UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

EVALUACIÓN DEL USO DE ETANOL Y GLICEROL COMO SOLVENTES ALTERNATIVOS EN UN PROCESO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO PARA LA RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES PRESENTES EN HOJAS DE OLIVO (*Olea europaea L.*)

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. DAYANA JUDITH RAMOS ALLCCA

ASESOR:

Dr. NILS LEANDER HUAMÁN CASTILLA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

MOQUEGUA – PERÚ

2023

UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Folio N° 20

ACTA DE SUSTENTACIÓN

I. Modalidad:

Tesis : [X]

Trabajo de Suficiencia Profesional : [ ]

Otro: ..... : [ ]

II. Documento de aprobación de la modalidad de titulación del bachiller:

RESOLUCION DE FACULTAD N° 0104-2021-FACIA-UNAM

Fecha: 09/12/2021 Y RESOLUCION DE FACULTAD N°093-2023-FACIA-UNAM, 04/07/2023

III. Documento de aprobación para la sustentación:

RESOLUCION DE FACULTAD N° 113-2023-FACIA-UNAM

Fecha: 04/08/2023

IV. El Jurado ha dictaminado la (el) TESIS,

TITULADO: "EVALUACIÓN DEL USO DE ETANOL Y GLICEROL COMO SOLVENTES ALTERNATIVOS EN UN PROCESO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO PARA LA RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES PRESENTES EN HOJAS DE OLIVO (Olea europaea L.)"

Bachiller: DAYANA JUDITH RAMOS ALLCCA

Asesor Principal: Dr. NILS LEANDER HUAMAN CASTILLA

Co-Asesor: .....

V. Se dictamina:

Como: APROBADO por UNANIMIDAD la sustentación de manera:

Presencial [X] Virtual [ ]

Con nota: QUINCE (15) por lo que; Sí [ ] No [ ]

Opta el Título Profesional de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL**.

Siendo las 11:16 horas, del 08 de AGOSTO del año 2023 se procede con la firma en conformidad de lo dictaminado por el Jurado.

Presidente	Primer Miembro	Segundo Miembro
Mg. César Augusto Nopo Olazabal	M.Sc. Lycet María Cáceres Bustinza	MSc. Karina Eduardo Palomino
(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)

	Miembro Accesitario	
	Msc. Beatriz Damiano Vásquez	
	(Nombres y Apellidos)	
Asesor Principal	Bachiller	Co-Asesor
Nils Leander Huaman Castilla	DAYANA JUDITH RAMOS ALLCCA	
(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)

DEDICATORIA

A Dios

Por estar conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome la fortaleza para continuar pese a todas las circunstancias que se han presentado.

A mis queridos abuelos María y Teodosio

Por ser un ejemplo de sacrifico y humildad. Por haberme brindado su amor, paciencia, apoyo y estar conmigo en los momentos más importantes durante todos estos años, inculcándome valores, ganas de superación y ser el motivo para el cumplimiento de mis objetivos.

A mi hijo Eduardo

Por ser mi motivación y aquel impulso para cada día ser mejor persona y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que ha sido mi guía a lo largo de mi vida y me ha dado la paciencia y sabiduría para alcanzar mis metas.

A mi asesor Dr. Nils Huamán Castilla por ser mi guía en todo el proceso de ejecución de tesis, en base a su experiencia y sabiduría. Siendo un ejemplo a seguir.

Al Dr. Franz Zirena Vilca, por su enseñanza y la orientación brindada para la realización de los análisis de cromatografía.

A mi querida madre Olivia Mery y tíos Erik, Giovanna, Gladyz, por estar presentes en cada momento importante de mi vida, brindándome sus consejos, motivándome a ser mejor persona y cumplir con mis objetivos.

A mis jurados, Mg Cesar Napa, M.Sc. Lycet Cáceres, M.Sc. Karina Eduardo y M. Sc Beatriz Damiano que gracias a sus comentarios y aportes ayudaron a fortalecer la presente investigación.

A los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial que en base a sus experiencias y conocimientos ayudaron a mi formación como profesional.

RESUMEN

El cultivo del olivo produce enormes cantidades de residuos agroindustriales como las hojas de olivo que no representan ningún valor comercial y genera problemas de gestión ambiental. No obstante, este residuo ha demostrado ser una fuente importante en polifenoles, los cuales poseen diversas propiedades biológicamente funcionales. A pesar de distintos estudios que tratan sobre la recuperación de polifenoles de esta matriz vegetal, las metodologías propuestas pueden sufrir serias deficiencias debido al aumento del costo y/o la toxicidad del solvente y dificultan su escalamiento. Sin embargo, los procesos verdes que involucran solventes amigables con el medio ambiente son escasos. Por ello, el presente trabajo evaluó el efecto del uso de mezclas agua – etanol (0, 15 y 30%) y agua – glicerol (0, 15 y 30%) sometidos a temperaturas moderadas (50 y 70 °C) sobre la recuperación de polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y perfil de polifenoles en hojas de olivo aplicando un proceso de Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU). El glicerol como solvente fue más eficiente logrando rendimientos superiores en la recuperación de polifenoles y capacidad antioxidante en comparación al etanol. La condición óptima fue establecida con 30% glicerol y 70°C, incrementando el contenido de polifenoles (14.85 mgEAG/gss) y la capacidad antioxidante (IC_{50}: 2.65 mg/mL y ORAC: 684.65 µmolET/gss). Respecto al etanol, bajo las mismas condiciones, logró una menor recuperación de polifenoles (12.26 mgEAG/gss) y la capacidad antioxidante (IC_{50}: 10.02 mg/mL y ORAC: 506.32 µmolET/gss). En el análisis del perfil de polifenoles de los extractos, la oleuropeína (24922.52 µg/gss) predomina como el polifenol más representativo en hojas de olivo. Por lo tanto, el glicerol se presenta como un solvente alternativo al ser eficiente, ecológico y rentable el cual se puede usar de manera efectiva como medio de extracción de polifenoles de hojas de olivo, reemplazando al etanol que por diversas razones no siempre se puede utilizar con fines alimentarios. Finalmente, los resultados obtenidos permiten la valorización de este residuo mediante la recuperación de sus componentes para la sostenibilidad alimentaria, la economía circular, consecuentemente, la viabilidad para la extracción a gran escala de polifenoles presentes en hojas de olivo.

Palabras clave: Polifenoles, Ultrasonido, Hojas de olivo, Glicerol, Etanol, Capacidad Antioxidante.

ABSTRACT

Olive cultivation produces enormous amounts of agro-industrial waste such as olive leaves that do not represent any commercial value and generates environmental management problems. However, this residue has proven to be an important source of polyphenols, which have various biologically functional properties. Despite different studies that deal with the recovery of polyphenols from this plant matrix, the proposed methodologies can suffer serious deficiencies due to the increase in cost and/or the toxicity of the solvent and make it difficult to scale them up. However, green processes involving environmentally friendly solvents are rare. For this reason, the present work evaluated the effect of using mixtures of water - ethanol (0, 15 and 30%) and water - glycerol (0, 15 and 30%) subjected to moderate temperatures (50 and 70 °C) on the recovery of total polyphenols, antioxidant capacity (DPPH and ORAC), reducing sugars and polyphenol profile in olive leaves applying an Ultrasound Assisted Extraction (UAE) process. Glycerol as a solvent was more efficient, achieving higher yields in polyphenol recovery and antioxidant capacity compared to ethanol. The optimal condition was established with 30% glycerol and 70°C, increasing the polyphenol content (14.85 mgGAE/gss) and the antioxidant capacity (IC_{50}: 2.65 mg/mL and ORAC: 684.65 µmolET/gss). Regarding ethanol, under the same conditions, it achieved a lower recovery of polyphenols (12.26 mgGAE/gss) and antioxidant capacity (IC_{50}: 10.02 mg/mL and ORAC: 506.32 µmolET/gss). In the analysis of the polyphenol profile of the extracts, oleuropein (24922.52 µg/gss) predominates as the most representative polyphenol in olive leaves. Therefore, glycerol is presented as an alternative solvent, being efficient, ecological and profitable, which can be used effectively as a means of extracting polyphenols from olive leaves, replacing ethanol, which for various reasons cannot always be used. for food purposes. Finally, the results obtained allow the valorization of this residue through the recovery of its components for food sustainability, the circular economy, consequently, the feasibility for the large-scale extraction of polyphenols present in olive leaves.

Keywords: Polyphenols, Ultrasound, Olive leaves, Glycerol, Ethanol, Antioxidant Capacity.

ÍNDICE

RESUMEN.....iii
ABSTRACT iv
INTRODUCCION..... 11
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 12
1.1. Descripción y formulación del problema 12
1.2. Objetivos 13
1.2.1. Objetivo General..... 13
1.2.2. Objetivos Específicos 13
1.3. Justificación e importancia..... 14
1.4. Hipótesis..... 14
1.5. Variables 15
II. MARCO TEÓRICO 16
2.1. Antecedentes del problema 16
2.2. Bases teóricas sobre el trabajo de investigación 19
2.2.1. La hoja de olivo: un residuo generado por la industria 19
2.2.2. Polifenoles presentes en las hojas de olivo 19
2.2.2.1. Clasificación de diferentes familias de polifenoles 20
2.2.2.2. Propiedades bioactivas presentes en hojas de olivo..... 21
2.2.3. Capacidad antioxidante 23
A. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)..... 23
B. ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)..... 24
2.2.4. Azúcares reductores..... 25
2.2.5. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) 26
2.2.6. Métodos de extracción de Polifenoles 27
2.2.6.1. Métodos convencionales 28
A. Extracción convencional (Sólido- Líquido) 28

B. Extracción Soxhlet 29
2.2.6.2. Métodos alternativos 30
A. Extracción por Líquidos presurizados (PLE) 30
B. Extracción Asistida por Microondas (MAE) 31
C. Extracción con Asistencia de Ultrasonido (EAU) 32
- Principios y Mecanismo de Acción por EAU 32
- Factores que afectan la EAU 35
2.3. Definición de términos 38
III. METODOLOGÍA 40
3.1. Tipo y nivel de investigación 40
3.2. Ámbito temporal y espacial 40
3.3. Muestra 40
3.4. Instrumentos para la recolección de datos 41
3.4.1. Materiales, equipos y reactivos 41
3.5. Procedimientos 43
3.5.1. Acondicionamiento 43
3.5.2. Metodología experimental 44
3.5.3. Determinación del contenido de Polifenoles Totales 45
3.5.4. Análisis de capacidad antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) 46
3.5.5. Metodología de capacidad antioxidante por ORAC 46
3.5.6. Metodología de azúcares reductores 47
3.5.7. Metodología de perfil de polifenoles 48
3.6. Análisis de datos 49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 51
4.1. Contenido de polifenoles totales 51
4.1.1. Efecto del uso de etanol 51
4.1.2. Efecto del uso de glicerol 52
4.2. Capacidad Antioxidante 53

4.2.1. DPPH 54
4.2.1.1. Efecto del uso de etanol 54
4.2.1.2. Efecto del uso de glicerol 54
4.2.2. ORAC 55
4.2.3. Efecto del uso de etanol 55
4.2.4. Efecto del uso de glicerol 56
4.3. Azúcares reductores 57
4.3.1. Efecto del uso de etanol 57
4.3.2. Efecto del uso de glicerol 57
4.4. Cuantificación de polifenoles específicos 58
4.4.1. Ácidos fenólicos 58
4.4.2. Flavanoles 59
4.4.3. Flavonoles 59
4.4.4. Estilbenos (resveratrol) 60
4.4.5. Flavona (apigenina) 60
4.4.6. Fenoles simples 62
4.4.7. Secoiroides (oleuropeína) 62
V. CONCLUSIONES 63
VI. RECOMENDACIONES 64
VII. REFERENCIAS 65
VIII. ANEXOS 83

TABLAS

Tabla 1. Variables dependientes e independientes 15

Tabla 2. Contenido total de polifenoles presentes en hojas de olivo 20

Tabla 3. Propiedades bioactivas de algunos polifenoles específicos 21

Tabla 4.Características fisicoquímicas del etanol..... 36

Tabla 5. Características fisicoquímicas del glicerol 37

Tabla 6. Estructura del diseño experimental para la evaluación de datos 50

Tabla 7. Caracterización fenólica de los extractos de hojas de olivo..... 51

Tabla 8. Poder antioxidante (DPPH) de los extractos de hoja de olivo..... 54

Tabla 9. Poder antioxidante (ORAC) de los extractos de hoja de olivo 56

Tabla 10. Caracterización de azúcares reductores de los extractos 58

Tabla 11. Perfil de polifenoles utilizando etanol y glicerol como solventes de extracción 61

FIGURAS

Figura 1. Polifenoles presentes en hojas de olivo 20
Figura 2. Principio del método DPPH..... 24
Figura 3. Mecanismo método ORAC 25
Figura 4. Proyección de Fischer de glucosa y fructosa 26
Figura 5. Representación Método Soxhlet 29
Figura 6. Representación de PLE 31
Figura 7. Representación de MAE 32
Figura 8. Representación de EAU 34
Figura 9. Principio de cavitación acústica 34
Figura 10. Representación gráfica de la burbuja de cavitación colapsando y liberando material vegetal en tres pasos..... 35
Figura 11. Diagrama de flujo experimental del proyecto de investigación 43
Figura 12. Esquema de los diferentes procesos de extracción para la obtención de polifenoles de las hojas de olivo 44
Figura 13. Metodología Polifenoles Totales (CPT)..... 45
Figura 14. Metodología DPPH 46
Figura 15. Metodología ORAC..... 47

GLOSARIO DE TÉRMINOS

EAU	: Extracción asistida por ultrasonido
EAG	: Equivalente de ácido gálico
DPPH	: 2,2 -difenil-1-picrylhydrazyl
ORAC	: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
rpm	: Revoluciones por minuto
nm	: Nanómetros
°C	: Grados Celsius
g	: Gramos
kg	: Kilógramos
L	: Litro
mL	: Mililitro
mM	: Milimol
µL	: Microlitro
µM	: Micromol
Kcal	: Kilocalorías
mg	: Miligramos
µg	: Microgramos
v	: Volumen
min	: Minutos
ppm	: Partes por millón
gss	: Gramos de sólido seco
p/v	: Relación peso/ volumen
v/v	: Relación volumen/ volumen

INTRODUCCION

La importancia del sector del aceite de oliva ha aumentado a nivel mundial debido a sus beneficios nutricionales relacionados con la salud. Sin embargo, durante el cultivo del olivo la poda y el procesamiento del fruto del olivo, quedan sin aprovechar grandes cantidades de residuos agrícolas. Los principales subproductos son las hojas, cuya cantidad depende de diferentes factores, como el cultivo del olivo, las condiciones ambientales, la edad del árbol, las prácticas de poda, entre otros (Clodoveo et al., 2022; Talhaoui et al., 2015) lo que a menudo genera graves problemas económicos y medioambientales para los productores.

Interesantemente, las hojas de olivo contienen cantidades elevadas de compuestos fenólicos cuyas principales actividades biológicas han demostrado efectos antioxidantes y antiinflamatorios, así como la capacidad para tratar enfermedades cardiovasculares, trastornos hepáticos, obesidad y diabetes (Kabbash et al., 2023). También han demostrado actividades anticlastogénicas, propiedades de eliminación de radicales libres e inhibe el desarrollo de diferentes tipos de células tumorales (Cavaca et al., 2020; Jemai et al., 2009).

Diferentes tecnologías de extracción han sido estudiadas para recuperar estos compuestos bioactivos de las hojas de olivo. No obstante, los métodos convencionales como la extracción Soxhlet y maceración (sólido-líquido) tienen muchos inconvenientes, como largos tiempos de extracción, exposición de los extractos a un calor excesivo y el uso de solventes tóxicos como hexano, acetona y metanol. Frente a este escenario, se han desarrollado tecnologías nuevas y sofisticadas, con tiempos de extracción más cortos, menos consumo de solventes, sostenible, ecológico, eficiente, de bajo costo, fácilmente escalable a nivel industrial como la extracción asistida por ultrasonido (EAU) (Chemat et al., 2017; Valinger et al., 2022).

Por ello, el presente trabajo se enfoca en proponer el uso de solventes alternativos como el glicerol combinado con tecnologías alternativas de extracción (EAU) que permitan la obtención de extractos ricos en polifenoles a partir de hojas de olivo.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción y formulación del problema

En la actualidad, Perú cultiva ~28 000 hectáreas de árbol de olivo (MIDAGRI, 2022) siendo Tacna, Arequipa y Moquegua las regiones que presentan la mayor proporción de área cultivada con 176 423, 41 976 y 684 toneladas respectivamente (MIDAGRI, 2022). Esta producción tiene como finalidad la obtención de aceituna y aceite de olivo. Sin embargo, la producción de ambos genera diferentes residuos agroindustriales tales como ramas y hojas, las cuales pueden ser obtenidas durante la poda, cosecha y limpieza de las aceitunas (Özcan & Matthäus, 2017). En particular, las hojas de olivo no tienen aplicaciones industriales, por ello no presentan ningún valor comercial. Si bien su uso se limita a la fertilización de suelos, una gran proporción de estos residuos se acumulan y finalmente son incinerados, consecuentemente pueden representar riesgos ambientales y un problema de gestión ambiental (Ruiz et al., 2017).

Interesantemente, este residuo ha demostrado ser una fuente rica en polifenoles, los cuales han demostrado efectos benéficos para la salud debido sus propiedades antioxidantes, consecuentemente puede ser usado como agente anticancerígeno, antihipertensivo, antiinflamatorio, hipoglucemiante, antiviral, antimicrobiano y antitumoral (Özcan & Matthäus, 2017; Romero et al., 2015; Susalit et al., 2011; Zuntar et al., 2019). Por ello, estos compuestos son de interés para los sectores farmacéutico, alimentario y cosmético, consecuentemente desarrollar métodos de extracción de estos polifenoles es aun de interés para la industria.

Diferentes métodos de extracción han sido desarrollados a la fecha, los cuales pueden clasificarse como convencionales y alternativos (Guido & Moreira, 2017). El uso de técnicas de extracción convencionales (solido-líquido), son asociados al consumo excesivo de tiempo y energía, uso de solventes tóxicos no amigables con el medio ambiente (acetona, metanol, hexano) los cuales limitan su producción a gran escala como una alternativa para revalorizar este residuo agroindustrial (Fontana et al., 2013; Lama-Muñoz et al., 2019).

Las tecnologías limpias o verdes (Green Technology) como extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, fluidos supercríticos

(FS) y líquidos presurizados (PLE) podrían ser la solución frente a este escenario (Ameer et al., 2017; Putnik et al., 2017). En particular, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un método sostenible, eficiente, de bajo costo, fácilmente escalable a nivel industrial. El uso de agua pura a temperaturas moderadas (<80°C) combinado con la EAU ha superado los rendimientos de la extracción convencional (Ameer et al., 2017; da Rosa et al., 2019; Khadhraoui et al., 2021). No obstante, el efecto del uso de solventes alternativos como el etanol y glicerol sobre la recuperación de polifenoles presentes en hojas de olivo es aún una tarea pendiente por resolver.

Por ello, en el presente trabajo de investigación se propuso evaluar el efecto del uso de solventes alternativos (agua-etanol), (agua-glicerol) y temperatura, en un proceso de extracción asistida por ultrasonido (EAU) como factores que afectan la recuperación y selectividad de polifenoles presentes en hojas de olivo.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del uso de proporciones de etanol y glicerol sobre la recuperación de polifenoles de hojas de olivo mediante un proceso de extracción asistida por ultrasonido (EAU).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de mezclas agua – etanol (0, 15 y 30%) a temperaturas moderadas (50 y 70°C) sobre la recuperación de polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y perfil de polifenoles en hojas de olivo mediante un proceso de extracción asistida por ultrasonido (EAU).

- Evaluar el efecto de mezclas agua – glicerol (0, 15 y 30%) a temperaturas moderadas (50 y 70°C) sobre la recuperación de polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y perfil de polifenoles en hojas de olivo mediante un proceso de extracción asistida por ultrasonido (EAU).

1.3. Justificación e importancia

Si bien diversos trabajos de investigación han demostrado que las hojas de olivo son una excelente fuente natural de polifenoles específicos tales como oleuropeína, hidroxitirosol, flavonas, flavonoles y entre otros. Estos compuestos presentan potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria debido a sus propiedades nutraceúticas y bioactivas, consecuentemente su recuperación de estos polifenoles permitirá la revalorización de estos descartes agroindustriales, los cuales actualmente no presentan ningún valor comercial y representan un problema de gestión ambiental.

El uso de métodos alternativos como la extracción asistida con ultrasonido (EAU) combinado con el uso de solventes de grado alimentario (etanol y glicerol) no solo permitirá mejorar los rendimientos en la recuperación de polifenoles, sino también permitirá evitar el uso de solventes tóxicos como el metanol, acetona y hexano. Adicionalmente, los costos de proceso se verán significativamente reducidos para un futuro escalamiento industrial.

Además, el uso de diferentes concentraciones de etanol y glicerol permitirá comprender el rol de la polaridad del solvente sobre la recuperación de los polifenoles, considerando las interacciones polifenoles-solvente. Esto permitirá no solo mejorar significativamente los rendimientos sino también establecer mejores criterios para mejorar la selectividad de familias específicas de polifenoles.

1.4. Hipótesis

Es posible mejorar la recuperación y selectividad de los polifenoles específicos presentes en las hojas de olivo mediante un proceso de Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) combinado con el uso de etanol y glicerol como solventes alternativos y temperaturas moderadas.

1.5. Variables

Tabla 1. Variables dependientes e independientes

VARIABLE	DIMENSIÓN	NIVEL	ÍNDICE
Independiente	Solvente	Etanol, Glicerol	
	Relación	0, 15, 30	%
	Temperatura	50, 70	°C
Dependiente	Polifenoles totales		mgEAG/gss
	Capacidad antioxidante DPPH		mg/mL
	Capacidad antioxidante ORAC		µmolET/gss
	Azúcares reductores		mg/gss
	Perfil de polifenoles		µg/gss

Fuente: Elaboración Propia (2023)

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del problema

Apostolakis et al. (2014) evaluaron la eficiencia de mezclas calentadas de agua y glicerol en la extracción de polifenoles de hojas secas de olivo y su comparación crítica con metodologías previamente optimizadas. La concentración de glicerol y el tiempo de extracción se optimizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta, mientras que la evaluación comparativa de la eficiencia de extracción entre mezclas de agua/glicerol y agua/etanol se llevó a cabo mediante cinética. Los resultados mostraron que una mezcla de glicerol acuoso al 9,3% (p/v) a 80 °C proporcionó un rendimiento de extracción muy satisfactorio en polifenoles totales (51,91 mg de equivalentes de ácido gálico por g de peso seco), superior al obtenido con 60% (v/v) etanol acuoso, a pH 2 y 24°C. El análisis de cromatografía líquida y espectroscopia de masas mostró que el perfil polifenólico de la mezcla de agua y glicerol era significativamente diferente al de la mezcla de agua y etanol, una sólida evidencia de selectividad diferenciada.

Kowalska et al. (2021) el objetivo del estudio fue optimizar las condiciones para la extracción de polifenoles, flavonoides y clorofila de hojas de menta (*Mentha piperita L., Lamiaceae*) y de hojas de ortiga común (*Urtica dioica L., Urticaceae*) mediante química verde. Como resultado del uso de sistemas de glicerol-agua para la extracción de los compuestos activos ensayados de hojas de menta y hojas de ortiga, se obtuvieron con mayor frecuencia extractos con concentraciones más altas de polifenoles, flavonoides y clorofila, en comparación con el uso de solventes clásicos como como agua y etanol. Demostraron que la temperatura de extracción tiene una influencia significativa en la concentración de los componentes determinados en los extractos. Para obtener los valores más altos de los parámetros analizados, las hojas de menta piperita deben extraerse con una mezcla de glicerol-agua en las proporciones de 30,5:69,5 a una temperatura de 50 °C, mientras que las condiciones óptimas para la extracción de las hojas de ortiga común fueron las siguientes: proporciones glicerol-agua de 12,5:87,5 y temperatura de extracción de 20 °C. El estudio mostró que el glicerol

puede ser un solvente alternativo en la extracción de polifenoles, flavonoides y clorofila, reemplazando, por ejemplo, al etanol.

Rouhani (2019) evaluó las condiciones óptimas del procedimiento para la extracción de esteviósido de hojas secas de Stevia Rebaudiana. Este compuesto se extrajo por medio de un sistema de sonicación tipo sonda usando glicerol como un solvente verde y generalmente reconocido como seguro (GRAS). Los resultados demostraron que las condiciones óptimas para la extracción asistida por ultrasonido (UAE) de esteviósido de Stevia Rebaudiana son glicerol como solvente, temperatura de 70 °C, proporción de planta a solvente de 1:30, 200W potencia de irradiación de ultrasonidos y frecuencia de irradiación de ultrasonidos de 20 kHz. Como consecuencia, se concluyó que la extracción asistida por ultrasonido es un método eficiente, rápido y económico para la extracción de esteviósido de Stevia Rebaudiana en comparación con los métodos Soxhlet y maceración. Esta investigación presentó un modelo matemático y un enfoque experimental para la optimización del contenido de esteviósido de Stevia Rebaudiana mediante extracción asistida por ultrasonido y análisis HPTLC. Por lo tanto, el método demostrado en la presente investigación podría utilizarse para extraer el esteviósido de Stevia Rebaudiana en las industrias de alimentos y bebidas.

Giacometti et al. (2018) evaluaron la extracción asistida por ultrasonido (EAU) de polifenoles específicos tales como oleuropeína (OLE), verbascósido (VER) y luteolin-4-O-glucósido (L4OG) presentes en las hojas de olivo. Para tal fin, diferentes concentraciones de etanol (0-80%) fueron utilizados en un proceso de EAU. Los resultados muestran que el uso de etanol al 60% permite obtener altas concentraciones de polifenoles específicos con 13,38; 0,363 y 0,527 mg /gss para OLE, VER y L4OG, respectivamente. Adicionalmente, los resultados encontrados mejoraron en 32.6%, 41.8% y 47.5% la recuperación de polifenoles tales como OLE, VER y LU, respectivamente en comparación con la extracción convencional (Etanol: 80%). Por lo tanto, la EAU es un método eficaz para mejorar los rendimientos de OLE, VER y L4OG en extractos de hojas de olivo.

Cifá et al. (2018) investigaron la extracción de oleuropeína de hojas de olivo mediante un estudio de los efectos de diferentes parámetros de extracción asistida por ultrasonido (USAE) sobre el rendimiento en la recuperación de oleuropeína, en comparación con la extracción por maceración convencional. El rendimiento de oleuropeína se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución, y también se determinó el contenido de fenoles totales. Las condiciones optimizadas (agua-etanol, 30:70 [v/v]; relación hoja-disolvente, 1: 5 [p/v]; 2 h; 25 °C) proporcionaron ~ 30% más de rendimiento de extracción de oleuropeína en comparación extracción por maceración convencional. El contenido total de fenoles obtenido usando las condiciones optimizadas de EAU fue mayor que el reportado en otros estudios. Por lo tanto, la EAU se muestra como una alternativa eficiente a las técnicas de extracción por maceración convencionales, ya que no solo puede ofrecer un mayor rendimiento de extracción de oleuropeína, sino que también muestra una serie de ventajas particulares, como la posibilidad de menores volúmenes de disolvente y menores tiempos de extracción, con la extracción realizada a temperaturas más bajas.

Huamán-Castilla et al. (2020) evaluaron el efecto del uso de mezclas agua - glicerol como solventes en proceso de extracción subcrítica a altas temperaturas (90-150°C) sobre la recuperación de polifenoles específicos de bajo peso molecular (monómeros) presentes en orujo de uva. Los resultados demostraron que las mezclas agua-glicerol fueron entre 10% y 30% más efectivos para recuperar polifenoles en comparación con las mezclas agua-etanol bajo las mismas condiciones. Las condiciones óptimas de extracción fueron 150°C, con 32.5% de glicerol para flavonoles y 50% para flavanoles, estilbenos y ácidos fenólicos todos compuestos de bajo peso molecular. Asimismo, el análisis computacional demostró que el glicerol presenta tres grupos hidroxilo en su estructura que le permite realizar un mayor número interacciones intermoleculares con los grupos funcionales de los diferentes polifenoles.

2.2. Bases teóricas sobre el trabajo de investigación

2.2.1. La hoja de olivo: un residuo generado por la industria

Según el Consejo Oleícola Internacional (IOC), la producción mundial de aceite de oliva y aceitunas de mesa en la campaña agrícola 2019-2020 se estiman entre 3,1 y 2,7 millones de toneladas (Mt), respectivamente (Gullón et al., 2020; Lama-Muñoz et al., 2020). Si bien esta actividad agroindustrial desempeña un papel importante en el ámbito económico y social de varios países, también genera grandes cantidades de subproductos o residuos agroindustriales como ramas y hojas obtenidas tanto de poda de aceitunos como de cosecha y limpieza de aceitunas (Özcan & Matthäus, 2017). Estos residuos tienen un impacto negativo en el medio ambiente debido a problemas de acumulación y producción de gases de efecto invernadero (Lama-Muñoz et al., 2020). En general, las hojas de olivo procedente de la poda es la biomasa más importante obtenida del propio cultivo (Ruiz et al., 2017). La poda del olivo es una operación imprescindible que se suele realizar para eliminar las ramas y hojas viejas e improductivas. Se ha estimado que la poda produce anualmente 25 kg de subproductos (ramitas y hojas) por árbol. Un lote típico de poda de olivo incluye 6.25 kg de hojas (aproximadamente 25% en peso), 12.5 kg de ramas delgadas (aproximadamente 50% en peso) y 6.25 kg de ramas gruesas o madera (aproximadamente 25% en peso), aunque las proporciones pueden variar según las condiciones de cultivo, árbol edad, producción y práctica de poda local (Espeso et al., 2021; Talhaoui et al., 2015).

2.2.2. Polifenoles presentes en las hojas de olivo

Los polifenoles son compuestos bioactivos presentes de forma natural en diferentes matrices vegetales (Landete, 2012; Nazzaro et al., 2020). La estructura química de estos compuestos contiene uno o más anillos de benceno con al menos un grupo hidroxilo, cuyos pesos moleculares pueden variar entre 200Da y 500kDa (Liu, 2013). La concentración de polifenoles presentes en las hojas de olivo puede variar debido a diferentes factores tales como la zona de cultivo, prácticas agronómicas, edad de la hoja, las condiciones climáticas, etapa de desarrollo de la hoja, las condiciones de almacenamiento y otros parámetros

abióticos (Tabla 2) (Molina-Alcaide & Yañez-Ruiz, 2008; Souilem et al., 2017; Talhaoui et al., 2015).

Tabla 2. Contenido total de polifenoles presentes en hojas de olivo

Variedad de hojas de olivo o sitios geográficos	Contenido Total de Polifenoles (mg GAE/g de hoja seca)	Referencia
Chétoui[a]	24.36 ± 0.85	Abaza et al., 2011
Serrana[a]	66 ± 8	Ahmad-Qasem et al., 2013
Ayvalık[b]	43.82	Şahin et al., 2015
Sevilla[b]	58.7	Herrero et al., 2011

[a] Variedad de hojas de olivo

[b] Sitios geográficos

2.2.2.1. Clasificación de diferentes familias de polifenoles

Las hojas de olivo contienen una gran variedad de polifenoles de alto y bajo peso molecular. Dentro del grupo de familias de polifenoles podemos mencionar: secoiridoides, flavones, flavonoles, flavanoles y ácidos fenólicos, los cuales se detallan en la Figura 1 (Şahin et al., 2015; Souilem et al., 2017).

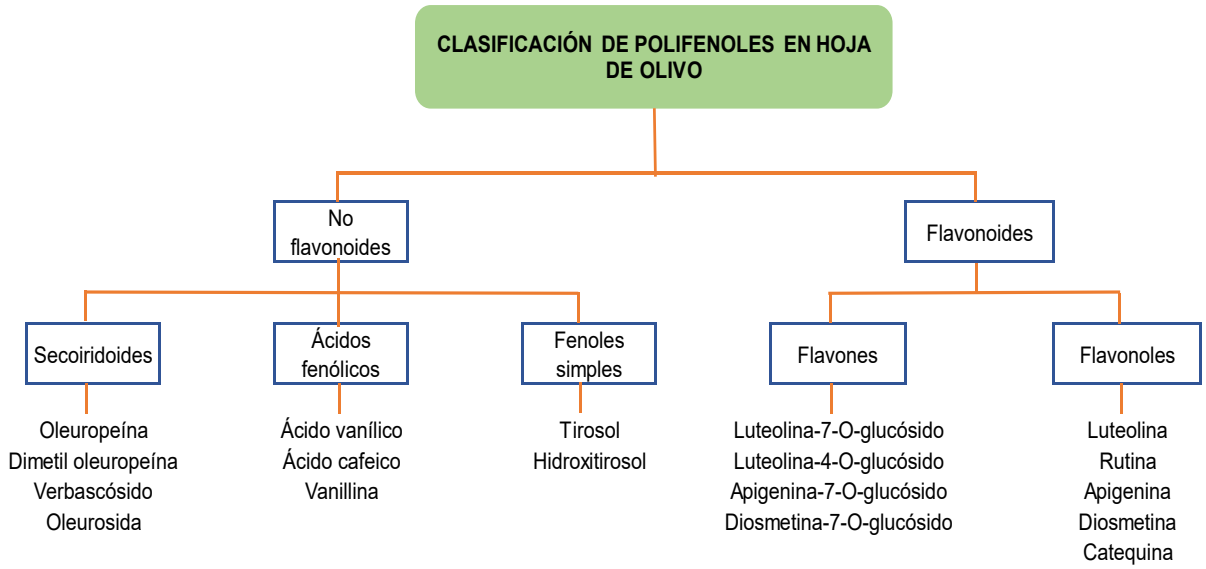


Figura 1. Polifenoles presentes en hojas de olivo

Fuente : Adaptado de (Şahin et al., 2015; Souilem et al., 2017)

2.2.2.2. Propiedades bioactivas presentes en hojas de olivo

Este residuo ha demostrado ser fuente rica en polifenoles naturales y beneficiosa para la salud debido a que muestran distintos efectos biológicos (Tabla 3).

Tabla 3. Propiedades bioactivas de algunos polifenoles específicos

Polifenol específico	Efectos relacionados con la salud	Autor
Oleuropeína	Previene las enfermedades cardíacas al proteger la membrana de la oxidación de los lípidos, así como también es eficaz contra diversas cepas de bacterias, virus, hongos. Interesantemente, la oleuropeína ha demostrado fuertes propiedades antiangiogénicas en pacientes con cáncer. Presenta propiedades de eliminación de radicales libres e inhibe el desarrollo de diferentes tipos de células tumorales. Además, muestra la eficacia para el tratamiento de diabetes tipo 2 al reducir el azúcar en la sangre y mejorar la secreción y la sensibilidad a la insulina.	(Cavaca et al., 2020; El & Karakaya, 2009; Gorzynik-Debicka et al., 2018; Jemai et al., 2009; Souilem et al., 2017)
Ácido cafeico (CA)	Estudios in vitro e in vivo han demostrado la actividad anticancerígena de este compuesto frente a un importante tipo de cáncer (hepatocarcinoma). Las propiedades anticancerígenas del CA están asociadas a su capacidad antioxidante y prooxidante, atribuida a su estructura química que tiene hidroxilos fenólicos libres, el número y posición de OH en el grupo catecol y el doble enlace en la cadena carbónica.	(Fırat et al., 2019; Monteiro Espíndola et al., 2019; Rajendra Prasad et al., 2011)
Hidroxitirosol (HT)	Es una molécula con importantes propiedades antioxidantes contra especies reactivas de oxígeno/nitrógeno. Interesantemente, esta molécula también ha demostrado prevenir el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Además, protege contra la aterosclerosis y previene la neuropatía diabética.	(Cavaca et al., 2020; Gorzynik-Debicka et al., 2018; Jemai et al., 2009; Robles-Almazan et al., 2018; Souilem et al., 2017)

Luteolina-7- O-glucósido	Muestra efectos antiinflamatorios y anticancerígenos específicos. La luteolina puede retrasar o bloquear el desarrollo de células cancerosas in vitro e in vivo mediante la protección frente a estímulos cancerígenos, mediante la inhibición de la proliferación de células tumorales.	(Luo et al., 2017; Seelinger et al., 2008)
Catequina	Actúan como anticancerígenos mediante la eliminación de antioxidantes de los radicales libres, la supresión de oncogenes y la formación de tumores, la inducción de la apoptosis, la modulación de la actividad enzimática relacionada con la desintoxicación, la oxidación y la reducción, la estimulación del sistema inmunitario y la reparación del ADN, y la regulación del metabolismo hormonal	(Higdon & Frei, 2003; Isemura, 2019; Zanwar et al., 2014; Zhang et al., 2022)
Resveratrol	Ayuda a prevenir el cáncer al eliminar los radicales libres que inducen daño en el ADN. Tiene efectos beneficiosos para hipertensión, accidente cerebrovascular, arritmia, cardiotoxicidad inducida por quimioterapia, miocardiopatía diabética, e insuficiencia cardíaca. Además, se ha encontrado que protege contra enfermedades cardiovasculares y neurológicos.	(Dayangac et al., 2009; Kores et al., 2019; Zordoky et al., 2014)
Kaempferol	Tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cardiovasculares y neuroprotectoras. Debido a su parecido con la hormona estrógeno, también se puede utilizar para el tratamiento de cánceres regulados por hormonas, como el de ovario, mama, cuello uterino, carcinoma hepatocelular y leucemia.	(Calderón-oliver& Ponce-alquicira, 2018; Lescano et al., 2019; Shields, 2017)
Procianidinas	Poseen excelentes propiedades farmacológicas, como propiedades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias y antitumorales, por lo que pueden usarse para tratar diversas enfermedades, incluida la enfermedad de Alzheimer, diabetes, artritis reumatoide, tumores y obesidad.	(Badeggi et al., 2020; Chen et al., 2022; Ma & Zhang, 2017; María et al., 2014)

2.2.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se utiliza para referirse a la capacidad de los compuestos para reaccionar con los radicales libres. Estos antioxidantes previenen la formación de radicales libres o eliminan especies reactivas de oxígeno (ROS), protegiendo así los daños celulares del estrés oxidativo y reduciendo el riesgo de cáncer, enfermedad cardíaca, diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc. (Pozo-Martinez et al., 2022; Zrinski et al., 2020).

Los polifenoles son ampliamente reconocidos por su actividad antioxidante, así como por su contribución a la mejora de la salud humana y actúan como quelantes de iones metálicos o captadores de radicales libres que neutralizan especies reactivas de oxígeno peligrosas mediante la donación de un electrón (Pozo-Martinez et al., 2022). Ambas actividades son responsables de las propiedades antioxidantes, que pueden ser útiles para evaluar la calidad de los alimentos o en la realización de las características beneficiosas de los productos (Li et al., 2014; Zrinski et al., 2020).

Hasta el momento, se han desarrollado muchos métodos analíticos para la evaluación de propiedades antioxidantes de matrices vegetales. En general, se basan en la capacidad de eliminación de los radicales libres: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), o en los potenciales de reducción de los compuestos: FRAP (Potencial Antioxidante Reductor Férrico), Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica (HPLC-ECD) (Ávách et al., 2011).

A. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

El modelo de eliminación de radicales DPPH es un método ampliamente utilizado para evaluar la actividad antioxidante de compuestos naturales y extractos de plantas. El grado de decoloración indica la capacidad de eliminación del extracto antioxidante, como resultado de su capacidad de donación de hidrógeno (Das et al., 2014).

El DPPH es una molécula portadora de nitrógeno radical, el electrón impar del átomo de nitrógeno en DPPH se reduce al recibir un

átomo de hidrógeno de los antioxidantes correspondiente (Contreras-Guzmán & Strong, 1982). El DPPH se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón sobrante sobre la molécula como un todo (Fig. 2), de modo que las moléculas no se dimerizan, como la mayoría de los demás radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta intenso, con una absorción en solución de metanol alrededor de 517 nm. Una vez que interactúe con un antioxidante que son una fuente de hidrógeno (por ejemplo, polifenoles), da como resultado la reducción de DPPH y pierde el color violeta para convertirse en difenilpicrilhidrazina (no radical) con un color amarillo claro residual del grupo picril (Baliyan et al., 2022; Pohanka, 2023).

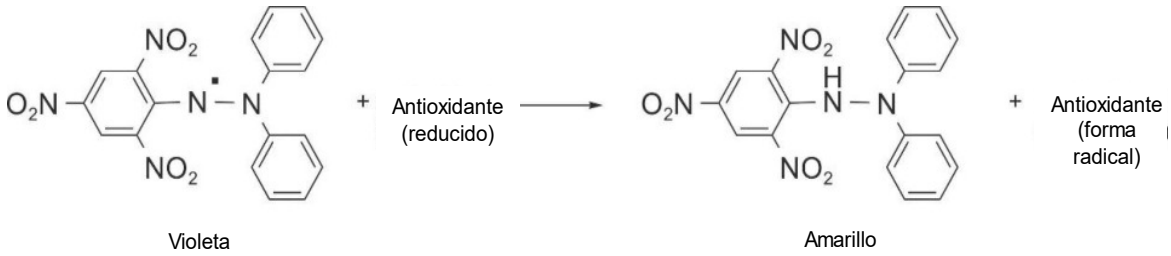


Figura 2. Principio del método DPPH

Fuente: (Pohanka, 2023)

B. ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)

El método ORAC es uno de los métodos más utilizados para estimar la capacidad secuestrante de radicales peroxilo debido a la similitud que presenta con el mecanismo de degradación oxidativa de los lípidos (Prior, 2015).

Este método se basa en medir la capacidad de transferir átomos de hidrógeno a radicales peroxilo (ROO·) generados por termólisis del AAPH, es una reacción cinética competitiva que involucra un generador de radicales libres sintéticos, una sonda molecular oxidativa (sonda de fluorescencia) y un antioxidante. De esta forma, se mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, como la fluoresceína, tras mezclarla con un generador de radicales libres como AAPH. El

antioxidante reacciona con los radicales peroxilos, retarda la oxidación de la fluoresceína y consecuentemente evita la pérdida de fluorescencia.

Finalmente, el grado de protección antioxidante se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar (un análogo de la vitamina E) (Huang et al., 2005; Pozo-Martinez et al., 2022).

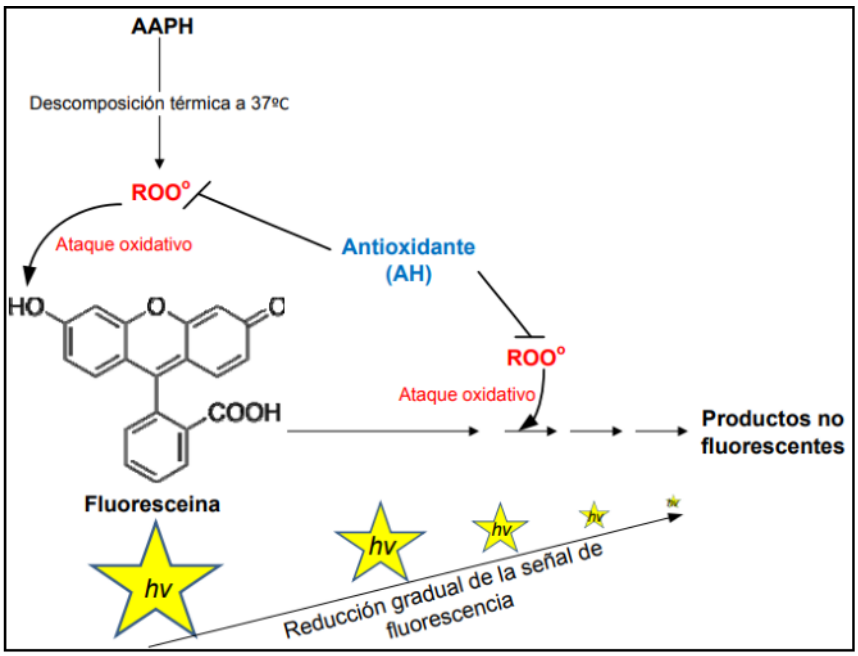


Figura 3. Mecanismo método ORAC

Fuente: (Pacheco, 2011)

2.2.4. Azúcares reductores

Los azúcares reductores son principalmente moléculas reductoras, poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) y un grupo hemiacetal, se caracterizan por sus funciones aldehído y cetona libre (alta reactividad del grupo carbonilo), poseen al menos un grupo hidroxilo (-OH). Los azúcares reductores incluyen glucosa, fructosa y galactosa como monosacáridos y lactosa y maltosa como disacáridos (Bener et al., 2018).

La glucosa es un polihidroxialdehído y la fructosa es una polihidroxicetona. A los polihidroxialdehídos se les llaman aldosas (ald- es por aldehído y -osa es el sufijo para un azúcar) y a las polihidroxicetonas se les llaman cetosas (cet- por cetona y -osa por el azúcar). Se utilizan las proyecciones de Fischer para visualizar la estereoquímica en todos los átomos de carbono asimétricos (Charrez et al., 2015; Wade, 2011).

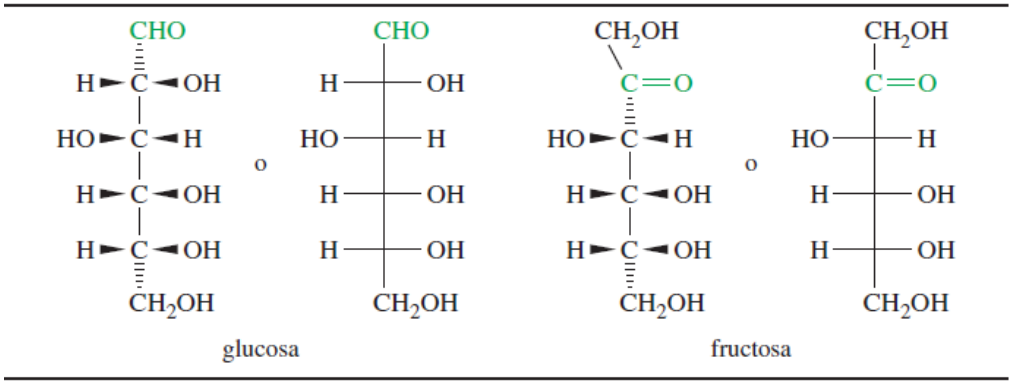


Figura 4. Proyección de Fischer de glucosa y fructosa

Fuente: (Wade, 2011)

Las moléculas hidroxiladas presentan una configuración estérica específica que les permite ser identificadas y cuantificadas en base a reacciones de óxido – reducción o a sus propiedades cromatográficas. Entre estas tenemos la prueba de Benedict, Prueba de Fehling, Prueba de Tollens, Método del DNS, Técnica cromatográfica HPLC (Bener et al., 2018; Wiercigroch et al., 2017).

2.2.5. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC)

La cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (Ultra High Performance Liquid Chromatography) es un avance importante en la cromatografía debido a la velocidad, resolución y sensibilidad significativamente mejoradas. Es un método de separación física en el que los componentes de una mezcla se separan por su distribución entre dos etapas; una fase estacionaria y una móvil. Se usa con frecuencia para separar, identificar y cuantificar compuestos de interés (Guijt, 2017; Nováková et al., 2017).

Mecanismo

UHPLC utiliza columnas empaquetadas con partículas porosas de menos de 2 µm (generalmente 1,8 µm) para aumentar enormemente el rendimiento y el poder de resolución en comparación con las columnas convencionales de 5 µm. Contiene material cromatográfico o fase estacionaria y una bomba que trabaja a presiones altas (6000 psi) para mover el eluyente o fase móvil a través de la columna. La separación se basa en las diferencias de retención entre los analitos, que depende de las propiedades del analito, el disolvente y la fase estacionaria utilizada. Por lo

general, se coloca un detector después de la columna para determinar los tiempos de retención de los analitos. El uso de velocidad, partículas con radio pequeño y número máximo de picos resolubles (capacidad de pico) comprende la eficiencia junto con la resolución. UHPLC reduce el consumo de volumen de fase móvil en al menos un 80 % en comparación con HPLC con un tiempo de ejecución muy corto (incluso menos de 1 min). Las partículas más pequeñas aumentan la presión, lo que por sí solo puede aumentar el factor de retención de la separación. Se requiere un volumen de inyección más bajo en la UHPLC. La temperatura más alta de la columna reduce la viscosidad de la fase móvil, lo que da como resultado un coeficiente de difusión y una velocidad de flujo altos sin una pérdida significativa en la eficiencia y un aumento en la contrapresión de la columna (Rahman, 2018).

La robustez y fiabilidad en combinación con la versatilidad han hecho de la UHPLC la técnica de separación aplicada con más frecuencia en el análisis químico. También presenta una alta capacidad de automatización y un aumento de resolución (De la Guardia & Armenta, 2011; Shockcor et al., 2017).

2.2.6. Métodos de extracción de Polifenoles

La extracción es el paso inicial en el aislamiento de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales, su objetivo principal es proporcionar el máximo rendimiento y la más alta calidad en la recuperación de compuestos bioactivos como los polifenoles (Soto et al., 2011). Los polifenoles se encuentran en las vacuolas celulares, las cuales están protegidas por paredes de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Braidot et al., 2011). En ese sentido, el método de extracción empleado para su recuperación debe romper estas paredes para liberar estos compuestos (Gao et al., 2019).

A la fecha han sido desarrollados diferentes métodos de extracción, los cuales se pueden clasificar en métodos convencionales cuyas temperaturas no superan el umbral de los 80°C con tiempos relativamente prolongados (>2h) y los métodos alternativos que operan a diferentes temperaturas y presiones relativas subcríticas y supercríticas con tiempos relativamente corto (< 30min) (Ameer et al., 2017).

Además, la extracción de polifenoles también está influenciada por diversos factores tales como la naturaleza química de los compuestos, técnica de extracción, solvente de extracción, naturaleza de los componentes de interés, propiedades fisicoquímicas de la matriz, disponibilidad de reactivos y equipos, costo y problemas de seguridad (Musa & Abdullah, 2011).

2.2.6.1. Métodos convencionales

A. Extracción convencional (Sólido- Líquido)

La extracción convencional (sólido-líquido) utiliza solventes orgánicos para obtener extractos ricos en polifenoles de diferentes matrices vegetales (Babbar et al., 2014; Do et al., 2014; A. Fontana et al., 2017). Si bien es de fácil uso y escalamiento a nivel industrial, genera el uso de grandes volúmenes de solventes, los cuales por lo general no son aptos para alimentos (acetona, metanol y hexano) y no son amigables con el medio ambiente (Soquetta et al., 2018). Por ello, el desarrollo de tecnologías alternativas (Green Technologies) que permitan la recuperación de polifenoles a bajos costos de producción, aptos para consumo humano y amigables con el medio ambiente siguen siendo una tarea pendiente para la industria de alimentos y farmacéutica (Dobrinčić et al., 2020). Por ejemplo, el uso de 70% etanol a 25°C por un periodo de 120 min permite obtener importantes concentraciones de polifenoles totales (32.7 mg GAE/g de materia seca de hojas de olivo) (Cifá et al., 2018). Resultados similares también fueron reportados por (Yancheva et al., 2016) quienes mencionan que el uso de 70% metanol, 15 min, a 70°C permite la obtención de concentraciones importantes de polifenoles (15.6 ± 0.5 mg GAE/g de hoja seca de olivo).

Por ello, la extractabilidad de los polifenoles depende de muchos factores, tales como la polaridad del solvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la estructura química de los polifenoles (Bosso et al., 2016; Roselló-Soto et al., 2019).

B. Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet se considera como un proceso de lixiviación. El principio de funcionamiento del aparato Soxhlet se muestra en la figura 5. Las muestras pulverizadas se colocan en envases (de celulosa) y se colocan en la cámara de extracción justo encima del matraz colector debajo de un condensador de reflujo. Luego, el solvente ya agregado a la botella calefactora se calienta para producir vapor que se condensará bajo agua corriente fría y volverá a caer en los timbales que contienen la muestra (Azwanida, 2015). El reflujo se mantiene individualmente y finalmente el extracto acuoso se recupera del matraz calefactor. Al ser un proceso continuo, la extracción soxhlet es ventajosa porque requiere menos tiempo y menos solvente en comparación con los métodos de percolación y maceración (Azwanida, 2015).

Sin embargo, informes han resaltado la influencia del exceso de calor afecta el contenido de los polifenoles termolábiles (Seidel, 2012). Sin embargo, este método de extracción a menudo es criticado por el uso de un gran volumen de solvente que eventualmente causa problemas ambientales además de un mayor costo involucrado y un largo período de tratamiento (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). Además, la exposición excesiva a la luz y al oxígeno conduce a la degradación de otros compuestos sensibles (Denery et al., 2004). Por ello, el desarrollo de métodos alternativos amigables con el medio ambiente es aún una tarea pendiente por resolver.

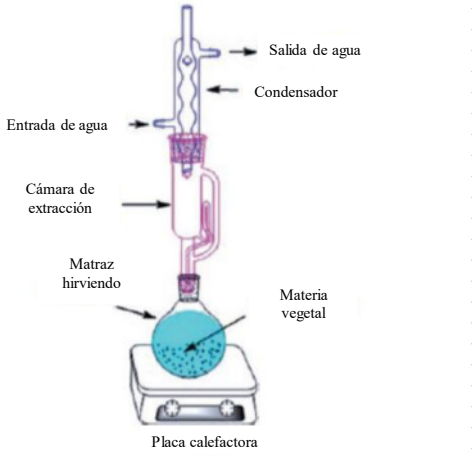


Figura 5. Representación Método Soxhlet

Fuente: (Alara et al., 2021)

2.2.6.2. Métodos alternativos

A. Extracción por Líquidos presurizados (PLE)

La extracción líquida presurizada es una tecnología alternativa de grado alimentario y amigable con el medio ambiente que permite reducir los tiempos de extracción y los volúmenes de solventes, así como mejorar el rendimiento de extracción de los polifenoles hasta en un 200% en comparación con la extracción convencional (Ameer et al., 2017; Plaza & Turner, 2015). Este método requiere el uso de alta temperatura y presión (~10 MPa), el cual mantiene el solvente en estado líquido, reduciendo significativamente su polaridad, favoreciendo su difusión en la matriz vegetal mejorando la extractabilidad de los polifenoles (Plaza & Turner, 2015). A medida que aumenta la temperatura, la constante dieléctrica del solvente disminuye, por lo que disminuye la polaridad del solvente (Joana Gil-Chávez et al., 2013). Además, el uso de PLE permite la obtención de extractos de grado alimenticio obtenidos solo cuando se usa agua u otros solventes GRAS (generalmente reconocidos como seguros), como el etanol (Plaza et al., 2010). No obstante la PLE es influenciada por las características del solvente, la temperatura de extracción y la estructura química de polifenoles (Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, Mart, et al., 2019). Sin embargo, existen diversas limitaciones de PLE, los cuales son la baja selectividad de analitos durante la extracción, la presencia de interferentes durante el proceso de extracción, el alto nivel de dilución de extractos, especialmente cuando se utilizan varios ciclos, y la necesidad de instrumentación avanzada, que conlleva a un proceso costoso. A pesar de estas limitaciones, la extracción de líquido presurizado es un método de extracción común que se ha utilizado de forma independiente para extraer polifenoles a través de diversas fuentes (Alara et al., 2021; Erdogan et al., 2011; Liazid et al., 2014).

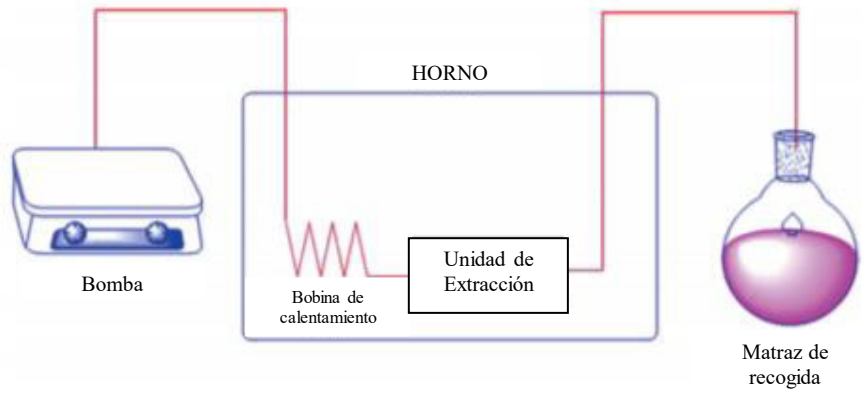


Figura 6. Representación de PLE

Fuente: (Alara et al., 2021)

B. Extracción Asistida por Microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas implica el uso de energía de radiación de microondas para calentar la mezcla de soluto-solvente. Las microondas son radiación electromagnética no ionizante con una frecuencia en el rango de 300 a 300 000 MHz, que corresponde a una longitud de onda (λ) de 1 mm a 1 m (Sanseverino, 2002). En la MAE, el calentamiento se produce de manera selectiva y dirigida, prácticamente sin pérdida de calor debido al sistema cerrado. Cuando la humedad se calienta dentro de las células de la planta, el agua se evapora y genera una presión tremenda en la pared de las células, lo que lleva a la ruptura y fácil lixiviación de los fitoconstituyentes (Mandal et al., 2007). Además, el calor se disipa volumétricamente y todas las moléculas expuestas a la radiación se ven afectadas directamente (Alupului et al., 2012). Una correcta elección del disolvente es fundamental para obtener un proceso de extracción óptimo y está determinada por la solubilidad del analito objetivo, la interacción entre el disolvente y la matriz de la planta y las propiedades de absorción de microondas del disolvente. En consecuencia, el disolvente debe tener una buena selectividad hacia el analito de interés y excluir los componentes de la matriz no deseados; ser compatible con otros pasos analíticos cromatográficos; y tener propiedades dieléctricas apropiadas (Sanseverino, 2002). El volumen del solvente también es un factor crítico. Eso debe ser suficiente para asegurar que la matriz vegetal esté siempre completamente sumergida. El mecanismo de calentamiento único de MAE puede reducir

significativamente el tiempo de extracción y, por lo tanto, minimizar la degradación de los componentes objetivo. También proporciona una mayor eficiencia y selectividad de extracción, lo que implica un bajo consumo de disolventes orgánicos.

La MAE es entonces una técnica prometedora en comparación con los métodos de extracción convencionales por ser económicamente viable, rápido y utilizado en una producción a escala industrial, pero se necesita una elección cuidadosa de la temperatura y la duración del calentamiento. (Talhaoui et al., 2015)

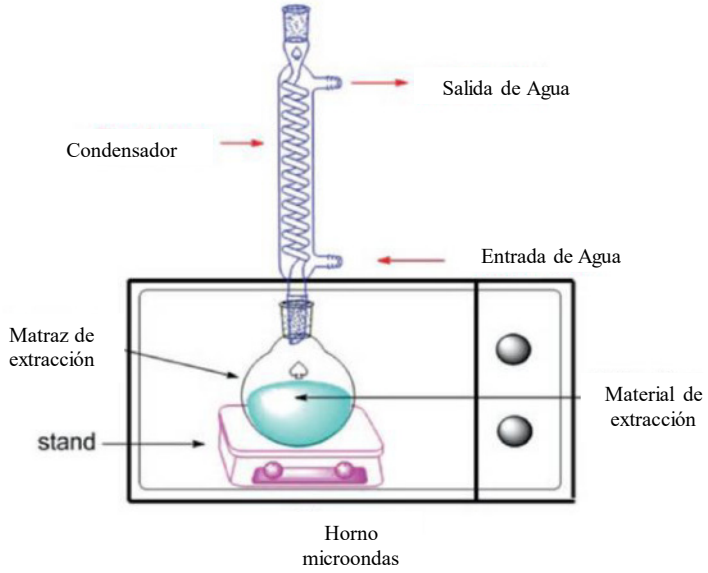


Figura 7. Representación de MAE

Fuente: (Alara et al., 2021)

C. Extracción con Asistencia de Ultrasonido (EAU)

La EAU ha surgido como una técnica prometedora que cumple los criterios requeridos como técnica de extracción verde económica. Las características notables de los EAU incluyen versatilidad, simplicidad, seguridad, rapidez, respeto por el medio ambiente y rentabilidad, debido al menor consumo de tiempo, energía y costosos disolventes orgánicos, lo que contrasta con las técnicas de extracción tradicionales (Ameer et al., 2017).

- **Principios y Mecanismo de Acción por EAU**

El ultrasonido se basa en la propagación de ondas mecánicas, formadas por un conjunto de ciclos definidos como la combinación de presiones altas y

bajas, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente (Awad et al., 2012; Musielak et al., 2016). Las principales características de las ondas de ultrasonido son:

- Longitud: distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción.
- Amplitud: altura máxima de una ola.
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): producto de la frecuencia por la longitud de onda.
- Potencia (W): relación entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad: relación de una unidad de potencia en una unidad de área (W/cm2).

El espectro de ondas que intervienen en el ultrasonido se denomina ondas ultrasónicas y las frecuencias de estas ondas son las que están por encima del rango audible (> 20 kHz) y por debajo de las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz). La magnitud de la frecuencia relacionada con el efecto de ultrasonido, es decir, frecuencias inferiores a 20 a 100 kHz, está dominada por efectos físicos y se utiliza comúnmente en técnicas analíticas no destructivas. Por otro lado, las frecuencias de 200 a 500 kHz están dominadas por efectos químicos. Entre las principales aplicaciones reportadas para los ultrasonidos se encuentran: emulsificación, cristalización, cinética de reacciones, fermentaciones y extracción de compuestos. Es la última aplicación que es el centro de nuestro interés (Ameer et al., 2017).

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) tiene la fuerza de cavitación acústica como la principal fuerza impulsora; es capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del presente solvente, provocando la formación de burbujas como resultado de cambios de temperatura y presión (Chemat et al., 2017).

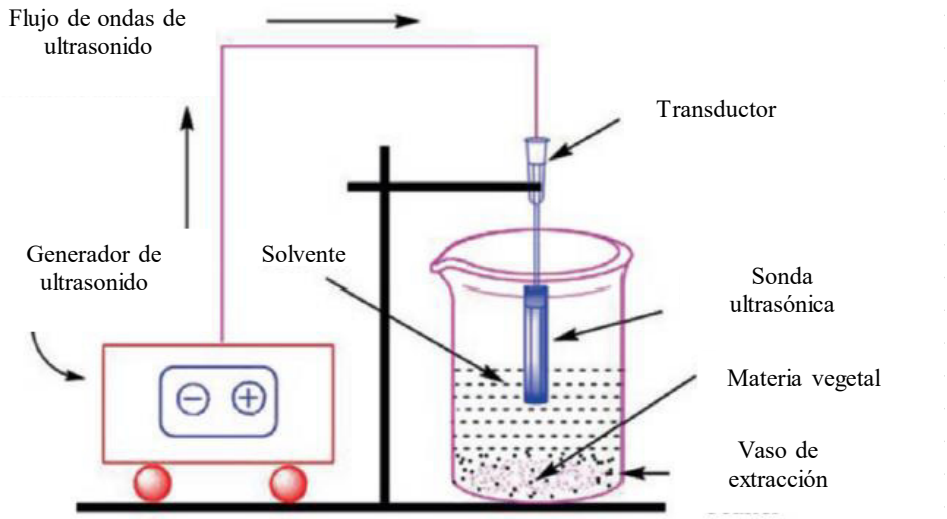


Figura 8. Representación de EAU

Fuente: (Alara et al., 2021)

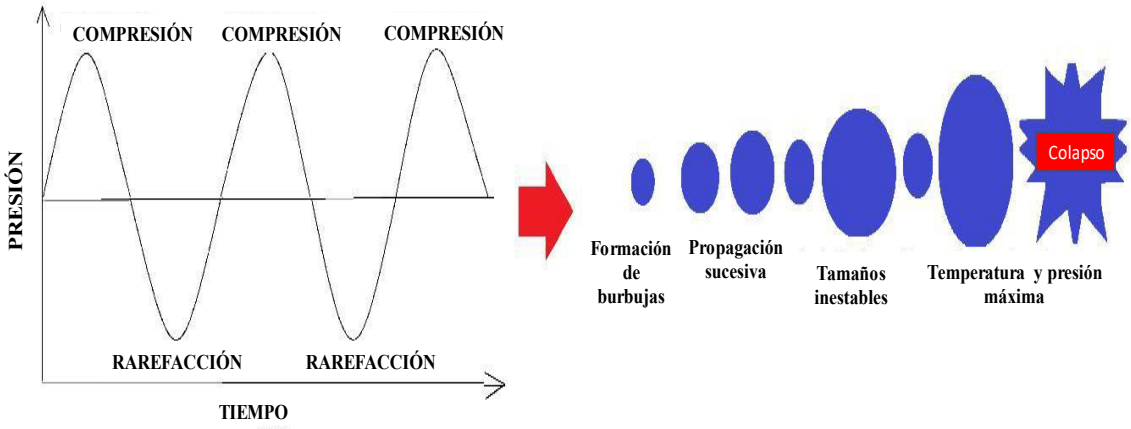


Figura 9. Principio de cavitación acústica

Fuente: Modificado por (Soria & Villamiel, 2010)

En general, se han identificado varios mecanismos involucrados en EAU. Una de las posiciones de nuestro mecanismo es la fragmentación atribuida a las colisiones entre partículas y ondas ultrasónicas, lo que provoca una reducción del tamaño de partícula, facilitando así la transferencia de masa. Otro es la erosión que ayuda a mejorar la accesibilidad del solvente implosionando las burbujas en la superficie de la matriz de la planta. Sono-capilaridad y Sonoporación, son capaces de mejorar la penetración de líquido a través de los canales producidos por la implosión de burbujas y la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares, respectivamente.

Finalmente, el mecanismo de pura tensión produce el colapso de la burbuja de cavitación en el fluido, debido al fenómeno de oscilación (Figura 10) (Khadhraoui et al., 2021; Medina-Torres et al., 2017).

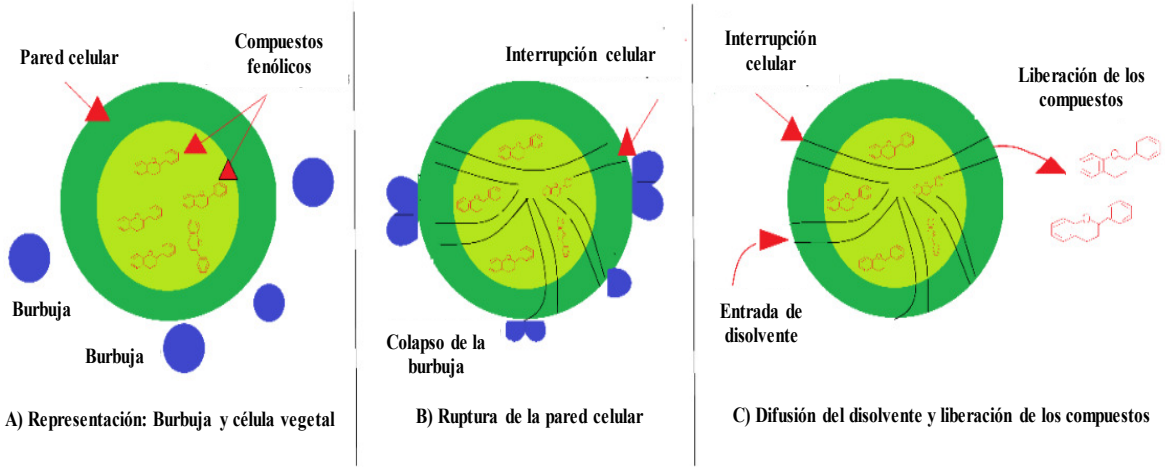


Figura 10. Representación gráfica de la burbuja de cavitación colapsando y liberando material vegetal en tres pasos

Fuente: Modificado por (Shirsath et al., 2012)

La irradiación ultrasónica se puede aplicar de dos formas: por contacto directo con la muestra a través de las paredes donde está contenida la muestra (indirectamente) como los sistemas de baño ultrasónico. La principal desventaja del baño ultrasónico es que generalmente opera a una sola frecuencia (20 o 40 kHz).

Sin embargo, existen sistemas de extracción más eficientes, como el sistema de Ultrasonido acoplado a una sonda, donde el contacto directo con la muestra permite que ésta desarrolle una potencia hasta 100 veces mayor que la proporcionada en el baño de ultrasonidos (Khadhraoui et al., 2021).

- **Factores que afectan la EAU**

Según Medina-Torres et al. (2017) describen que los parámetros que afectan la extracción asistida por ultrasonido son:

a) Solventes

El uso de solventes verdes eco-amigables con el medio ambiente tales como etanol, glicerol, isopropanol, entre otros, han permitido reducir las temperaturas de operación y mejorar los rendimientos de extracción (Huaman-Castilla, Mart, et al., 2019).

En particular, para la EAU es necesario considerar algunos parámetros fisicoquímicos tales como viscosidad, tensión superficial, presión de vapor del solvente y la solubilidad. Estos parámetros afectarán la cavitación acústica en la EAU. Entonces, cuanto mayor sean las fuerzas cohesivas (viscosidad y tensión superficial), menor será la cavitación dentro del sistema. Por ello, a continuación, se detallan las propiedades del etanol y glicerol, los cuales son tema objetivo del presente proyecto.

- **Etanol**

El etanol (C_2H_5OH) es un tipo de compuesto químico que contiene el grupo hidroxilo (-OH), el cual en una situación de presión y de temperatura normal, se caracteriza por ser un líquido incoloro e inflamable en un punto de ebullición de 78 °C. Cuando se lo soluciona en agua se lo suele usar como disolvente y en la elaboración de bebidas alcohólicas. El etanol se utiliza ampliamente como un disolvente versátil, miscible con agua y con muchos disolventes orgánicos incluyendo ácido acético, acetona, benceno, tetracloruro de carbono, cloroformo, dietil éter, etilén glicol, glicerol, piridina y tolueno (Kerton y Marriot, 2014).

Tabla 4.Características fisicoquímicas del etanol

Solvente	Temperatura de ebullición (°C)	Temperatura de inflamación (°C)	Viscosidad a 20 °C (Cp)	Tensión superficial (dina/cm)	Presión de vapor (m Hg a 20°C)	Constante dieléctrica A 20 °C (ε)
Etanol	78	16	1.08	22.9	40	24

Fuente: (Kerton & Marriot, 2014)

- **Glicerol**

El glicerol $(C_3H_8O_3)$ denominado también, 1,2,3-trihidroxipropano o 1,2,3- propanotriol, es un polialcohol, un alcohol que posee tres grupos hidroxilos (-OH) y que es conocido comercialmente como glicerina. Se trata de un compuesto líquido a temperatura ambiente, viscoso, incoloro, inodoro y ligeramente dulce. La presencia de los tres grupos hidroxilo le hace ser higroscópico, fácilmente soluble en agua y alcoholes, ligeramente soluble en disolventes orgánicos como éteres y dioxanos, e insoluble en hidrocarburos.

Es una molécula altamente flexible, capaz de formar enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. El empleo de glicerol como disolvente presenta por otra parte varios inconvenientes, como es su alta viscosidad (1490 cP a 20 ° C) y la baja solubilidad de compuestos y gases altamente hidrófobos, hecho que limita sus posibles aplicaciones. El inconveniente de la viscosidad se supera usualmente calentando por encima de 60 °C o usando co-disolventes. También se puede conseguir utilizando ultrasonidos de alta intensidad o microondas (Lafuente Aranda, 2017).

Tabla 5. Características fisicoquímicas del glicerol

Solvente	Temperatura de ebullición (°C)	Temperatura de inflamación (°C)	Viscosidad a 20 °C (Cp)	Tensión superficial (dina/cm)	Presión de vapor (m Hg a 20°C)	Constante dieléctrica A 20 °C (ε)
Glicerol	290	160	1.490	59.4	0.0025	42.5

Fuente: (Kerton & Marriot, 2014)

b) Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que intervienen en la EAU. En general, un aumento en esta variable se correlaciona con mejoras en los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos debido a: la inducción de rupturas de enlaces de la matriz, aumento de la solubilidad del compuesto, velocidad de difusión del solvente, transferencia de masa y reducción de la viscosidad y tensión del solvente (Medina-Torres et al., 2017). Aunque la temperatura puede aumentar la transferencia de masa durante la extracción, también puede promover mayores tasas de degradación de los compuestos obtenidos, algunos hallazgos sugieren que el aumento de la amplitud de ultrasonido, alta temperatura (T°>150°C) y tiempo de operación, conllevan a la degradación de polifenoles y podrían originar la formación de compuestos de Maillard potencialmente cancerígenos como el hidroximetilfurfural (HMF) (Huaman-Castilla, Mart, et al., 2019). Otro inconveniente en el empleo de altas temperaturas sería una disminución en la tasa de extracción constante, debido a la reducción en la intensidad de la cavitación como resultado de la menor tensión superficial y el aumento de la presión de vapor de las burbujas de cavitación.

c) Tiempo de extracción

Durante el proceso de EAU, los solutos se encuentran en contacto con el solvente, por tal motivo, la eficiencia de extracción está muy influenciada por el tiempo de interacción entre las dos fases (Hossain et al., 2012).

Según Şahin & Şamli, (2013), el contenido de compuestos fenólicos extraídos por ultrasonido aumenta en función del tiempo, siguiendo un mecanismo formado por dos etapas principales. El primero se denomina paso de "lavado", que cubre los primeros 10 a 20 minutos de extracción. En este paso se lleva a cabo la disolución de los componentes solubles en las superficies de la matriz y es en esta etapa que se puede lograr hasta el 90% de la recuperación del contenido total de los compuestos fenólicos, lo que indica una tasa de extracción considerablemente rápida. En la segunda etapa, conocida como “extracción lenta”, la transferencia de masa del soluto desde la matriz al solvente se realiza por difusión; el tiempo de este proceso puede durar de 60 a 100 minutos.

2.3. Definición de términos

- **Polifenoles:** Son un grupo de sustancias químicas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula encontradas en frutas, verduras, cereales y bebidas.

- **Cavitación acústica:** Se refiere a la formación y colapso de cavidades, o burbujas, en un medio líquido que se somete repentinamente a bajas presiones. Cuando un líquido se somete a una onda ultrasónica de alta intensidad durante la parte de rarefacción del ciclo, la presión en la onda está por debajo de la presión ambiental y las bolsas de gas se expanden hasta que las bolsas colapsan violentamente debido a las altas tensiones desarrolladas en las paredes.

- **Solventes GRAS:** Solventes Generalmente Reconocido como seguro**.**

- **Tecnología verde:** Describe el uso de la tecnología y la ciencia para crear productos y servicios que sean respetuosos con el medio ambiente. Está directamente relacionada con la tecnología limpia, que se refiere específicamente a productos o servicios que mejoran el rendimiento operativo al mismo tiempo que reducen los costos, el consumo de energía, los desechos o los efectos negativos sobre el medio ambiente.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y nivel de investigación

Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental aplicada, donde se utilizó un diseño factorial completo, cuyos datos fueron analizados mediante un análisis de varianza con un 95% de confiabilidad. Esto con la finalidad de evaluar el efecto de las variables experimentales tales como, temperatura (50°C y 70°C), solvente (etanol y glicerol) y polaridad del solvente (0%,15%,30%) sobre las variables respuesta tales como contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante, azúcares reductores y perfil de polifenoles presentes en las hojas de olivo.

Nivel de investigación

El presente trabajo de investigación es de investigación aplicada y experimental.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El desarrollo del proyecto de investigación se llevó a cabo durante el periodo marzo 2022- marzo 2023. El acondicionamiento de muestras, el análisis de contenido de polifenoles, capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por EAU se realizaron en el Laboratorio de Tecnologías Sustentable para la Extracción de Compuestos de Alto Valor (TESECAV) de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAM-Moquegua. El perfil de polifenoles se evaluó en el laboratorio de Contaminantes Orgánicos y Ambiente de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de Ilo-UNAM. El contenido de azúcares se evaluó en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Nacional de Juliaca, departamento de Puno.

3.3. Muestra

~10 kg de hojas de olivo variedad sevillana fueron proporcionadas por la empresa Agroindustrias Unidas del Perú S.A.C (Fundo Olivers, Islay, Arequipa), las cuales fueron recolectadas durante la época de poda. Luego,

una vez recolectadas las muestras solo se consideraron las hojas sanas (elípticas, verdes y sin daño físico) y se descartaron las hojas con problemas patológicos. Las hojas se transfirieron inmediatamente en papel secante para su traslado a Laboratorio.

3.4. Instrumentos para la recolección de datos

3.4.1. Materiales, equipos y reactivos

a. Materiales

- Matraces Erlenmeyer (50, 100 y 250 mL)
- Vasos de precipitados de vidrio (50, 100, 250 mL)
- Fiolas (10, 250 y 500 ml)
- Probetas de vidrio (10, 50, 100, 250, 500 mL)
- Micropipetas (50 y 100 µL)
- Frascos color ámbar de plástico 200 mL
- Tubo Eppendorf de polipropileno para micro centrífuga de capacidad de 1.5 mL
- Tubos de plástico para centrífuga de 100 mL
- Puntas para micropipeta de 20 - 200 µL
- Puntas para micropipeta de 100- 1000 µL
- Puntas para micropipetas de 0.5µL -10mL
- Espátulas
- Papel filtro estándar
- Papel secante
- Papel aluminio

b. Equipos

- Ultrasonido de sonda Marca JP- Selecta, modelo (CY-500 Optic Ivymen Systems™) de 20 kHz y 500 W.
- Espectrofotómetro UV-visible. Marca: Thermo Scientific, modelo Genesys 150.
- Lector Multi-Modal de Microplacas. Marca: BioTek, modelo Synergy™ HTX.
- Molino de mano (Marca Bosch MS6CA4120)
- Balanza analítica. Marca: Sartorius, modelo Entris.
- Agitador magnético con temperatura (Modelo IKA C-MAG HS-7)
- Congeladora. Marca: Samsung, modelo Rh25h5613sg.

- Micropipeta automática de volumen variable de 10-100 µL
- Micropipeta automática de volumen variable de 20-200 µL
- Micropipeta automática de volumen variable de 100-1000 µL
- Centrífuga (Pro Hospital GP6)
- Tamiz vibratorio (Analysette 3 pro, Fritsch, Idar-Oberstein, Alemania)

c. Insumos y reactivos

- Etanol 96º
- Glicerol 99.5%
- Agua destilada
- Agua MiliQ
- Folin Ciocalteu al 97%
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico - Trolox (>98 de pureza)
- 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo – DPPH (>90 de pureza)
- 2,2'-Azinobis (2-amidinopropano) diclorhidrato – AAPH (>97 de pureza)
- Fluoresceína (>95 de pureza)
- Reactivo Fenol Folin ciocalteu (1N)
- Carbonato de sodio al 10% (p/v)
- Hidrógeno-ortofosfato dipotásico (K_2HPO_4)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Ácido gálico (>99 de pureza)
- Acetona (>99 de pureza)
- Etanol grado HPLC (>99% de pureza)
- Metanol grado HPLC (>99% de pureza)
- Ácido fórmico
- Acetonitrilo
- Ácido cafeíco (≥99 %)
- Ácido vanílico (≥99 %)
- Catequina (≥98 %)
- Epicatequina (≥98 %)
- Procianidina B2 (≥98 %)
- Procianidina A2 (≥98 %)
- Quercitrina (≥98 %)
- Kaempferol (≥98 %)

- Rutina (≥98 %)
- Resveratrol (≥98 %)
- Apigenina (≥98 %)
- Hidroxitirosol (≥99 %)
- Tirosol (≥99 %)
- Oleuropeína (≥99 %)

3.5. Procedimientos

3.5.1. Acondicionamiento

Las muestras de hojas de olivo fueron secadas a temperatura ambiente protegidas de la luz. Mediante un molino de pulso se redujo el tamaño de partícula de la muestra y a través de tamizador vibratorio (Analysette 3 pro, Fritsch, Idar-Oberstein, Alemania) se obtuvo una muestra de ~0.5 mm (Putnik et al., 2017). Luego, las muestras fueron protegidas de la luz y congeladas a -20°C para su posterior análisis. La Figura 11 muestra la metodología que se aplicó al trabajo de investigación.

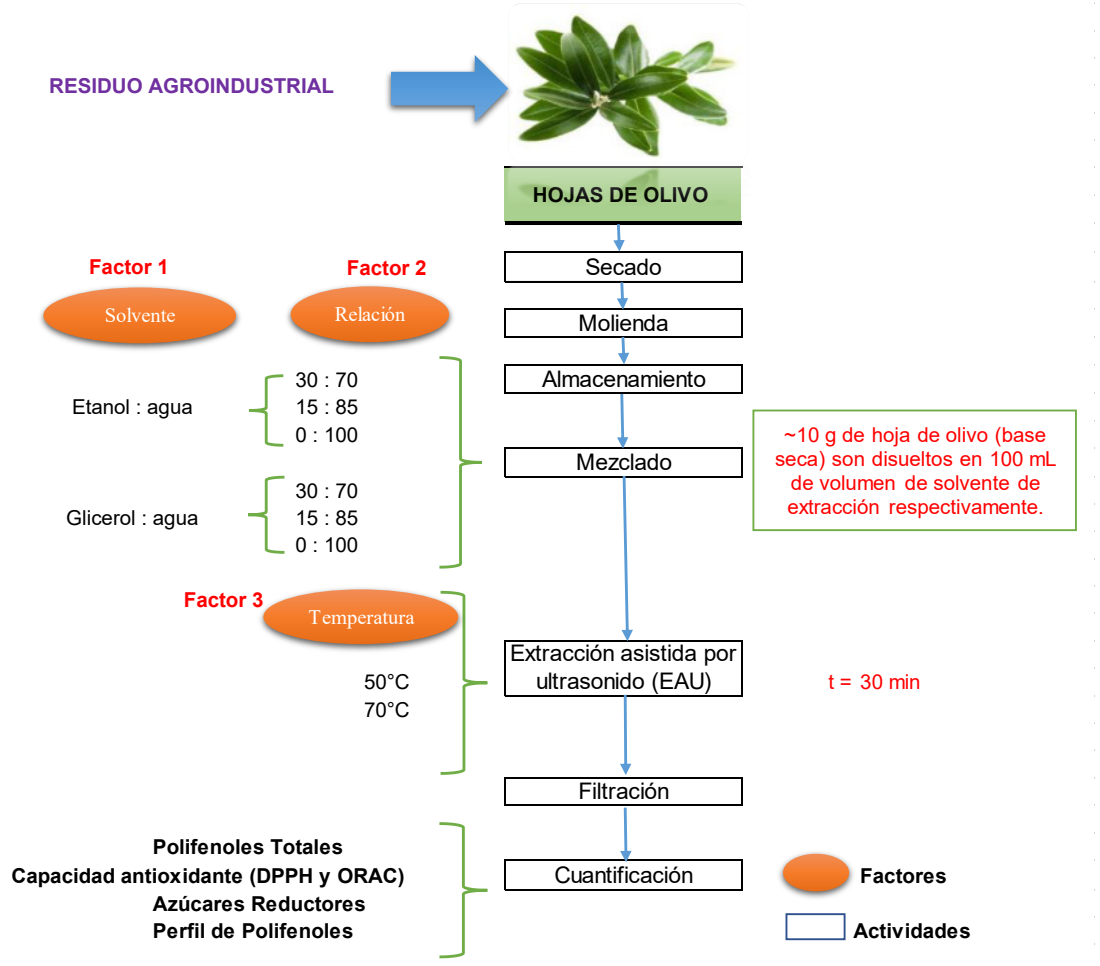


Figura 11. Diagrama de flujo experimental del proyecto de investigación

3.5.2. Metodología experimental

La EAU permitió obtener extractos ricos en polifenoles a partir de hojas de olivo mediante la adición de diferentes solventes tales como etanol (0%, 15% y 30%), glicerol (0%, 15% y 30%) a diferentes temperaturas de extracción (50 y 70°C) (Figura 12). Los parámetros de proceso se definieron en base a investigaciones previas reportadas por Giacometti et al. (2018) y Huaman-Castilla et al. (2019). En resumen, ~10 g de hoja de olivo (base seca) se disolvieron en un matraz de 100 mL de volumen de solvente de extracción respectivamente. La relación muestra sólida: volumen de extracto fue de 1:10. Luego, el equipo de ultrasonido trabajó a una frecuencia de 20 kHz con una potencia de salida al 70% del rango máximo por un periodo de 30 min.

A continuación, los extractos fueron filtrados usando filtro de celulosa de 0.45 µm. Esto con la finalidad de evitar la presencia de partículas no deseadas (carbohidratos, fibras y proteínas) que pueden quedar suspendidas en los viales de recolección (Wang et al., 2018). Finalmente, los extractos crudos se recogieron y almacenaron en viales ámbar a -20 °C para su posterior análisis de polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y el perfil de polifenoles.

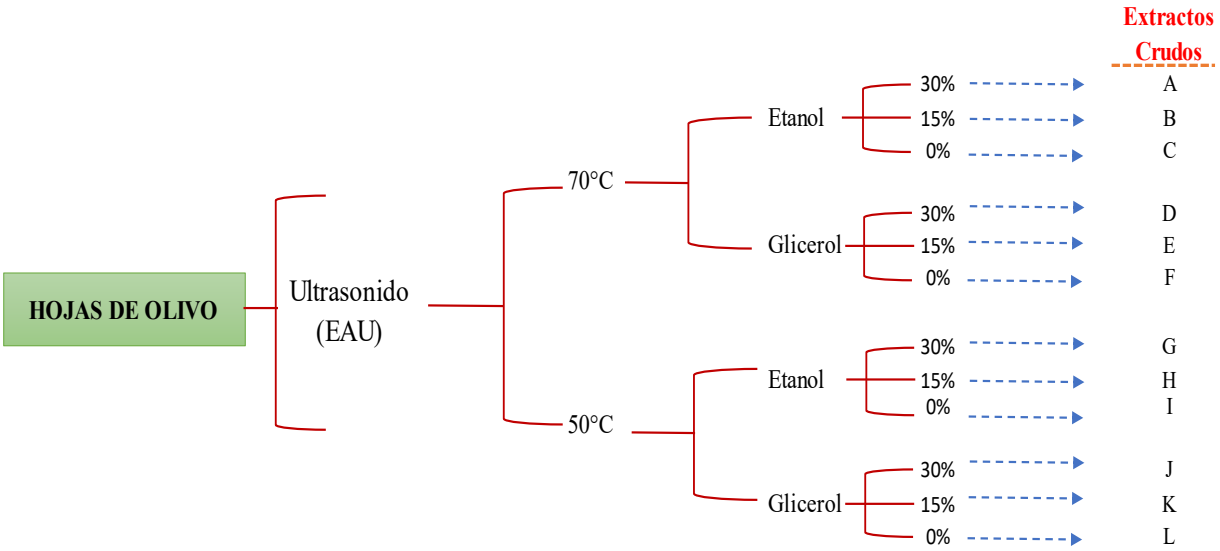


Figura 12. Esquema de los diferentes procesos de extracción para la obtención de polifenoles de las hojas de olivo

3.5.3. Determinación del contenido de Polifenoles Totales

El contenido de polifenoles totales (CPT) de los extractos crudos de hojas de olivo fueron determinados utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu de Singleton y Rossi (1965), el cual fue adaptado por Huamán-Castilla et al. (2021) con algunas modificaciones. 150 µL de agua destilada, 20 µL de extracto de hojas de olivo y 10 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) fueron mezclados y agitados durante 3 minutos. Luego, se añadió 20 µL de carbonato de sodio al 10% (p/v) y se dejó reposar por 1 hora bajo oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 765 nm en un lector de microplacas (Multi-Modal de Microplacas Synergy™ HTX). Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente por gramo de sólido seco (mg EAG/gss) (Figura 13).

Previamente, una curva estándar fue realizada usando ácido gálico. Por ello, diferentes concentraciones de ácido gálico fueron preparadas (Anexo 2). Luego, bajo los mismos criterios establecidos por el ensayo de Folin-Ciocalteu se procedió a determinar las absorbancias de cada una de las concentraciones de ácido gálico. Los resultados permitieron construir una curva estándar (absorbancia versus concentración) y generar la ecuación de una recta. La ecuación de la recta permitió determinar el contenido total de polifenoles presentes en los extractos de hoja de olivo.

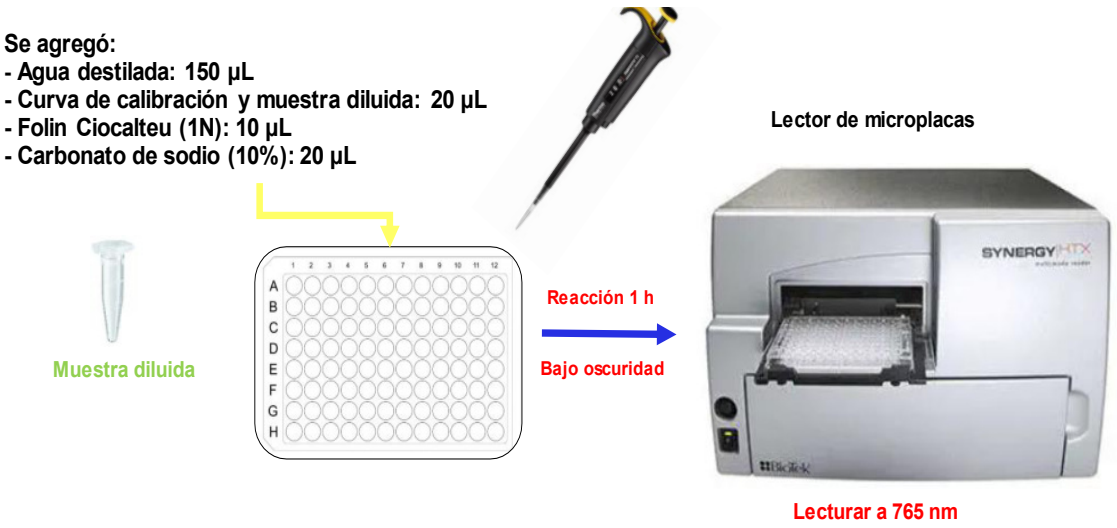


Figura 13. Metodología Polifenoles Totales (CPT)

3.5.4. Análisis de capacidad antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl)

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) desarrollado por Brand et al., (1995) con algunas modificaciones. En resumen, se mezclaron 5 µL de extracto con 195 µL de solución metanólica DPPH (0,1 mM), en una placa de 96 pocillos. Luego, la solución se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. La reducción de DPPH se midió a 517 nm (Lector de microplacas). Simultáneamente, se utilizaron como blanco 200µL metanol y como parte del control 200 µL de solución de DPPH (Figura 14).

Los resultados fueron expresados como IC_{50}, la cual es definida como la concentración de extracto de hoja de olivo necesario para inhibir el 50% de la actividad del radical DPPH (Vergara-Salinas et al., 2013). Los valores de capacidad antioxidante se expresaron en (mg/mL).

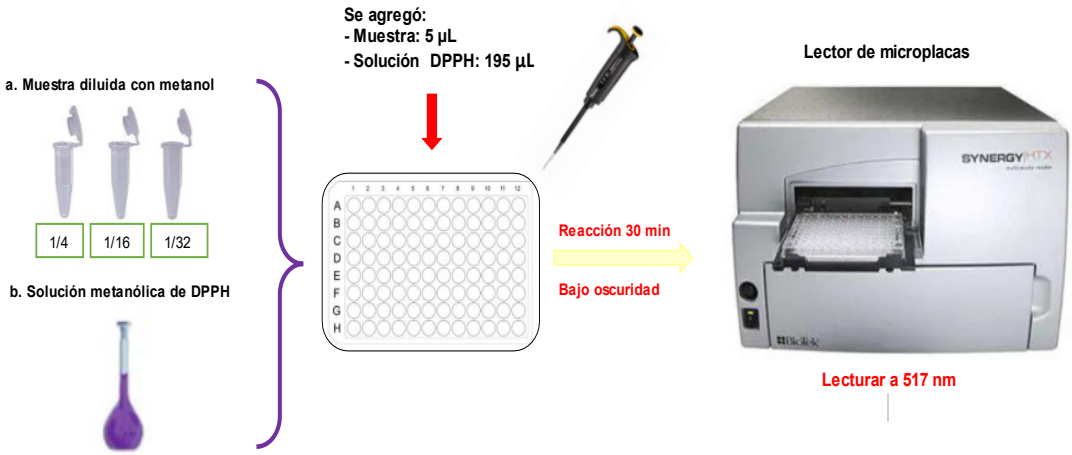


Figura 14. Metodología DPPH

3.5.5. Metodología de capacidad antioxidante por ORAC

La capacidad antioxidante por ORAC (Capacidad de Absorción de radicales de Oxígeno) se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Chirinos et al. (2013). Para tal fin, un lector de microplacas Multi-Modal de Microplacas Synergy™ HTX, con placas negras de 96 pocillos fue usado. Donde el AAPH se utilizó como generador de radicales peroxilo, trolox como estándar y fluoresceína como emisor de fluorescencia. Previamente, se preparó una solución buffer PBS (75 nM y pH 7.4) que se utilizó para diluir el

AAPH, la curva Trolox, fluoresceína y para la dilución de los extractos a evaluar. En la placa de 96 pocillos se colocaron una muestra de 25 µL de solución estándar de Trolox (8, 16, 24, 32 y 40 nM), muestra diluida y blanco (PBS), los cuales fueron incubados durante 10 min a 37 °C antes de la inyección automática de fluoresceína y AAPH diluida en el lector de microplacas (Figura 15). La fluorescencia se midió a 485 nm (λ: excitación y a 520 nm (λ: emisión) cada minuto durante 50 min (Anexo 4).

Los valores finales ORAC se expresaron como µmol equivalentes de Trolox (ET) por gramo sólido seco de hoja de olivo.

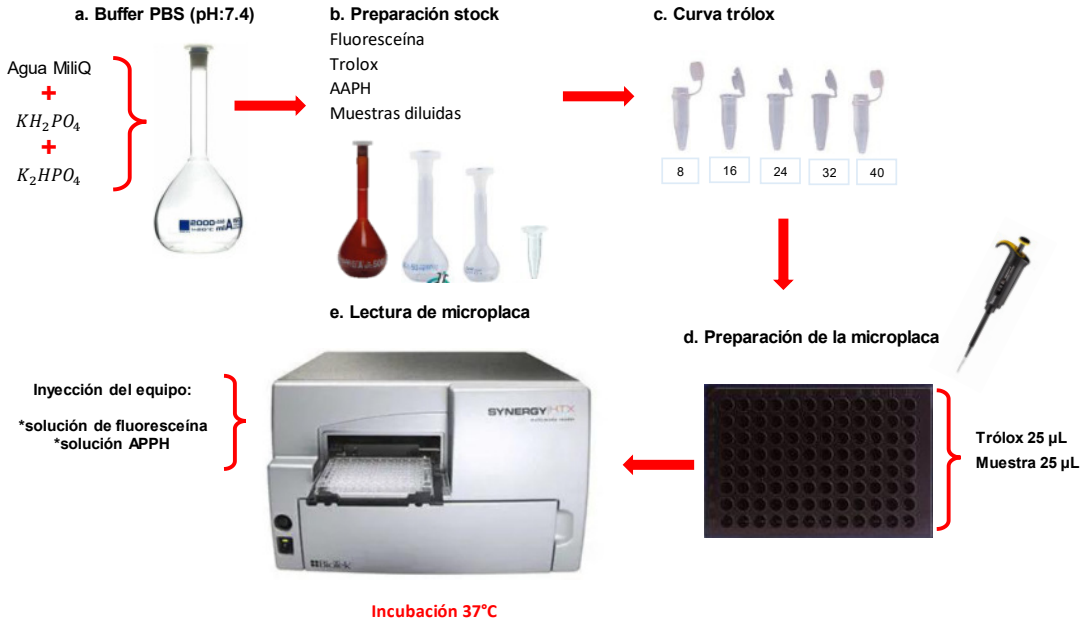


Figura 15. Metodología ORAC

3.5.6. Metodología de azúcares reductores

La cuantificación de glucosa y fructosa se realizó según la metodología de Wilson et al., (1981), el cual fue adaptado por Mariotti-Celis et al. (2018) con algunas modificaciones. Se tomó 2 ml de extractos de hojas de olivo y se diluyó en 3 mL de agua ultra pura (MiliQ). Posteriormente, con una jeringa se tomaron 3 mL de la muestra diluida y se pasó por un filtro de 0,22 µm (nylon). Luego, se tomaron 300 µL de la muestra filtrada y se mezcló con 700 µL de acetonitrilo para hacer el análisis en el equipo HPLC equipado con un detector IR Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, Massachusetts, EE. UU.). De la muestra preparada se inyectó 20µL bajo un

flujo de 1 mL/min. La separación cromatográfica se realizó en fase Normal a 30 ºC, usando una columna LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR NH2 (5 µm) a 40ºC. La fase móvil fue de Acetonitrilo/agua (70/30%) (Merck, USA) para después ser analizada por el detector IR. Cada pico principal en los cromatogramas de HPLC de los extractos se identificó por el tiempo de retención frente al estándar puro (curva de calibración). Los resultados fueron expresados como miligramos de glucosa y fructuosa por gramo de hojas de olivo en base seca.

3.5.7. Metodología de perfil de polifenoles

La cuantificación de polifenoles se realizó utilizando la metodología propuesta por Chirinos *et al*. (2013) con algunas modificaciones. Para la extracción de fase sólida, se activó cartuchos SPE SiliaPrep C18 5 mL, 500 mg (Silicycle, Québec, Cánada) con 10 mL de metanol grado HPLC, seguido de 10 mL de agua MiliQ. Posteriormente, 25 mL de los extractos se inyectaron a los cartuchos con una presión de vacío moderada. Luego, se utilizó 5ml de metanol para eluir los compuestos retenidos en los cartuchos, se filtraron los extractos eluidos usando un filtro de jeringa de 0,22 µm (nylon) y se colocaron en viales ambar. Luego, 2 uL de las muestras fueron inyectadas a un UHPLC (Agilent 1290 Infinity II, USA) con detector de arreglo de diodos (DAD). Las muestras se inyectaron en una columna InfinityLab (Agilent, USA) Poroshell EC-C18 (2.1 mm × 150 mm x 1.9 um) para la separación a 30°C. La fase móvil estuvo compuesta por solvente (A) agua MiliQ con ácido fórmico al 0,1 % y (B) acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %.), utilizando la siguiente gradiente: 0 min 95% A – 5% B, 15 min 60% A – 40% B y 18 min 95% A – 5% B a un flujo de 0.3 mL/min. Finalmente, los polifenoles se identificaron y cuantificaron comparando el tiempo de retención y el área bajo la curva de diferentes estándares de polifenoles previamente diluidos entre 0,3 y 20 µg/mL. (λ: 270 nm, Rutina, Quercitrina, Tirosol; λ: 280 nm, Oleuropeína, Catequina, Procianidina B2, Epicatequina, Ácido vanílico, Procianidina A2, Hidroxitirosol; λ: 324 nm, Ácido Cafeico, Resveratrol, Apigenina y λ: 373 nm, Kaempferol) (Anexo 5).

3.6. Análisis de datos

Diseño experimental

Un arreglo multifactorial completo (2x2x3 con 2 repeticiones) fue utilizado para evaluar el efecto de los factores en estudio tales como, temperatura (50°C y 70°C), tipo de solvente (etanol y glicerol) y relación solvente (0%, 15%, 30%) sobre las variables respuesta contenido total de polifenoles, capacidad antioxidante, azúcares reductores y perfil de polifenoles partir de hoja de olivo. En total de 24 observaciones por cada respuesta fueron analizadas mediante el programa Statgraphics Plus, el cual permitió determinar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación Tukey con un nivel de significancia al 5% (p-valor < 0.05).

Modelo factorial para la extracción asistida por ultrasonido

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk}: Representa a la variable respuesta

μ : Media global de todos los tratamientos

α : Factor temperatura

β : Factor tipo de solvente

γ : Concentración del solvente

ε_{ij}: Error experimental

Tabla 6. Estructura del diseño experimental para la evaluación de datos

Tratamiento	Temperatura (°C)	Solvente	Relación (v/v)	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante	Azúcares reductores	Perfil de polifenoles
1	50	etanol: agua	0: 100				
2	50	etanol: agua	15: 85				
3	50	etanol: agua	30: 70				
4	50	glicerol: agua	0: 100				
5	50	glicerol: agua	15: 85				
6	50	glicerol: agua	30: 70				
7	70	etanol: agua	0: 100				
8	70	etanol: agua	15: 85				
9	70	etanol: agua	30: 70				
10	70	glicerol: agua	0: 100				
11	70	glicerol: agua	15: 85				
12	70	glicerol: agua	30: 70				

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Contenido de polifenoles totales

4.1.1. Efecto del uso de etanol

El contenido de polifenoles totales varia de 5.54 a 12.26 mg EAG/gss, cuando el etanol es usado como solvente de extracción (Tabla 7). A 70°C, un incremento en la concentración de etanol de 0 a 30% mejora en 40% la recuperación de polifenoles (Tabla 7). Şahin & Şamli (2013) observaron bajo un proceso asistido por ultrasonido a 34.1 °C, que un aumento en la concentración de etanol de 0 a 50% mejora la extracción de polifenoles en 65% en hojas de olivo. Asimismo, Martínez-Patiño et al. (2018) reportaron que los incrementos de 20 a 50% de etanol mejora en 19% la recuperación de polifenoles en un proceso de extracción por ultrasonido (75°C) a partir de hojas de olivo.

Tabla 7. Caracterización fenólica de los extractos de hojas de olivo

Condiciones de proceso		Etanol		Glicerol	
		Polifenoles (mgEAG/gss)		Polifenoles (mgEAG/gss)	
Temperatura (°C)	% solvente	Promedio	D.E	Promedio	D.E
50	0	5.54 $^{a, A}$	±0.33	5.97 $^{a, A}$	±0.45
50	15	8.73 $^{a, B}$	±0.06	8.31 $^{a, B}$	±0.25
50	30	10.23 $^{a, C}$	±0.22	10.02 $^{a, C}$	±0.33
70	0	8.76 $^{a, B}$	±0.79	8.28 $^{a, B}$	±0.12
70	15	10.10 $^{a, C}$	±0.09	12.01 $^{b, D}$	±0.50
70	30	12.26 $^{a, D}$	±0.13	14.85 $^{b, E}$	±0.09

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre etanol y glicerol, mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las condiciones de operación (temperatura y concentraciones) por solvente. D.E. (Desviación Estándar).

Probablemente, la presencia de un grupo polar hidroxilo (OH^-) hidrofílico y un grupo no polar (metilo) en la estructura química del etanol le confiere una mayor habilidad para formar enlaces de hidrógeno e interacciones no polares con las moléculas de polifenoles (Huaman-Castilla et al., 2019; Parke & Birch, 1999). Adicionalmente, el agua pura presenta mayor polaridad (π*: 0,98) que el etanol

(π*: 0,27). Entonces, la adición de etanol reduce la polaridad del solvente, por lo que, la solubilidad de los polifenoles mejora significativamente (Mariotti-Celis et al., 2018).

Con respecto al efecto de la temperatura, los incrementos de temperatura favorecen la recuperación de polifenoles presentes en hojas de olivo. Por ejemplo, el uso de 30% de etanol con incrementos de 50 a 70°C favorece en 20% la recuperación de polifenoles (Tabla 7). Al respecto, Khemakhem et al. (2016) mostraron que un incremento de temperatura de 10°C a 70°C mejora en un 26% la recuperación de polifenoles presentes en hojas de olivo mediante extracción asistida por ultrasonido. Los incrementos de temperatura aumentan la transferencia de masa y el rendimiento de la extracción como consecuencia de la ruptura de la matriz vegetal y liberación de los polifenoles (Şahin et al., 2015; Vergara-Salinas et al., 2013). Por ello, las mejores condiciones de proceso fueron establecidas con 30% de etanol a 70°C (Tabla 7).

4.1.2. Efecto del uso de glicerol

El uso de glicerol como solvente alternativo permitió obtener importantes concentraciones de polifenoles, cuyos valores varían de 5.97 a 14.85 mg EAG/gss (Tabla 7). A 70°C, el incremento de glicerol de 0 a 30% favorece en 79% la recuperación de polifenoles (Tabla 7). Si bien a la fecha no hay reportes de la efectividad de glicerol en un proceso de extracción asistida por ultrasonido en hojas de olivo, otros trabajos en diferentes matrices vegetales reportaron que el glicerol es más efectivo que el etanol y agua pura para la recuperación de polifenoles. Por ejemplo, Kowalska et al. (2021) en un proceso por maceración observaron que el glicerol fue un 6% más efectivo para recuperar polifenoles al incrementar concentraciones de glicerol de 0 a 30% (50°C) a partir de hojas de menta piperita. Asimismo, Huamán-Castilla et al. (2020) demostraron que mezclas glicerol-agua favorece en 45% la recuperación de polifenoles en comparación con las mezclas agua-etanol en orujo de uva. Esta efectividad del glicerol probablemente se deba a la polaridad solvente, donde el glicerol presenta un mayor número de grupos hidroxilo comparado con la molécula de etanol, consecuentemente, el glicerol tiene una mayor habilidad para formar puentes hidrogeno con otros grupos funcionales presentes en los polifenoles.

Por otro lado, se ha argumentado que la capacidad del glicerol para aumentar la eficiencia de extracción de polifenoles se debe a su polaridad, esto

podría atribuirse a su constante dieléctrica más baja (ε = 42,5). Entonces, la adición de glicerol al agua podría reducir drásticamente la constante dieléctrica del agua (ε = 80,1) favoreciendo las interacciones no polares (Karakashov & Grigorakis, 2015; Makris & Lalas, 2020).

Por otro lado, un incremento de temperatura de 50°C a 70°C con 30% de glicerol mejoró en 48 % la recuperación de polifenoles presentes en las hojas de olivo (Tabla 7). Karakashov et al. (2015) reportaron que un aumento de temperatura 50°C a 70°C con 10% de glicerol mejoró en 16% la recuperación de polifenoles totales en *Hypericum perforatum*. Rouhani, (2019) demostró que incrementos de temperatura de 50°C a 80°C con glicerol (57%) mejoró la recuperación de polifenoles en 34% a partir de hojas de stevia Rebaudiana con ultrasonido. Este comportamiento puede ser debido a la inducción de rupturas de enlaces de la matriz, disminución de la viscosidad del solvente y tensión superficial, lo que conduce a una mejor transferencia de masa, una mayor difusión en los tejidos celulares de las plantas y aumento de la presión de vapor. Por ello, las mejores condiciones de proceso fueron establecidas con 30% de glicerol a 70°C (Tabla 7).

Si bien dos tipos de solventes fueron utilizados (etanol y glicerol), la mejor condición de extracción fue establecida usando glicerol (30%) a 70°C. Por ello, el uso de glicerol favoreció en 21 % la recuperación de polifenoles en comparación con el uso de etanol bajo las mismas condiciones. (Tabla 7). Al respecto, Apostolakis et al. (2014) demostraron que mezclas agua- glicerol (9.3 %) fueron 13% más efectivo en comparación a mezclas agua-etanol (60%) en un proceso por maceración. Mientras, Rouhani, (2019) reportaron que el uso de glicerol favorece en 17% la recuperación de polifenoles comparado con el uso de etanol en un proceso de extracción asistida por ultrasonido bajo las mismas condiciones (proporción de sólido a solvente: 1:30 (g/mL), 70°C, 20 kHz) a partir de hojas de Stevia Rebaudiana.

4.2. Capacidad Antioxidante

Se emplearon dos métodos para evaluar la capacidad antioxidante. El ensayo DPPH cuantifica la transferencia de electrones entre el radical DPPH y los polifenoles, mientras el análisis ORAC mide la capacidad de los polifenoles para transferir átomos de hidrógeno e inhibir los radicales peroxilo que son radicales biológicos (Erpel et al., 2021; Huamán-Castilla et al., 2020).

4.2.1. DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de hojas de olivo fue expresada como el factor IC_{50} (mg extracto/mL de solución DPPH), que representa la cantidad de extracto necesario en mg para inhibir en un 50% la actividad de la solución DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

4.2.1.1. Efecto del uso de etanol

De acuerdo con nuestros resultados, los valores DPPH son inversamente proporcionales con los promedios encontrados para polifenoles totales (CPT). Los valores IC_{50} con el uso de etanol varían de 29.15 a 10.02 mg/mL (Tabla 8). Por ejemplo, si fijamos la temperatura a 70°C, un incremento de 0 a 30% en la concentración de etanol reduce en 25% los valores $IC_{50.}$ Al respecto, Mkadmini et al. (2015) demostraron que incrementos de concentración de 20% a 50% de etanol a 63°C reduce en 18% el radical DPPH en frutos de loto *Zizyphus* de Túnez con ultrasonido.

4.2.1.2. Efecto del uso de glicerol

Los valores IC_{50} cuando el glicerol es usado como solvente varían de 30.03 a 2.65 mg/mL (Tabla 8). Por ejemplo, a una temperatura de 70°C, un incremento de 0 a 30 % en la concentración de glicerol reduce en 79% los valores $IC_{50.}$ (Tabla 8).

Jab et al. (2021) reportaron que un aumento de 20 a 50% de glicerol a 80°C reduce en 23% el IC_{50} en la planta *Silybum marianum* cuando un sistema de ultrasonido fue usado.

Tabla 8. Poder antioxidante (DPPH) de los extractos de hoja de olivo

Condiciones de proceso		Etanol		Glicerol	
		IC 50 (mg/mL)		IC 50 (mg/mL)	
Temperatura (°C)	% solvente	Promedio	D.E	Promedio	D.E
50	0	29.15 $^{a, D}$	±0.71	30.03 $^{a, E}$	±0.84
50	15	14.58 $^{b, C}$	±0.17	9.18 $^{a, D}$	±0.44
50	30	12.33 $^{b, B}$	±0.95	6.22 $^{a, B}$	±0.29
70	0	13.30 $^{a, B}$	±0.79	12.49 $^{a, C}$	±0.68
70	15	13.08 $^{b, B}$	±0.84	5.03 $^{a, B}$	±0.32
70	30	10.02 $^{b, A}$	±0.70	2.65 $^{a, A}$	±0.11

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre etanol y glicerol,

mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las condiciones de operación (temperatura y concentraciones) por solvente. D.E. (Desviación Estándar).

Por ello, la mejor condición fue establecida a 70°C con 30% de glicerol (IC_{50}: 2.65 mg/mL). Esto indica que serán necesarios 2.65 mg de extracto para reducir en 50% la actividad del radical DPPH. Al respecto, Mariotti-Celis et al. (2018) señalaron que a mayor contenido de polifenoles la capacidad antioxidante aumenta, por lo tanto, se va a requerir menor cantidad de extracto para inhibir el radical DPPH.

4.2.2. ORAC

De acuerdo con nuestros resultados, los valores ORAC de los extractos obtenidos siguen la misma tendencia en relación a los valores de polifenoles totales (CPT), cuanto mayor es la temperatura y concentración de solvente, mayor es la capacidad antioxidante en los extractos.

4.2.3. Efecto del uso de etanol

El uso de etanol permitió obtener valores con alta capacidad antioxidante que varían de 141.75 y 506.32 65 µmol ET/gss (Tabla 9). A una temperatura de 70°C con un incremento de concentración de 0 a 30% mejora en 77% la capacidad antioxidante. De acuerdo a estos resultados, Giordano et al., 2022 reportaron que el etanol mejora en 27% la capacidad antioxidante en comparación a los extractos con agua pura de planta *Argylia radiata* en una extracción convencional (T: 25 ◦C, Relación muestra: solvente 1:10, 3 horas).

Los valores de ORAC dependen en gran medida de la solubilidad de los compuestos en los medios de reacción. Por esa razón, el etanol es utilizado para la extracción de antioxidantes de muestras complejas como un solvente orgánico e influye en la cinética de reacción y en la disponibilidad de los compuestos para reaccionar con los radicales (Carvalho et al., 2023).

4.2.4. Efecto del uso de glicerol

Los valores ORAC cuando el glicerol es usado como solvente varían de 139.5 a 684.65 µmol ET/gss (Tabla 9). Si fijamos la temperatura en 70°C, incrementos de concentración de 0 a 30% mejora en 120% la capacidad antioxidante de los extractos. No se han encontrado referencias en esta matriz y método de determinación de capacidad antioxidante. Sin embargo, Kowalska et al. (2021) reportaron que la actividad antioxidante usando glicerol al 30% (50°C) fue 15% más alta en comparación con los extractos de agua a partir de hojas de menta en una extracción convencional.

Tabla 9. Poder antioxidante (ORAC) de los extractos de hoja de olivo

Condiciones de proceso		Etanol		Glicerol	
		Capacidad Antioxidante (µmolET/gss)		Capacidad Antioxidante (µmolET/gss)	
Temperatura (°C)	% solvente	Promedio	D.E	Promedio	D.E
50	0	141.75 $^{a, A}$	±6.32	139.5 $^{a, A}$	±14.60
50	15	250.16 $^{b, B}$	±7.24	193.6 $^{a, B}$	±9.09
50	30	355.47 $^{a, C}$	±39.69	311.65 $^{a, C}$	±4.07
70	0	285.24 $^{a, B}$	±7.91	288.3 $^{a, C}$	±9.44
70	15	310.03 $^{a, BC}$	±9.68	505.74 $^{b, D}$	±19.48
70	30	506.32 $^{a, D}$	±23.42	684.65 $^{b, E}$	±14.88

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre etanol y glicerol, mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las condiciones de operación (temperatura y concentraciones) por solvente. D.E. (Desviación Estándar).

Por ello, el uso de glicerol (30%) a 70°C fue 35% más efectivo para inhibir el radical peroxilo en comparación con el uso de etanol bajo las mismas condiciones (Tabla 9). La metodología ORAC mide el grado de inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo (AAPH) por los compuestos de interés (polifenoles) (Prior, 2015).

4.3. Azúcares reductores

4.3.1. Efecto del uso de etanol

De acuerdo con nuestros resultados, los extractos obtenidos presentaron contenido de azúcares reductores entre 1.53 a 4.68 mg/gss de fructosa y no se detectó presencia de glucosa cuando el etanol es usado como solvente de extracción (Tabla 10). La adición de etanol disminuyó la extracción de fructuosa. Por ejemplo, el uso de etanol a 30% con incrementos de 50 a 70°C redujeron en 59% la recuperación de fructosa (Tabla 10). Además, un aumento en la concentración de etanol de 0 a 30% combinado con 70°C fue 62% más efectivo para reducir el contenido de fructosa (Tabla 10). Este comportamiento puede ser debido a que los azúcares reductores son compuestos hidrófilos que forman fácilmente enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Por lo tanto, la presencia de un solvente de baja polaridad como el etanol desfavorece su solubilidad durante la extracción (Alavi et al., 2014; Alves et al., 2007).

4.3.2. Efecto del uso de glicerol

Los extractos obtenidos a partir de hojas de olivo mediante el uso de glicerol como solvente presentaron importantes concentraciones de azúcares reductores que varían de 3.97 y 14.63 mg/gss de fructosa, y no hubo presencia de glucosa (Tabla 10). Si fijamos la concentración de glicerol a 30%, los incrementos de temperatura de 50 a 70°C favorecieron en 21% la recuperación de fructosa (Tabla 10). Por otro lado, la composición del solvente juega un rol muy importante en la recuperación de fructosa. Por ejemplo, a 70°C incrementos en la concentración de glicerol de 0 a 30% favorece en un 268 % la recuperación de fructosa (Tabla 10). Al respecto, este comportamiento probablemente se deba a la habilidad de los azúcares para establecer enlaces de hidrógeno con mayor intensidad entre los grupos hidroxilo del glicerol y los azucares reductores. (Huamán-Castilla et al., 2020). Finalmente, el uso de etanol disminuyó la extracción de fructosa. Por ejemplo, al usar 30% de etanol (70°C) reduce en 90% la recuperación de fructosa en comparación del glicerol bajo las mismas condiciones (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización de azúcares reductores de los extractos

Condiciones de proceso		Etanol			Glicerol		
		Fructosa (mg/gss)		Glucosa (mg/gss)	Fructosa (mg/gss)		Glucosa (mg/gss)
Temperatura (°C)	% solvente	$\overline{X}$	D.E	$\overline{X}$	$\overline{X}$	D.E	$\overline{X}$
50	0	4.68 $^{a, A}$	±0.01	ND	4.65 $^{a. A}$	±0.01	ND
50	15	1.86 $^{a, B}$	±0.01	ND	8.14 $^{b, B}$	±0.02	ND
50	30	3.78 $^{a, C}$	±0.02	ND	12.05 $^{b, C}$	±0.06	ND
70	0	4.00 $^{a, D}$	±0.02	ND	3.97 $^{a, D}$	±0.01	ND
70	15	5.27 $^{a, E}$	±0.02	ND	6.14 $^{b, E}$	±0.02	ND
70	30	1.53 $^{a, F}$	±0.01	ND	14.63 $^{b, F}$	±0.04	ND

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre etanol y glicerol, mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las condiciones de operación (temperatura y concentraciones) por solvente. $\overline{X}$: Promedio, D.E: (Desviación Estándar). El contenido de fructosa y glucosa se expresaron en mg/gss de hoja de olivo. ND: no detectado.

4.4. Cuantificación de polifenoles específicos

4.4.1. Ácidos fenólicos

Las mejores condiciones de extracción de ácidos fenólicos presentes en hojas de olivo fueron establecidas con glicerol al 30% (70°C), el cual fue 13% más efectivo en comparación con el uso etanol bajo las mismas condiciones (Tabla 11). Esto permitió una mayor recuperación de ácido vanílico (5.51 µg/gss) y ácido cafeíco (4.77 µg/gss) (Tabla 11). Al respecto, Huamán-Castilla et al., (2020) reportaron que las altas concentraciones de glicerol (50%) a 150 °C recuperan ~15 veces más ácidos fenólicos en comparación con el uso de etanol bajo las mismas condiciones en extractos de orujo de uva carménère.

Este resultado se puede atribuir al hecho de que el etanol presenta una polaridad más baja que el glicerol, por lo que, el uso de solventes con constantes dieléctricas como el del etanol ($\varepsilon = 24,5$) y glicerol ($\varepsilon = 42,5$) reducen notoriamente la constante dieléctrica del agua ($\varepsilon = 80,1$) en un proceso de extracción (Karakashov & Grigorakis, 2015; Makris & Lalas, 2020). Sin embargo, Michail et al., 2015 reportan que mezclas de agua-etanol poseen una polaridad más baja que la mezcla agua-glicerol. Por ello, las mezclas agua-glicerol fueron más eficientes para recuperar ácidos fenólicos en comparación con el agua pura y etanol (Eyiz et al., 2019; Kowalska et al., 2021).

Interesantemente, los rendimientos de ácidos fenólicos obtenidos mediante el uso de mezclas agua-glicerol también pueden explicarse por los enlaces de hidrógeno adicionales entre el glicerol y los ácidos en comparación con los otros alcoholes. Por ejemplo, el tercer grupo hidroxilo del glicerol permite la formación de un enlace de hidrógeno de tres centros, lo que intensifica el enlace de hidrógeno del glicerol y los ácidos fenólicos. En consecuencia, el glicerol confiere al solvente de extracción una mayor energía de solvatación de los polifenoles que el etanol (Huamán-Castilla et al., 2020).

Si bien se ha cuantificado al ácido cafeico y vanílico, las hojas de olivo contienen un gran número de ácidos fenólicos, donde el gálico es uno de los polifenoles más abundantes mientras que el cafeico y vanílico son minoritarios (Abaza et al., 2015).

4.4.2. Flavanoles

La recuperación de flavanoles varía entre 16.85 y 145.44 µg/gss y de 16.85 a 142.10 µg/gss con el uso de etanol y glicerol respectivamente (Tabla 11). Contrario al comportamiento de los ácidos fenólicos, el uso de glicerol no fue más efectivo para recuperar estos compuestos; mientras que el uso de etanol presento un efecto favorable en el contenido de estos compuestos. Por ello, la cantidad más alta de flavanoles (145.44 µg/gss) fueron establecidas a 70°C con 30% de etanol. Esto favorece ~2.4 veces la recuperación de flavanoles en comparación de glicerol bajo las mismas condiciones. Bajo estos parámetros, el contenido de Catequina, epicatequina, procianidina B2 y procianidina A2 fueron de 25.21 µg/gss, 6.29 µg/gss, 21.33 µg/gss y 92.60 µg/gss respectivamente (Tabla 11). Este comportamiento probablemente se asocia a que los grupos carbonilo e hidroxilo en la estructura química de los flavanoles podrían formar fácilmente enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales del etanol (Huaman-Castilla, Mart, et al., 2019).

4.4.3. Flavonoles

El contenido de flavonoles varía entre 376.86 y 1089.91 µg/gss y de 596.04 y 1171.30 µg/gss con el uso de etanol y glicerol respectivamente (Tabla 11). Similar al comportamiento de los ácidos fenólicos, la mejor condición fue establecida con 15% de glicerol a 70°C, bajo estas condiciones la quercitrina (745.60 µg/gss) fue el flavonol más abundante en comparación a kaempferol

(4.67 µg/gss) y rutina (421.03 µg/gss) (Tabla 11). Estos compuestos son relativamente polares debido a la presencia de los grupos carbonilo e hidroxilo en su estructura química, consecuentemente, podrían formar fácilmente enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales del glicerol en comparación con el etanol (Cheigh et al., 2015).

4.4.4. Estilbenos (resveratrol)

La recuperación de resveratrol varia de 28.54 a 62.83 µg/gss y de 21.40 a 65.89 µg/gss cuando el etanol y glicerol es usado como solvente de extracción respectivamente (Tabla 11). A 70°C, un incremento de 0 a 15% de glicerol mejora en 5% la recuperación de resveratrol; mientras que los cambios de etanol de 0 a 15% reduce en 66% la recuperación de este compuesto (Tabla 11). Al respecto, dos trabajos recientes de Huamán-Castilla et al., (2020) y Huaman-Castilla, et al., (2019) reportaron que los cambios de 15 a 50% de glicerol como cosolvente mejoran en 48% la recuperación de resveratrol en comparación con el uso de etanol bajo las mismas condiciones. Probablemente, la presencia de tres grupos hidroxilo en la estructura del glicerol permite una mayor afinidad por los grupos OH del resveratrol.

4.4.5. Flavona (apigenina)

La recuperación de apigenina varía entre 25.06 y 178.54 µg/gss y de 58.31 a 279.95 µg/gss con el uso de etanol y glicerol respectivamente (Tabla 11). Similar a los flavonoles, el uso de etanol y agua pura no fueron efectivos para recuperar apigenina; mientras que el uso de glicerol presentó un efecto favorable en el contenido de este compuesto. Por ejemplo, a 70°C, el uso de 15% de glicerol favorece en 200% y 56% la extracción de apigenina en comparación a etanol y agua pura bajo las mismas condiciones (Tabla 11). Probablemente, este comportamiento puede ser debido a que la apigenina contiene tres grupos hidroxilo, los cuales interactúan con los tres grupos hidroxilo presentes en el glicerol (Huamán-Castilla et al., 2020; Pan et al., 2020).

Tabla 11. Perfil de polifenoles utilizando etanol y glicerol como solventes de extracción

Descripción	EAU- HOJA DE OLIVO																							
	50°C						70°C						50°C						70°C					
	0% ETOH		15% ETOH		30% ETOH		0% ETOH		15% ETOH		30% ETOH		0% GLY		15% GLY		30% GLY		0% GLY		15% GLY		30% GLY	
	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.	$\overline{X}$	C.V.
Ácidos fenólicos (µg/gss)																								
Ac. cafeico	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	7.54 ^{b}	0.03	ND	-	0.34 $^{a, A}$	0.08	0.70 $^{a, A}$	0.03	ND	-	0.70 $^{a, A}$	0.05	4.77 $^{a, B}$	0.03
Ác. Vanílico	1.67 $^{a, B}$	0.06	1.99 $^{b, C}$	0.02	4.78 $^{b, D}$	0.01	1.61 $^{a, A}$	0.06	5.69 $^{b, E}$	0.06	1.61 $^{a, A}$	0.02	1.67 $^{a, B}$	0.06	1.61 $^{a, A}$	0.00	1.61 $^{a, A}$	0.04	1.61 $^{a, A}$	0.02	4.78 $^{a, C}$	0.05	5.51 $^{b, D}$	0.04
Σ:	**1.67** $^{a, B}$		**1.99** $^{b, C}$		**4.78** $^{b, D}$		**1.61** $^{a, A}$		**5.69** $^{b, E}$		**9.15** $^{a, F}$		**1.67** $^{a, B}$		**1.96** $^{a, C}$		**1.61** $^{a, A}$		**1.61** $^{a, A}$		**5.48** $^{a, D}$		**10.29** $^{b, E}$	
Flavanoles (µg/gss)																								
Catequina	2.80 $^{a, A}$	0.08	4.62 $^{a, A}$	0.04	4.65 $^{a, A}$	0.04	17.99 $^{a, B}$	0.03	3.26 $^{a, A}$	0.08	25.21 $^{b, C}$	0.07	2.80 $^{a, A}$	0.07	5.49 $^{b, A}$	0.08	6.24 $^{b, B}$	0.06	17.99 $^{a, C}$	0.03	12.28 $^{b, B}$	0.07	12.43 $^{a, B}$	0.05
Epicatequina	3.70 $^{a, A}$	0.03	9.46 $^{a, E}$	0.06	8.78 $^{a, D}$	0.05	4.03 $^{a, B}$	0.02	20.01 $^{a, F}$	0.04	6.29 $^{a, C}$	0.03	3.70 $^{a, A}$	0.03	11.34 $^{b, C}$	0.02	39.82 $^{b, D}$	0.11	4.03 $^{a, B}$	0.02	42.17 $^{b, E}$	0.09	53.35 $^{b, F}$	0.08
Procianidina B2	2.58 $^{a, B}$	0.08	3.16 $^{b, D}$	0.03	2.86 $^{a, C}$	0.96	11.21 $^{a, E}$	0.07	2.52 $^{a, A}$	0.05	21.33 $^{b, F}$	0.18	2.58 $^{a, B}$	0.18	2.52 $^{a, A}$	0.00	3.25 $^{b, C}$	0.07	11.21 $^{a, F}$	0.07	4.19 $^{b, E}$	0.03	3.52 $^{a, D}$	0.07
Procianidina A2	7.77 $^{a, A}$	0.08	55.86 $^{b, E}$	0.12	27.87 $^{a, B}$	0.04	38.84 $^{a, C}$	0.06	55.51 $^{a, D}$	0.06	92.60 $^{b, F}$	0.09	7.77 $^{a, A}$	0.09	28.78 $^{a, B}$	0.11	60.20 $^{b, D}$	0.06	38.84 $^{a, C}$	0.06	83.18 $^{b, F}$	0.06	72.80 $^{a, E}$	0.10
Σ:	**16.85** $^{a, A}$		**73.10** $^{b, D}$		**44.16** $^{a, B}$		**72.06** $^{a, C}$		**81.30** $^{a, E}$		**145.44** $^{b, G}$		**16.85** $^{a, A}$		**48.13** $^{a, B}$		**109.51** $^{b, D}$		**72.06** $^{a, C}$		**141.82** $^{b, E}$		**142.10** $^{a, F}$	
Flavonoles (µg/gss)																								
Quercitrina	525.61 $^{a, D}$	0.16	185.48 $^{a, A}$	0.15	580.37 $^{a, F}$	0.14	514.95 $^{a, C}$	0.11	574.38 $^{a, E}$	0.13	435.85 $^{a, B}$	0.13	525.61 $^{a, C}$	0.16	715.14 $^{b, D}$	0.14	823.42 $^{b, F}$	0.34	514.95 $^{a, B}$	0.11	745.60 $^{b, E}$	0.09	416.20 $^{a, A}$	0.05
Kaempferol	3.83 $^{a, B}$	0.07	4.74 $^{a, E}$	0.05	4.47 $^{a, D}$	0.06	8.25 $^{a, F}$	0.01	3.58 $^{a, A}$	0.02	4.17 $^{a, C}$	0.04	3.83 $^{a, A}$	0.07	5.50 $^{b, D}$	0.08	8.84 $^{b, F}$	0.03	8.25 $^{a, E}$	0.01	4.67 $^{b, C}$	0.07	3.99 $^{a, B}$	0.03
Rutina	66.59 $^{a, A}$	0.10	186.65 $^{b, B}$	0.05	295.61 $^{b, C}$	0.03	410.10 $^{a, E}$	0.14	330.36 $^{a, D}$	0.10	649.88 $^{b, F}$	0.14	66.59 $^{a, B}$	0.10	121.76 $^{a, C}$	0.07	22.03 $^{a, A}$	0.04	410.10 $^{a, D}$	0.14	421.03 $^{b, E}$	0.08	569.95 $^{a, F}$	0.11
Σ:	**596.04** $^{a, B}$		**376.86** $^{a, A}$		**880.44** $^{b, C}$		**933.30** $^{a, E}$		**908.32** $^{a, D}$		**1089.91** $^{b, F}$		**596.04** $^{a, A}$		**842.40** $^{b, B}$		**854.29** $^{a, C}$		**933.30** $^{a, D}$		**1171.30** $^{b, F}$		**990.14** $^{a, E}$	
Estilbenos (µg/gss)																								
Resveratrol	28.54 $^{a, A}$	0.10	31.15 $^{b, B}$	0.05	57.19 $^{b, E}$	0.08	62.83 $^{a, F}$	0.09	41.35 $^{a, C}$	0.05	52.40 $^{b, D}$	0.02	28.54 $^{a, C}$	0.10	21.40 $^{a, A}$	0.04	27.29 $^{a, B}$	0.08	62.83 $^{a, E}$	0.09	65.89 $^{b, F}$	0.09	49.95 $^{a, D}$	0.07
Flavona (µg/gss)																								
Apigenina	120.63 $^{a, D}$	0.16	94.88 $^{a, C}$	0.05	124.59 $^{a, E}$	0.07	178.54 $^{a, F}$	0.16	93.01 $^{a, B}$	0.04	25.06 $^{a, A}$	0.08	120.63 $^{a, B}$	0.16	121.61 $^{b, C}$	0.10	152.48 $^{b, D}$	0.07	178.54 $^{a, E}$	0.16	279.95 $^{b, F}$	0.04	58.31 $^{b, A}$	0.10
Fenoles simples (µg/gss)																								
Hidroxitirosol	59.63 $^{a, C}$	0.03	131.04 $^{b, D}$	0.11	34.39 $^{b, B}$	0.04	254.58 $^{a, F}$	0.05	31.49 $^{a, A}$	0.19	222.56 $^{b, E}$	0.17	59.63 $^{a, D}$	0.03	27.84 $^{a, B}$	0.06	23.58 $^{a, A}$	0.05	254.58 $^{a, E}$	0.05	60.18 $^{b, D}$	0.03	254.00 $^{a, E}$	0.12
Tirosol	113.60 $^{a, E}$	0.08	25.73 $^{a, C}$	0.09	11.30 $^{a, A}$	0.09	32.74 $^{a, D}$	0.07	22.88 $^{b, B}$	0.06	25.89 $^{a, C}$	0.06	113.60 $^{a, E}$	0.08	32.53 $^{b, D}$	0.09	15.82 $^{b, A}$	0.04	32.74 $^{a, D}$	0.07	15.97 $^{a, B}$	0.02	26.07 $^{a, C}$	0.05
Σ:	**173.22** $^{a, D}$		**156.77** $^{b, C}$		**45.69** $^{b, A}$		**287.32** $^{a, F}$		**54.52** $^{a, B}$		**248.44** $^{b, E}$		**173.22** $^{a, D}$		**60.36** $^{b, B}$		**39.40** $^{a, A}$		**287.32** $^{a, F}$		**76.15** $^{b, C}$		**280.07** $^{a, E}$	
Secoiridoides (µg/gss)																								
Oleuropeina	85.87 $^{a, A}$	0.07	301.35 $^{b, C}$	0.60	81.07 $^{a, A}$	0.09	425.16 $^{a, D}$	0.14	104.22 $^{a, B}$	0.15	13962.14 $^{a, E}$	1.1	85.87 $^{a, A}$	0.07	109.91 $^{a, B}$	0.10	119.24 $^{b, B}$	0.15	425.16 $^{a, C}$	0.14	6971.47 $^{b, D}$	0.16	24922.52 $^{b, E}$	1.26

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre solventes de extracción, mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre condiciones de operación (concentración y temperatura) de cada solvente. ETOH: Etanol. GLY: Glicerol. $\overline{X}$: Promedio. C.V: Coeficiente de Variación. ND: no detectado.

4.4.6. Fenoles simples

La recuperación de fenoles simples varía de 54.52 a 287.31 µg/gss y de 76.15 a 287.31 µg/gss. Similar al comportamiento de los estilbenos, el agua pura a 70°C mejora en ~13.5 y ~2.5 veces la recuperación de fenoles simples en comparación con etanol y glicerol (30%) respectivamente (Tabla 11). Por ello, el parámetro óptimo de operación fue con agua pura a 70°C. Este comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que el hidroxitirosol y tirosol son más solubles en agua y disolventes orgánicos polares que la oleuropeína, debido a sus diferentes estructuras químicas (Habibi & Mohammadi, 2018). Se ha informado que el contenido de hidroxitirosol de las hojas de olivo, utilizando el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es de alrededor de 2,28 mg por 100 g de extracto de hoja de olivo, mientras que el tirosol suele estar presente en una cantidad mínima (0,0007 mg/g de hojas secas de hoja de olivo) (Clodoveo Lisa et al., 2022).

4.4.7. Secoiroides (oleuropeína)

La recuperación de oleuropeína varía entre 85.87 y 13962.14 µg/gss y de 85.87 y 24922.52 µg/gss con el uso de etanol y glicerol respectivamente (Tabla 11). Si fijamos la temperatura a 70°C el uso de glicerol (30%) fue 78% más efectivo para recuperar oleuropeína en comparación del etanol bajo las mismas condiciones (Tabla 11). Al respecto, Yateem et al., (2014) reportaron que esto es debido a los grupos hidroxilo polares de la oleuropeína, los cuales presentan mayor afinidad con solventes polares y las interacciones de los enlaces de hidrógeno del glicerol (Zurob et al., 2020). La oleuropeína es el compuesto bioactivo mayoritario en los extractos de hojas de olivo llegando a encontrarse valores de ~43.4 – 122.3 mg/gss (Lama-Muñoz et al., 2020), ~21.5 – 106.5 mg/gss (Irakli et al., 2018) y ~14.1 – 40.4 (Clodoveo Lisa et al., 2022).

V. CONCLUSIONES

- El uso de mezclas agua – etanol de 0 a 30% mostraron un efecto favorable en la obtención de extractos polifenólicos, de los cuales el uso de 30% de etanol a 70°C tuvo el mejor performance en la recuperación de polifenoles totales (12.26 mgEAG/gss), la capacidad antioxidante (IC_{50}: 10.02 mg/mL y ORAC: 506.32 µmolET/gss), así como redujo la recuperación de fructosa (1.53 mg/g). Con respecto a polifenoles específicos obtuvo cantidades mayores de extractabilidad de flavanoles (145.44 µg/gss).

- El uso de mezclas agua – glicerol de 0 a 30% mostraron un efecto favorable en recuperación de polifenoles. Bajo estas condiciones, el uso de glicerol al 30% combinado con 70°C permitió una mayor recuperación de polifenoles totales (14.85 mgEAG/gss) y capacidad antioxidante expresado como IC_{50} (2.75 mg/mL) y ORAC (684.65 µmolET/gss). No obstante, esta condición incrementa la recuperación de azúcares reductores. Con respecto a los polifenoles específicos, fue más eficiente para la recuperación de ácidos fenólicos (10.29 µg/gss) y oleuropeína (24922.52 µg/gss).

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso de solventes eutécticos profundos (DES) como el glicerol, combinado con ácido láctico, ácido cítrico, cloruro de colina y aminas para la recuperación de polifenoles con el fin de usar solventes de bajo costo y amigables con el medio ambiente.

- El glicerol como solvente de extracción combinado con EAU se presentan como una buena alternativa de extracción sustentable, se recomienda continuar realizando estudios en diferentes matrices vegetales que posean alto contenido de polifenoles, teniendo en cuenta parámetros como el tiempo de extracción, la frecuencia, el tamaño de partícula de la muestra.

- Realizar un análisis de costo al proceso de extracción para establecer la mejor condición de proceso y así poder realizar un escalamiento a nivel industrial.

VII. REFERENCIAS

Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Mahjoub Haddada, F., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites*, *62*(1), 96–104. https://doi.org/10.3989/gya.044710

Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). Olive Tree (Olea europeae L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Anti*, 682–698. https://doi.org/10.3390/antiox4040682

Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *17*, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.008

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*(February), 200–214. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011

Alavi, T., Pazuki, G., & Raisi, A. (2014). Solubility of Fructose in Water – Ethanol and Water – Methanol Mixtures by Using H-Bonding Models. *Food Engineering & Physical Properties*. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12441

Alupului, A., Călinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, *74*(2), 129–142.

Alves, L. A., Almeida E Silva, J. B., & Giulietti, M. (2007). Solubility of D-glucose in water and ethanol/water mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, *52*(6), 2166–2170. https://doi.org/10.1021/je700177n

Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(2), 295–315. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253

Apostolakis, A., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2014). Optimisation and Comparative Kinetics Study of Polyphenol Extraction from Olive Leaves (Olea europaea) Using Heated Water/Glycerol Mixtures. *SEPARATION*

AND PURIFICATION TECHNOLOGY. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.010

Ávách, Š. Ť., Olasová, M. A. H., & Lasta, V. (2011). Application and Comparison of Methods of Antioxidant Activity Determination in Fruit and Vegetable Juices. *Chemické Listy*, *772*.

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, *48*(2), 410–427. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004

Azwanida. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *04*(03), 3–8. https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196

Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K., & Bhargav, V. K. (2014). Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(10), 2568–2575. https://doi.org/10.1007/s13197-012-0754-4

Badeggi, U. M., Ismail, E., Adeloye, A. O., Botha, S., & Hussein, A. A. (2020). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Capped with Procyanidins from Leucosidea sericea as Potential Antidiabetic and Antioxidant Agents. *Biomolecules*.

Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of. *Molecules*.

Bener, M., AKY¨UZ, E., Burak SEN, F., SOZGEN BASKAN, K., Esma, T., & APAK, R. (2018). A simple automated microplate method for determining reducing sugars in food extracts and synthetic serum using cupric-neocuproine as reductant. *Turkish Journal of Chemistry*, 794–807. https://doi.org/10.3906/kim-1707-30

Bosso, A., Guaita, M., & Petrozziello, M. (2016). Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts. *Food Chemistry*, *207*, 162–169. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.084

Braidot, E., Zancani, M., Petrussa, E., Vianello, A., Bertolini, A., Peresson, C., Macrì, F., & Patui, S. (2011). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (Vitis vinifera L.). *Plant Signaling & Behavior*, *3*(9), 626–632. https://doi.org/10.4161/psb.3.9.6686

Brand-Williams, M. E. C., & Berset, C. (1995). Respostas Perceptivas E. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Calderón-oliver, M., & Ponce-alquicira, E. (2018). Fruits: A Source of Polyphenols and Health Benefits. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 1–30). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811518-3/00007-7

Carvalho, J. R. B., Meireles, A. N., Marques, S. S., Greg, B. J. R., Ramos, I., Silva, E. M. P., Barreiros, L., & Segundo, M. A. (2023). Exploiting Kinetic Features of ORAC Assay for Evaluation of Radical Scavenging Capacity. *Antioxidants*, 1–14.

Cavaca, L. A. S., López-Coca, I. M., Silvero, G., & Afonso, C. A. M. (2020). The olive-tree leaves as a source of high-added value molecules: Oleuropein. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 64). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00005-X

Charrez, B., Hebbard, L., & Qiao, L. (2015). The role of fructose in metabolism and cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation ·*, *June*. https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0009

Cheigh, C., Yoo, S., Ko, M., Chang, P., & Chung, M. (2015). Extraction characteristics of subcritical water depending on the number of hydroxyl group in flavonols. *FOOD CHEMISTRY*, *168*, 21–26. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.047

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560.

https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Chen, H., Wang, W., Yu, S., Wang, H., Tian, Z., & Zhu, S. (2022). Procyanidins and Their Therapeutic Potential against Oral Diseases. *Molecules*, 1–19.

Chirinos, R., Campos, D., Warnier, M., Pedreschi, R., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2008). Antioxidant properties of mashua (Tropaeolum tuberosum) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. *Food Chemistry*, *111*(1), 98–105. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.038

Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, *47*, 145–152. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025

Cifá, D., Skrt, M., Pittia, P., Di Mattia, C., & Poklar Ulrih, N. (2018). Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science and Nutrition*, *6*(4), 1128–1137. https://doi.org/10.1002/fsn3.654

Clodoveo Lisa, M., Crupi, P., Annunziato, A., & Corbo, F. (2022). Innovative Extraction Technologies for Development of Functional Ingredients Based on Polyphenols from Olive Leaves. *Foods*.

Contreras-Guzmán, E. S., & Strong, F. C. (1982). Determination of Tocopherols (Vitamin E) by Reduction of Cupric Ion. *JAOAC 65*, 1215–1221.

da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Gariepy, Y., & Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (Olea europaea L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *58*, 102234. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234

Das, N., Islam, E., Jahan, N., Islam, M. S., Khan, A., & Islam, R. (2014). Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of Crescentia cujete leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *Complementary and Alternative Medicine*.

Dayangac, D., Bora, G., Ayhan, P., Kocaefe, C., Dalkara, S., Yelekc, K., Demir, A., & Hayat, E.-Y. (2009). Histone Deacetylase Inhibition Activity and

Molecular Docking of (E) -Resveratrol : Its Therapeutic Potential in Spinal Muscular Atrophy. *Chem Biol Drug Des*, *21*, 355–364. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00781.x

De la Guardia, M., & Armenta, S. (2011). Downsizing the Methods. *Green Analytical Chemistry*, *57*(11), 157–184. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53709-6.00007-0

Denery, J. R., Dragull, K., Tang, C. S., & Li, Q. X. (2004). Pressurized fluid extraction of carotenoids from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina and kavalactones from Piper methysticum. *Analytica Chimica Acta*, *501*(2), 175–181. https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.026

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. *Journal of Food and Drug Analysis*, *22*(3), 296–302. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001

Dobrinčić, A., Repajic, M., Elez Garofulić, I., Tuđen, L., Dragović-Uzelac, V., & Levaj, B. (2020). Comparison of Di ff erent Extraction Methods for the. *Processes*, *8*(9), 1008.

El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (Olea europaea) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, *67*(11), 632–638. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x

Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I., & Seckin, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(7), 1592–1597. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.006

Erpel, F., Parada, J., Pedreschi, F., & Ricardo, P. (2021). Pressurized Hot Liquid Extraction with 15 % v / v Glycerol-Water as An Effective Environment-Friendly Process to Obtain Durvillaea incurvata and Lessonia spicata Phlorotannin Extracts with Antioxidant and Antihyperglycemic Potential. *Antioxidants*.

Espeso, J., Isaza, A., Lee, J. Y., Sörensen, P. M., Jurado, P., Avena-Bustillos, R. de J., Olaizola, M., & Arboleya, J. C. (2021). Olive Leaf Waste Management. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*(May), 1–13.

https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.660582

Eyiz, V., Tontul, I., & Turker, S. (2019). Optimization of green extraction of phytochemicals from red grape pomace by homogenizer assisted extraction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *0123456789*. https://doi.org/10.1007/s11694-019-00265-7

Fırat, F., Özgül, M., Türköz Uluer, E., & Inan, S. (2019). Effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on angiogenesis, apoptosis and oxidatıve stress ın various cancer cell lines. *Biotechnic and Histochemistry*, *94*(7), 491–497. https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1589574

Fontana, A., Antoniolli, A., D'Amario Fernández, M. A., & Bottini, R. (2017). Phenolics profiling of pomace extracts from different grape varieties cultivated in Argentina. *RSC Adv.*, *7*(47), 29446–29457. https://doi.org/10.1039/C7RA04681B

Fontana, A. R., Antoniolli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(38), 8987–9003. https://doi.org/10.1021/jf402586f

Gao, Y., Zietsman, A. J. J., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing wine grape cell walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. *Molecules*, 1–19. https://doi.org/10.3390/molecules24010165

Giacometti, J., Žauhar, G., & Žuvić, M. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of major phenolic compounds from olive leaves (Olea europaea L.) using response surface methodology. *Foods*, *7*(9), 1–14. https://doi.org/10.3390/foods7090149

Giordano, A., Morales-Tapia, P., Moncada-Basualto, M., Pozo-Martínez, J., Olea-Azar, C., Nesic, A., & Cabrera-Barjas, G. (2022). Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity (ORAC, EPR and Cellular) of Different Extracts of Argylia radiata Vitroplants and Natural Roots. *Molecules*, *27*(3). https://doi.org/10.3390/molecules27030610

Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A. M., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols.

International Journal of Molecular Sciences, *19*(3). https://doi.org/10.3390/ijms19030686

Guido, L. F., & Moreira, M. M. (2017). Techniques for Extraction of Brewer ' s Spent Grain Polyphenols : a Review. In *Food Bioprocess Technol*. Food and Bioprocess Technology. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1913-4

Guijt, R. M. (2017). Future Technology for Characterizing Biotechnology. In *Comprehensive Biotechnology* (Third Edit, Vol. 2, Issue June 2016, pp. 849–859). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09103-2

Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Research International*, *137*(September). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109683

Habibi, H., & Mohammadi, A. (2018). Application and Optimization of Microwave-Assisted Extraction and Dispersive Liquid – Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Oleuropein and Hydroxytyrosol in Olive Pomace. *Food Analitic Methods*.

Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., & Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*, *1218*(42), 7511–7520. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.053

Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(1), 89–143. https://doi.org/10.1080/10408690390826464

Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (Origanum majorana L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *19*(3), 582–590. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.001

Huamán-Castilla, N. L., Campos, D., García-Ríos, D., Parada, J., Martínez-Cifuentes, M., Mariotti-Celis, M. S., & Pérez-Correa, J. R. (2021). Chemical properties of vitis vinifera carménère pomace extracts obtained by hot pressurized liquid extraction, and their inhibitory effect on type 2 diabetes

mellitus related enzymes. *Antioxidants*, *10*(3), 1–14. https://doi.org/10.3390/antiox10030472

Huamán-Castilla, N. L., Mariotti-Celis, M. S., Martinez-Cifuentes, M., & Perez-Correa, J. R. (2020). Glycerol as Alternative Co-Solvent for Water Extraction of Polyphenols from Carm é n è re Pomace : Hot Pressurized Liquid Extraction and Computational Chemistry Calculations. *Biomolecules*, *10*, 1–14.

Huaman-Castilla, N. L., Martínez-Cifuentes, M., Camilo, C., Pedreschi, F., Mariotti-Celis, M., & Pérez-Correa, J. R. (2019). The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLE/RP process on Carménère pomace extracts. *Molecules*, *24*(17), 1–16. https://doi.org/10.3390/molecules24173145

Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841–1856. https://doi.org/10.1021/jf030723c

Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, *124*(January 2017), 382–388. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070

Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease. *Molecules*, *24*(3). https://doi.org/10.3390/molecules24030528

Jab, M., Ciganovi, P., Jablan, J., & Marguí, E. (2021). Industrial Crops & Products Silybum marianum glycerol extraction for the preparation of high-value anti-ageing extracts. *Industrial Crops & Products*, *168*(January). https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113613

Jemai, H., Feki, A. E. L., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(19), 8798–8804. https://doi.org/10.1021/jf901280r

Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be

Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(1), 5–23. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005

Kabbash, E. M., Shakour, Z. T. A., Ahmady, S. H. El, Wink, M., & Ayoub, I. M. (2023). Comparative metabolic profiling of olive leaf extracts from twelve different cultivars collected in both fruiting and flowering seasons. *Scientific Reports*, 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-022-27119-5

Karakashov, B., & Grigorakis, S. (2015). Optimisation of organic solvent-free polyphenol extraction from Hypericum triquetrifolium Turra using Box – Behnken experimental design and kinetics. *Ind Chem*. https://doi.org/10.1007/s40090-015-0034-z

Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Makris, D. P. (2015). Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants Optimisation of polyphenol extraction from Hypericum perforatum (St . John ' s Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *Journal of Dermatological Science*, *2*(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2014.11.002

Kerton, F., & Marriot, R. (2014). Alternative Solvents for Green Chemistry, 2nd Edition. In *Chromatographia* (Vol. 77). https://doi.org/10.1007/s10337-014-2742-5

Khadhraoui, B., Ummat, V., Tiwari, B. K., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2021). Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. *Ultrasonics Sonochemistry*, *76*, 105625. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105625

Khemakhem, I., Micol, V., García-pérez, J. V., & Ayadi, M. A. (2016). Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics - Sonochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.010

Kores, K., Lešnik, S., Bren, U., Janezic, D., & Konc, J. (2019). Discovery of Novel Potential Human Targets of Resveratrol by Inverse Molecular Docking. *Journal of Chemical Information and Modeling*. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00981

Kowalska, G., Baj, T., Kowalski, R., & Szymanska, J. (2021). Optimization of Glycerol – Water Extraction of Selected Bioactive Compounds from Peppermint and Common Nettle. *Antioxidants*.

Lafuente Aranda, G. (2017). Glicerol : Síntesis Y Aplicaciones. In *Universidad Nacional De Educación a Distancia Má* (pp. 1–56). http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf

Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, *320*(March), 126626. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126626

Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., de Torres, A., Romero, I., & Castro, E. (2019). Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions. *Food Chemistry*, *293*(January), 161–168. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.075

Landete, J. M. (2012). Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(10), 936–948. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.513779

Lescano, C. H., Lima, F. F. De, Rodrigues, A., & Caires, L. (2019). Polyphenols Present in Campomanesia Genus : Pharmacological and Nutraceutical Approach. In *Polyphenols in Plants* (2nd ed.). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00027-X

Li, S., Li, S., Li, H., & Xu, X. (2014). Antioxidant Capacities of Herbal Infusions. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00005-2

Liazid, A., Barbero, G. F., Azaroual, L., Palma, M., & Barroso, C. G. (2014). Stability of anthocyanins from red grape skins under pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction conditions. *Molecules*, *19*(12), 21034–21043. https://doi.org/10.3390/molecules191221034

Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, *78*(SUPPL.1). https://doi.org/10.1111/1750-3841.12101

Luo, Y., Shang, P., & Li, D. (2017). Luteolin: A Flavonoid that has multiple cardio-protective effects and its molecular mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(OCT), 1–10. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00692

Luque de Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, *369*(1–2), 1–10. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5

Ma, Z. F., & Zhang, H. (2017). Phytochemical Constituents , Health Benefits , And Industrial Applications of Grape Seeds : A Mini-Review. *Antioxidants*, 1–11. https://doi.org/10.3390/antiox6030071

Makris, D. P., & Lalas, S. (2020). Glycerol and Glycerol-Based Deep Eutectic Mixtures as Emerging Green Solvents for Polyphenol Extraction : The Evidence So Far. *Molecules*.

Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). *Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research* (Vol. 1, Issue 1, pp. 7–18).

María, A., Wilson, M., Castro-arredondo, S. I., & Balandrán-quintana, R. R. (2014). Computational study of the structure – free radical scavenging relationship of procyanidins. *Food Chemistry*, *161*, 155–161. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.111

Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Pedreschi, F., Iglesias-Rebolledo, N., & Pérez-Correa, J. R. (2018). Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of Vitis vinifera ‘Carménère’ pomace extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, *53*(4), 1072–1078. https://doi.org/10.1111/ijfs.13684

Martínez-Patiño, J. C., Gullón, B., Romero, I., Ruiz, E., Brnčić, M., Žlabur, J. Š., & Castro, E. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology. *Ultrasonics* -

Sonochemistry. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.031

Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, *7*(3). https://doi.org/10.3390/agronomy7030047

Michail, A., Sigala, P., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2015). Kinetics of Ultrasound-Assisted Polyphenol Extraction from Spent Filter Coffee Using Aqueous Glycerol. *Chemical Engineering Communications*, *January 2015*, 37–41. https://doi.org/10.1080/00986445.2015.1004667

MIDAGRI. (2022). *Boletín Estadístico Mensual "EL AGRO EN CIFRAS" - 2022*. https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/2826318-boletin-estadistico-mensual-el-agro-en-cifras-2022

Mkadmini, K., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., & Ksouri, R. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian Zizyphus lotus fruits using response surface methodology. *FOOD CHEMISTRY*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.047

Molina-Alcaide, E., & Yañez-Ruiz, D. R. (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding : A review ☆. *Animal Feed Science and Technology*, *147*, 247–264. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.021

Monteiro Espíndola, K. M., Ferreira, R. G., Mosquera Narvaez, L. E., Rocha Silva Rosario, A. C., Machado Da Silva, A. H., Bispo Silva, A. G., Oliveira Vieira, A. P., & Chagas Monteiro, M. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, *9*(JUN), 3–5. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541

Musa, K. H., & Abdullah, A. (2011). Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (Psidium guajava L .): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analitic Methods*, *4*, 100–107. https://doi.org/10.1007/s12161-010-9139-3

Musielak, G., Mierzwa, D., & Kroehnke, J. (2016). Food drying enhancement by ultrasound – A review. *Trends in Food Science and Technology*, *56*, 126–141. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.003

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Feo, V., Battistelli, A., Da Cruz, A. G., & Coppola, R. (2020). Polyphenols, the new frontiers of prebiotics. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed.). Elsevier Inc.

https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.002

Nováková, L., Svoboda, P., & Pavlík, J. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography. In *Liquid Chromatography* (Second Edition). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4

Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2017). A review: benefit and bioactive properties of olive (Olea europaea L.) leaves. *European Food Research and Technology*, *243*(1), 89–99. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2726-9

Pacheco, E. (2011). *Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa*.

Pan, X., Shao, Y., Wang, F., Cai, Z., Liu, S., Xi, J., He, R., Zhao, Y., & Zhuang, R. (2020). Protective effect of apigenin magnesium complex on H 2 O 2 - induced oxidative stress and inflammatory responses in rat hepatic stellate cells. *Pharmaceutical Biology*, *58*(1), 553–560. https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1772840

Parke, S. A., & Birch, G. G. (1999). Solution properties of ethanol in water. *Food Chemistry*, *67*, 241–246.

Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010). Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. *Food Research International*, *43*(4), 1123–1129. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.005

Plaza, M., & Turner, C. (2015). Trends in Analytical Chemistry Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 39–54. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022

Pohanka, M. (2023). International Journal of Electrochemical Science Assays of antioxidant capacity : Optics and voltammetry ☆. *International Journal of Electrochemical Science*, *18*(10), 100276. https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100276

Pozo-Martinez, J., Vázquez- Rodriguez, S., Olea-Azar, C., & Moncada-Basualto, M. (2022). Evaluation of ORAC methodologies in determination of antioxidant capacity of binary trihydroxybenzoyl) coumarin derivatives. *ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104298

Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, *18*, 797–810. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018

Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., & Bursać Kovačević, D. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (Olea europea). *Food and Bioproducts Processing*, *106*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004

Rahman, M. (2018). Application of Computational Methods in Isolation of Plant Secondary Metabolites. In *Computational Phytochemistry*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812364-5.00004-3

Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Venkata Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *349*(1–2), 11–19. https://doi.org/10.1007/s11010-010-0655-7

Robles-Almazan, M., Pulido-moran, M., Moreno-fernandez, J., Ramirez-tortosa, C., Rodriguez-garcia, C., & Quiles, J. L. (2018). Hydroxytyrosol : Bioavailability , toxicity , and clinical applications. *Food Research International*, *105*(July 2017), 654–667. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053

Romero, M., Toral, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., Olivares, M., Gálvez, J., & Duarte, J. (2015). Function olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food and Function*. https://doi.org/10.1039/c5fo01101a

Roselló-Soto, E., Martí-Quijal, F., Cilla, A., Munekata, P., Lorenzo, J., Remize, F., & Barba, F. (2019). Influence of Temperature, Solvent and pH on the Selective Extraction of Phenolic Compounds from Tiger Nuts by-Products: Triple-TOF-LC-MS-MS Characterization. *Molecules*, *24*(4), 797. https://doi.org/10.3390/molecules24040797

Rouhani, M. (2019). Industrial Crops & Products Modeling and optimization of ultrasound-assisted green extraction and rapid HPTLC analysis of stevioside from Stevia Rebaudiana. *Industrial Crops & Products*, *132*(February), 226–235. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.029

Ruiz, E., Romero, I., Manzanares, P., & Castro, E. (2017). Olive-derived biomass as a source of energy and chemicals. *Biofuels Bioproducts Biorefining*. https://doi.org/10.1002/bbb.1812

Şahin, S., İlbay, Z., & Kırbaşlar, İ. (2015). Study on Optimum Extraction Conditions for Olive Leaf Extracts Rich in Polyphenol and Flavonoid. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, *50*(8), 1181–1189. https://doi.org/10.1080/01496395.2014.966203

Şahin, S., & Şamli, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 595–602. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029

Sanseverino, A. M. (2002). *MICROONDAS EM SÍNTESE ORGÂNICA* (Vol. 25, Issue 4, pp. 660–667).

Seelinger, G., Merfort, I., Wölfle, U., & Schempp, C. M. (2008). Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules*, *13*(10), 2628–2651. https://doi.org/10.3390/molecules13102628

Seidel, V. (2012). Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Methods in Molecular Biology*, *864*, 27–41. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1

Shields, M. (2017). Chemotherapeutics. In *Pharmacognosy*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00014-7

Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *53*, 10–23. https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003

Shockcor, J. P., Pont, D., & Co, P. (2017). HPLC – NMR , Pharmaceutical Applications. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed.). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00377-0

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144 LP – 158.

Soquetta, M. B., Terra, L. de M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 400–412.

https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978

Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(7), 323–331. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003

Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., & Carlos, J. (2011). Recovery , concentration and purification of phenolic compounds by adsorption : A review. *Journal of Food Engineering*, *105*, 1–27. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010

Souilem, S., Fki, I., Kobayashi, I., Khalid, N., Neves, M. A., Isoda, H., Sayadi, S., & Nakajima, M. (2017). Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(2), 229–248. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1834-7

Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-moccetti, T., & Verbruggen, M. (2011). Phytomedicine Olive (Olea europaea) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension : Comparison with Captopril. *European Journal of Integrative Medicine*, *18*(4), 251–258. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.016

Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, *77*, 92–108. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011

Valinger, D., Kušen, M., & Benkovi, M. (2022). Enhancement of the Green Extraction of Bioactive Molecules from Olea europaea Leaves. *Separations*, 1–17.

Vergara-Salinas, J. R., Bulnes, P., Zúñiga, M. C., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Mateos-Martín, M. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2013). Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(28), 6929–6936. https://doi.org/10.1021/jf4010143

Wade, J. (2011). *Química Orgánica*.

Wang, B., Qu, J., Luo, S., Feng, S., Li, T., Yuan, M., Huang, Y., Liao, J., Yang, R., & Ding, C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from olive (olea europaea) leaves, and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *Molecules*, *23*(10). https://doi.org/10.3390/molecules23102513

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., & Kochan, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review Ewelina. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045

Wilson, A. M., Work, T. M., Bushway, A. A., & Bushway, R. J. (1981). *HPLC Determination of Fructose , Glucose, Sucrose in Potatoes*. *32*(02), 198–200.

Yancheva, S., Mavromatis, P., & Georgieva, L. (2016). Polifenolen profil i antioksidantna aktivnost na ekstrakti ot maslinovi lista. *Journal of Central European Agriculture*, *17*(1), 154–163. https://doi.org/10.5513/JCEA01/17.1.1684

Yateem, H., Afaneh, I., & Al-Rimawi, F. (2014). Optimum Conditions for Oleuropein Extraction from Olive Leaves. *International Journal of Applied Science and Technology*, *4*(5), 153–157.

Zanwar, A. A., Badole, S. L., Shende, P. S., Hegde, M. V, & Bodhankar, S. L. (2014). Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease. In *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00021-9

Zhang, C., Xin, X., Zhang, J., Zhu, S., Niu, E., & Zhou, Z. (2022). Comparative Evaluation of the Phytochemical Profiles and Antioxidant Potentials of Olive Leaves from 32 Cultivars. *Molecules*.

Zordoky, B. N. M., Robertson, I. M., & Dyck, J. R. B. (2014). Preclinical and Clinical Evidence for the Role ofResveratrol in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *BBA - Molecular Basis of Disease*. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.016

Zrinski, I., Pungjunun, K., Martinez, S., Zavašnik, J., Stanković, D., Kalcher, K., & Mehmeti, E. (2020). Evaluation of phenolic antioxidant capacity in beverages based on laccase immobilized on screen-printed carbon electrode modified with graphene nanoplatelets and gold nanoparticles.

Microchemical Journal, *152*(September 2019), 104282. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104282

Zuntar, I., Putnik, P., Nutrizio, M., Šupljika, F., Poljanec, A., Dubrovi, I., & Jambrak, A. R. (2019). Phenolic and Antioxidant Analysis of Olive Leaves Extracts Obtained by High Voltage Electrical Discharges. *Foods*, *8*, 1–29.

Zurob, E., Cabezas, R., Villarroel, E., Rosas, N., Merlet, G., Quijada-maldonado, E., Romero, J., & Plaza, A. (2020). Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS. *Separation and Purification Technology*, *248*(January), 117054. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117054

VIII. ANEXOS

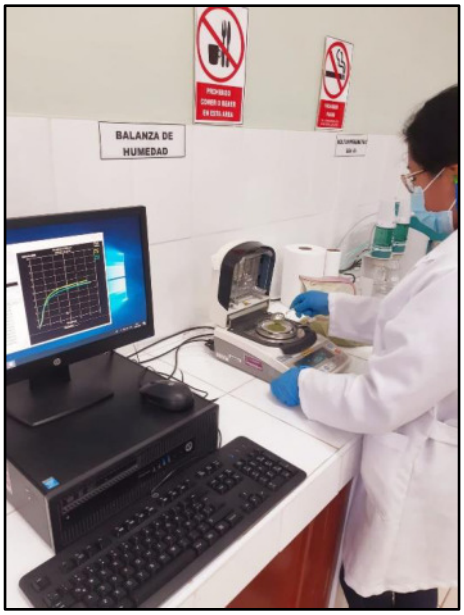
Anexo 1. Panel Fotográfico

Fotografía 1 y 2. Muestra de hoja de olivo



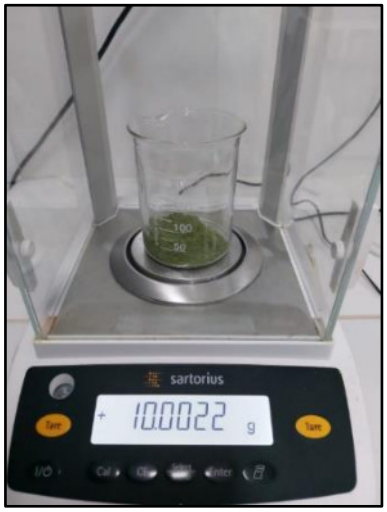


Fotografía 3. Determinación de humedad en hojas de olivo



Extracción Asistida por Ultrasonido

Fotografía 4. Pesado de hoja de olivo

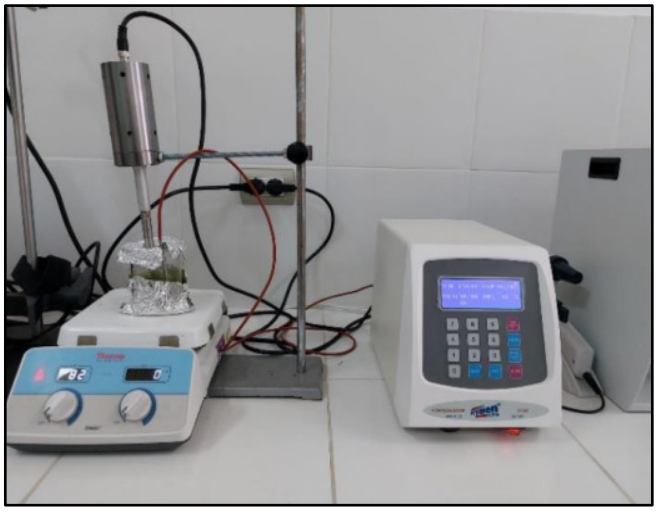


Fotografía 5. Muestra y solvente



Fotografía 6 y 7. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)

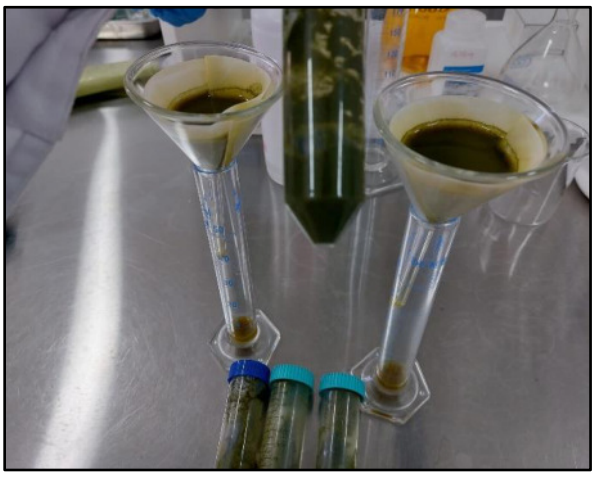




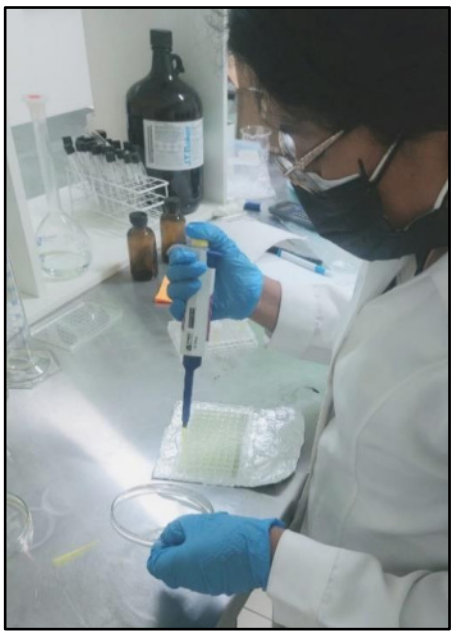
Fotografía 8. Centrifugado de extracto



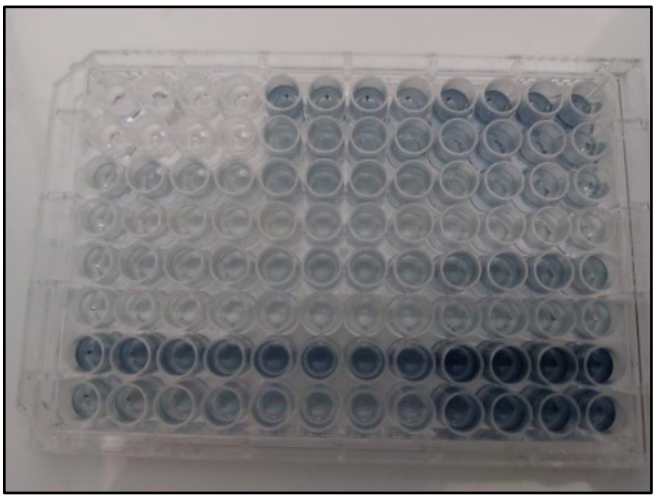
Fotografía 9. Filtrado de extractos



Fotografía 10. Preparación de placa CTP



Fotografía 11. Viraje de CTP



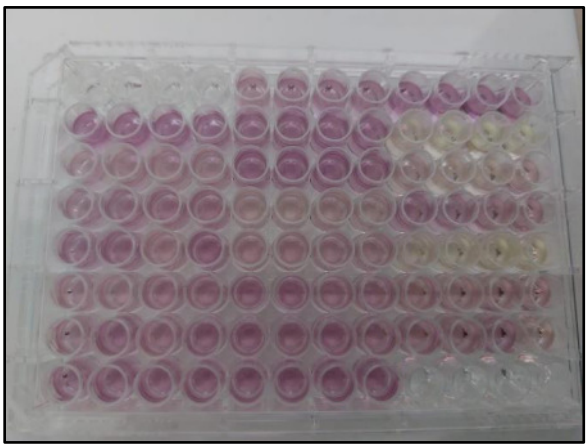
Fotografía 12. Lectura de CTP



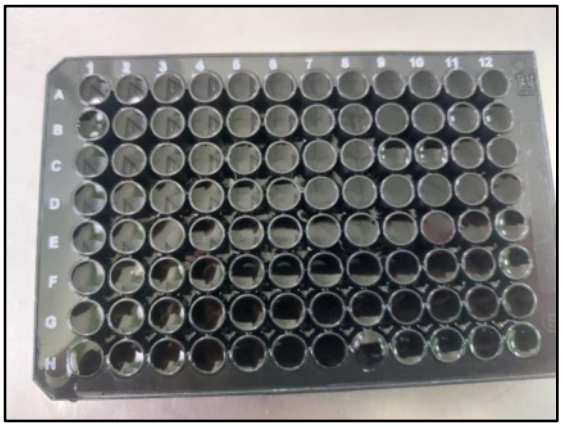
Fotografía 13. Preparación de placa DPPH



Fotografía 14. Viraje DPPH



Fotografía 15. Preparación placa ORAC

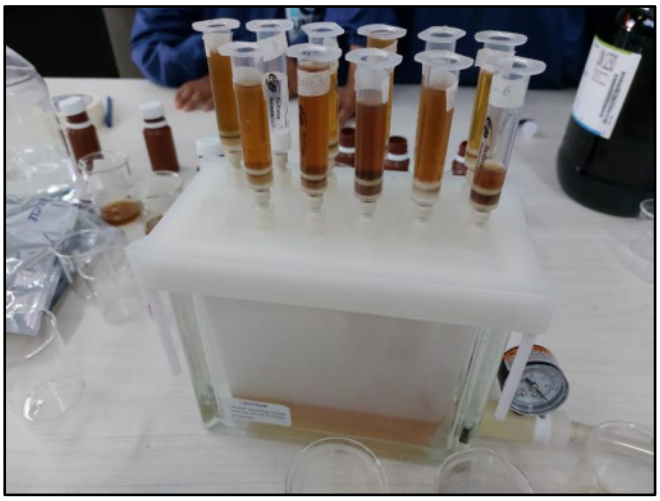


Fotografía 16. Lectura



Cuantificación e Identificación de polifenoles específicos de extractos de hojas de olivo

Fotografía 17 y 18. Elución de extractos de hoja de olivo





Fotografía 19. Distribución de viales con extractos de hojas de olivo en UHPLC



Fotografía 20. Lectura y cuantificación de polifenoles específicos de extractos de hojas de olivo en UHPLC



Anexo 2. Curva de calibración de ácido gálico y contenido total de polifenoles

Se calibró el método para la determinación de polifenoles totales haciendo uso de la metodología descrita, empleando ácido gálico como patrón. En la Tabla 12, se muestran los valores de absorbancias a 765 nm correspondientes a las diferentes concentraciones de ácido gálico (mg/L).

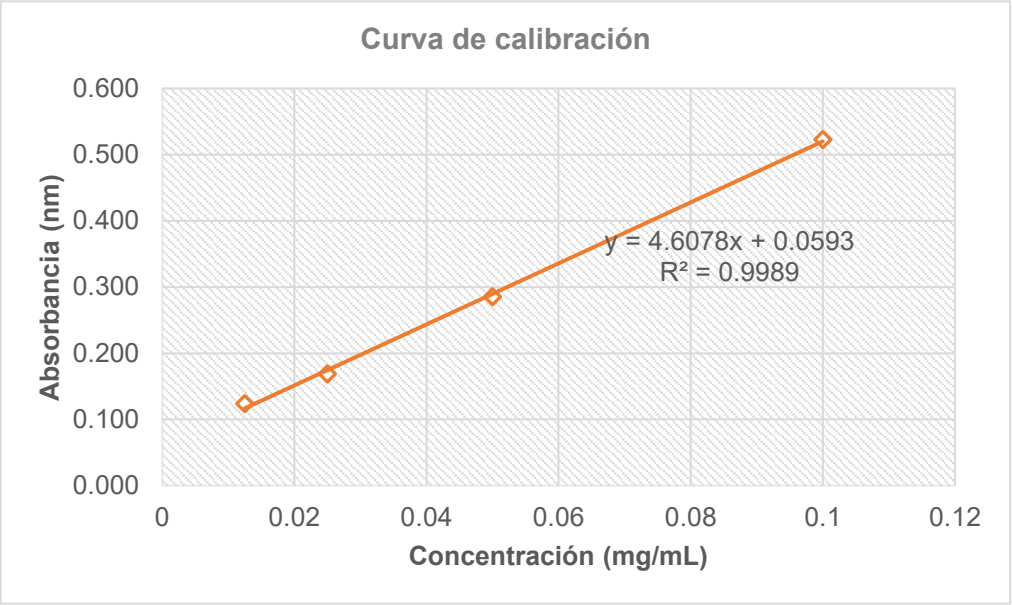
Tabla 12. Curva de calibración del método de Folin Ciocalteu

N°	Ácido gálico (mg/L)	Absorbancia 765 nm
1	0.1	0.523
2	0.05	0.285
3	0.025	0.169
4	0.0125	0.124

Los datos de la Tabla 12, fueron sometidos a una regresión lineal simple, con la finalidad de obtener una curva de calibración para el método y la ecuación que asocia a las tres variables en estudio. El análisis de regresión lineal nos permite obtener una función lineal que relaciona una variable dependiente Y (Absorbancia a 765 nm) con una variable independiente X (ácido gálico mg/mL). El coeficiente de determinación R2 indica el grado de correlación entre las dos variables. Del análisis se obtuvo la siguiente ecuación:

$y = 4.6078 x + 0.0593$, con $R2=0.9989$. Esto significa que el 99.89% de la variabilidad de la concentración puede ser explicada por la variable absorbancia a 765 nm. En la siguiente figura, se observa la representación de la curva de calibración.

Figura 16. Curva de calibración de ácido gálico



Anexo 3. Metodología DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos crudos de hojas de olivo fue determinada según la metodología propuesta por (M. E. C. Brand-Williams & Berset, 1995).

A. Preparación de disoluciones

Se preparó tres diluciones metanólicas seriadas del extracto de hojas de olivo a distintas concentraciones (1/4, 1/16, 1/32).

B. Solución metanólica de DPPH:

Se procedió a pesar 10 mg de DPPH en un matraz volumétrico de 500 ml, aforando con metanol grado HPLC (>95%) y protegió de la luz. Esta solución debe ser fresca, pudiendo utilizar sólo si su Absorbancia es mayor a 0,5.

C. Armado de placa

Se mezcló 5µL de las diluciones de los extractos diluidos (muestra) con 195 µL de solución metanólica de DPPH. Dejar reaccionar 30min y proteger de la luz. Simultáneamente, se utilizaron como blanco metanol y como parte del control 200 µL de solución de DPPH y 200 µL de metanol. Los resultados fueron expresados en IC50 (mg/mL), concentración necesaria del extracto de hojas de olivo para inhibir el 50% de la absorción de radicales DPPH.

D. Cálculos

El porcentaje de inhibición (capacidad secuestradora de radicales libres) para cada concentración de muestra, se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \left(1 - \frac{Ac}{Ab}\right) x100$$

Donde:

Ac=Absorbancia de las muestras (promedio triplicado) a 517 nm

Ab=Absorbancia del control negativo a 517 nm

Con el porcentaje de inhibición obtenida para cada concentración de muestra se realizó una regresión lineal, donde la variable independiente es la concentración de muestra y la dependiente el % de inhibición de DPPH, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = mC + n$$

Donde: el % de inhibición a la concentración "C" de muestra, y "m" y "n" son los coeficientes determinados en la regresión lineal.
Con la ecuación anterior, se determinó el factor IC_{50}, cantidad de antioxidante necesario para reducir en un 50% la actividad del radical DPPH:

$$IC_{50} = \frac{50 - n}{m}$$

La actividad antiradical se define como la cantidad de antioxidante necesario para reducir la concentración inicial del radical DPPH en un 50%.

Anexo 4. Metodología de capacidad antioxidante por ORAC

Los análisis ORAC de los extractos obtenidos se realizaron en un fluorómetro de microplaca de acuerdo a la metodología propuesta por (Chirinos et al., 2008).

1. **Reactivos**
   a. **Preparación de solución Buffer fosfato (PBS) pH 7.4 (75mM)**
      - Se pesó 10.1241 g de K2HPO4 (fosfato dipotásico, hidrógeno-ortofosfato dipotásico o hidrógeno-fosfato de potasio), y añadió a una fiola de 100 mL, luego fue llevado al respectivo volumen con agua MiliQ. (Solución A)
      - Se pesó 2.2960 g de KH2PO4 (fosfato monopotasico o Fosfato de monopotasio), y añadió a una fiola de 100 mL, llevar al respectivo volumen con agua MiliQ. (Solución B).

      Para llegar a la concentración de 75 mM. Se mezcló 100 mL de la solución A con 100 mL de la solución B, esta mezcla se llevó a un volumen de 1000 mL con agua MiliQ.

   b. **Preparación de solución de fluoresceína (55nM)**
      - Para preparar el Stock se pesó 0.0167 g de fluoresceína (PM: 376.28) y llevó a 10 mL con el PBS (pH: 7.4).
      - Al momento de hacer el ensayo se tomaron 10 uL de la solución stock y se agregó 990 uL de PBS en un ependorf de 2 mL y se agitó bien en el vortex. (dilución 1).
      - Luego se tomaron 50 uL de la dilución 1 y se agregó a 40 mL de la solución PBS en una fiola de 50mL, el conjunto se agitó en el vortex. (Dilución 2).

   c. **Solución de AAPH (153 mM)**
      - Esta solución se preparó al momento de hacer el ensayo
      - Se disolvió 0.207 g de AAPH (PM: 271.19) en 5 mL de PBS (pH: 7.4) y agitó en un vortex hasta su completa disolución
      - La solución preparada es colocada en hielo hasta el momento de su empleo.

d. Solución Trólox (0.01M)

- Se disolvió 0.0628 g de Trolox (PM: 250.29) en 25 mL del PBS (pH:7.4).
- Luego se pasa a dividir la solución en ependorf de 2 mL (1.5 mL). Solución stock.

2. Preparación de la curva estándar de Trolox

- Se descongeló la solución stock del Trolox y se tomó 1 mL de esta, para luego llevarla a una concentración de 0.0002 M (1 mL del stock de trolox será colocado em una fiola de 50 mL y aforarlo con PBS). Solución diluida
- A partir de la solución diluida se realizó la curva estándar tomando en cuenta las cantidades indicadas en la siguiente tabla.

Tabla 13. Preparación curva estándar de Trólox

Concentración de Trólox (uM)	Volumen de la solución diluida de Trolox (0.0002M)	Volumen del PBS (pH: 7.4)
8	40 uL	960 uL
16	80 uL	920 uL
24	120 uL	880 uL
32	160 uL	840 uL
40	200 uL	800 uL

- Las diluciones se realizaron en tubos ependdorf de 1.5 mL para luego pasarlas a microplaca.

3. Protocolo ORAC

- La microplaca de 96 pozos será llenó con las soluciones establecidas de la siguiente forma:

Tabla 14. Preparación de microplaca

Reactivo	Concentración inicial	Volumen
Fluoresceína	55 nM	250 uL
AAPH	153 mM	25 uL
Trólox	8; 16; 24; 32; 40 uM	25 uL
Muestra		25 uL

- La microplaca fue cargada primero con el trolox (o muestra) y luego llevada a incubación a 37°C por 10 min y luego se inyectó el AAPH, el mismo que debe estar a bajas temperaturas (baño de hielo) antes de ser incorporado a la microplaca.
- Una vez realizada la inyección se procedió a realizar la lectura de los pozos cada minuto por un tiempo de 55 min.

Anexo 5. Parámetros para identificación de polifenoles específicos presentes en hojas de olivo mediante el uso de UHPLC - DAD

Polifenol específico	Longitud de onda (nm)	Ecuación lineal	r^2
Hidroxitirosol	280	y = 22,656x – 2,214	0,9993
Tirosol	270	y = 15,075x + 1,372	0,9998
Catequina	280	y = 25,251x – 0,531	0,9999
Ácido cafeico	324	y=149,119x + 0,975	0,9998
Procianidina B2	280	y= 41.359x - 2.484	0.9997
Epicatequina	280	y = 43,395x + 2,155	0,9999
Ácido vanílico	280	y = 141,992x + 5,457	0,9998
Rutina	270	y = 6,615x + 1,780	0,9992
Procianidina A2	280	y = 59,280x – 0,796	0,9999
Quercitrina	270	y = 24,462x + 2,283	0,9997
Oleuropeína	280	y = 9,512x – 2,997	0,9972
Resveratrol	324	y = 78,810x + 31,358	0,9985
Apigenina	324	y = 71,169x + 0,871	0,9998
Kaempferol	373	y = 38,023x – 1,536	0,9997

Polifenol específico	Tiempo de retención (min)	Límite de detección (ng/mL)	Límite de cuantificación (ng/mL)
Hidroxitirosol	3,66	1,7	5,1
Tirosol	5,412	0,2	0,7
Catequina	5,877	2,9	8,7
Ácido cafeico	6.423	0.4	1.2
Procianidina B2	6.632	5.7	17.1
Epicatequina	7,149	0,9	2,6
Ácido vanílico	7,678	0,3	0,8
Rutina	8,960	0,1	0,3
Procianidina A2	9,638	0,5	1,4
Quercitrina	10,328	0,5	1,6
Oleuropeína	11,403	1,8	5,5
Resveratrol	11,891	7,6	22,9
Apigenina	14,920	0,7	2,2
Kaempferol	15,335	4,9	14,7

Anexo 6. Análisis de varianza para polifenoles totales (CTP) – Suma de cuadrados – Prueba de Normalidad y Homocedasticiad

Modelos Lineales Generalizados

Número de variables dependientes: 4

Número de factores categóricos: 3

A= Solvente

B= Concentración

C= Temperatura

Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de Varianza para CTP

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	151.825	11	13.8022	114.14	0.0000
Residuo	1.45108	12	0.120923		
Total (Corregido)	153.276	23			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Solvente	2.42414	1	2.42414	20.05	0.0008
Concentración	89.0872	2	44.5436	368.36	0.0000
Temperatura	50.8493	1	50.8493	420.51	0.0000
Solvente*Concentración	1.52976	2	0.764882	6.33	0.0133
Solvente*Temperatura	2.98192	1	2.98192	24.66	0.0003
Concentración*Temperatura	0.86318	2	0.431592	3.57	0.0608
Solvente*Concentración* Temperatura	4.08906	2	2.04453	16.91	0.0003
Residuo	1.45108	12	0.120923		
Total (corregido)	153.276	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadrados Medios Esperados (CME)

Fuente	*CME*
Solvente	(8)+Q1
Concentración	(8)+Q2
Temperatura	(8)+Q3
Solvente*Concentración	(8)+Q4
Solvente*Temperatura	(8)+Q5
Concentración*Temperatura	(8)+Q6
Solvente*Concentración*Temperatura	(8)+Q7
Residuo	(8)

Denominadores de Prueba-F

Fuente	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Denominador*
Solvente	12.00	0.120923	(8)
Concentración	12.00	0.120923	(8)
Temperatura	12.00	0.120923	(8)
Solvente*Concentración	12.00	0.120923	(8)
Solvente*Temperatura	12.00	0.120923	(8)
Concentración*Temperatura	12.00	0.120923	(8)
Solvente*Concentración* Temperatura	12.00	0.120923	(8)

Componentes de Varianza

Fuente	*Estimado*
Residuo	0.120923

R-Cuadrada = 99.0533 %

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.1855 %

Error estándar del est. = 0.34774

Error medio absoluto = 0.197235

Estadístico Durbin-Watson = 1.4868 (P=0.2158)

Análisis de Residuos

	Estimación	*Validación*
n	24	
CME	0.120923	
MAE	0.197235	
MAPE	2.34766	
ME	1.81336E-15	
MPE	-0.0923171	

La salida también resume el desempeño del modelo para ajustar los datos, y para predecir cualquier valor retenido fuera del proceso de ajuste.

Se muestra:

(1) el cuadrado medio del error (CME)

(2) el error medio absoluto (MAE)

(3) el porcentaje de error medio absoluto (MAPE)

(4) el error medio (ME)

(5) el porcentaje de error medio (MPE)

Cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los primeros tres estadísticos miden la magnitud de los errores. El mejor modelo dará el valor más pequeño. Los últimos dos estadísticos miden el bias (sesgo). El mejor modelo dará un valor cercano a 0.

Prueba de comparación Múltiples para CTP por Solvente

Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Solvente	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
Etanol	12	9.27176	0.100384	X
Glicerol	12	9.90739	0.100384	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
Etanol - Glicerol	*	-0.635628	0.309314

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiple para CTP por Concentración
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Concentración	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
0	8	7.13703	0.122945	X
15	8	9.7879	0.122945	X
30	8	11.8438	0.122945	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
0 - 15	*	-2.65087	0.465137
0 - 30	*	-4.70678	0.465137
15 - 30	*	-2.05592	0.465137

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiple para CTP por Temperatura
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Temperatura	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
50	12	8.134	0.100384	X
70	12	11.0452	0.100384	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
50 - 70	*	-2.91116	0.309314

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Pruebas de Normalidad para CTP

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.99398	0.9999

Verificación de varianza

	Prueba	*Valor-P*
NCV test	0.9896121	0.31984

Anexo 7. Análisis de varianza para capacidad antioxidante por DPPH – Suma de cuadrados – Prueba de Normalidad y Homocedasticidad

Modelos Lineales Generalizados

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 3

A= Solvente

B= Concentración

C= Temperatura

Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de Varianza para DPPH

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	1586.61	9	176.29	462.81	0.0000
Residuo	5.33276	14	0.380911		
Total (Corregido)	1591.94	23			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Solvente	120.028	1	120.028	315.11	0.0000
Concentración	809.607	2	404.804	1062.72	0.0000
Temperatura	336.502	1	336.502	883.41	0.0000
Solvente*Concentración	60.9287	2	30.4644	79.98	0.0000
Solvente*Temperatura	5.26276	1	5.26276	13.82	0.0023
Concentración*Temperatura	254.279	2	127.14	333.78	0.0000
Residuo	5.33276	14	0.380911		
Total (corregido)	1591.94	23			

Cuadrados Medios Esperados (CME)

Fuente	*CME*
Solvente	(7)+Q1
Concentración	(7)+Q2
Temperatura	(7)+Q3
Solvente*Concentración	(7)+Q4
Solvente*Temperatura	(7)+Q5
Concentración*Temperatura	(7)+Q6
Residuo	(7)

Denominadores de Prueba-F

Fuente	*GI*	*Cuadrado Medio*	*Denominador*
Solvente	14.00	0.380911	(7)
Concentración	14.00	0.380911	(7)
Temperatura	14.00	0.380911	(7)
Solvente*Concentración	14.00	0.380911	(7)
Solvente*Temperatura	14.00	0.380911	(7)
Concentración*Temperatura	14.00	0.380911	(7)

Componentes de Varianza

Fuente	*Estimado*
Residuo	0.380911

R-Cuadrada = 99.665%

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.4497%

Error estándar del est. = 0.61718

Error medio absoluto = 0.41618

Estadístico Durbin-Watson = 1.00004 (P=0.0127)

Análisis de Residuos

	Estimación	*Validación*
n	24	
CME	0.380911	
MAE	0.41618	
MAPE	3.76248	
ME	8.14164E-16	
MPE	-0.0182405	

La salida también resume el desempeño del modelo para ajustar los datos, y para predecir cualquier valor retenido fuera del proceso de ajuste.

Se muestra:

(1) el cuadrado medio del error (CME)

(2) el error medio absoluto (MAE)

(3) el porcentaje de error medio absoluto (MAPE)

(4) el error medio (ME)

(5) el porcentaje de error medio (MPE)

Cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los primeros tres estadísticos miden la magnitud de los errores. El mejor modelo dará el valor más pequeño. Los últimos dos estadísticos miden el bias (sesgo). El mejor modelo dará un valor cercano a 0.

Prueba de comparación Múltiples para DPPH por Solvente

Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Solvente	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
Glicerol	12	10.9364	0.178165	X
Etanol	12	15.4091	0.178165	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
Etanol - Glicerol	*	4.47267	0.540408

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiples para DPPH por Concentración

Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Concentración	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
30	8	7.80671	0.218206	X
15	8	10.4701	0.218206	X
0	8	21.2414	0.218206	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
0 - 15	*	10.7712	0.810764
0 - 30	*	13.4347	0.810764
15 - 30	*	2.66344	0.810764

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiples para DPPH por Temperatura
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Temperatura	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
70	12	9.42829	0.178165	X
50	12	16.9172	0.178165	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
50 - 70	*	7.4889	0.540408

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Pruebas de Normalidad para DPPH

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.91763	0.05179

Verificación de varianza

	Prueba	*Valor-P*
NCV test	1.08447	0.2977

Anexo 8. Análisis de varianza para capacidad antioxidante por ORAC – Suma de cuadrados – Prueba de Normalidad y Homocedasticiad

Modelos Lineales Generalizados

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 3

A= Solvente

B= Concentración

C= Temperatura

Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de Varianza para ORAC

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	579146.	11	52649.7	187.20	0.0000
Residuo	3374.9	12	281.242		
Total (Corregido)	582521	23			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Solvente	12555.7	1	12555.7	44.64	0.0000
Concentración	254786.	2	127393.	452.97	0.0000
Temperatura	235281.	1	235281.	836.58	0.0000
Solvente*Concentración	6172.95	2	3086.47	10.97	0.0020
Solvente*Temperatura	38357.2	1	38357.2	136.39	0.0000
Concentración*Temperatura	13838.4	2	6919.19	24.60	0.0001
Solvente*Concentración* Temperatura	18155.0	2	9077.48	32.28	0.0000
Residuo	3374.9	12	281.242		
Total (corregido)	582521	23			

Cuadrados Medios Esperados (CME)

Fuente	*CME*
Solvente	(8)+Q1
Concentración	(8)+Q2
Temperatura	(8)+Q3
Solvente*Concentración	(8)+Q4
Solvente*Temperatura	(8)+Q5
Concentración*Temperatura	(8)+Q6
Solvente*Concentración* Temperatura	(8)+Q7
Residuo	(8)

Denominadores de Prueba-F

Fuente	*GI*	*Cuadrado Medio*	*Denominador*
Solvente	12.00	281.242	(8)
Concentración	12.00	281.242	(8)
Temperatura	12.00	281.242	(8)
Solvente*Concentración	12.00	281.242	(8)
Solvente*Temperatura	12.00	281.242	(8)
Concentración*Temperatura	12.00	281.242	(8)
Solvente*Concentración*Temperatura	12.00	281.242	(8)

Componentes de Varianza

Fuente	*Estimado*
Residuo	281.242

R-Cuadrada = 99.4206 %

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.8896 %

Error estándar del est. = 16.7703

Error medio absoluto = 9.77128

Estadístico Durbin-Watson = 2.15555 (P=0.6704)

Análisis de Residuos

	Estimación	*Validación*
n	24	
CME	281.242	
MAE	9.77128	
MAPE	3.23858	
ME	6.03961E-14	
MPE	-0.148685	

La salida también resume el desempeño del modelo para ajustar los datos, y para predecir cualquier valor retenido fuera del proceso de ajuste.

Se muestra:

(1) el cuadrado medio del error (CME)

(2) el error medio absoluto (MAE)

(3) el porcentaje de error medio absoluto (MAPE)

(4) el error medio (ME)

(5) el porcentaje de error medio (MPE)

Cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los primeros tres estadísticos miden la magnitud de los errores. El mejor modelo dará el valor más pequeño. Los últimos dos estadísticos miden el bias (sesgo). El mejor modelo dará un valor cercano a 0.

Prueba de comparación Múltiples para ORAC por SOLVENTE

Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Solvente	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
Etanol	12	308.162	4.84116	X
Glicerol	12	353.907	4.84116	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
Etanol - Glicerol	*	-45.7451	14.9171

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiples para ORAC por Concentración
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Concentración	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
0	8	213.696	5.92918	X
15	8	314.884	5.92918	X
30	8	464.522	5.92918	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
0 - 15	*	-101.188	22.4319
0 - 30	*	-250.827	22.4319
15 - 30	*	-149.638	22.4319

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiples para ORAC por Temperatura
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Temperatura	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
50	12	232.022	4.84116	X
70	12	430.046	4.84116	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
50 - 70	*	-198.024	14.9171

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Pruebas de Normalidad para ORAC

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.98032	0.9016

Verificación de varianza

	Prueba	*Valor-P*
NCV test	1.857383	0.17293

Anexo 9. Análisis de varianza de Azúcares Reductores – Suma de cuadrados – Prueba de Normalidad y Homocedasticiad

Modelos Lineales Generalizados

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 2

A=Solvente

B=Concentración

Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de Varianza para Azúcares Reductores

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	311.68	5	62.3361	39.71	0.0000
Residuo	28.2556	18	1.56976		
Total (Corregido)	339.936	23			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Solvente	135.28	1	135.28	86.18	0.0000
Concentración	57.458	2	28.729	18.30	0.0000
Solvente*Concentración	118.942	2	59.4712	37.89	0.0000
Residuo	28.2556	18	1.56976		
Total (corregido)	339.936	23			

Cuadrados Medios Esperados (CME)

Fuente	*CME*
Solvente	(4)+Q1
Concentración	(4)+Q2
Solvente*Concentración	(4)+Q3
Residuo	(4)

Denominadores de Prueba-F

Fuente	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Denominador*
Solvente	18.00	1.56976	(4)
Concentración	18.00	1.56976	(4)
Solvente*Concentración	18.00	1.56976	(4)

Componentes de Varianza

Fuente	*Estimado*
Residuo	1.56976

R-Cuadrada = 91.688%

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 89.3791%

Error estándar del est. = 1.2529

Error medio absoluto = 0.966667

Estadístico Durbin-Watson = 2.54603 (P=0.9194)

Análisis de Residuos

	Estimación	*Validación*
n	24	
CME	1.56976	
MAE	0.966667	
MAPE	25.5716	
ME	2.22045E-16	
MPE	-9.27041	

La salida también resume el desempeño del modelo para ajustar los datos, y para predecir cualquier valor retenido fuera del proceso de ajuste.

Se muestra:

(1) el cuadrado medio del error (CME)

(2) el error medio absoluto (MAE)

(3) el porcentaje de error medio absoluto (MAPE)

(4) el error medio (ME)

(5) el porcentaje de error medio (MPE)

Cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los primeros tres estadísticos miden la magnitud de los errores. El mejor modelo dará el valor más

pequeño. Los últimos dos estadísticos miden el bias (sesgo). El mejor modelo dará un valor cercano a 0.

Prueba de comparación Múltiples Azúcares Reductores por Solvente
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Solvente	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
Etanol	12	3.5175	0.361681	X
Glicerol	12	8.26583	0.361681	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
Etanol - Glicerol	*	-4.74833	1.07461

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de comparación Múltiples Azúcares Reductores por Concentración
Método: 95.0 porciento HSD de Tukey

Concentración	*Recuento*	*Media MC*	*Sigma MC*	*Grupos Homogéneos*
0	8	4.32375	0.442967	X
15	8	5.35375	0.442967	X
30	8	7.9975	0.442967	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*Límites +/-*
0 - 15		-1.03	1.59955
0 - 30	*	-3.67375	1.59955
15 - 30	*	-2.64375	1.59955

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Pruebas de Normalidad para Azúcares Reductores

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.92912	0.09316

Verificación de varianza

	Prueba	*Valor-P*
NCV test	0.1166649	0.73268

FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNAM

Formulario de autorización para la publicación electrónica en la página web del Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Moquegua, de conformidad con la Ley N° 30035 Ley que regula el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto y Resolución de Comisión Organizadora N° 041-2022-UNAM que aprueba el Reglamento que regula el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

1. DATOS DEL AUTOR

Nombres y Apellidos	: Dayana Judith Ramos Allcca
DNI/Carnet de Extranjería/Pasaporte N°	: 70308406
Correo electrónico	: dayannaramos7@gmail.com
Teléfono/Celular	: 942326798

2. GRADO, TITULO O ESPECIALIZACIÓN (Marque con una X)

Bachiller	Título Profesional	Magister	Doctor	Segunda Especialidad
	X			

3. TIPO DE PUBLICACIÓN (Marque con una X)

a) Articulo ( )
b) Tesis de pregrado (X)
c) Tesis de Maestría ( )
d) Tesis de Doctorado ( )
e) Monografía ( )
f) Reporte de caso científico o hallazgos ( )
g) Libro ( )
h) Parte de un libro ( )
i) Revisión ( )
j) Conferencia ( )
k) Presentación ( )
l) Artículo preliminar ( )
m) Articulo antes de ser publicado ( )
n) Artículo de prensa ( )
o) Documentos internos ( )
p) Imagen ( )
q) Documentos técnicos ( )
r) Ponencias presentadas en eventos científicos (Jornada, Congreso, Simposio Conferencias, etc.) ( )
s) Informes de suficiencia profesional ( )
t) Patentes producidas por académicos/as ( )

4. TIPO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (Marque con una X)

a) Tesis (X)
b) Trabajo de Investigación ( )
c) Trabajo de suficiencia profesional ( )
d) Trabajo académico ( )

5. DATOS DE LA PUBLICACION

a) Título: "Evaluación del uso de etanol y glicerol como solventes alternativos en un proceso de extracción asistida por ultrasonido para la recuperación de polifenoles presentes en hojas de olivo (*Olea europaea L.*).....
b) Campo del conocimiento OCDE (Indicar el código de clasificación OCDE de la obra : https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html) : 2.11.02
c) Fecha de publicación: .....

6. DATOS DEL ASESOR:

a) Nombres y Apellidos : Nils Leander Huamán Castilla
b) DNI/Pasaporte/Cédula : 41939181
c) ORCID : 0000-0002-3748-0883

FIRMA : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDAD : 70308406
NOMBRES Y APELLIDOS : Dayana Judith Ramos Allcca

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

LICENCIAS

Licencia Estándar

Bajo los siguientes términos, autorizo el depósito de mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

Con la autorización de depósito da mi trabajo de investigación, otorgo a la Universidad Nacional de Moquegua, una Licencia No Exclusiva para reproducir. distribuir, comunicar al público, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público mi trabajo de investigación (incluido el resumen), en formato físico o digital, en cualquier medio, conocido o por conocerse, a través de los diversos servicios provistos por la Universidad, creados o por crearse, tales como el Repositorio Institucional Digital de la UNAM, Colección de Tesis, entre otros, en el Perú y en el extranjero, por el tiempo y veces que considere necesarias, y libre de remuneraciones.

En virtud de dicha Licencia, la UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA, podrá reproducir mi trabajo de investigación en cualquier tipo de soporte y en más de un ejemplar, sin modificar su contenido, solo con los propósitos de seguridad, respaldo y preservación.

Declaro que el trabajo de investigación es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, o coautoría con titularidad compartida, y me encuentro facultado a conceder la presente licencia y, asimismo, garantizo que dicho trabajo de investigación no infringe derechos de autor de terceras personas.

La UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA consignara el nombre del/los autor/es del trabajo de investigación, y no le hará ninguna modificación más de la permitida en la presente licencia.

Autorizo el depósito (marque con una X).

(X) **SI autorizo que se deposite inmediatamente.**

FIRMA : .....



DOCUMENTO DE IDENTIDAD : 70308406
NOMBRES Y APELLIDOS : Dayana Judith Ramos Allcca
FECHA : 16/08/2023.

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN / TESIS / TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL

Yo, Dayana Judith Ramos Allcca,
bachiller de la Escuela Profesional de: Ingeniería Agroindustrial
,
de la Universidad Nacional de Moquegua, identificado(a) con DNI Nº 70308406, autor(a) del Trabajo de Investigación / Tesis / Trabajo de suficiencia profesional, denominado:

Evaluación del uso de etanol y glicerol como solventes alternativos en un proceso de extracción asistida por ultrasonido para la recuperación de polifenoles presentes en hojas de olivo (Olea europaea L.).

Declaro bajo juramento que:

1. El trabajo de investigación es auténtico, siendo resultado de mi trabajo personal, que no se ha copiado, que no se ha utilizado ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones diversas, sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor, tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor. Por tanto, el trabajo de investigación no ha sido plagiado total ni parcialmente.
2. El trabajo de investigación no ha sido autoplagiada, es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
3. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presentan en el trabajo de investigación constituirán aporte a la realidad investigada.

Soy consciente de que, el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones universitarias y/o legales, por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de irregularidades en el trabajo de investigación, así como de los derechos sobre la obra presentada.

Moquegua, 16 de agosto del 2023



Huella digital

Nombres y Apellidos: Dayana Judith Ramos Allcca
DNI: 70308406

Document Information

Analyzed document	INFORME FINAL DE TESIS_URKUND.docx (D172835590)
Submitted	2023-08-15 13:00:00
Submitted by	
Submitter email	nhuamanc@unam.edu.pe
Similarity	19%
Analysis address	nhuamanc.unampe@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA **Universidad Nacional de Moquegua / PROYECTO CORREGIDO DAYANA JUDITH RAMOS ALLCCA EPIA.pdf** — 24
Document PROYECTO CORREGIDO DAYANA JUDITH RAMOS ALLCCA EPIA.pdf (D119887584)
Submitted by: ollallac@unam.edu.pe
Receiver: ollallac.unampe@analysis.urkund.com

SA **Universidad Nacional de Moquegua / Tesis Eduardo & Fiorella_NH.docx** — 7
Document Tesis Eduardo & Fiorella_NH.docx (D171445212)
Submitted by: nhuamanc@unam.edu.pe
Receiver: nhuamanc.unampe@analysis.urkund.com

SA **Universidad Nacional de Moquegua / INFORME-TESIS-NH2.docx** — 17
Document INFORME-TESIS-NH2.docx (D171428647)
Submitted by: nhuamanc@unam.edu.pe
Receiver: nhuamanc.unampe@analysis.urkund.com

SA **Universidad Nacional de Moquegua / INFORME FINAL. YPE 2023 16mayo para OURIGINAL.docx** — 1
Document INFORME FINAL. YPE 2023 16mayo para OURIGINAL.docx (D171165983)
Submitted by: eescobedop@unam.edu.pe
Receiver: eescobedop.unampe@analysis.urkund.com

SA **Universidad Nacional de Moquegua / TESIS PARA EMPASTAR 26 - 05 - 2023_Analisis.docx** — 2
Document TESIS PARA EMPASTAR 26 - 05 - 2023_Analisis.docx (D171261167)
Submitted by: nhuamanc@unam.edu.pe
Receiver: nhuamanc.unampe@analysis.urkund.com

SA **Universidad Nacional de Moquegua / informe de tesis omar_final.docx** — 2
Document informe de tesis omar_final.docx (D172281878)
Submitted by: eescobedop@unam.edu.pe
Receiver: eescobedop.unampe@analysis.urkund.com

SA **Universidad Nacional de Moquegua / Proyecto de tesis Maria Quispe Angulo_URKUND.docx** — 1
Document Proyecto de tesis Maria Quispe Angulo_URKUND.docx (D171755592)
Submitted by: nhuamanc@unam.edu.pe
Receiver: nhuamanc.unampe@analysis.urkund.com