas.

Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

La Figura 5.18 muestra la inhibición de los extractos etanólicos sobre la acción de los biocatalizadores evaluados. De acuerdo a Zabala *et al*, (2008), el etanol es un inhibidor competitivo que puede ocupar todos los sitios activos de la enzima, provocándose así un bloqueo de la actividad enzimática.

La Figura 5.19 muestra el efecto de la temperatura en la recuperación acuosa de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas desde residuos de frambuesa

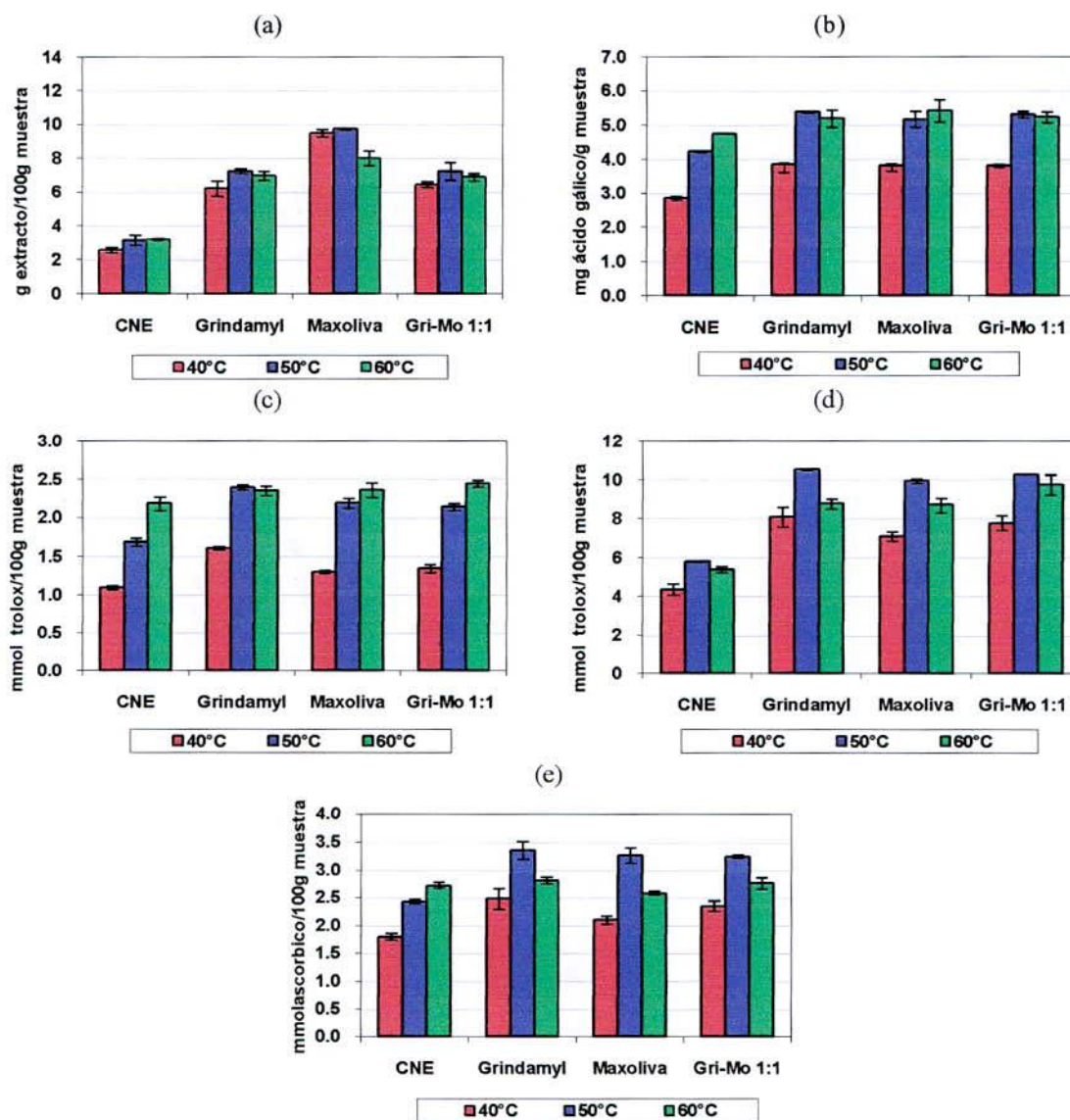


Figura 5.19: Efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático durante el proceso de extracción acuosa de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.
 Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón E/S, 10%; razón L/S, 20:1; 18 horas.
 Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

En la Figura 5.19 se aprecia que los dos preparados enzimáticos comerciales evaluados así como su mezcla en igual proporción, aplicados a una razón enzima/sustrato de 10%, incrementan el contenido de sólidos solubles con respecto a controles no enzimáticos, independiente de la temperatura de trabajo, tal como sucede en la extracción hidroalcohólica (75/25% vH₂O/vEtOH).

Con un tratamiento enzimático a 50°C, se consigue un aumento en el contenido fenólico superior al 25% (de 4,2 a 5,4 mg ácido gálico/g muestra seca). La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de muestras tratadas con enzimas, en comparación con los extractos no enzimáticos, aumenta alrededor de 40% (de 1,7 a 2,4 mmol trolox/100g muestra seca), cerca de 80% (de 5,8 to 10,5 mmol trolox/100g muestra seca) y aproximadamente 38% (de 2,4 to 3,3 mmol ácido ascórbico/100g muestra seca) para los métodos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.

Es importante hacer notar que el preparado comercial Grindamyl CA 150 es ligeramente más efectivo que la enzima Maxoliva y que no se aprecia un efecto sinérgico entre ambos en ninguno de los ensayos realizados.

La aplicación de pectinasas comerciales a una temperatura de trabajo de 50°C, incrementa el contenido de sustancias fenólicas en los extractos acuosos de frambuesa. Según Ortega-Regules *et al*, (2006), este hecho puede ser explicado por la liberación de las antocianinas desde las vacuolas en que se encuentran contenidas luego de la degradación de la pared celular vegetal. También es posible que los polifenoles que están atrapados en la matriz de la pared celular sean liberados después de su degradación (Bagger-Jorgensen y Meyer, 2004).

A continuación se realiza una evaluación del efecto de la concentración de enzima para los dos sistemas extractores que permiten una recuperación de antioxidantes fenólicos más potentes que los obtenidos mediante extracción convencional sólido/líquido (mezcla hidroetanólica 75/25% vH₂O/vEtOH y agua destilada). Se analiza un rango de razón enzima/sustrato entre 0,75 y 10 %, manteniendo fijos el tiempo de reacción en 18 horas, la temperatura en 50°C, la agitación 150 rpm y la razón S/R de 20:1, con la enzima Grindamyl CA 150

5.3.3.1 Efecto de la concentración de enzima en el tratamiento enzimático durante la extracción hidroetanólica (75/25% vH₂O/vEtOH) de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de frambuesa

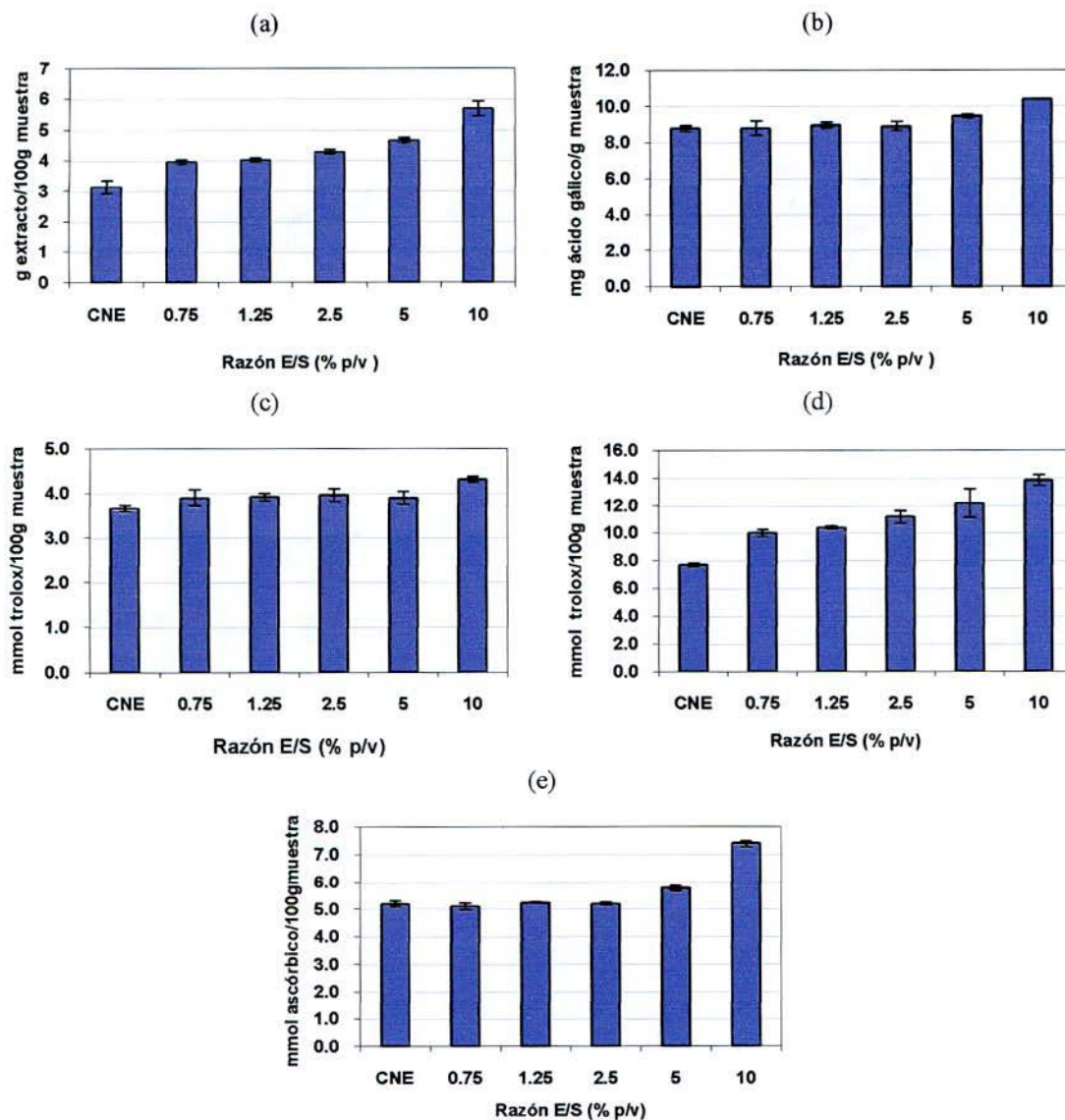


Figura N° 5.20: Efecto de la concentración de Enzima en la extracción hidroalcohólica (75/25% vH₂O/vEtOH) de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón S/R, 20:1; 50°C, 18 horas.

Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)

Tal como puede apreciarse en la Figura 5.20, los rendimientos de extracción de sólidos solubles se incrementan desde un 27 % hasta un 82 %, al aumentar la concentración del biocatalizador. El contenido fenoles totales sólo se ve modificado a altas concentraciones de enzima, con incrementos del 8 % y 23 %, para razones E/S de 5 y 10, respectivamente. Similarmente, la actividad antioxidante de los extractos evaluada por el método FRAP, presenta aumentos de 6 % y 42 % para concentraciones de 5 y 10 %, respectivamente, mientras que para las otras concentraciones ensayadas permanece sin variación; lo mismo sucede en el caso de la actividad antioxidante de los extractos evaluada por el método DPPH, inalterable a bajas razones E/S y con alzas de 7 y 18 % a razones E/S de 5 y 10, respectivamente. La actividad antioxidante determinada por el método ABTS se acrecienta, con respecto al control no enzimático, para todas las razones E/S analizadas, desde un 30 % cuando la concentración de Grindamyl es un 0,75%, hasta un 80% de incremento cuando la concentración de Grindamyl es un 10%.

5.3.3.2 Efecto de la concentración de enzima en el tratamiento enzimático durante la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de frambuesa

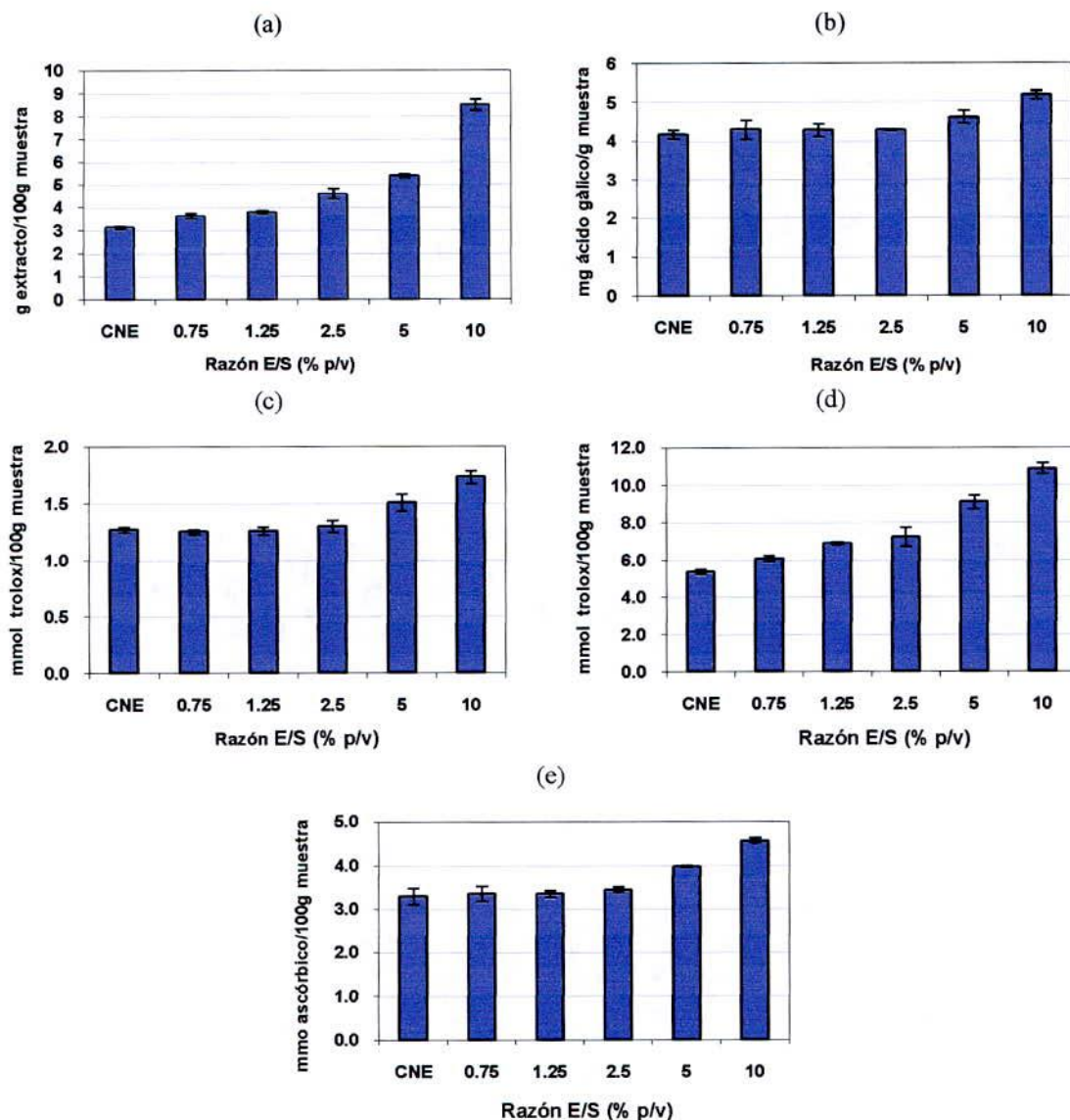


Figura 5.21: Efecto de la concentración de enzima en la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa.

*Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón S/R, 20:1; 50°C, 18 horas.
Resultados son expresados como Promedio ± D.E. (n=3)*

Tal como puede verse en la Figura 5.21, el contenido de sólidos solubles se incrementa desde un 15 % hasta un 172 %, al aumentar la concentración del biocatalizador. Los fenoles totales sólo se ven modificados a altas concentraciones de enzima, con incrementos del 11 % y 25 %, para razones E/S de 5 % y 10 %, respectivamente. Similarmente, la actividad antioxidante de los extractos acuosos evaluada por el método FRAP, presenta aumentos de 20 % y 38% para concentraciones de 5 % y 10%, respectivamente, mientras que para las otras concentraciones ensayadas permanece sin variación; lo mismo sucede con la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH, con alzas de 18 % y 36 % a razones E/S de 5 % y 10 %, respectivamente. La actividad antioxidante determinada por el método ABTS se acrecienta, con respecto al control no enzimático, para todas las razones E/S analizadas, desde un 13 % cuando la concentración de Grindamyl es un 0,75 %, hasta un 103 % de incremento cuando la concentración de Grindamyl es un 10%.

Una concentración enzimática de 5% se selecciona para estudios posteriores.

5.3.4 Efecto del tiempo de incubación en la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas desde residuos de frambuesa

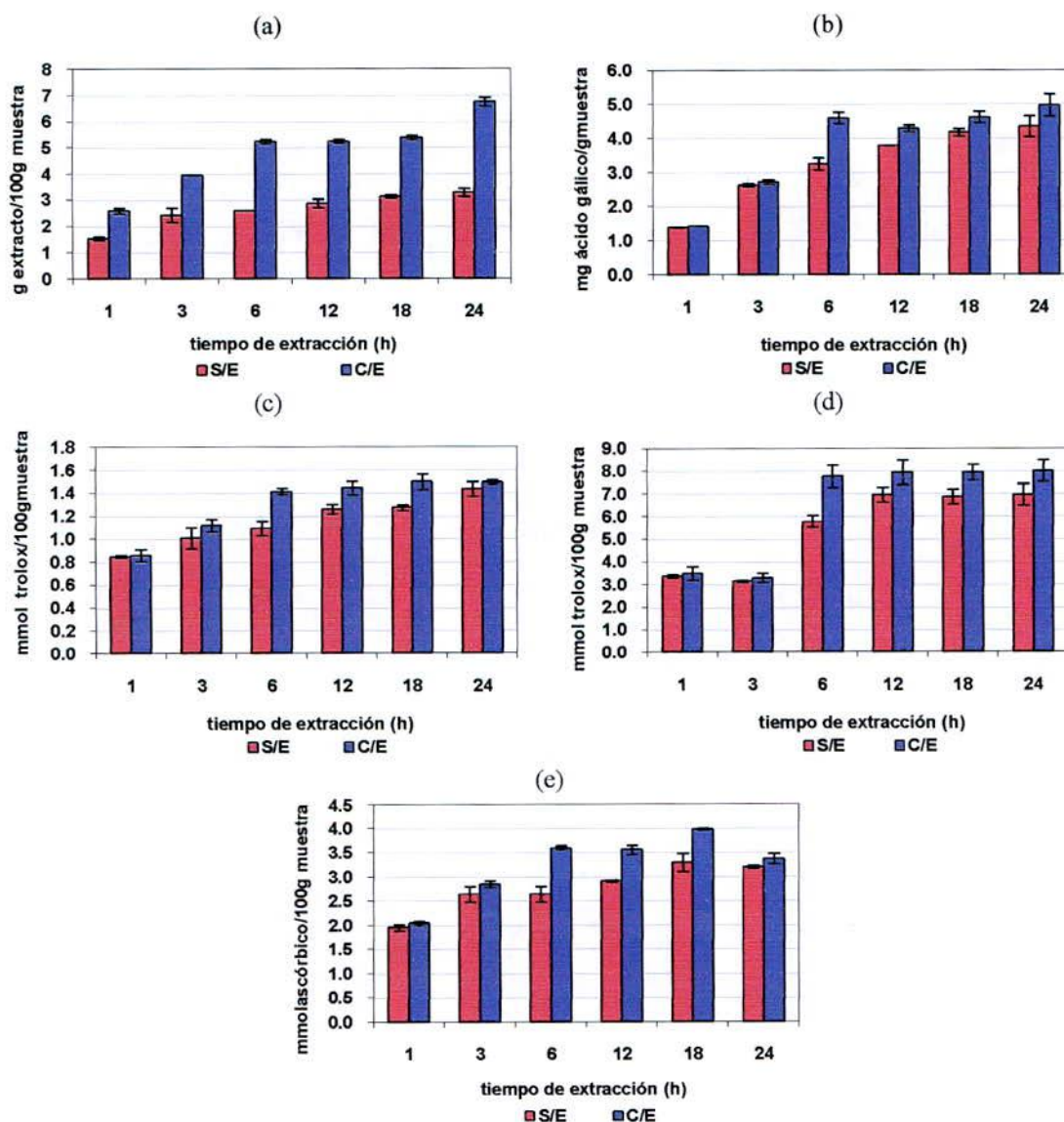


Figura 5.22. Efecto del tiempo de incubación en la extracción acuosa de antioxidantes fenólicos asistida con enzimas desde residuos de frambuesa.

(a) Rendimiento de recuperación de sólidos solubles; (b) Contenido total de fenoles extraíbles; (c) Actividad antioxidante medida por el método DPPH; (d) Actividad antioxidante medida por el método ABTS; (e) Actividad antioxidante medida por el método FRAP

Condiciones: muestra seca y desgrasada, 1 g; razón E/S 5%; razón L/S, 20:1; 50°C. Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

La Figura 5.22 ilustra la recuperación de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa durante la extracción acuosa asistida enzimáticamente, empleando Grindamyl al 5 %, para diferentes tiempos de extracción. Tal como puede apreciarse, los sólidos solubles aumentan a lo menos dos veces, en relación al control no enzimático, para cada uno de los tiempos analizados. El contenido de fenoles totales se incrementa con el tratamiento enzimático a partir de las seis horas, ya que tiempos menores de incubación no ofrecen ventajas respecto a la extracción acuosa; la mayor diferencia entre ambos sistemas se obtiene a las 6 horas de incubación (42 %), sobre ese tiempo, la recuperación de polifenoles se mantiene invariante y con incrementos sostenidos de 10% con respecto al contenido de polifenoles presentes en los extractos no tratados; pese a que la extracción convencional se ve favorecida con el tiempo de extracción.

Vale la pena destacar que la extracción convencional durante 24 horas no supera los resultados obtenidos a las 6 horas de tratamiento enzimático y, por tanto, la extracción acuosa asistida enzimáticamente mejora la eficiencia de extracción por sobre la extracción acuosa. Esto último es coincidente con lo reportado por Li *et al*, (2006b), quienes determinan que la máxima recuperación de polifenoles desde cáscaras de limón, usando Celluzyme MX a una concentración del 1,5 % p/p se produce a las seis horas de tratamiento y que sobre ese período pequeñas diferencias en la recuperación son observadas.

Grindamyl produce un importante incremento de la actividad antioxidante evaluada por los ABTS, DPPH y FRAP, con mejoras en comparación al control sin enzimas de 34, 30 y 36%, respectivamente.

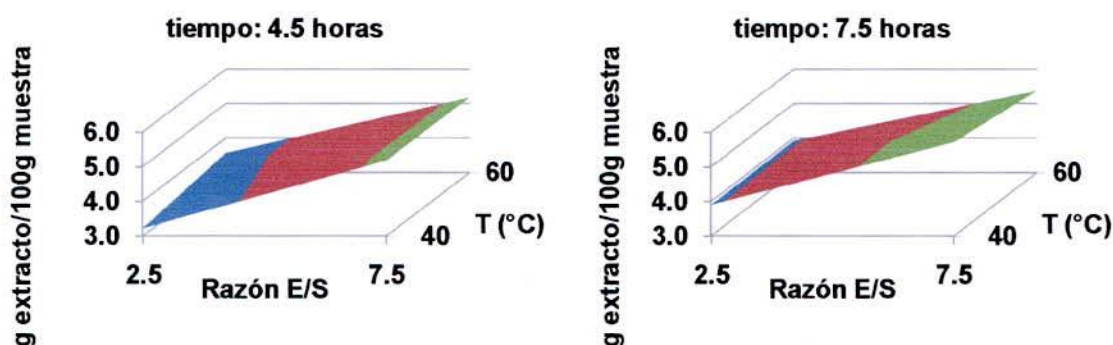
Es importante hacer notar que el comportamiento de las muestras no tratadas enzimáticamente, donde un incremento del tiempo de incubación mejora la extractibilidad de los compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes se puede explicar teniendo en cuenta que los compuestos fenólicos poliméricos son más activos que los monoméricos debido a la presencia de un mayor número de grupos hidroxilo; los compuestos monoméricos serían los más fácilmente extraíbles mientras con el aumento del tiempo de extracción se está favoreciendo la extracción de los compuestos de mayor peso molecular.

En general, comparada con la extracción por solvente, el contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y la actividad antioxidante de los extractos crudos resultantes de la extracción acuosa asistida por enzimas es más baja que la extracción hidroalcohólica; sin embargo, este método presenta algunas ventajas operacionales a considerar en cuanto a su factibilidad tecnológica para extraer polifenoles desde materiales residuales vegetales.

5.3.5 Estudio de las interacciones entre parámetros en la extracción acuosa enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa

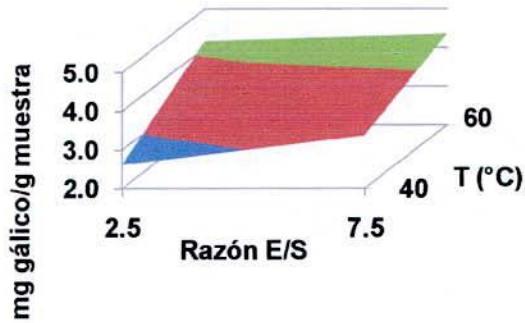
En esta actividad se evalúa el efecto de las interacciones entre parámetros en la extracción acuosa enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa en base a un diseño factorial 2^3 con repeticiones en el punto central. El proceso extractivo se realiza en discontinuo a 150 rpm de agitación y una razón agua/residuo de 20. La temperatura se varía entre 40 y 60°C, los tiempos de extracción entre 4.5 y 7.5 horas y la razón enzima/residuo entre 2,5 y 7,5%.

En la Figura 5.23 se presentan los resultados obtenidos con cada uno de los extractos acuosos enzimáticamente tratados obtenidos a partir de residuos de frambuesa utilizados en el diseño experimental.

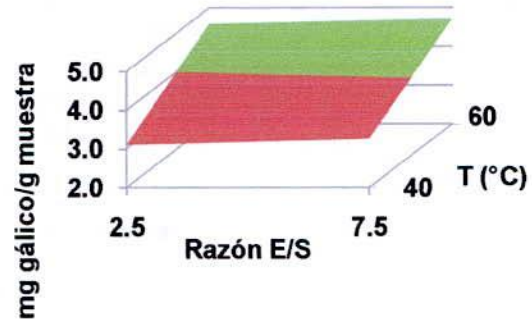


Rendimiento de Sólidos solubles
 $R=4,44+0,23t+0,02T+0,90E/S-0,18tT-0,03tE/S-0,05TE/S+0,01tTE/S$

tiempo: 4.5 horas

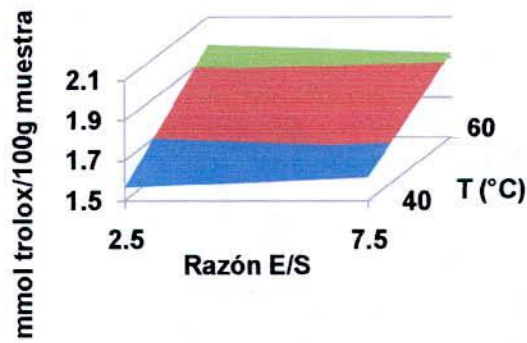


tiempo: 7.5 horas

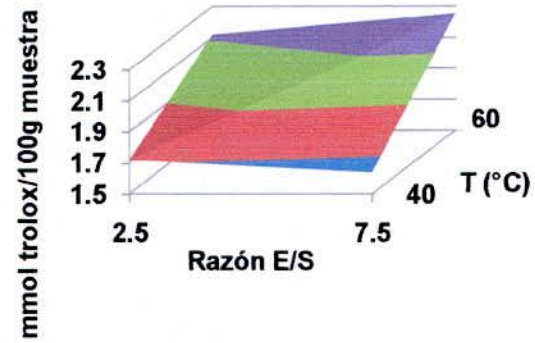


Contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles
 $R=3,87+0,19t+0,74T+0,13E/S+0,04tT-0,07tE/S-0,03TE/S-0,06tTE/S$

tiempo: 4.5 horas

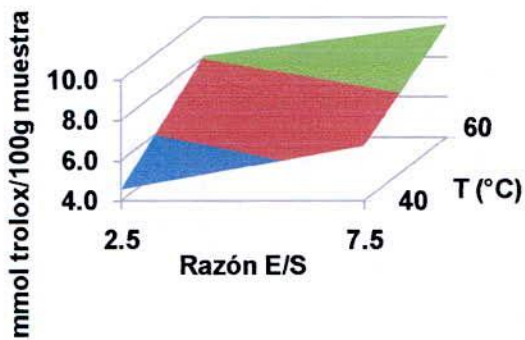


tiempo: 7.5 horas

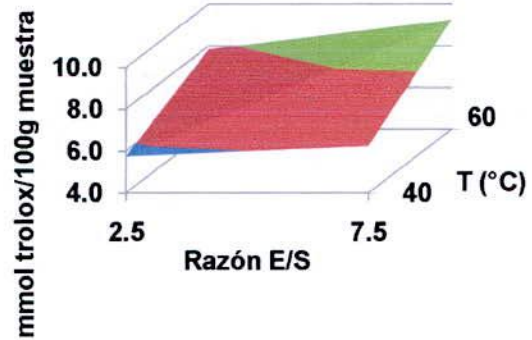


Actividad antioxidante medida por el método DPPH
 $R=1,81+0,10t+0,20T+0,02E/S+0,01tT-0,01tE/S-0,01TE/S+0,08tTE/S$

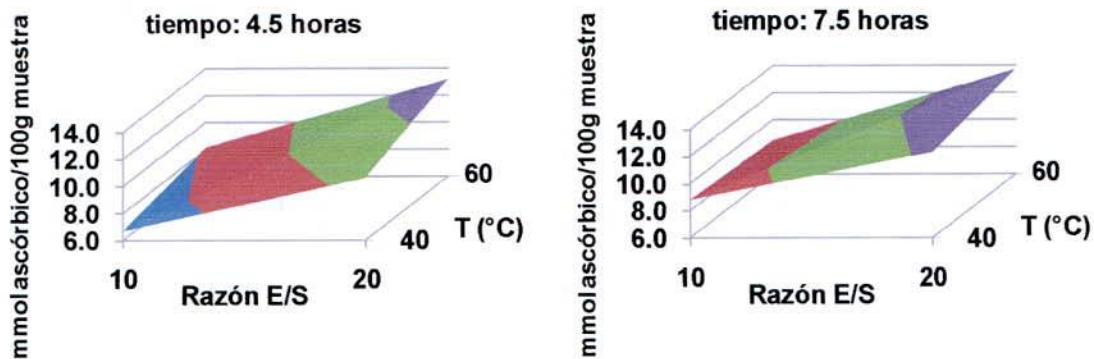
tiempo: 4.5 horas



tiempo: 7.5 horas



Actividad antioxidante medida por el método ABTS
 $R=7.508+0.155t+1.277T+0.773E/S+0.094tT-0.058tE/S-0.071TE/S+0.353tTE/S$



Actividad antioxidante medida por el método FRAP
 $R=2.501+0.190t+0.320T-0.003E/S+0.002tT+0.038tE/S+0.025TE/S+0.039tTE/S$

Figura 5.23 :Superficies respuesta para los rendimientos de solidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos acuosos enzimáticamente obtenidos a partir de residuos de frambuesa a cortos y largos tiempos de contacto

Los extractos acuosos de residuos de frambuesa tratados enzimáticamente presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles a valores altos de tiempo y razón solvente/residuo para la menor temperatura, mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles. El contenido fenólico se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón enzima/residuo, en cambio, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles. El mismo comportamiento es observado para la actividad antioxidante, medida por los métodos DPPH y ABTS. La habilidad para reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} es máxima a valores altos tiempo, temperatura y razón enzima/residuo y mínima en el punto del diseño experimental donde el tiempo y la temperatura de extracción son bajos y la razón enzima/residuo es alta.

En el caso de los sólidos solubles, la variable más importante es la razón enzima/sustrato, mientras que la temperatura influencia mayoritariamente la recuperación de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante medida por DPPH y FRAP. Temperatura y razón enzima/residuo ejercen el mayor efecto en el ensayo ABTS.

5.4 Estabilidad oxidativa de aceite crudo de pepa de uva en presencia de distintos antioxidantes

Una de las principales alteraciones de los alimentos durante su tratamiento y conservación es la rancidez, que se manifiesta en la aparición de aromas y gustos desagradables, y conlleva a su rechazo por parte del consumidor.

Los residuos de frambuesa resultan ser una materia prima favorable para la obtención de compuestos de naturaleza polifenólica con una elevada actividad antioxidante *in-vitro*. Es preciso comprobar si esa actividad *in-vitro* se mantiene en los alimentos y por tanto, si los extractos obtenidos son capaces de prevenir el desarrollo de la rancidez en aceites.

Se evalúa a continuación, la estabilidad oxidativa del aceite crudo de pepa de uva (obtenido directamente por prensado desde las semillas sin adición de preservantes exógenos) en presencia del extracto hidroalcohólico liofilizado procedente de residuos de frambuesa obtenido mediante extracción sólido-líquido durante 18h a 50°C y 150 rpm de agitación,

Para efectos de comparación se adicionan también los antioxidantes naturales ácido ascórbico, ácido gálico y catequina así como los antioxidantes sintéticos BHA, BHT y TBHQ, todos ellos a una concentración de 2 g/ kg aceite.

El seguimiento de la oxidación se realiza mediante el índice de peróxidos, un indicador de la magnitud de los productos primarios de oxidación en aceites (Chatha *et al*, 2006; Anwar *et al*, 2007).

En la Figura 5.24 se presentan los valores de índice de peróxido observados durante el calentamiento de los aceites.

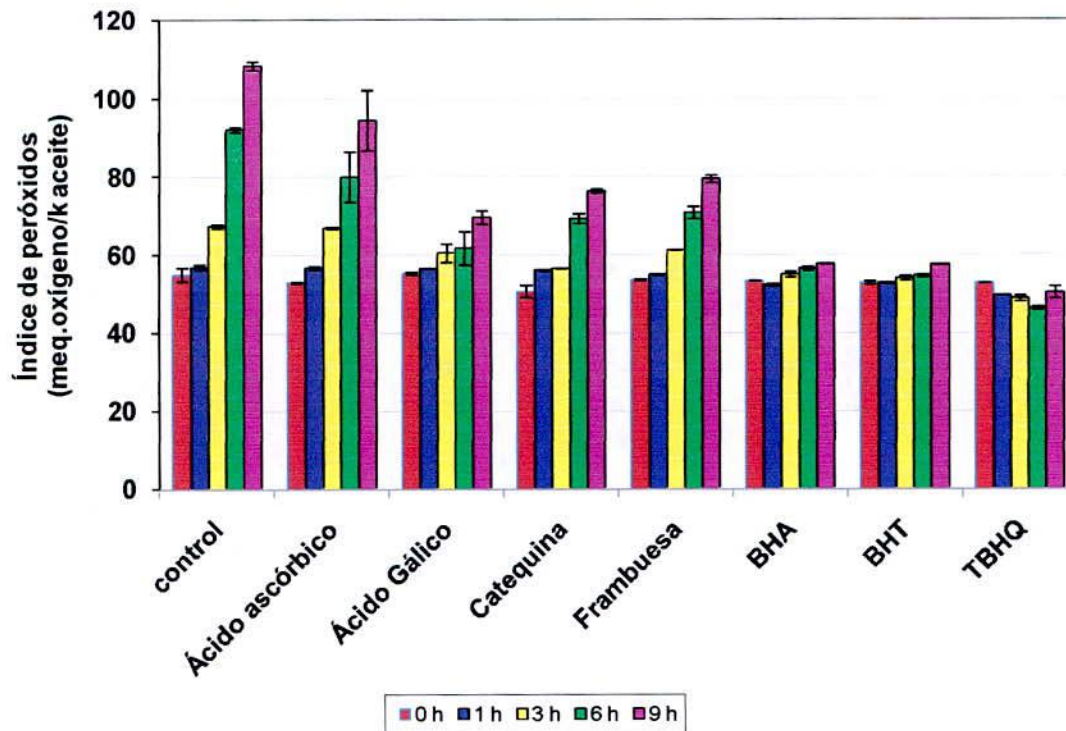


Figura N°5.24: Estabilidad oxidativa del aceite crudo de pepa de uva en presencia de distintos antioxidantes naturales y sintéticos.
 Resultados son expresados como Promedio \pm D.E. (n=3)

Tal como se muestra en la Figura N°5.20, al inicio del período de calentamiento todos los aceites presentan índices de peróxidos en el rango de 50 a 55 meq de oxígeno/ kg aceite. El comportamiento del índice de peróxido del aceite control (sin antioxidantes) durante el calentamiento muestra un incremento desde 54,9 meq de oxígeno/ kg aceite al tiempo cero hasta 108,3 meq de oxígeno/ kg aceite al final del período de calentamiento. La termo-oxidación se detuvo a las 9 horas, considerando que el control superó los 100 meq de oxígeno/ kg aceite, lo cual supone un completo deterioro como aceite para consumo humano (Moreno-Álvarez *et al*, 2007).

El aceite acondicionado con el extracto rico en polifenoles también presenta tendencia al incremento en el índice de peróxidos en función del tiempo de calentamiento; un comportamiento análogo se observa para los aceites enriquecidos con antioxidantes naturales, mientras que la estabilidad de los aceites a los cuales se les ha incorporado antioxidantes sintéticos se mantiene constante, señalando que a los tiempos evaluados los aceites con BHA, BHT y TBHQ no han sufrido un deterioro oxidativo como consecuencia de la temperatura.

El aceite con extracto de residuos de frambuesa calentado durante 9 horas inhibe la oxidación del aceite de pepa de uva en un 26,7%, es más eficaz que el antioxidante natural ácido ascórbico, el cual inhibe la oxidación del aceite de pepa de uva en 12,9%. Su acción es similar a la inhibición obtenida con catequina (29,6%) ($P > 0.05$) y levemente inferior a la protección que otorga el ácido gálico (35,9%) ($P < 0.05$). Los polifenoles presentes en el extracto de residuos de frambuesa actúan como retardadores del enranciamiento capturando los radicales libres que hayan podido generarse; sin embargo, el aceite con extracto de residuos de frambuesa presenta menor efectividad que los antioxidantes sintéticos comerciales BHA, BHT y TBHQ, cuyos porcentajes de inhibición de la oxidación del aceite son 46,8, 46,9 y 53,6%, no presentando diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$). A pesar de las condiciones de alta temperatura a las que fueron sometidos los aceites, los valores registrados para el índice de peróxido del aceite que contenía el extracto de residuos de frambuesa son inferiores a los del control crudo para todos los tiempos analizados, es decir, en ningún caso ejerce un efecto pro-oxidante.

Aunque el empleo de antioxidantes alimentarios sintéticos está permitido, las normativas internacionales tienden a restringir su empleo a concentraciones inferiores a 200 ppm (Giese, 1996), y en concreto, la Unión Europea prohíbe su empleo en alimentos infantiles y aceites envasados. Su uso está regulado y restringido en numerosos países, y su utilización en alimentos está decreciendo. Por el contrario, los antioxidantes naturales presentan la ventaja de no poseer restricciones en sus niveles de adición a los aceites. Qasem y Al-Ismael, (2004), investigan la actividad antioxidante de extractos alcohólicos de flores de camomila, semillas de anís y eneldo en aceites de maíz y soja a una concentración de 3 g de extracto por/ kg de aceite, mientras que Ramahlo y Neuza, 2008, emplean extracto de romero a concentración de 1g de extracto/ kg de aceite de soja, indicando que este valor es consistente con la recomendación comercial.

Aceites estabilizados con antioxidantes sintéticos o naturales usualmente presentan menores valores de peróxidos que los aceites de control (Chatha *et al*, 2006; Anwar *et al*, 2007). La disminución del valor de peróxido de aceite de soja estabilizado con extracto metanólico de cáscara de arroz al final de un período de incubación de 15 días a 60°C es de 32,7% (Devi *et al*, 2007).

Por otro lado, Zia-ur-Rehman, (2006) analiza la capacidad de extractos obtenidos con cáscaras de cítricos para estabilizar aceite de maíz a 25°C por un período de 6 meses, encontrando una disminución del valor de peróxido entre 89,9 y 93,9% en muestras de aceite estabilizado con extracto de cáscara de cítricos a diferentes concentraciones. Chatha *et al*, (2006) informan una disminución del valor de peróxidos del aceite de maravilla entre 22,2 y 45,6% usando extractos acetónicos y metanólicos al 80% de cáscaras de arroz. La adición de extractos metanólicos al 80% de residuos de granada, manzana, frutos cítricos, maíz, trigo y arroz disminuyen el valor de peróxidos entre 70% y 42% con respecto al control, de acuerdo a lo reportado por Sultana *et al*, 2008. Aunque entre los resultados reportados en bibliografía y el presentado en este estudio existen diferencias entre la naturaleza del sustrato, las condiciones de almacenamiento de los aceites y las concentraciones de los extractos adicionados, todos ellos ponen de manifiesto la actividad protectora de los extractos de origen vegetal (menores valores de peróxido en relación al aceite testigo sin antioxidantes).

5.5 CONSIDERACIONES FINALES

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos obtenidos a partir de pomazas de berries, se encuentra en el rango entre 1,17 y 19,14 mg ácido gálico/g muestra seca, 2,22 y 17,20 ácido gálico/g muestra seca y 1,26 y 21,50 mg ácido gálico/g muestra seca, para residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, respectivamente. Dependiendo del tipo de solvente extractor y de parámetros tales como tiempo de extracción, temperatura de extracción y razón solvente/residuo.

Kähkönen, *et al* (1999) determinan el contenido fenólico de 92 materiales vegetales, entre ellos de berries. Sus resultados muestran la considerable cantidad de polifenoles presentes en este tipo de frutos, indicando, por ejemplo, que las frutillas, las uvillas, las grosellas negras, las grosellas rojas, las moras del ártico, las frambuesas, los arándanos rojos y poseen 14,8, 12,4, 20,3, 12,6, 16,2, 23,9 y 21,2 mg ácido gálico/g muestra seca. Dichos valores son cercanos a los obtenidos en este estudio en las condiciones más favorables de extracción.

Con respecto a frutas y vegetales, se observa que los extractos de berries contienen una mayor cantidad de polifenoles totales. Particularmente, uvas blancas, ciruelas, naranjas y manzanas tienen un contenido de polifenoles totales de alrededor de 7,9; 15,9; 14,6 y 9,6 mg de ácido gálico/g muestra seca, respectivamente y verduras como zapallos italianos, apio, cebollas y bruselas presentan valores de 8,5, 4,5, 13,4 y 4,7 mg de ácido gálico/g muestra seca, respectivamente (Cieślik *et al*, 2006), todos ellos con un contenido menor al determinado en este trabajo si se aplica el solvente, el tiempo, la temperatura y la razón solvente/residuo más adecuados para la extracción.

En relación a extractos obtenidos a partir de otros residuos agroindustriales como pomasa de manzana (10,16 mg ácido gálico/ g muestra seca; Sudha *et al*, (2006)). Blanco *et al*, (2010) evalúan el contenido fenólico cáscaras de los cítricos como limón mexicano, toronja, naranja agria, limón real, lima, naranja de valencia y mandarina en 5,7; 11,4; 7,9, 3,5; 6,6; 2,8 y 7,4 (mg ácido gálico/ g cáscara seca), todos ellos con un contenido menor al determinado en este trabajo si se aplica el solvente, el tiempo, la temperatura y la razón solvente/residuo más adecuados para la extracción.

En cambio, la cantidad de polifenoles totales encontrada en otros trabajos es superior a lo conseguido en este estudio bajo las mejores condiciones de extracción. Por ejemplo, Zhou *et al*, (2009), determinan un contenido de polifenoles equivalente a 47 mg de ácido gálico/ g muestra seca en extractos de pomasa de fresas chinas (bayberry); Larrauri *et al*, (1997) cuantifican los fenoles en 43 mg ácidoalcoólico/ g muestra seca para pomasa de uva roja y Yu *et al*, (2005) indican que para pieles de maní es posible obtener entre 90-125 mg de fenoles totales/g muestra seca.

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa, fluctúa entre 0,48 y 16,47 mmol trolox/100g muestra seca; entre 0,11 y 40 mmol trolox/100 g muestra seca y entre 0,45 y 12,3 mmol ácido ascórbico/100 g muestra seca, medida por los métodos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Helbig *et al*, (2008), obtienen actividades antioxidantes, para residuos de arándanos, sauco y grosellas negras extraídos con hexano de 5,8, 84,4 y 74,7 $\mu\text{mol trolox}/100\text{g}$, respectivamente; es decir, sus resultados son tres ordenes de magnitud inferiores a los presentados en este estudio. Los mismos autores señalan que si la extracción se realiza con agua, los valores de actividad antioxidante de los extractos de residuos de grosella negra se incrementan considerablemente, alcanzando los 83,9 $\mu\text{moles}/\text{g}$, siendo este valor aún más bajo que la actividad conseguida a las condiciones de extracción más favorables. La actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de los residuos de frambuesa es incluso superior a la determinada por Pellegrinni *et al*, (2006) para extractos de romero (43,95 $\mu\text{mol trolox}/\text{g}$).

Los positivos resultados obtenidos en esta investigación han sido la base para la generación del proyecto FONDEF "Desarrollo de un proceso biotecnológico para la revalorización de descartes de la industria de procesamiento de berries", desarrollado en conjunto por la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV, la empresa Bayas del Sur y el Centro Regional de Estudios en Alimentos Saludables, CREAS. Este proyecto, en su segundo año de ejecución, ha obtenido extractos polifenólicos con elevada la capacidad antioxidantes desde descartes de berries como moras y maqui, medidos por los métodos DPPH, ABTS, FRAP y método ORAC, demostrando la viabilidad técnica y económica de la recuperación de un extracto con importantes características nutraceuticas, de manera eficaz y competitiva al mercado ya existente, pudiéndose conseguir rentabilidades adicionales al proceso de origen.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

Se han caracterizado detalladamente 8 residuos provenientes del procesamiento de proximal de 8 residuos provenientes del procesamiento de arándano rojo, arándano azul, durazno, frambuesa, pera, pera desplumada, pera tamizada y pimentón, presentando todos ellos un bajo contenido de proteínas, aceite y cenizas. Los residuos de la familia de los berries, compuestos principalmente por pieles y semillas, poseen un elevado contenido de fibra cruda. De la composición en fibras detergente se deduce que para una efectiva acción de enzimas hidrolíticas sobre la pared celular vegetal se requiere de una combinación de celulasas, hemicelulasas y pectinasas.

Dentro de los 8 residuos estudiados, aquellos derivados de arándano azul, arándano rojo y frambuesa resultan ser las materias primas más adecuadas para desarrollar un proceso de extracción estándar de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes.

La extracción convencional sólido/líquido de antioxidantes fenólicos a partir de residuos de arándano azul, arándano rojo y frambuesa, se ve favorecida con altas temperaturas de incubación sin afectar la calidad/actividad de los extractos obtenidos. Altas razones solvente/residuo mejoran la extractibilidad de los polifenoles. La influencia del tiempo es variable ya que en ocasiones menores tiempos de operación resultan ser convenientes.

En este trabajo se demuestra la importancia de la elección de la solución extractora en la obtención de extractos ricos en antioxidantes fenólicos a partir de subproductos del procesado industrial de arándano azul, arándano rojo y frambuesa. De las soluciones extractoras ensayadas, la mezcla agua:etanol (50/50% vH₂O/vEtOH) es la más efectiva.

De los tres descartes de berries, la pomasa de frambuesa resulta ser la fuente más promisoría para obtener un extracto antioxidante debido a su elevado contenido en polifenoles, a su gran capacidad captadora de radicales ABTS^{•+} o DPPH[•] y a su habilidad para reducir Fe³⁺ a Fe²⁺.

Todos los biocatalizadores evaluados (Cellubrix, Granozyme, Grindamyl CA 150, Maxoliva, Olivex, Pectinex Ultra SP, rohapect 10L, Rohapect DA6L, Rohapect Max, Rohavin, Ultrazym 100G y Viscozym) incrementan los rendimientos de extracción de sólidos solubles con respecto al control no enzimático, aunque no todos mejoran la extractibilidad de los compuestos fenólicos ni la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Las enzimas más efectivas son las pectinasas Grindamyl CA 150 de Danisco y Maxoliva de DSM con un rendimiento en polifenoles y actividades antioxidantes que superan a los controles no enzimáticos.

El tratamiento enzimático con Grindamyl CA 150 de Danisco y Maxoliva de DSM sólo es efectivo si se efectúa con agua o con la mezcla hidroetanólica (75/25 %vH₂O/vEtOH) y a elevadas razones enzima/sustrato.

La extracción acuosa asistida enzimáticamente incrementa el contenido de polifenoles totales y mejora la actividad antioxidante de los extractos medida por los métodos DPPH, ABTS y FRAP en comparación al proceso acuoso, reduciendo significativamente los tiempos de extracción.

El extracto hidroetanólico (50/50% vH₂O/vEtOH) proveniente de residuos de frambuesa inhibe la oxidación de aceite crudo de pepa de uva de manera superior al ácido ascórbico, similar a los antioxidantes naturales ácido gálico y catequina, pero inferior a la de los antioxidantes sintéticos BHA, BHT y TBHQ.

6.2 RECOMENDACIONES

Sería conveniente evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa también mediante el método ORAC, ya que el Departamento de Agricultura de Estados Unidos publicó una base de datos en la que se informa la actividad ORAC como el mejor índice de la capacidad antioxidante de un alimento y en Chile, investigadores del INTA están próximos a publicar contenidos referenciales de ORAC en aproximadamente 130 productos de exportación hortofrutícola, con el propósito de reforzar el rol de nuestro país como potencia alimentaria.

Asimismo, sería provechoso evaluar la composición fenólica de los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa, mediante técnicas cromatográficas, que permitan la

identificación sus principales compuestos fenólicos y evaluar sus características nutraceuticas como fuentes de fibra dietaria u oligosacaridos no digeribles.

También sería aconsejable analizar el efecto de extractos de residuos de frambuesa ricos en compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante seleccionados sobre la oxidación de Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y sobre cultivos de células mamíferas para determinar su potencial antimutagénico y anticarcinogénico.

Sería interesante comprobar la capacidad de los extractos de frambuesa para retrasar el proceso oxidativo de aceites a concentraciones mayores a la empleada en este estudio (200 ppm, que equivale al límite permitido para antioxidantes sintéticos) hasta adicionar 1g de extracto/ kg de aceite, un valor consistente con la recomendación comercial para antioxidantes naturales.

Idealmente, también se debería realizar el seguimiento de la oxidación de emulsiones (como mayonesas o sopas) en presencia de los extractos de frambuesa.

Además, sería recomendable realizar ensayos de estabilidad oxidativa de aceites en presencia de los extractos de frambuesa, mediante el método de Rancimat.

Finalmente, en virtud de los buenos resultados obtenidos con residuos de frambuesa, sería interesante iniciar experiencias a escala piloto para estudiar la rentabilidad y el grado de competitividad económica con respecto a productos similares existentes actualmente en el mercado.

6.3 PROYECCIONES

Lo residuos de frambuesa podrían ser una buena alternativa para la obtención de alimentos funcionales ricos en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, cuya ingesta disminuya el riesgo de desarrollo de enfermedades no transmisibles que, en la actualidad, son las principales limitantes de la calidad y expectativas de vida de la población mundial. No obstante, para que un alimento sea aceptado como funcional, sus efectos beneficiosos deben ser avalados experimentalmente mediante estudios de intervención en humanos que pongan de manifiesto los efectos reales de este tipo de productos para la salud humana. (Roberfroid 2002).

CAPITULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, H., Rezaei, K. and Rashidi, L., 2008. Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists Society* **85**, pp. 83-89.

Abdalla, A., Darwish, S., Ayad, E. and El-Hamahmy, R. 2007. Egyptian mango by-product 2: antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry* **103**, pp. 1141-1152.

Abdel-Aal, E.S.M. and Rabalski, I., 2008. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Open Agriculture Journal* **2**, pp. 7-14.

Abdille, Md.H.; Singh, R.P.; Jayaprakasha, G.K.; Jena, B.S., 2004. Antioxidant activity of the extracts from *Killenia indica* fruits. *Food Chemistry* **90**, pp. 891-896.

Abeyasinghe, D.C., Li, X., Sun, C., Zhand, W., Zhou, C. and Chen, K., 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry* **104**, pp.1338-1344.

Adom, K.K. and Liu, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 6182-6187.

Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G., Prasada-Rao, U.J.S. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry* **105**, pp. 982-988.

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., Al-Rawahy, F., 2007. Compositional and functional characteristics of dates, syrups and their by-products. *Food Chemistry* **104**, pp. 943-947.

Allaith, A., 2008. Antioxidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit of various cultivars. *International Journal of Food Science and Technology* **43**, pp. 1033-1040.

Alonso, A.M, Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B. and García A., 2002. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 5832-5836.

Alonso-Salces, R.M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., and Vicente, F., 2001. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A* **933**, pp. 37-43.

Amarowicz, R., Naczki, M. and Shahidi, F., 2000. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *Journal of the American Oil Chemists Society* **77**, pp. 957-961.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. and Weil, J.A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* **84**, pp. 551-556.

Andreasen, M.F., Christensen, L.P., Meyer, A.S., and Hansen A., 1999. Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79** pp., 411-413.

Andreoni, N., 1997. Hazelnut phenolic substances as natural antioxidant. *Acta Horticulturae*. **445**, pp. 217-221.

- Anesini, C., Ferrano, G.E. and Filip, R., 2008. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 9225-9229.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. and Ryan, D., 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst* **125**, pp. 989-1009.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., Mc Donald, S and Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* **127**, pp.183-198.
- Anwar, F., Siddiq, A., Iqbal, S. and Asi, M.R., 2007. Stabilization of sunflower oil with moringa oleifera leaves under ambient storage. *Journal of Food Lipids* **14**, pp. 35-49.
- Arts I.C.W and Hollman, P.C.H., 1998. Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 5156-5162.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990a. Official Methods of Analysis edited by K. Helrich, 15th Edition. p. 342. Ed. Board. USA.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990b. *ibid.* pp. 777.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990c. *ibid.* pp. 995.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990d. *ibid.* pp.80.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990e. *ibid.* pp. 956.
- Atala, E., Vásquez L., Speisky, H., Lissi E., López-Alarcón, C. 2009. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: an evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chemistry* **113**, pp. 331-333.
- Atoui A.K., Mansouri, A., Boskou, G., and Kefalas, P., 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* **89**, pp.27-36.
- Aruoma, O.I., Murcia, A., Butler, J., and Halliwell, B., 1993. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, pp. 1880-1885.
- Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Warren, D., Jenner, P., Butler, J. and Halliwell, B., 1997. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry* **60**, pp.149-156.
- Azizah, A.H., Nik-Ruslawati, N.M. and Swee-Tee, T., 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* **64**, pp. 199-202.
- Bagger-Jorgensen, R., and Meyer, A.S., 2004. Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. *European Food Research and Technology*, **219**, pp. 620-629.
- Balasinska, B. and Troszynska, A., 1998. Total antioxidant activity of evening primrose (*Oenothera paradoxa*) cake extract measured *in vitro* by liposome model and murine L1210 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 3558-3563.

- Bandoniene, D. and Murkovic M., 2002. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp., 2482-2487.
- Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R.I., Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V.E. and López-Munguía, A., 2002. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp.4491-4496.
- Bazykina, N.I., Nikolaevskii, A.N., Filippenko, T.A. and Kaloerova, V.G., 2002. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **36**, pp. 46-49.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* **18**, pp.355-383.
- Baublis, A., Decker, E.A. and Clydesdale, F.M., 2000. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry* **68**, pp. 1-6.
- Bezerra, R.M.F. and Dias, A.A., 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis.inhibition by ethanol and cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **126**, pp.49-59.
- Bell, J.K., 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. *Canadian Journal of Animal Science* **73**, pp. 679-967.
- Ben-Shalom, N., 1986. Hidrance of Hemicellulose and cellulose Hydrolysis by pectic substances. *Journal of food Science* **51**, pp. 720-730.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Analytical Biochemistry* **239**, pp. 70-76.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, pp. 1199-1200.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 2123-2129.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J. and Medina, M., 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* **66**, pp. 209-215.
- Bonvehí, J.S., Torrento M.S. and Llorente, E.C., 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp. 1848-1853.
- Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Rexborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A. and Wagner, K.H., 2000. Vitamin E: review. *Journal of Science and Food Agricultural* **80**, pp. 913-938.
- Brand-Williams W., Cuvelier, M.E. and Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **28**, pp 25-30.
- Bravo, L. and Saura-Calixto, F., 1998. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 135-141.
- Brett, C.T, Waldron, K.W., 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Chapman and Hall, London, UK.

- Burda, S. and Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp.2774-2779.
- Cacace, J.E. and Mazza, G., 2002. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp.5939-5946.
- Cacace, J.E. and Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds. *Journal of Food Engineering* **59**, pp. 379-389.
- Cadahía, E., Conde, E., García-Vallejo, M.C. and Fernández de Simón, B., 1997. High pressure liquid chromatographic analysis of polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*: proanthocyanidins, ellagitannins and flavonol glycosides. *Phytochemical Analysis* **8**, pp.78-83.
- Cao, G., Alessio, H.M. and Cutler, R.G., 1993. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **14**, pp. 303-311.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, pp. 3426-3431.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* **22**, pp.749-760.
- Cao, G., Verdon, C.P., Wu, A.H.B., Wang, H. and Prior, R.L., 1995. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry* **41**, pp. 1738-1744.
- Carbonell, E., Costell, E., Durán, L., 1990. Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **30**, pp. 1-9.
- Chambers, S.J., Lambert, N., Plumb, G.W. and Williamson, G., 1996. Evaluation of the antioxidant properties of a methanolic extract from juice plus fruit and juice plus vegetable (dietary supplements). *Food Chemistry* **57**, pp. 271-274.
- Chatha, S.A.S., Anwar, F., Manzoor, M. and Bajwa, J.R., 2006. Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. *Grasas y Aceites* **57**, pp.328-335.
- Chen, H., Zuo, Y. and Deng, Y., 2001. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **913**, pp. 387-395.
- Cherry, J.R. and Fidantsef, A., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, pp.438-443.
- Chizzola, R., Michitsch, H. and Franz, C., 2008. Antioxidative properties of thymus vulgaris leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 6897-6904.
- Choi, S.W., Lee, S. K., Kim, E.O. and Oh, J.H., 2007. Antioxidant and anti-melanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, pp. 3920-3925.
- Chun O.K. and Kim D.O., 2004. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. *Food Research International* **37**, pp. 337-342.
- Cieślak, E., Gręda, A. and Adamus, W., 2006. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry* **94**, pp. 135-142.

- Cilliers, J.J.L. and Singleton, V.L., 1990. Nonenzymic autoxidative reactions of caffeic acid in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **41**, pp.84-86.
- Collao, C., Curotto, E., and Zúñiga M.E., 2007. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* **58**, pp., 10-14.
- Conde, E., Cadahía E. and García-Vallejos, M. C., 1997. Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. *Phytochemical Analysis* **8**, pp. 186-193.
- Cruz, J.M., Domínguez, H. and Parajó, J.C., 2004. Assessment of the Production of Antioxidants from Winemaking Waste Solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp. 5612-5620.
- Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C., 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society* **73**, pp. 645-652.
- da Silva Pinto, M., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. and Shetty, K. 2008. Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria × ananassa Duch.*) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 4386-4392.
- Dao, L.T., Takeoka, G.R., Edwards, R.H. and Berrios, J., 1998. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 3564-3569.
- Davey, M.W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D. and Fletcher, J., 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, pp.825-860.
- Dawes, H.W. and Keene, J.B., 1999. Phenolic composition of kiwifruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 2398-2403.
- de Pascual Teresa, S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C., 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, pp. 5331-5337.
- del Refugio-Ramos, M., Jerz, G., Villanueva, S., López-Dellamary, F., Waibel, R., and Winterhalter, P., 2004. Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana Mill. Lauraceae cv. Hass*). *Phytochemistry* **65**, pp. 955-962.
- Devi, R.R., Jayalekshmy, A. and Arumughan, C., 2007. Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. *Food Chemistry* **104**, pp. 658-664.
- Domínguez, H., Núñez, M.J., Lema, J.M., 1993. Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables. *Food Chemistry* **46**, pp. 277-284.
- Domínguez, H., Núñez, M.J., Lema, J.M., 1994. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chemistry* **49**, pp. 271-286.
- Donovan, J.L., Meyer, A.S. and Waterhouse, A.L., 1998. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 1247-1252.

Duh, P.D. and Yen, G.C., 1995. Changes in antioxidant activity and components of methanolic extracts of peanut hulls irradiated with ultraviolet light. *Food Chemistry* **54**, pp. 127-131.

Ehlenfeldt, M.K. and Prior, R.L., 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp. 2222-2227.

Erkan, N., Ayranci, G. and Ayranci, E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, camosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* **110**, pp. 76-82.

Escarpa, A. and Gonzalez, M.C., 2001. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, pp 57-139.

Escribano, M.T. and Santos-Buelga, C. 2003 in *Methods in Polyphenol Analysis* edited by Celestino Santos-Buelga and Gary Williamson Cambridge Royal Society of Chemistry, **383** pp.

Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Conde, E. and García-Vallejo, M.C., 1996. Low molecular weight phenolic compounds in Spanish oakwoods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, pp. 1507-1511.

Fernández de Simón, B., Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C. and Estrella, I., 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1531-1535.

Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., García-Parrilla, M.C. and Troncoso, A.M., 2004. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta* **513**, pp.113-118.

Figuerola F, Hurtado ML, Estevez AM, Chiffelle I, Asenjo F. 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry Food* **91**, pp. 395-401.

Fitzpatrick D.F., Fleming R.C., Bing B., Maggi D.A., O'Malley R.M., 2000. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, pp. 6384-6390.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. and Ritiene, A., 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 1035-1040.

Frankel, E.N., 1993. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology* **4**, pp. 220-225.

Frankel, E.N., 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry* **57**, pp. 51-55.

Frankel, E.N., Huang, S.W. and Aeschbach, R., 1997. Antioxidant Activity of Green Teas in Different Lipid Systems. *Journal of American Oil Chemists Society* **74**, pp. 1309-1315.

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

Fukumoto, L.R. and Mazza, G., 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, pp. 3597-3604.

Gómez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Medina-Juárez, L.A., Ortega-García, J., Cázarez-Casanova, R. and Angulo-Guerrero, O., 1999. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, pp. 1445-1447.

Gao, L. and Mazza, G., 1995. Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, pp. 343-346.

Gao, L. and Mazza, G., 1996. Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science* **61**, 600-603.

Garau, M.C., Simal, S., Rossello, C. and Femenia, A., 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry* **104**, pp. 1014-1024.

García-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry* **84**, pp. 13-18.

Gazzani, G., Papetti, A., Massolini, G. and Daglia, M., 1998. Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 4118-4122.

Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A. and Scaccini, C., 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 361-367.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. and Ferro-Luzzi, A., 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, pp. 29-36.

Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. and Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, pp. 4581-4589.

González-Paramás, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S. and Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp. 234-238.

Giese J. 1996. Antioxidants: tools for preventing lipidoxidation. *Food Technology* **50**, pp. 73-80.

Guillén, D.A., Merello, F., Barroso, C.G. and Pérez-Bustamante, J.A., 1997. Solid-Phase Extraction for Sample Preparation, in the HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in "Fino" Sherry Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, pp. 403-406.

Goering, H.K., Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, procedures and some applications). *Agriculture Handbook*. 379. USDA. Agricultural Research Service, pp. 5-11.

Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P. and Drilleau, J.F. 1998. Reversed-phase HPLC following Thiolyis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. *Kermerrien*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp.1698-1705.

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W. and Riechel, T.L., 1998. High molecular weight plant polyphenolics (*tannins*) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 1887-1892.

- Hakkinen, S., Heinonen, M., Karenlampi, S., Mykkanen H., Ruuskanen, J. and Torroenen, R., 1999. Screening of selected Flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* **32**, pp.345-353.
- Hall, C.A. and Cuppett, S.L., 1997 in *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro* edited by Okeizie Auroma and Susan Cuppett AOCS press, pp.141-168.
- Halliwell B. and Gutteridge JC., 1989. Lipid peroxidation: a chain reaction. *Free Radical Biology and Medicine* pp.188-276.
- Halliwell B. and Gutteridge JC., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, pp. 125-126.
- Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S., and Aruoma O.I., 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **35**, pp. 7-20.
- Hamada, J.S., 1997. Large-scale high-performance liquid chromatography of enzymes for food applications. *Journal of Chromatography A* **760**, pp. 81-87.
- Hamama, A.A. and Nawar, W.W., 1991. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, pp. 1063-1069.
- He, X., Lian, L., Lin, L. and Bernart M.W., 1997. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Journal of Chromatography A*, **791**, pp. 127-134.
- Heinonen, M., Meyer, A.S. and Frankel, E.N., 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density-lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 107-112.
- Helbig, D., Böhmb, V., Wagner, A., Schubert, R. and Jahreis, G., 2008. Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues. *Food Chemistry* **111**, pp.1043-1049.
- Herodez, S.S., Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z., 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry* **80**, pp.275-282.
- Hodgson, J.M., Croft, K.D., Puddey, I.B., Mori, T.A. and Beilin, L.J., 1996. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *Nutritional Biochemistry* **7**, pp. 664-669.
- Holmes, A.B. and Chokyun, R., 1978. Structure and chemical composition of cranberry cell wall material. *Journal of Food Science* **43**, pp. 112-115.
- Hu, C., Cai, Y.Z., Li, W., Corke, H. and Kitts, D.D., 2007. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. *Hedong Wuma*) extract. *Food Chemistry* **104**, pp.955-961.
- Hudson, B.J. and Lewis, J.I., 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils: structural criteria for activity. *Food Chemistry* **10**, pp. 47-51.
- Hsu, B., Coupar I.M., Ng, K., 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry* **98**, pp.317-328.

Ikken, Y., Morales, P., Martinez, A., Marín, M.L., Haza, A.I. and Cambero, M.I., 1999. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the ames test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 3257-3264.

Illanes, A., 1999. Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology* **2**, pp. 9.

Ismail, A., Marjan, Z.M. and Foong C.W., 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* **87**, pp. 581-586.

Ito, A., Shamon, L.A., Yu, B., Mata-Greenwood, E., Lee, S.K., van Breemen, R.B., Mehta, R.G., Farnsworth, N.R., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M. and Kinghorn, A.D., 1998. Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 3509-3516.

Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M. and Ogiso, T., 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* **70**, pp. 343-349.

Ito N., Fukushima S., Tamano S., Hirose M. and Hagiwara A., 1986. Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* **77**, pp. 1261-1265.

Jang, H.D., Chang, K.S., Huang, Y.S., Hsu, C.L. and Lee, S.H., 2007. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry* **103**, pp. 749-756.

Jayaprakasha, G.K., Singh R.P. and Sakariah, K.K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* **73**, pp. 285-290.

Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R. and Lee, S.C., 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp. 3389-3393.

Jialal, I. and Devaraj, S., 1997. *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro* edited by Okezie Auroma and Susan Cuppett AOCS press, pp.85-94.

Jonfia-Essien, W.A., West, G., Alderson, P.G. and Tucker, G., 2008. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry* **108**, pp.1155-1159.

Julkunen-Tiito, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, pp. 213-217.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 3954-3962.

Kalt, W., Fomey, C.F., Martin, A. and Prior, R.L., 1999. Antioxidant capacity, vitamin C. Phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 4638-4644.

Kanatt, S. R., Chander, R., Radhakrishna, P., Sharma, A., 2005. Potato peel extract: a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, pp. 1499-1504.

Kapasakalidis, P.G. Rastall, R.A. and Gordon, M.H., 2009. Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum L.*) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, pp. 4342-4351.

- Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I., Boban, M., 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry* **86**, pp 593-600.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. and Jukic, M., 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* **94**, pp. 550-557.
- Kawaree, R., Okonogi, S., Chowwanapoonpohn, S. and Phutdhawong, W., 2008. Chemical composition and antioxidant evaluation of volatile oils from Thai medicinal plants. *Acta Horticulturae* **786**, pp. 209-215.
- Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Kim, S.L., Park, Y.J., Ro, H.M., Chung, I.M., 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 7265-7270.
- Kim, Y.J., Kim, D.O., Chun, O.K., Shin, D.H., Jung, H., Lee, C.Y. and Wilson, D.B., 2005. Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *thermobifida fusca*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, pp. 9560-9565.
- Kirk, O., Vedel-Borchert, T. and Crone-Fuglsang, C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, pp. 345-351.
- Koca, I., Ustun, N.S., Koca, A.F. and Karadeniz, B., 2008. Chemical composition, antioxidant activity and anthocyanin profiles of purple mulberry (*Morus rubra*) fruits. *Journal of Food Agriculture and Environment* **6**, pp. 39-42.
- Koponen, J.M., Happonen, A.M., Auriola, S., Kontkanen, H., Buchert, J., Poutanen, K.S. and Törrönen A.R., 2008. Characterization and fate of black currant and bilberry flavonols in enzyme-aided processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 3136-3144.
- Kosar, M., Göger, F. and Baser, H.K.C., 2008. *In Vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *salvia virgata* jacq. From Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 2369-2374.
- Kulisic, T., Dragovic-Uzelac, V. and Milos, M., 2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme *Food Technology and Biotechnology* **44**, pp. 485-492.
- Labuckas, D.O., Maestri, D.M. Perelló, M., Martínez, M.L. and Lamarque, A.L. 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry* **107**, pp.607-612.
- Landbo, A.K. and Meyer, A. S., 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from blackcurrant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp. 3169-3177
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R. and Kranner, J., 1999. pH-Dependent forms of red-wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 67-70.
- Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A.G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**, pp. 214-222.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P. and Saura-Calixto, F., 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, pp. 1390-1393.

Larrauri, J.A., Sánchez-Moreno, C. and Saura-Calixto, F., 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 2694-2697.

Larrosa, M., Llorach, R., Espin J. C. and Tomás-Barberán F. A., 2002. Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **35**, pp. 532-542.

Lee, S., Kim, J.H., Jeong, S.M., Kim, D.R., Ha, J.U., Nam, K.C. and Ahn, D.U., 2003. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity rice hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 4400-4403.

Lee, J. and Wrolstad, R.E., 2004. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Food Chemistry and Toxicology* **69**, pp. 564-562.

Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A. and Valcárcel, M., 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta* **46**, pp.1123-1130.

Lehtinen, P. and Laakso, S., 1998. Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 4842-4845.

Lemanska, K. Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R. Soffers, A.M. and Rietjens, I., 2001. The influence of pH on antioxidant properties and themechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine* **31**, pp. 869-881.

Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Ciz, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. and Trakhtenberg, S., 2003. Apple and Pear Peel and Pulp and Their Influence on Plasma Lipids and Antioxidant Potentials in Rats Fed Cholesterol-Containing Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 5780-5785.

Li, B.B., Smith, B. Hossain, Md.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology* **48**, pp. 182-188.

Li, B.B., Smith, B. Hossain, Md.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology* **48**, pp. 189-196

Limiroli, R., Consonni, R., Ranalli, A., Bianchi, G. and Zetta, L., 1996. H NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, pp. 2040-2048.

Lin, J.K., Lin, C.H., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y. and Juan, I.M., 1998. Survey of catechins, gallic acid, and methylxantines in green, oolong, pu-erh and black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 3635-3642.

Llobera, A. and Cañellas, J. 2007. Dietary fibre content and antioxidant activity of manto negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* **101**, pp.659-666.

Llorach, R., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. and Ferreres, F., 2002. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 3458-3464.

Llorach R., Espin, J.C., Tomas-Barberan F.A. and Ferreres, F., 2003. Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 2181-2187.

Llorach R., Tomas-Barberan, F.A. and Ferreres, F., 2004. Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp. 5109-5116.

Loo, A.Y., Jain, K. and Darah, I., 2007. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry* **104**, pp. 300-307.

Lu, Y. and Foo, L.Y., 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry* **68**, pp. 81-85.

Madsen, H.L. and Bertelsen, G., 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology* **6**, pp. 271-277.

Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D., Schieber, A. and Carle, R., 2008. Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *European Food Research and Technology* **227**, pp.267-275.

Maillard, M.N. and Berset, C., 1995. Evolution of antioxidant activity during kilning, role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, pp. 1789-1793.

Maisot, P., Thibault, J.F. and Rouau, X., 1989. Degradation of carrot (*Daucus carota*) fibres with cell wall polysaccharide- degrading enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **49**, pp. 45-57.

Maisuthisakul, P., Pasuk, S. and Ritthiruangdej, P., 2008. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**, pp. 229-240.

Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R. and Gordon, M.H., 2006. Antioxidant properties of teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer) extract in soybean oil and emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, pp. 2719-2725.

Mansfield, S.D., Mooney, C. and Saddler, J.N., 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress* **15**, pp. 804-816.

Manach, C., Scalbert, A., Rémésy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**, pp. 727-747.

Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society* **45**, pp. 594-598.

Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V.I., 1996. Antioxidative activity of phenolic acids on triacylglycerols and fatty acid methyl esters from olive oil. *Food Chemistry* **56**, pp. 139-145.

Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V.I., 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. *Food Chemistry* **58**, pp. 245-248.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras J.M. and Muñón, M.J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. **17**, pp. 271-278.

Mata, A. T., Proence, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F. and Araujo, M.E.M., 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* **103**, pp. 778-786.

Matthäus, B., 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 3444-3452.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B. and Ewert, B., 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of cabernet franc, merlot, and pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 4009-4017.

McDonald, S. Prenzler, P.D., Antolovich M. and Robards K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* **73**, pp. 73-84.

Merken, H. and Beecher, G., 2000. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A* **897**, pp.177-184.

Meyer, A.S., Heinonen, M. and Frankel, E.N., 1998a. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry* **61**, pp. 71-75.

Meyer, A.S., Jepsen, S.M. and Sorensen, N.S., 1998b. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 2439-2446.

Micard, V., Renard C.M.G.C. and Thibault, J.F., 1994. Studies on enzymic release of ferulic acid from sugar-beet pulp. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie* **27**, pp. 59-66.

Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A. and Kanter, M., 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition* **19**, 312S-319S.

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V. and Milner A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **84**, pp. 407-412.

Miller N.J. and Rice-Evans C.A., 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research* **26**, pp. 195-199.

Miyake, Y., Murakami, A., Sugiyama, Y., Isobe, M., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., 1999. Identification of coumarins from lemon fruit (*Citrus limon*) as inhibitors of *in vitro* tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 3151-3157.

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **26**, pp. 211-219.

Moon J.K. and Shibamoto, T., 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, pp. 1655-1666.

Moreno-Álvarez, M.J, Guarán, C.Y., Belén, D.R, García-Pantaleón, D. and Medina, C.A., 2007. Efecto de los extractos de flavonoides de harinas de cáscaras y semillas de pomelos sobre la estabilidad de aceite de soja. *Grasas y Aceites* **58**, pp.351-358.

Morimoto, K., Tsuji, K., Ito, T., Miyata, N., Uchida, A., Osawa, R., Kitusaka, H. and Takahashi, A., 1991. DNA damage in forestomach epithelium from male F344 rats following oral administration of tert-butylquinone, one of the forestomach metabolites of 3-BHA. *Carcinogenesis* **12**, pp. 703-708.

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Lema, J.M., 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**, pp. 3890-3897.

- Moure, A., Cruz, M.J., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Núñez M.J. and Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* **72**, pp. 145-171.
- Murakami, M., Yamaguchi T., Takamura, H. and Matoba, T. 2004. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Food Science* **69**, pp. 41-44.
- Murthy, K.N.C., Singh, R.P. and Jayaprakasha, G.K., 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 5909-5914.
- Naidu, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery?: an overview. *Nutrition Journal* **2**, pp. 7-16.
- Nawirska, A., and Kwasińska, M., 2005. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry* **91**, pp. 221-225.
- Nychas, G.J.E., 1995. Natural antimicrobials from plants. In new methods of food preservation. GW Gould (ed.). Blackie Academic and Profesional. Glasgow. pp. 58-89.
- Nogueira, W.A., Nogueira, F.N. and Devens, D.C. 1999. Temperature and pH control in composting of coffee and agricultural wastes. *Water Science and Technology* **40**, pp. 113-119.
- Noguchi, Y., Fukuda, K., Matsushima, A., Haishi, D., Hiroto, M., Kodera, Y., Nishimura, H. and Inada, Y., 1999. Inhibition of Df-protease associated with allergic diseases by polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 2969-2972.
- Olsen P., Meyer, O., Bille, N. and Würtzen, G. 1986. Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed in utero. *Food and Chemical Toxicology* **24**, pp. 1-12.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-Garcia, J.M., López-Roca, J.M., and Gómez-Plaza, E., 2006. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta* **563**, pp.26-32.
- Ortuño, A., García-Puig, D., Fuster, M.D., Pérez, M.L., Sabater, F., Porras, I., García-Lidon, A., Del Rio, J.A., 1995. Flavanone and nortkaton levels in different varieties of grapefruit and pummelo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, pp. 1-5.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R.L., 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**, pp. 4619-4626.
- Paiva-Martins F. and Gordon M. H., 2002. Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive polyphenols in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society* **79**, pp. 571-576.
- Palma, M., Piñeiro, Z. and Barroso, C.G., 2001. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *Journal of Chromatography A* **921**, pp.169-174.
- Palma, M. and Taylor, L.T., 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* **849**, pp. 117-124.
- Pardo, F., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Navarro, G., Huerta, M.D., 1999. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry* **67**, pp. 135-142.

- Park, S. and Zhao, Y., 2006. Development and characterization of cranberry pomace extract-based edible films. *Journal of Food Science* **71**, pp. E95-E96.
- Pekic, B., Kovac, V., Alonso, E. and Revilla, E., 1998. Study of the Extraction of. Proanthocyanidins from Grape Seeds. *Food Chemistry* **61**, pp. 201-206.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M. and Brighenti, F., 2006. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition and Food Research* **50**, pp.1030-1038.
- Peters M.M., Rivera M.I., Jones T.W., Monks T.J. and Lau S. S., 1996. Glutathione conjugates of tert-butyl-hydroquinone, a metabolite of the urinary tract tumor promoter 3-tert-butyl-hydroxyanisole, are toxic to kidney and bladder. *Cancer Research* **56**, pp.1006-1011.
- Pietta, P., Simonetti, P. and Mauri, P., 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 4487-4490.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. and Núñez, M.J., 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* **85**, pp. 267-273.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. and Núñez, M.J., 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, pp. 2111-2117.
- Pinelo, M., Tress A. G., Pedersen M., Arnous A. and Meyer A. S., 2007. Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. *American Journal of Food Technology* **2**, pp. 641-651.
- Pinelo, M., Zornoza, B. and Meyer A. S., 2008. Selective release of phenols from apple skin: mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Separation and Purification Technology* **63**, pp. 620-627.
- Poutaten, K., 1997. Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends in Food Science and Technology* **81**, pp. 300-306.
- Prior, R.L. and Cao, G., 1999. *In vivo* antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, pp. 1173-1181.
- Pryzbylski, R., Lee, Y.C. and Eskin, N.A.M., 1998. Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**, pp. 1595-1601.
- Puupponen-pimiä, R., Nohynek, L., Ammann, S. Oksman-Caldentey, K.M. and Buchert, J., 2008. Enzyme-Assisted Processing Increases Antimicrobial and Antioxidant Activity of Bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 681-688.
- Qasem, A. and Al-Ismaïl, K., 2004. Antioxidant activity of alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds in two vegetable oils and two animal fats. *Grasas y Aceites* **55**, pp.345-353.
- Qiang, X. Yong-Lie Ch. and Wan Qian-Bing' W., 2009. Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* **77**, pp.435-441.

Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S. and Horax, R., 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp.5183-5186.

Ramalho, V.C. and Neuza, J., 2008. Antioxidant action of rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas y Aceites* **59**, pp.128-131.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. and Kawakishi, S., 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology* **6**, pp. 75-82.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T. Pihlaja, K. Heikki Vuorela, H. and Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* **56**, pp.3-12.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, pp. 1231-1237.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* **22**, pp. 375-383.

Rice-Evans, C.A. and Miller, N.J., 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* **234**, pp. 279-293.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radicals in Biology and Medicine* **20**, pp. 933-956.

Rice-Evans, C.A., Miller N.J and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radicals in Biology and Medicine* **20**, pp. 933-956.

Rivero-Perez, M.D., Gonzalez-Sanjose, M.L., Ortega-Heras, M. and Muniz, P., 2008. Antioxidant potential of single-variety red wines aged in the barrel and in the bottle. *Food Chemistry* **111**, pp. 957-964.

Rocha-Guzman, N.E., Herzog, A., Gonzalez-Laredo, R.F., Ibarra-Pérez, F.J., Zambrano-Galvan, G. and Gallegos-Infante, J.A., 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry* **103**, pp. 521-527.

Rodis, P.S., Karathanos, V.T. and Mantzavinou, A., 2002. Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 596-601.

Robards, K. and Antolovich, M., 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *The Analyst* **122**, pp.11-34.

Robards, K., Prenzler, P.D, Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**, pp. 401-436.

Roberfroid, M.B. 2002. Global view on functional foods: european perspectives. *British Journal of Nutrition*, **88** , pp S133-S138.

Rodríguez de Sotillo, D., Hadley, M. and Wolf-Hall, C., 1998. Potato peel extract a nonmutagenic antioxidant with potential antimicrobial activity. *Journal of Food Science* **63**, pp. 907-910.

- Roedig-Penman A. and Gordon M.H., 1998. Antioxidant Properties of Myricetin and Quercetin in Oil and Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society* **75**, pp. 169-181.
- Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* **92**, pp.235-254.
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, pp. 402-420.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Franco, D., Sineiro, J. and Núñez, M.J., 2003. Residuos Agroindustriales como fuente de antioxidantes. *Afinidad* **504**, pp.153-160.
- Ruenroengklin, N., Zhong, J. Duan, X., Yang, B., Li, J. and Jiang, Y., 2008. Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences* **9**, pp. 1333-1341.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Provost, C. and Vivas, N., 1999. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 425-431.
- Saito, S.T., Gosmann, G., Saffi, J., Presser, M., Richter, M.F. and Bergold, A.M., 2007. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *Assamica* IAC-259 cultivar) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, pp. 9409-9414.
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace, S.C., and Hideo Yamasaki H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **177**, pp. 67-80.
- Saleh, M.M., Hashem, F.A. and Glombitza, K.W., 1998. Study of citrus *taitensis* and radical scavenger activity of the flavonoids isolated. *Food Chemistry* **63**, pp. 397-400.
- Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-García, M.J. and Esqueda, M., 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 2537-2542.
- 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**, pp. 121-137.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**, pp. 270-276.
- Sánchez-Moreno C. and Larrauri J.A., 1998. Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Science and Technology International* **4**, pp. 391-399.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., 1999. Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, pp. 1301-1304.
- Sancho, P., Pinacho, P., Ramos, P. and Tejedor C., 2004. Microbiological characterization of food residues for animal feeding. *Waste Management* **24**, pp.919-926.

Santos-Buelga, C. and Scalbert, A., 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**, pp. 1094-1117.

Sáyago-Ayerdi, S.G., Arranz, S., Serrano, J. and Goñi, I., 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal. Agriculture. Food Chemistry*. **55**, pp. 7886-7890.

Schieber, A., Stintzing, F.C. and Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. *Trends in Food Science and Technology* **12**, pp. 401-413.

Schaub, S.M. and Leonard J.J., 1996. Composting: An alternative waste mangment option for food processing industries. *Trends in Food Science and Technology* **7**, pp. 263-268.

Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H. and Tijburg, L., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology* **212**, pp. 319-328.

Serafini, M., Ghiselli, A. and Ferro-Luzzi, A., 1996. *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* **50**, pp. 28-32.

Serafini, M., Maiani, G. and Ferro-Luzzi, A., 1997. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, pp. 3148-3151.

Seeram, N.P., 2008. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 630-635.

Shabtai, Y., Gotshal, N., Ramot, O. and Wisniak, J., 1998. Enzymatic pretreatment of jojoba seeds to facilitate oil extraction. *Indian Journal of Chemical Technology* **5**, pp. 124-130.

Shahidi, F., Janitha, P.K. and Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32**, pp. 67-103.

Shankar, D., Agrawal, Y.C., Sarkar, B.C. and Singh, B.P.N., 1997. Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for enhanced oil availability and recovery. *Journal of the American Oil Chemists Society* **74**, pp. 1543-1547.

Sudha, M. L., Baskaran, V., & Leelavathi, K., 2006. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*

Shui, G. and Leong, L.P., 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry* **97**, pp. 277-284.

Simonetti, P., Pietta, P. and Testolin, G., 1997. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected italian wines. **45**, pp. 1152-1155.

Singh, N. and Rajini P.S., 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry* **85**, pp. 611-616.

Singh, R.P., Murthy, K.N.C and Jayaprakasha, G.K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, pp. 81-86.

- Singleton, V. and Rossi, J., 1965. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, pp.144-148.
- Slimestad, R. and Verheul, M.J., 2005. Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, pp. 3114-3119.
- Soong, Y.Y. and Barlow, P.J., 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* **88**, pp. 411-417.
- Soto, C., Concha, J. Zuniga, M.E., 2008. Antioxidant content of oil and defatted meal obtained from borage seeds by an enzymatic-aided cold pressing process. *Process Biochemistry* **43**, pp.696-699.
- Sparr-Eskilsson, C. and Bjorklund, E., 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **902**, pp. 227-250.
- Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* **81**, pp. 200-208.
- Stadler, R.H. and Guillot, F.L., 1997 *In antioxidant methodology in vivo and in vitro* edited by Okezie Auroma and Susan Cuppett AOCS press, pp.101-113.
- Stahl, W. and Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, pp. 345-351.
- Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Duan, X. and Chen, F., 2007. Polyphenolic profile and antioxidant activities of oolong tea infusion under various steeping conditions. *International Journal of Molecular Sciences* **8**, pp. 1196-1205.
- Suarez, B., Picinelli, A. and Mangas, J.J., 1996. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders. *Journal of Chromatography A* **727**, pp. 203-209.
- Sultana, B., Anwar, F., Asi, M.R. and Chatha, S.A.S., 2008. Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: stabilization of corn oil. *Grasas y Aceites* **59**, pp. 205-217.
- Sun, T., Powers, J.R. and Tand, J., 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry* **105**, pp. 101-106.
- Sun, T. Tang, J. and Powers, J.R., 2005. Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, pp. 42-48.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H. and Sun, M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* **102**, pp. 938-953.
- Tachakittirungrod, S., Okonogi, S. and Chowwanapoonpohn, S., 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry* **103**, pp. 381-388.
- Takeoka, G.R. and Dao, L.T., 2003. antioxidant constituents of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 496-501.
- Tanaka, N., Nishikawa, K. and Ishimaru, K., 2003. Antioxidative capacity of extracts and constituents in *Cornus capitata* adventitious roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 5906-5910.

- Tapiero, H., Townsend, D.M. and Tew, K.D., 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **58**, pp. 100-110.
- Tena, M. T., Ríos, A. and Valcárcel, M., 1998. Supercritical fluid extraction of t-resveratrol and other phenolics from a spiked solid. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **361**, pp.143-148.
- Thaipong, K., Boonprakob, U. and Crosby, K., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**, pp. 669-675.
- Thiyam, U., Kuhlmann, A., Stöckmann H. and Schwarz K., 2004. Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential. *Comptes Rendus Chimie* **7**, pp.611-616.
- Tobar, P., Moure, A., Soto, C. Chamy, R. Zúñiga, M.E., 2005. Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an Enzyme Assisted Process. *Journal Water Science and Technology* **51**, 47-52.
- Theander, O., Aman, P., Westerlund., E., Andersson, R., Pettersson, D., 1995. Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and klason lignin (The uppsala method): collaborative study. *Journal of AOAC International*. **78**, pp. 1030-1044.
- Treibold, H.O. and Aurand, L.W., 1963. *Food composition and analysis*. pp. 338-339. D.van Nostrand Company Inc. New York.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Yamamoto, A., Kawakishi, S. and Osawa, T., 1994. Antioxidative components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, pp. 2671-2674.
- Tura, D. and Robards. K., 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A* **975**, pp. 71-93.
- Ulloa, J.B., van Weerd, J.H., Huisman E.A., and Verreth, J.A., 2004. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. *Waste Management* **24**, pp. 87-97.
- Valenzuela, A. and Nieto, S., 1996. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites* **47**, pp. 186-196.
- van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager A. and Jongen, W.M.F., 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp. 3606-3613.
- Vattem, D.A. and Shetty K., 2002. Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnology* **16**, pp. 189-210.
- Velioglu, Y.S., Mazza G., Gao L. and Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 4113-4117.
- Venneria, E., Fanasca, S., Monastra, G., Finotti, E., Ambra, R., Azzini, E., Durazzo, A., Foddai, M.S. and Maiani, G. 2008. Assessment of the nutritional values of genetically modified wheat, corn, and tomato crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, pp. 9206-9214.
- Versari, A., Biesenbruch, S., Barbanti, D. Farnell, P.J. and Galassi, S. 1997. Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices. *Food Research International* **30**, pp.811-817.

- Vinson, J.A, Hao, Y., Su, X. and Zubik, L., 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in food, vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, pp. 3630-3634.
- Vinson, J.A, Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J. and Bose, P., 2003. Antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 5528-5533.
- Von Gadow, A., Joubert, E. and Hansmann, C.F., 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, pp. 632-638.
- Van Soest, P.J. y Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *Journal of the A.O.A.C. International* **51**, pp 770-785.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**, pp. 3583-3597.
- Voragen, A.G.J. and Pilnik, W., 1989. Pectin-Degading enzymes in fruit and vegetables processing. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* **389**, pp. 93-115.
- Wanasundara, U.N. and Shahidi, F., 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry* **63**, pp. 335-342.
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, pp. 701-705.
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L., 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, pp. 304-309.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Booren, A.M. and Gray J.I., 1999. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 840-844.
- Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z. and Jiang, Y.M., 2007. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry* **101**, pp. 1658-1663.
- Wang S.Y. and Lin H.S., 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 140-146.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U. and Locke, S.J., 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters* **187**, pp. 33-37.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R.C. and Locke, S.J., 1987. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* **924**, pp. 408-419.
- Weinberg, Z.G., Akiri, B., Potoyevski, E. and Kanner, J., 1999. Enhancement of polyphenol recovery from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 2959-2962.
- Wettasinghe M. and Shahidi F., 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chemistry* **67**, pp. 399-414.

- Wettasinghe, M. and Shahidi, F., 1999. Evening primrose meal, a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 180-1812.
- Wolfe, K., Wu, X. and Liu, R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, pp. 609-614.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. V., Gebhardt, S. E., Prior, R. L., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp.4026-4037.
- Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. and Ariga, T., 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, pp. 2544-2548.
- Yen, G.C. and Duh, P.D., 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, pp. 629-632.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. and Peng, H.H., 1997. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, pp. 30-34.
- Yen, G.C. and Wu, J.Y., 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* **65**, pp. 375-379.
- Yi, O.S., Han, D. and Shin, H.K., 1991. Synergistic antioxidative affects of tocopherol and ascorbic acid in fish oil/lecithin/water system. *Journal of the American Oil Chemists Society* **68**, pp. 881-883.
- Yilmaz, Y. and Toledo, R. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, pp. 255-260.
- Young, A. J. and Lowe, G.M., 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**, pp. 20-27.
- Yu, J., Ahmedna M. and Goktepe, I., 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry* **90**, pp.199-206.
- Yu, R., Mandlekar, S. and Kong, A., 2000. Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular Pharmacology* **58**, pp. 431-437.
- Zabala, D., Echavarría, B. and Martínez, A. 2008 Actividad inhibitoria sobre la enzima dihidrofolato reductasa de extractos de esponjas marinas del golfo de Urabá. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* **15**, pp. 285-289.
- Zandi, P. and Gordon, M.H., 1999. Antioxidant activity of extracts from old tea leaves. *Food Chemistry* **64**, pp. 285-288.
- Zhang, C.X., Wu, H. and Weng, X.C., 2004. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. *Food Chemistry* **84**, pp. 219-222.
- Zhang, Z.Q., Pang, X.Q., Yang, C., Ji, Z.L., Jiang, Y.M., 2001. Role of anthocyanins degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry* **75**, pp. 217-221.
- Zhao, Q., Bowles, E.J. and Zhang, H.Y., 2008. Antioxidant activities of eleven Australian essential oils. *Natural Product Communications* **3**, pp. 837-842.

Zheng, W. and Wang S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp. 5165-5170.

Zhou, S., Fang, Z., Lü, Y., Chen, J., Liu, D. and Ye, X. 2009. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra Sieb. et Zucc.*) pomace. *Food Chemistry* **112**, pp. 394-399.

Zia-ur-Rehman, 2006. Citrus peel extract- a natural source of antioxidant. *Food Chemistry* **99**, pp. 450-454.

Zielinski, H. and Kozłowska H., 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, pp. 2008-2016.

Zuñiga, M.E., Soto, C., Mora, A., Chamy, R. and Lema, J.M., 2003. Enzymic pre-treatment of guevina avellana mol oil extraction pressing. *Process Biochemistry* **39**, pp.51-57.

Anexo I

**PRESENTACIONES A CONGRESOS Y
PUBLICACIONES**

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Laroze, L. Soto, C. y Zúñiga, M.E. Aplicación de Enzimas en la Extracción de Antioxidantes Fenólicos desde una Selección de Residuos Agroindustriales. XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites ASAGA 2005 Buenos Aires, Argentina.
- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Phenolic antioxidant extraction from selected agroindustrial residual sources. XIII Congreso Europeo de Biotecnología 2007 Barcelona, España.
- Laroze, L. y Zúñiga M.E. VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria- REDBIO 2007, Viña del Mar, Chile.
- Laroze, L., Moure A., Domínguez, H., Parajó, J.C. and. Zúñiga, M.E. Extraction of Phenolic antioxidants from berries By-Products. XXIV International Conference on Polyphenols 2008, Salamanca, España.
- Soto, C., Laroze, L. y Zúñiga, M.E. "Contenido de antioxidantes fenólicos en jugos naturales" IV Congreso Panamericano Promoción del consumo de verduras y frutas 2008, Santiago, Chile.
- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Effect of ethanol concentration on enzymatically assisted phenolic antioxidant extraction from raspberry wastes. IVX Congreso Europeo de Biotecnología 2009 Barcelona, España.
- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Temperature effect on phenolic antioxidant extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. IVX Congreso Europeo de Biotecnología 2009 Barcelona, España.
- Laroze, L. and Zúñiga, Extraction of phenolic antioxidants from berry processing by products. World Congress on Oils and Fats & 28th ISF Congress 2009 Sydney, Australia.
- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Effect of enzyme concentration on phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes. VII EuroFed Lipid Congress 2009 Graz, Austria.
- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Extracción acuosa enzimáticamente asistida de antioxidantes fenólicos desde residuos de frambuesa. IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2009 San José, Costa Rica.
- Concha, J., Laroze, L. Soto, C. and Zúñiga, M.E. Residuos de la agroindustria y su potencial uso en la recuperación de bioactivos. IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2009 San José, Costa Rica.
- Laroze, L. Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M.E., Domínguez, H. Supercritical CO_2 extraction of antioxidants from berries 2010 II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Natal, Brazil.

- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Phenolic antioxidant extraction from raspberry solid wastes assisted by enzymes 15th IUFOST Congress scheduled for 2010 Cape Town, South Africa.
- Laroze, L. and Zúñiga, M.E. Effect of enzyme concentration on hydroethanolic extraction of phenolic antioxidants from raspberry residues 14th International Biotechnology Symposium 2010 Rimini, Italy.

PUBLICACIONES

- Laroze L. and Zúñiga, M.E., 2007. Phenolic antioxidant extraction from selected agroindustrial residual sources. *Journal of Biotechnology*, **131 (2)**, pp. S193-S194.
- Laroze L., Zúñiga, M.E. and Soto,C., 2008. Raspberry phenolic antioxidants extraction. *Journal of Biotechnology*, **136 (S)**, pp. S728-S729.
- Zúñiga, M.E. and Laroze, L., 2009. Effect of ethanol concentration on enzymatically assisted phenolic antioxidant extraction from raspberry wastes *New Biotechnology*, **25 (S)**, pp.147-148.
- Zúñiga, M.E. and Laroze, L., 2009. Temperature effect on phenolic antioxidant extraction from raspberry wastes assisted by enzymes *New Biotechnology*, **25 (S)**, pp.170.
- Laroze, L. Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M.E., Domínguez, H., 2010. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents". Accepted for publication in the *European Food Research and Technology*.
- Laroze, L., Soto, C. and Zúñiga, M.E., 2010. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. Accepted for publication in the *Electronic Journal of Biotechnology*

Anexo II

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO, LA
TEMPERATURA Y LA RAZON SOLVENTE/RESIDUO EN
LA EXTRACCION DE ANTIOXIDANTES FENOLICOS
DESDE RESIDUOS DE ARANDANO AZUL, ARANDANO
ROJO Y FRAMBUESA**

Tabla II.1 Rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de arándano azul

Experiencia (t, T, R/S)	Sólidos solubles (g extracto/100g muestra)				Fenoles totales (mg de ácido gálico/g muestra)				DPPH (mmoles trolox/100g muestra)				MEOH:		AE		
	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	H ₂ O	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	H ₂ O	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v
1 (-,-,-)	2,49 ±0,13	2,80 ±0,20	5,04 ±0,07	5,21 ±0,30	1,81 ±0,08	1,81 ±0,08	10,26 ±0,05	7,97 ±0,22	9,700 ±0,37	0,22 ±0,00	0,35 ±0,02	2,53 ±0,15	0,26 ±0,00	4,60 ±0,06	2,53 ±0,15	3,21 ±0,16	0,08 ±0,00
2 (+,-,-)	3,62 ±0,08	3,50 ±0,08	4,77 ±0,14	5,49 ±0,11	1,14 ±0,08	4,23 ±0,02	10,30 ±0,19	11,36 ±1,37	4,38 ±0,06	0,75 ±0,03	1,16 ±0,07	3,60 ±0,01	0,21 ±0,00	4,45 ±0,16	3,60 ±0,01	3,86 ±0,17	0,18 ±0,01
3 (-,+,-)	3,43 ±0,08	3,32 ±0,11	5,51 ±0,04	5,87 ±0,13	2,64 ±0,05	3,45 ±0,01	12,38 ±0,05	10,06 ±0,25	13,12 ±0,27	0,72 ±0,02	0,95 ±0,00	2,84 ±0,08	0,36 ±0,01	6,84 ±0,08	2,84 ±0,08	3,37 ±0,04	0,16 ±0,01
4 (+,+,-)	4,69 ±0,039	4,58 ±0,005	5,07 ±0,04	5,30 ±0,19	1,82 ±0,05	7,57 ±0,15	12,59 ±0,48	14,74 ±0,36	5,32 ±0,59	1,03 ±0,04	1,98 ±0,02	3,69 ±0,36	0,25 ±0,01	4,53 ±0,11	3,69 ±0,36	4,00 ±0,05	0,20 ±0,01
5 (-,-,+)	2,87 ±0,08	2,76 ±0,08	5,79 ±0,02	6,22 ±0,14	2,49 ±0,21	1,92 ±0,01	13,27 ±0,00	8,55 ±0,08	11,96 ±0,08	0,23 ±0,01	0,42 ±0,02	2,73 ±0,06	0,46 ±0,03	6,40 ±0,02	2,73 ±0,06	4,54 ±0,04	0,08 ±0,03
6 (+,-,+)	4,50 ±0,08	3,82 ±0,08	5,68 ±0,08	6,24 ±0,14	1,40 ±0,01	5,99 ±0,33	13,15 ±0,13	12,68 ±0,42	5,53 ±0,12	0,86 ±0,01	0,78 ±0,01	4,54 ±0,12	0,36 ±0,01	11,73 ±0,63	4,54 ±0,12	3,86 ±0,00	0,17 ±0,00
7 (-,+,+)	4,11 ±0,09	3,89 ±0,09	7,02 ±0,12	6,60 ±0,13	4,27 ±0,03	4,06 ±0,29	16,63 ±0,02	11,73 ±0,03	17,29 ±0,12	0,77 ±0,06	0,80 ±0,01	4,19 ±0,03	0,71 ±0,01	8,14 ±0,19	4,19 ±0,03	8,56 ±0,12	0,14 ±0,02
8 (+,+,+)	6,08 ±0,06	5,28 ±0,16	7,30 ±0,13	7,19 ±0,23	2,52 ±0,11	8,14 ±0,32	16,49± 0,57	19,14 ±1,51	7,82 ±0,48	1,16 ±0,05	2,22 ±0,08	8,58 ±0,74	0,50 ±0,01	8,12 ±0,58	8,58 ±0,74	6,25 ±0,06	0,21 ±0,01
9 (0,0,0)	5,25 ±0,18	4,96 ±0,34	6,31 ±0,44	6,23 ±0,26	3,33 ±0,11	4,60 ±0,13	12,60± 0,18	12,87 ±0,16	13,41 ±0,19	0,53 ±0,01	1,68 ±0,01	4,24 ±0,12	0,49 ±0,01	6,58 ±0,57	4,24 ±0,12	3,96 ±0,04	0,11 ±0,02
10 (0,0,0)	4,99 ±0,16	4,74 ±0,34	6,49 ±0,09	6,35 ±0,00	3,25 ±0,01	4,34 ±0,02	14,13 ±0,06	13,10 ±0,05	13,45 ±0,01	0,66 ±0,01	1,06 ±0,03	4,38 ±0,11	0,47 ±0,01	5,64 ±0,17	4,38 ±0,11	4,08 ±0,02	0,13 ±0,00
11 (0,0,0)	5,03 ±0,16	4,80 ±0,17	5,99 ±0,08	6,41 ±0,25	3,45 ±0,05	5,27 ±0,08	12,80 ±0,05	13,51 ±0,02	12,71 ±0,20	0,63 ±0,07	1,25 ±0,01	4,64 ±0,27	0,49 ±0,01	5,67 ±0,30	4,64 ±0,27	4,05 ±0,00	0,14 ±0,00
12 (0,0,0)	4,82 ±0,13	4,92 ±0,23	6,27 ±0,13	6,51 ±0,04	3,36 ±0,08	5,16 ±0,09	13,23 ±0,44	13,98 ±0,25	10,93 ±0,08	0,58 ±0,03	1,18 ±0,04	4,52 ±0,30	0,45 ±0,02	6,29 ±0,45	4,52 ±0,30	3,42 ±0,10	0,13 ±0,02

Los residuos de arándano azul en agua presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (6,1 g extracto/100 g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (2,5 g extracto/100 g muestra). Con respecto al contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo y al menor tiempo de extracción (4,3 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de temperatura y razón residuo solvente y al máximo tiempo evaluado se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (1,1 mg ácido gálico/ g muestra). En relación a la actividad antioxidante, se observa el mismo comportamiento anteriormente descrito para el contenido de compuestos fenólicos totales, a valores altos temperatura y razón solvente/residuo y al menor tiempo de extracción, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (0,7 mmol trolox/100 g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el valor de tiempo de extracción es alto (0,2 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano azul en etanol presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (5,3 g extracto/100 g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (2,7 g extracto/100 g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (8,1 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (1,8 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (2,2 mmol trolox/100 g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de estos tres parámetros son bajos (0,3 mmol trolox/100 g muestra).

Los residuos de arándano azul en la mezcla hidroetanólica presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (7,3 g extracto/100g muestra), mientras que a valores bajos de temperatura y razón residuo solvente para tiempos de extracción largos se obtiene el mínimo de extraíbles (4,8 g extracto/100g muestra). En el caso del contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (16,6 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros principales se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (10,3 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, y razón solvente/residuo para la menor temperatura de extracción, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (11,7 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el tiempo de extracción es alto (4,4 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano azul en metanol presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (7,2 g extracto/100 g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (5,2 g extracto/100 g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (19,1 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (8,0 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (8,6 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de estos tres parámetros son bajos (2,5 mmol trolox/100 g muestra).

Los residuos de arándano azul en metanol:agua presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (5,8 g extracto/100 g muestra), mientras que a valores altos de temperatura y tiempo de extracción y para la menor razón solvente/residuo se obtiene el mínimo de extraíbles (2,3 g extracto/100 g muestra). En el caso de los compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (17,3 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción largos se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (4,4 mg ácido gálico/ g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos cortos de extracción se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (8,6 mmol trolox/100 g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de los tres parámetros principales son bajos (3,2 mmol trolox/100 g muestra).

Los residuos de arándano azul en acetato de etilo presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (3,6 g extracto/100 g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (1,2 g extracto/100 g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (1,1 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de tiempo y temperatura y razón solvente/residuo se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (0,2 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (0,2 mmol trolox/100 g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de estos tres parámetros son bajos (0,07 mmol trolox/100 g muestra).

Tabla II.2: Modelos de superficie respuesta obtenidos para los rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de arándano azul

Agua	Sólidos solubles	$R=4,31+0,76t+0,59T+0,43S/R+0,07tT+0,14tS/R+0,11TS/R+0,10tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=2,64-0,60t+0,52T+0,44S/R-0,05tT-0,23tS/R+0,14TS/R-0,01tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=0,42-0,06t+0,07T+0,12S/R-0,02tT-0,02tS/R+0,04TS/R-0,03tTS/R$
Etanol	Sólidos solubles	$R=4,12+0,58t+0,56T+0,23S/R+0,12tT+0,06tS/R+0,13TS/R+0,00tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=4,71+1,84t+1,16T+0,38S/R+0,21tT+0,20tS/R-0,09TS/R-0,21tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=1,15+0,44t+0,42T-0,02S/R+0,17tT+0,00tS/R+0,04TS/R+0,10tTS/R$
Etanol/H ₂ O 50.50% v/v	Sólidos solubles	$R=5,89-0,08t+0,47T+0,66S/R+0,04tT+0,10tS/R+0,27TS/R+0,08tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=13,17+0,02t+1,53T+1,77S/R+0,163tT+0,04tS/R+0,43TS/R+0,12tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=6,58+0,36t+0,06T+1,75S/R-0,94tT+0,97tS/R-0,53TS/R-0,39tTS/R$
Metanol	Sólidos solubles	$R=6,12+0,04t+0,22T+0,55S/R-0,04tT+0,11tS/R+0,11TS/R+0,18tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=12,48+2,50t+1,89T+1,00S/R+0,57tT+0,43tS/R+0,52TS/R+0,25tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=4,22+0,984t+0,72T+0,90S/R+0,33tT+0,57tS/R+0,66TS/R+0,32tTS/R$
Metanol/H ₂ O 50.50% v/v	Sólidos solubles	$R=4,44-0,28t-0,30T+0,40S/R-0,87tT-0,05tS/R-0,02TS/R-0,23tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=10,29-3,67t+1,23T+1,47S/R-0,73tT-0,37tS/R+0,61TS/R-0,10tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=4,43-0,20t+0,84T+1,09S/R-0,21tT-0,53tS/R+0,76TS/R-0,20tTS/R$
Acetato de etilo	Sólidos solubles	$R=2,21+0,71t+0,36T+0,10S/R+0,21tT+0,12tS/R-0,03TS/R+0,02tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=0,68+0,23t+0,20T+0,04S/R-0,06tT+0,02tS/R+0,01TS/R+0,00tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=0,14+0,04t+0,03T-0,00S/R-0,01tT+0,00tS/R+0,00TS/R+0,00tTS/R$

La Tabla II.2 muestra que para la extracción acuosa de residuos de arándano azul, la recuperación de sólidos solubles se ve afectada por las tres variables principales, mientras que el contenido total de fenoles se ve negativamente influenciado por el tiempo de extracción y positivamente por la temperatura de extracción y la razón solvente/residuo. La razón solvente/residuo es el parámetro más importante en la capacidad antioxidante. En el caso de la extracción etanólica, tanto el rendimiento de recuperación de sólidos solubles como el contenido fenólico se ve afectado por las tres variables principales; para el método del DPPH, tiempo y temperatura de extracción influyen mayoritariamente la capacidad antirradicalaria de los extractos etanólicos. Tanto la razón solvente/residuo como la temperatura y la interacción entre ambas variables afectan el contenido de extractables de los extractos hidroetanólicos de residuos de arándano azul; las dos variables principales anteriormente mencionadas ejercen la mayor influencia en la recuperación de compuestos fenólicos y en el caso de la actividad antioxidante, la razón solvente/residuo es la variable de mayor relevancia, la interacción entre tiempo y temperatura provoca un efecto negativo en la capacidad de captación de radicales libres DPPH, mientras que la interacción entre tiempo y razón solvente/residuo provoca el efecto contrario. Por otro lado, la recuperación de sólidos solubles desde extractos metanólicos de residuos de arándano azul se ve afectada por la razón solvente/residuo y por la temperatura de extracción. Tiempo y temperatura son los parámetros que mayoritariamente influyen la recuperación de polifenoles y tanto las interacciones entre dos variables como la interacción entre los tres parámetros principales ejercen un efecto positivo en la extractibilidad de los compuestos fenólicos. Los tres parámetros principales cobran relevancia en la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de residuos de arándano azul. El rendimiento de recuperación de sólidos solubles con la mezcla hidrometanólica se ve mayoritariamente afectado por la interacción entre tiempo y temperatura, que en conjunto ejercen un efecto negativo en el proceso extractivo, mientras que en el contenido de polifenoles extraíbles influyen la temperatura y el tiempo de incubación de manera positiva y en mayor medida el tiempo de extracción de manera negativa. Para el método del DPPH, las variables más importantes son la razón solvente/residuo y la temperatura. El tiempo de extracción es el parámetro más relevante en la recuperación de sólidos solubles desde residuos arándano azul con acetato de etilo, mientras que tiempo y temperatura de extracción son las variables que se muestran mayoritariamente influyentes en el contenido total de polifenoles extraíbles y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. Ninguna de las interacciones entre variables resultan ser significativas, al menos a los niveles seleccionados.

Tabla II.3: Rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de arándano rojo

Experiencia (t, T, R/S)	Sólidos solubles (g extracto/100g muestra)				Fenoles totales (mg de ácido gálico/g muestra)				DPPH (mmoles trolox/100g muestra)				MEOH:		AE	
	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH		
1 (-,-,-)	4,34 ±0,13	5,24 ±0,10	6,11 ±0,14	6,72 ±0,04	2,22 ±0,07	3,46 ±0,07	10,55 ±0,02	6,18 ±0,01	7,61 ±0,06	2,11 ±0,03	0,25 ±0,01	0,78 ±0,02	3,04 ±0,18	1,47 ±0,02	2,87 ±0,10	0,60 ±0,01
2 (+,-,-)	4,41 ±0,40	6,26 ±0,05	5,38 ±0,11	7,22 ±0,02	1,92 ±0,12	4,63 ±0,01	9,76 ±0,25	7,343 ±0,01	7,47 ±1,58	2,32 ±0,04	0,23 ±0,00	0,87 ±0,03	2,71 ±0,09	2,35 ±0,04	2,82 ±0,11	0,54 ±0,03
3 (-,+,-)	4,56 ±0,11	5,74 ±0,04	6,66 ±0,07	7,17 ±0,05	2,690 ±0,05	4,87 ±0,02	12,11 ±0,281	7,16 ±0,08	10,63 ±0,35	2,68 ±0,03	0,31 ±0,00	0,88 ±0,02	3,42 ±0,15	1,80 ±0,01	3,17 ±0,03	0,57 ±0,02
4 (+,+,-)	5,23 ±0,66	6,79 ±0,05	5,44 ±0,00	5,68 ±0,01	2,81 ±0,23	5,71 ±0,35	10,97 ±0,01	7,72 ±0,33	5,41 ±0,09	2,70 ±0,02	0,28 ±0,01	1,16 ±0,04	2,80 ±0,09	2,23 ±0,03	2,35 ±0,02	0,55 ±0,05
5 (-,-,+)	4,738 ±0,07	6,30 ±0,08	7,17 ±0,07	8,59 ±0,03	3,39 ±0,02	4,29 ±0,03	13,49 ±0,00	8,20 ±0,11	12,43 ±0,46	2,52 ±0,17	0,470 ±0,00	0,61 ±0,01	5,80 ±0,18	2,02 ±0,01	5,09 ±0,22	0,91 ±0,03
6 (+,-,+)	5,96 ±0,07	7,20 ±0,21	5,64 ±0,75	8,45 ±0,58	2,88 ±0,01	5,15 ±0,05	10,903 ±0,01	9,72 ±0,14	14,68 ±0,84	2,64 ±0,06	0,42 ±0,00	0,82 ±0,02	5,64 ±1,11	2,47 ±0,16	6,15 ±0,42	0,88 ±0,01
7 (-,-,+)	5,54 ±0,05	7,74 ±0,29	8,50 ±0,22	9,65 ±0,10	4,96 ±0,03	5,46 ±0,00	16,53 ±0,30	15,10 ±0,30	17,20 ±0,30	2,71 ±0,13	0,64 ±0,01	1,30 ±0,03	7,94 ±0,22	2,87 ±0,16	5,49 ±0,10	0,98 ±0,08
8 (+,+,-)	6,76 ±0,15	8,78 ±0,80	6,94 ±0,09	9,73 ±0,05	4,14 ±0,24	6,59 ±0,30	13,84 ±0,67	12,02 ±0,17	12,20 ±0,94	3,12 ±0,01	0,68 ±0,02	1,75 ±0,05	4,14 ±0,24	3,83 ±0,09	5,80 ±0,10	0,85 ±0,00
9 (0,0,0)	3,83 ±0,45	6,52 ±0,22	6,95 ±0,37	8,50 ±0,10	2,50 ±0,04	5,00 ±0,10	13,25 ±0,90	9,38 ±0,10	10,95 ±0,45	2,51 ±0,00	0,41 ±0,01	0,93 ±0,02	4,85 ±0,65	1,97 ±0,08	5,87 ±0,19	0,46 ±0,00
10 (0,0,0)	3,16 ±0,05	7,16 ±0,05	6,70 ±0,23	9,79 ±0,20	2,18 ±0,04	5,53 ±0,13	13,24 ±0,01	9,36 ±0,01	11,67 ±0,12	2,07 ±0,05	0,31 ±0,00	1,14 ±0,02	5,06 ±0,09	2,41 ±0,12	6,19 ±0,24	0,55 ±0,01
11 (0,0,0)	3,92 ±0,01	6,74 ±0,04	6,71 ±0,12	9,15 ±0,02	2,47 ±0,06	5,62 ±0,02	12,56 ±0,06	10,25 ±0,01	10,61 ±0,07	2,30 ±0,02	0,39 ±0,01	1,13 ±0,01	5,66 ±0,02	2,42 ±0,00	5,94 ±0,62	0,48 ±0,04
12 (0,0,0)	4,81 ±0,47	7,32 ±0,39	6,30 ±0,18	9,58 ±0,49	3,18 ±0,19	5,68 ±0,02	12,17 ±0,07	10,81 ±0,10	11,62 ±0,08	2,46 ±0,01	0,45 ±0,05	1,15 ±0,04	5,68 ±0,19	2,54 ±0,26	6,06 ±0,43	0,62 ±0,01

Los residuos de arándano rojo en agua presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (6,8 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (4,3 g extracto/100g muestra). En el caso del contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (5,0 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de temperatura y razón solvente/residuo y largos tiempos de extracción se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (1,9 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (0,7 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el tiempo de extracción es máximo (0,2 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano rojo en etanol presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (8,8 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (5,2 g extracto/100g muestra). En el caso del contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (6,6 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (3,5 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (1,8 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo y temperatura son bajos y la razón solvente/residuo es máxima (0,6 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano rojo en la mezcla hidroetanólica presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (8,5 g extracto/100g muestra), mientras que a valores bajos de razón solvente/residuo y temperatura para tiempos de extracción largos se obtiene el mínimo de extraíbles (5,4 g extracto/100g muestra). En el caso del contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (16,5 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de razón solvente/residuo y temperatura para tiempos de extracción largos se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (9,8 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (7.9 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el tiempo de extracción es alto (2,7 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano rojo en metanol presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (9,7 g extracto/100g muestra), mientras que a valores bajos de razón solvente/residuo y altos de tiempo y temperatura se obtiene el mínimo de extraíbles (5,7 g extracto/100g muestra). Con respecto al contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (15,1 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros principales se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (6,2 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo, se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (3,8 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de estos tres parámetros son bajos (1,5 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano rojo en metanol:agua presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (7,1 g extracto/100g muestra), mientras que a valores altos de temperatura y tiempo de extracción y para la menor razón solvente/residuo se obtiene el mínimo de extraíbles (3,2 g extracto/100g muestra). En el caso de los compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos (17,2 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores altos de tiempo y temperatura para la menor razón solvente/residuo se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (5,4 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de tiempo y razón solvente/residuo para la menor temperatura de extracción se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (6,1 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo y temperatura de extracción son altos y la razón solvente/residuo es baja (2,3 mmol trolox/100g muestra).

Los residuos de arándano rojo en acetato de etilo presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (5,7g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (2,9 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (3,1 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de tiempo y temperatura y razón solvente/residuo se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (2,1 mg ácido gálico/g muestra). En relación a la actividad antioxidante, a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de extracción cortos se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (1,0 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor actividad antioxidante se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el tiempo de extracción es alto (0,5 mmol trolox/100 g muestra).

Tabla II.4: Modelos de superficie respuesta obtenidos para los rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de arándano rojo

Agua	Sólidos solubles	$R=4,77+0,40t+0,33T+0,56S/R+0,07tT+0,21tS/R+0,07TS/R-0,08tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=2,94-0,19t+0,52T+0,72S/R+0,01tT-0,14tS/R+0,18TS/R-0,09tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=0,40-0,01t+0,07T+0,14S/R+0,01tT+0,01tS/R+0,04TS/R+0,01tTS/R$
Etanol	Sólidos solubles	$R=6,79+0,50t+0,51T+0,75S/R+0,02tT-0,02tS/R+0,25TS/R+0,01tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=5,17+0,50t+0,64T+0,35S/R-0,01tT-0,00tS/R+0,01TS/R+0,08tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=1,04+0,13t+0,25T+0,10S/R+0,05tT+0,04tS/R+0,16TS/R+0,01tTS/R$
Etanol/H ₂ O 50.50% v/v	Sólidos solubles	$R=6,55-0,56t+0,33T+0,66S/R-0,14tT-0,07tS/R+0,18TS/R-0,02tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=12,45-0,90t+1,09T+1,15S/R-0,06tT-0,42tS/R+0,40TS/R+0,03tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=4,72-0,61t+0,14T+1,44S/R-0,49tT-0,38tS/R+0,02TS/R-0,42tTS/R$
Metanol	Sólidos solubles	$R=8,35-0,13t+0,16T+1,20S/R-0,22tT+0,12tS/R+0,43TS/R+0,28tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=9,44+0,02t+1,32T+2,08S/R-0,65tT-0,41tS/R+0,98TS/R+0,50tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=2,37+0,34t+0,30T+0,42S/R+0,01tT+0,01tS/R+0,25TS/R+0,12tTS/R$
Metanol/H ₂ O 50.50% v/v	Sólidos solubles	$R=5,73-0,10t-0,08T+1,13S/R-0,33tT+0,24tS/R+0,34TS/R+0,04tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=11,06-0,98t+0,37T+3,22S/R-1,58tT+0,37tS/R+0,13TS/R-0,31tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=4,81+0,06t-0,01T+1,42S/R-0,19tT+0,28tS/R+0,03TS/R+0,01tTS/R$
Acetato de etilo	Sólidos solubles	$R=3,83+0,30t+0,38T+0,64S/R+0,035tT+0,16tS/R+0,14TS/R+0,07tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=2,51+0,10t+0,20T+0,15S/R+0,01tT+0,04tS/R-0,04TS/R+0,06tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=0,66-0,03t+0,00T+0,17S/R-0,01tT-0,01tS/R+0,01TS/R-0,02tTS/R$

De la Tabla II.4 se desprende que para la extracción acuosa de residuos de arándano rojo, el rendimiento de recuperación de sólidos solubles se ve afectado por las tres variables principales. Los fenoles totales extraíbles se ve influenciados principalmente por la temperatura y la razón solvente/residuo. La razón solvente/residuo es el parámetro más importante en la capacidad antioxidante medida por el método DPPH. En el caso de la extracción con etanol, las tres variables principales afectan en mayor medida la recuperación de sólidos solubles, la interacción entre temperatura y razón solvente/residuo también ejerce un efecto positivo sobre el proceso extractivo. Temperatura, tiempo y razón solvente/residuo influyen la extracción etanólica de polifenoles desde residuos de arándano rojo. La temperatura, el tiempo de extracción y la interacción entre temperatura y razón solvente/residuo son los parámetros más influyentes en la capacidad de captación de radicales libres DPPH. En cuanto a las experiencias realizadas con la mezcla hidroetanólica, el rendimiento de recuperación de sólidos solubles se ve mayoritariamente afectado por la razón solvente/residuo, el tiempo ejerce un efecto negativo en el proceso extractivo mientras que la temperatura lo favorece. En el contenido de polifenoles influyen positivamente la razón solvente/residuo y la temperatura, mientras que el tiempo de incubación perjudica la extractibilidad de los polifenoles. Para el método del DPPH, la variable más importante es la razón solvente/residuo. La recuperación de sólidos solubles desde extractos metanólicos de residuos de arándano rojo se ve notoriamente afectada por la variable principal razón solvente/residuo, también ejerce un efecto la interacción entre la temperatura y la razón solvente/residuo. Por otro lado, la temperatura y la interacción entre el tiempo y la razón solvente/residuo son los parámetros que mayoritariamente influyen la recuperación de polifenoles. Las tres variables principales afectan mayoritariamente la capacidad antioxidante. La razón solvente/ residuo afecta mayoritariamente el rendimiento de recuperación de sólidos solubles de extractos hidrometanólicos de arándano rojo; La razón solvente/ residuo ejerce la mayor influencia en la recuperación de compuestos fenólicos y un marcado efecto negativo se aprecia en el caso de la interacción entre tiempo y temperatura. La actividad antioxidante de los extractos hidrometanólicos de arándano rojo se ve principalmente afectada por la razón solvente/residuo y en menor medida por la interacción entre tiempo y razón solvente/residuo. Las tres variables principales se muestran mayoritariamente influyentes en la recuperación de sólidos solubles con acetato de etilo, mientras que en el contenido de polifenoles, la temperatura y la razón solvente/residuo son los parámetros más relevantes. La capacidad antioxidante de la extracción con acetato de etilo se ve afectada principalmente por la razón solvente/residuo.

Tabla II.5 Rendimientos de sólidos solubles y contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles de los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa

Experiencia (t, T, R/S)	Sólidos solubles (g extracto/100g muestra)				Fenoles totales (mg de ácido gálico/g muestra)							
	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	MEOH: H ₂ O 50:50 % v/v	AE	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	MEOH: H ₂ O 50:50 % v/v	AE
1 (-,-,-)	1,42 ±0,10	2,82 ±0,20	2,61 ±0,04	5,02 ±0,17	2,47 ±0,08	1,71 ±0,08	1,26 ±0,06	4,27 ±0,06	7,34 ±0,00	9,21 ±0,09	7,19 ±0,36	0,69 ±0,05
2 (+,-,-)	2,23 ±0,02	5,13 ±0,23	4,23 ±0,08	6,64 ±0,36	2,73 ±0,33	3,88 ±0,04	1,86 ±0,02	8,99 ±0,02	11,37 ±0,01	14,22 ±0,11	10,93 ±1,19	1,59 ±0,05
3 (-,+,-)	1,91 ±0,04	3,46 ±0,12	3,83 ±0,00	5,40 ±0,11	3,59 ±0,02	2,17 ±0,08	1,95 ±0,12	6,91 ±0,29	12,72 ±0,14	12,83 ±0,01	11,89 ±0,29	1,01 ±0,02
4 (+,+,-)	2,75 ±0,04	6,57 ±0,04	5,05 ±0,04	7,59 ±0,04	3,25 ±0,09	4,79 ±0,08	3,04 ±0,08	11,26 ±0,01	14,01 ±0,01	15,45 ±0,08	11,68 ±0,14	2,47 ±0,03
5 (-,+,-)	1,65 ±0,07	3,45 ±0,07	3,79 ±0,09	4,05 ±0,02	3,85 ±0,00	2,27 ±0,16	2,17 ±0,10	5,75 ±0,52	11,76 ±0,65	11,74 ±0,22	8,71 ±0,54	0,68 ±0,06
6 (+,+,-)	2,49 ±0,20	5,50 ±0,08	5,14 ±0,16	7,27 ±0,24	4,12 ±0,20	4,65 ±0,08	2,31 ±0,01	11,31 ±0,12	14,76 ±0,15	18,05 ±0,19	13,09 ±1,31	1,63 ±0,01
7 (-,+,-)	2,37 ±0,00	4,97 ±0,00	5,32 ±0,01	4,87 ±0,38	4,59 ±0,03	2,28 ±0,08	3,09 ±0,13	8,02 ±0,30	19,27 ±0,94	16,14 ±0,09	13,60 ±0,32	1,64 ±0,02
8 (+,+,-)	3,37 ±0,04	7,61 ±0,02	6,63 ±0,00	6,88 ±0,06	3,89 ±0,03	5,31 ±0,004	3,94 ±0,03	14,09 ±0,23	19,46 ±0,18	21,50 ±1,81	13,45 ±0,84	2,56 ±0,12
9 (0,0,0)	2,70 ±0,14	4,86 ±0,04	4,128 ±0,17	4,34 ±0,53	4,95 ±0,05	3,78 ±0,00	3,33 ±0,02	9,39 ±0,25	13,62 ±0,63	15,02 ±0,07	14,57 ±1,60	1,62 ±0,05
10 (0,0,0)	2,63 ±0,02	4,93 ±0,02	4,28 ±0,11	4,79 ±0,03	5,01 ±0,18	3,47 ±0,11	3,52 ±0,10	9,83 ±0,04	15,39 ±0,01	14,20 ±0,09	14,36 ±0,47	1,61 ±0,11
11 (0,0,0)	2,76 ±0,00	5,20 ±0,50	4,42 ±0,26	4,82 ±0,04	5,49 ±0,10	3,33 ±0,09	3,29 ±0,05	9,62 ±0,32	15,88 ±0,22	13,54 ±0,01	15,03 ±0,33	1,71 ±0,04
12 (0,0,0)	2,48 ±0,09	5,02 ±0,09	4,20 ±0,06	5,64 ±0,45	5,63 ±0,01	3,73 ±0,09	3,63 ±0,04	9,65 ±0,10	14,52 ±0,06	13,98 ±0,27	17,76 ±0,33	1,73 ±0,04

Los residuos de frambuesa en agua presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (3,4 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (1,4 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (3,9 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (1,3 mg ácido gálico/g muestra).

Los residuos de frambuesa en etanol presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (7,6 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (2,9 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (14,1 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (4,3 mg ácido gálico/g muestra).

Los residuos de frambuesa en la mezcla hidroetanólica presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (6,6 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (2,6 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (19,5 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (7,3 mg ácido gálico/g muestra).

Los residuos de frambuesa en metanol presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (7,0 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (3,6 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (21,5 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (9,2 mg ácido gálico/g muestra).

Los residuos de frambuesa en metanol:agua presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos (4,6 g extracto/100g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros principales se obtiene el mínimo de extraíbles (2,5 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos (13,6 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros principales se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (7,2 mg ácido gálico/g muestra).

Los residuos de frambuesa en acetato presentan el mayor rendimiento de recuperación de sólidos solubles en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (5,3 g extracto/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el mínimo de extraíbles (1,7 g extracto/100g muestra). Lo mismo sucede con el contenido de compuestos fenólicos totales, el mayor rendimiento de recuperación de polifenoles se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (2,6 mg ácido gálico/g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor extractibilidad de polifenoles (0,6 mg ácido gálico/g muestra).

Tabla II.6: Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de frambuesa

Experiencia (t, T, R/S)	DPPH (mmoles trolox/100g muestra)			ABTS (mmoles trolox/100g muestra)			FRAP (mmol ascórbico/100g muestra)											
	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	MEOH: H ₂ O 50:50 % v/v	AE	H ₂ O	EOH	EOH: H ₂ O 50:50 % v/v	MeOH	MEOH: H ₂ O 50:50 % v/v	AE						
1 (-,-,-)	0,67 ±0,01	3,42 ±0,01	4,02 ±0,18	6,12 ±0,29	4,04 ±0,30	0,12 ±0,01	2,16 ±0,05	5,74 ±0,34	5,54 ±0,30	15,86 ±0,14	12,60 ±0,34	0,78 ±0,03	1,22 ±0,01	2,82 ±0,09	5,09 ±0,13	6,70 ±0,13	4,25 ±0,13	0,45 ±0,00
2 (+,-,-)	0,48 ±0,01	7,31 ±0,03	5,36 ±0,44	9,77 ±0,02	5,80 ±0,14	0,23 ±0,00	2,60 ±0,03	14,26 ±0,09	23,04 ±0,05	23,70 ±0,44	19,36 ±0,63	1,45 ±0,02	1,55 ±0,07	4,29 ±0,02	8,64 ±0,66	8,82 ±0,06	4,65 ±0,01	0,78 ±0,00
3 (-,+,-)	0,58 ±0,00	4,67 ±0,07	5,97 ±0,24	8,27 ±0,10	7,04 ±0,90	0,27 ±0,01	3,69 ±0,15	10,49 ±0,22	14,16 ±0,48	22,07 ±0,05	20,43 ±1,73	1,83 ±0,07	1,64 ±0,04	3,50 ±0,09	7,82 ±0,05	8,15 ±0,12	6,25 ±0,03	0,65 ±0,01
4 (+,+,-)	0,68 ±0,10	8,89 ±0,01	7,92 ±0,28	10,43 ±0,22	7,08 ±0,01	0,46 ±0,02	4,04 ±0,05	15,88 ±0,13	30,69 ±0,06	23,18 ±1,80	25,14 ±0,14	2,63 ±0,08	2,28 ±0,07	5,12 ±0,02	10,25 ±0,66	8,50 ±0,06	6,07 ±0,01	1,16 ±0,00
5 (-,-,+)	0,94 ±0,03	4,76 ±0,01	13,45 ±0,01	6,68 ±0,00	5,74 ±0,50	0,23 ±0,00	2,82 ±0,13	6,83 ±0,48	14,52 ±0,66	16,13 ±0,43	15,58 ±0,06	1,45 ±0,25	1,53 ±0,02	4,33 ±0,10	8,03 ±0,32	10,58 ±0,33	5,12 ±0,15	0,67 ±0,00
6 (+,-,+)	0,82 ±0,07	7,72 ±0,05	15,96 ±0,31	13,12 ±0,01	7,39 ±0,14	0,37 ±0,02	3,86 ±0,32	14,82 ±0,18	30,22 ±0,08	30,00 ±1,25	32,89 ±1,65	1,72 ±0,04	2,15 ±0,01	6,69 ±0,02	12,30 ±0,53	12,30 ±0,12	8,54 ±0,19	1,14 ±0,00
7 (-,+,+)	1,92 ±0,01	6,55 ±0,21	16,47 ±0,71	9,51 ±0,04	8,14 ±0,10	0,42 ±0,00	5,15 ±0,07	12,18 ±0,08	25,53 ±2,74	26,12 ±0,01	22,38 ±1,90	2,13 ±0,18	2,71 ±0,11	5,64 ±0,35	10,71 ±0,11	13,21 ±0,06	7,74 ±0,07	0,99 ±0,07
8 (+,+,+)	1,12 ±0,03	11,39 ±0,08	11,22 ±0,55	13,69 ±0,07	7,41 ±0,04	0,72 ±0,00	5,98 ±0,13	20,01 ±0,24	40,58 ±0,38	31,36 ±0,73	26,23 ±0,35	3,00 ±0,11	3,38 ±0,04	7,87 ±0,07	15,48 ±0,16	13,76 ±0,28	7,54 ±0,21	1,61 ±0,01
9 (0,0,0)	1,70 ±0,01	6,74 ±0,41	9,82 ±0,18	11,74 ±0,26	10,31 ±0,83	0,43 ±0,01	4,68 ±0,16	12,25 ±0,22	32,10 ±2,44	19,83 ±0,04	22,78 ±1,01	1,65 ±0,01	2,53 ±0,00	4,95 ±0,01	9,86 ±0,40	8,14 ±0,20	6,43 ±0,19	0,86 ±0,01
10 (0,0,0)	1,85 ±0,02	6,80 ±0,11	12,27 ±0,55	12,00 ±0,22	10,40 ±0,04	0,43 ±0,01	4,53 ±0,01	12,41 ±0,08	30,54 ±0,78	21,92 ±0,13	22,20 ±0,24	1,72 ±0,02	2,62 ±0,00	5,33 ±0,02	9,73 ±0,30	8,42 ±0,00	5,81 ±0,08	0,83 ±0,00
11 (0,0,0)	2,15 ±0,11	6,68 ±0,31	10,16 ±0,12	12,15 ±0,06	11,37 ±0,62	0,47 ±0,00	5,00 ±0,03	13,50 ±0,17	30,41 ±2,62	22,58 ±0,38	23,65 ±0,63	1,71 ±0,00	2,58 ±0,11	5,32 ±0,09	9,87 ±0,30	8,23 ±0,10	6,63 ±0,160	0,84 ±0,02
12 (0,0,0)	1,84 ±0,06	7,05 ±0,21	8,44 ±0,21	11,75 ±0,17	12,40 ±0,26	0,46 ±0,00	4,23 ±0,13	14,23 ±0,16	29,22 ±0,26	22,79 ±0,86	26,93 ±0,08	1,92 ±0,01	2,29 ±0,02	5,68 ±0,02	9,75 ±0,26	8,39 ±0,05	7,22 ±0,32	0,85 ±0,01

En relación a la actividad antioxidante de los extractos acuosos medida por el método DPPH, a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (1,9 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra en el punto experimental donde los valores de temperatura y razón solvente/residuo son bajos y el tiempo de operación es máximo (0,5 mmol trolox/100g muestra). Con respecto a la actividad antioxidante medida por el método ABTS, los residuos de frambuesa en agua presentan la mayor capacidad secuestradora de radicales ABTS en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (6,0 mmol trolox/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (2,2 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (3,4 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el menor efecto reductor (1,2 mmol ascórbico/100g muestra).

En relación a la actividad antioxidante de los extractos etanólicos medida por el método DPPH, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (11,4 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo son bajos (3,4 mmol trolox/100g muestra). Con respecto a la actividad antioxidante medida por el método ABTS, los residuos de frambuesa en etanol presentan la mayor capacidad secuestradora de radicales ABTS en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (20,0 mmol trolox/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (5,7 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (7,9 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el menor efecto reductor (2,8 mmol ascórbico/100g muestra).

En relación a la actividad de los extractos hidroetanólicos antioxidante medida por el método DPPH, a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (16,5 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo son bajos (4,0 mmol trolox/100g muestra). Con respecto a la actividad antioxidante medida por el método ABTS, los residuos de frambuesa en la mezcla hidroetanólica presentan la mayor capacidad secuestradora de radicales ABTS en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (40,6 mmol trolox/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (5,5 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (15,5 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el menor efecto reductor (5,0 mmol ascórbico/100g muestra).

En relación a la actividad antioxidante de los extractos metanólicos medida por el método DPPH, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (13,7 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo son bajos (6,1 mmol trolox/100g muestra). Con respecto a la actividad antioxidante medida por el método ABTS, los residuos de frambuesa en metanol presentan la mayor capacidad secuestradora de radicales ABTS en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (31,4 mmol trolox/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (15,9 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (13,8 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el menor efecto reductor (6,7 mmol ascórbico/100g muestra).

En relación a la actividad antioxidante de los extractos hidrometanólicos medida por el método DPPH, a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (8,1 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo son bajos (4,0 mmol trolox/100g muestra). Con respecto a la actividad antioxidante medida por el método ABTS, los residuos de frambuesa en metanol:agua presentan la mayor capacidad secuestradora de radicales ABTS en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos (32,9 mmol trolox/100g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (12,6 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de temperatura y razón solvente/residuo para tiempos de operación cortos (8,5 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de los tres parámetros principales se obtiene el menor efecto reductor (4,2 mmol ascórbico/100g muestra).

En relación a la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con acetato de etilo medida por el método DPPH, a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo se alcanza la mayor capacidad secuestradora de radicales DPPH (0,7 mmol trolox/100g muestra); en cambio, la menor capacidad secuestradora de radicales DPPH se registra en el punto experimental donde los valores de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo son bajos (0,1 mmol trolox/100g muestra). Con respecto a la actividad antioxidante medida por el método ABTS, los residuos de frambuesa en acetato de etilo presentan la mayor capacidad secuestradora de radicales ABTS en el punto del diseño en que se emplean los valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (3,0 mmol trolox/100g muestra); por el contrario, a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene la menor capacidad secuestradora de radicales ABTS (0,8 mmol trolox/100g muestra). Lo mismo sucede con la actividad antioxidante medida por el método FRAP, la mayor capacidad reductora del ión férrico se consigue a valores altos de tiempo, temperatura y razón solvente/residuo (1,6 mmol ascórbico/100g muestra), mientras que a valores bajos de estos tres parámetros se obtiene el menor efecto reductor (0,4 mmol ascórbico/100g muestra).

Tabla II.7: Modelos de superficie respuesta para los rendimientos de sólidos solubles, contenido de compuestos fenólicos totales extraíbles y actividad antioxidante de los extractos de residuos de frambuesa

Agua	Sólidos solubles	$R=2,42+0,46t+0,34T+0,23S/R+0,02tT+0,01tS/R+0,09TS/R+0,02tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=2,79+0,33t+0,55T+0,42S/R+0,16tT-0,08tS/R+0,90TS/R+0,02tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=1,26-0,13t+0,18T+0,30S/R-0,05tT-0,11tS/R+0,15TS/R-0,12tTS/R$
	Actividad antioxidante (ABTS)	$R=4,06+0,34t+0,92T+0,66S/R-0,03tT+0,14tS/R+0,18TS/R-0,01tTS/R$
	Actividad antioxidante (FRAP)	$R=2,20+0,28t+0,44T+0,39S/R+0,04tT+0,04tS/R+0,16TS/R-0,03tTS/R$
Etanol	Sólidos solubles	$R=4,93+1,27t+0,72T+0,45S/R+0,17tT-0,10tS/R+0,19TS/R+0,02tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=9,09+2,59t+1,24T+0,97S/R+0,02tT+0,32tS/R+0,02TS/R+0,11tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=6,83+1,99t+1,03T+0,77S/R+0,28tT-0,04tS/R+0,33TS/R+0,19tTS/R$
	Actividad antioxidante (ABTS)	$R=12,75+3,67t+2,07T+0,89S/R-0,36tT+0,29tS/R+0,57TS/R+0,32tTS/R$
	Actividad antioxidante (FRAP)	$R=5,13+0,96t+0,50T+1,10S/R+0,00tT+0,19tS/R+0,12TS/R-0,03tTS/R$
Etanol/H ₂ O 50:50% v/v	Sólidos solubles	$R=4,45+0,69t+0,63T+0,65S/R-0,06tT-0,03tS/R+0,12TS/R+0,05tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=14,17+1,06t+2,53T+2,48S/R-0,70tT-0,27tS/R+0,53TS/R-0,01tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=10,14+0,15t+0,43T+4,31S/R-0,82tT-0,68tS/R-0,70TS/R-0,97tTS/R$
	Actividad antioxidante (ABTS)	$R=25,55+8,10t+4,71T+4,68S/R-0,20tT-0,41tS/R+0,64TS/R+0,04tTS/R$
	Actividad antioxidante (FRAP)	$R=9,83+1,84t+1,23T+1,80S/R-0,03tT+0,43tS/R+0,23TS/R+0,16tTS/R$
Metanol	Sólidos solubles	$R=5,38+0,88t+0,52T+0,30S/R-0,14tT+0,05tS/R+0,06TS/R+0,01tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=14,68+2,41t+1,59T+1,97S/R-0,42tT+0,50tS/R+0,38TS/R+0,18tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=10,42+2,05t+0,78T+1,05S/R-0,47tT+0,60tS/R+0,07TS/R-0,10tTS/R$
	Actividad antioxidante (ABTS)	$R=22,73+3,26t+2,38T+2,10S/R-1,67tT+1,02tS/R+0,96TS/R+0,01tTS/R$
	Actividad antioxidante (FRAP)	$R=9,58+0,63t+0,69T+2,25S/R-0,41tT-0,06tS/R+0,30TS/R+0,11tTS/R$
Metanol/H ₂ O 50:50% v/v	Sólidos solubles	$R=4,02-0,10t+0,31T+0,51S/R-0,16tT-0,08tS/R-0,10TS/R-0,01tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=12,72+1,06t+1,38T+1,16S/R-1,03tT+0,26tS/R-0,18TS/R-0,21tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=8,10+0,34t+0,84T+0,59S/R-0,51tT-0,11tS/R-0,23TS/R-0,08tTS/R$
	Actividad antioxidante (ABTS)	$R=23,23+4,06t+1,71T+2,43S/R-1,95tT+1,20tS/R-1,70TS/R-1,44tTS/R$
	Actividad antioxidante (FRAP)	$R=6,35+0,43t+0,63T+0,97S/R-0,53tT+0,37tS/R-0,23TS/R-0,38tTS/R$
Acetato de etilo	Sólidos solubles	$R=3,45+1,27t+0,26T+0,24S/R+0,14tT+0,08tS/R-0,09TS/R+0,02tTS/R$
	Fenoles totales extraíbles	$R=1,58+0,54t+0,38T+0,09S/R+0,06tT-0,07tS/R+0,09TS/R-0,06tTS/R$
	Actividad antioxidante (DPPH)	$R=0,38+0,09t+0,11T+0,08S/R+0,03tT+0,02tS/R+0,02TS/R+0,01tTS/R$
	Actividad antioxidante (ABTS)	$R=1,83+0,33t+0,53T+0,20S/R+0,09tT-0,04tS/R-0,03TS/R+0,06tTS/R$
	Actividad antioxidante (FRAP)	$R=0,90+0,242t+0,17T+0,17S/R+0,04tT+0,03tS/R+0,03TS/R-0,00tTS/R$

La Tabla II.7, muestra que para la extracción acuosa de residuos de frambuesa, el rendimiento de recuperación de sólidos solubles se ve afectado por las tres variables principales al igual que el contenido total de compuestos fenólicos extraíbles y la capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y FRAP, en el caso del método DPPH el parámetro más relevante es la razón solvente/residuo. Tanto para la recuperación de sólidos solubles como contenido fenólico de los extractos etanólicos, los parámetros más importantes son las tres variables principales. La capacidad antirradicalaria medida por los métodos del DPPH, ABTS y FRAP se ve influenciada por estos mismos tres parámetros. La recuperación hidroetanólica de sólidos solubles, el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante medida por los métodos ABTS y FRAP se ven influenciados mayoritariamente por las tres variables principales, mientras que la razón solvente/residuo es el parámetro más importante en la capacidad antioxidante de los extractos hidroetanólicos medida con DPPH. En la recuperación sólidos solubles, del contenido fenólico y de la capacidad de captación de radicales libres DPPH de los extractos metanólicos, los parámetros más importantes son las tres variables principales. Para el método del ABTS además de estas tres variables principales, la interacción entre dos variables influyen la capacidad antirradicalaria, positivamente en el caso de tiempo y razón solvente/residuo y temperatura y razón solvente/residuo y negativamente cuando interaccionan el tiempo y la temperatura de extracción. La razón solvente/residuo ejerce el mayor efecto sobre la actividad antioxidante medida por el método FRAP. Al emplear la mezcla hidrometanólica, el rendimiento de sólidos solubles se ve mayoritariamente afectado por la razón solvente/residuo y temperatura, mientras que en el contenido fenólico influyen las tres variables principales y interacción entre la temperatura y el tiempo de extracción, que ejerce un efecto negativo sobre la extractibilidad de los polifenoles. Para el método DPPH, la variable más importante es la temperatura, mientras que para el método FRAP el parámetro más influyente es la razón solvente/residuo. En el caso del método ABTS, tiempo de extracción es el parámetro con mayor peso; sin embargo, el resto de las variables también ejercen influencias en el proceso extractivo. El tiempo de extracción es el parámetro más relevante en la recuperación de sólidos solubles desde residuos de frambuesa con acetato de etilo de etilo, mientras que tiempo y temperatura se muestran mayoritariamente influyentes en la recuperación de polifenoles. La escasa capacidad antioxidante medida por el método DPPH está afectada por la temperatura. Las tres variables principales ejercen un efecto significativo en la capacidad antioxidante evaluada por el método ABTS al igual que por el método FRAP