UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. KARLA SYNDEL DÍAZ HUAMANÍ
Bach. YOLANDA CRISTINA PALOMINO VILLEGAS

Asesor: Dr. Nils Leander Huamán Castilla
Co-Asesor: Mg. Erik Edwin Allcca Alca

Para optar el Título Profesional de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

MOQUEGUA – PERU
2023

UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

10

Folio N° 009

ACTA DE SUSTENTACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA — UNAM — FEDATARIO

I. Modalidad:

Tesis : [X]

Trabajo de Suficiencia Profesional : [ ]

Otro: ..... : [ ]

II. Documento de aprobación de la modalidad de titulación del bachiller:
Resolución de C.O. N° 0545-2020-UNAM
Fecha: 09/10/2020 y Resolución de C.O. N° 0468-2020-UNAM, 07/09/2020

III. Documento de aprobación para la sustentación:
Resolución de Facultad N° 053-2023-FACIA-UNAM
Fecha: 05/05/2023

IV. El Jurado ha dictaminado la (el) TESIS,
TITULADO: "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO"

Bachiller: KARLA SYNDEL DIAZ HUAMANÍ
Asesor Principal: Dr. NILS LEANDER HUAMÁN CASTILLA
Co-Asesor: Mg. ERIK EDWIN ALLCCA ALCA

V. Se dictamina:

Como: APROBADO por UNANIMIDAD la sustentación de manera:

Presencial [X] Virtual [ ]

Con nota: CATORCE (14) por lo que; Sí [X] No [ ]

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

Siendo las 18:21 horas, del 15 de MAYO del año 2023 se procede con la firma en conformidad de lo dictaminado por el Jurado.

Presidente	Primer Miembro	Segundo Miembro
Dr. Elías Escobedo Pacheco	MSc. Lycet María Caceres Bustinza	MSc. Beatriz Damiano Vásquez
(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)

Miembro Accesitario
MSc. Karina Erika Eduardo Palomino
(Nombres y Apellidos)

Asesor Principal	Bachiller	Co-Asesor
Dr. Nils Huaman Castilla	Karla Syndel Díaz Huamaní	
(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)

UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Folio N° ...18.....

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA UNAM FEDATARIO

ACTA DE SUSTENTACIÓN

I. Modalidad:

Tesis : [X]

Trabajo de Suficiencia Profesional : [ ]

Otro: ..... : [ ]

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

Resolución de Comisión Organizadora N° 0545-2020-UNAM

Fecha: 09/10/20 y Resolucion de C.O. N° 0468-2020-UNAM, 07/09/2020

III. Documento de aprobación para la sustentación:

Resolución de Facultad N° 053-2023-FACIA-UNAM

Fecha: 05/05/2023

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

TITULADO: "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO"

Bachiller: YOLANDA CRISTINA PALOMINO VILLEGAS

Asesor Principal: DR. NILS LEANDER HUAMÁN CASTILLA

Co-Asesor: Mg. ERIK EDWIN ALLCCA ALCA

V. Se dictamina:

Como: APROBADO por UNANIMIDAD la sustentación de manera:

Presencial [X] Virtual [ ]

Con nota: ONCE (11) por lo que; Sí [ ] No [ ]

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

Siendo las 18:37 horas, del 12 de JULIO del año 2023 se procede con la firma en conformidad de lo dictaminado por el Jurado.

Presidente	Primer Miembro	Segundo Miembro
Dr. Elías Escobedo Pacheco	M.Sc. Lycet María Cáceres Bustinza	Msc. BEATRIZ DAMIANO VÁSQUEZ
(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)

Miembro Accesitario
Msc. Karina Erika Eduardo Palomino
(Nombres y Apellidos)

Asesor Principal	Bachiller	Co-Asesor
(Nombres y Apellidos)	Yolanda Cristina Palomino Villegas (Nombres y Apellidos)	(Nombres y Apellidos)

DEDICATORIA

Dedicamos con todo nuestro corazón nuestra tesis a nuestros padres, pues sin ellos no lo habríamos logrado. Su bendición a diario a lo largo de nuestra vida nos protege y nos lleve por el camino del bien. Por eso le damos nuestro trabajo en ofrenda por su paciencia y amor.

A nuestros queridos y amados esposos, por su sacrificio y esfuerzo, por creer en nuestra capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado brindándonos su cariño, comprensión y amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios a quien ha sido nuestra guía, fortaleza, y su mano de fidelidad han estado con nosotros hasta el día de hoy.

A nuestros padres quienes con su amor, paciencia y esfuerzo nos han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en nosotros el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer a las adversidades porque Dios está con nosotros siempre.

A la Universidad Nacional de Moquegua nuestra alma máter, quien nos dio la bienvenida para emprender nuestro aprendizaje, colaborando a nuestro desarrollo y otorgándonos cuantiosos conocimientos a través de nuestros docentes y asesores de esta tesis Dr. Nils Huamán Castilla y Mgr. Erick Allcca Alca.

A nuestros compañeros de la Escuela Profesional de Ingeniería de Agroindustrial, por todo el apoyo brindado.

RESUMEN

La producción de olivo genera importantes cantidades de residuos como las hojas propias del árbol. Estas hojas en particular son recolectadas durante la poda y representan un bajo valor económico y generan un problema de gestión ambiental. No obstante, este residuo en particular presenta importantes concentraciones de polifenoles. Por ello, este trabajo evaluó el efecto de diferentes mezclas agua-etanol y agua-glicerol combinado con temperaturas moderadas (50 – 70 °C) en un proceso de Extracción por Líquidos Presurizados (ELP) combinado con un proceso de Purificación con Resinas (PR) sobre los compuestos antioxidantes presentes. Para tal fin, el contenido total de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y perfil de polifenoles fueron analizados en todos los extractos obtenidos del proceso combinado ELP - PR.

De acuerdo con nuestros resultados, el uso de altas concentraciones de etanol (30 %) y glicerol (30 %) a 70 °C, durante la ELP, favorecen la obtención de extractos con importantes concentraciones de polifenoles y capacidad antioxidante; sin embargo, cuando el proceso combinado ELP-PR fue usado los extractos que fueron purificados redujeron su capacidad antioxidante en ~30 %. No obstante, las altas temperaturas favorecen la extracción de azúcares en los extractos. Sin embargo, el uso de etanol y glicerol reducen la presencia de estos compuestos. Por ello, las mejores condiciones en la ELP fueron establecidas con Etanol (30 %) a 70 °C. Adicionalmente, diferentes familias específicas de polifenoles fueron identificadas tales como ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles, estilbenos y secoiridoides. Interesantemente, cuando los extractos fueron purificados mediante el uso de resinas macroporosas, el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante se redujo significativamente entre 15 y 35 %. Esto permitió establecer las mejores condiciones globales de extracción y purificación en el proceso ELP (etanol 30 % - 70 °C) y purificación (etanol 80 %). Por lo tanto, el uso de etanol demostró ser más eficiente que el glicerol en la recuperación de polifenoles presentes en las hojas de olivo. Finalmente, los resultados obtenidos permitirán revalorizar las hojas de olivo y escalar tecnologías para la obtención selectiva de polifenoles. Asimismo, este enfoque global e integrador podría aplicarse a otros descartes agroindustriales.
PALABRAS CLAVES: glicerol, etanol, extracción líquida presurizada, polifenoles, capacidad antioxidante, perfil de polifenoles, purificación

Abstract

Production from Olive generates significant amounts of residues such as the leaves of the tree. These leaves in particular are collected during pruning and represent a low economic value and create an environmental management problem. However, this residue in particular presents significant concentrations of polyphenols. Therefore, this work evaluated the effect of different mixtures of water-ethanol and water-glycerol combined with moderate temperatures (50 – 70 °C) in an ELP process combined with a purification process with resins on the antioxidant compounds present. For this purpose, the total content of polyphenols, antioxidant capacity (DPPH and ORAC), reducing sugars and polyphenol profile were analyzed in all the extracts obtained from the combined ELP-PR process.

According to our results, the use of high concentrations of ethanol (30%) and glycerol (30%) at 70 °C, during ELP, favor obtaining extracts with important concentrations of polyphenols and antioxidant capacity; However, when the combined ELP-PR process was used, the extracts that were purified reduced their antioxidant capacity by ~30%. However, high temperatures favor the extraction of sugars in the extracts. However, the use of ethanol and glycerol reduce the presence of these compounds. Therefore, the best conditions in the ELP were established with Ethanol (30%) at 70 °C. Additionally, different specific families of polyphenols were identified such as phenolic acids, flavanols, flavonols, stilbenes and secairidoids. Interestingly, when the extracts were purified by using macroporous resins, the polyphenol content and antioxidant capacity were significantly reduced between 15 and 35%. This allowed establishing the best overall extraction and purification conditions in the ELP process (ethanol 30% - 70 °C) and purification (ethanol 80%). Therefore, the use of ethanol proved to be more efficient than glycerol in the recovery of polyphenols present in olive leaves. Finally, the results obtained will allow olive leaves to be revalued and technologies to be scaled up for the selective obtaining of polyphenols. Likewise, this global and integrative approach could be applied to other agroindustrial discards.

KEY WORDS: glycerol, ethanol, pressurized liquid extraction, polyphenols, antioxidant capacity, polyphenol profile, purification

INDICE

DEDICATORIA ..... **I**
AGRADECIMIENTOS ..... **II**
RESUMEN ..... **III**
Abstract ..... **IV**
I. INTRODUCCIÓN **2**
1.1. Descripción formulación del problema **2**
1.2. Objetivos **4**
1.2.1. Objetivo general 4
1.2.2. Objetivos específicos 4
1.3. Justificación e importancia **5**
1.4. Hipótesis **6**
II. MARCO TEÓRICO **7**
2.1. Antecedentes 7
2.2. Bases teóricas sobre el trabajo de investigación 10
1.2.1. Hojas de olivo 10
1.2.2. Polifenoles 10
1.2.3. Usos y perspectivas de los polifenoles como compuestos bioactivos ... 12
1.2.4. Extracción de polifenoles por diferentes tecnologías 13
1.2.5. Purificación de extractos polifenólicos 24
1.2.6. Rol de la polaridad del solvente 26
2.3. Definición de términos 28
III. METODOLOGÍA **29**
3.1.1. Materia prima 29
3.1.2. Materiales 29
3.1.3. Equipos 30
3.1.4. Insumos y Reactivos 30
3.1.5. Métodos 31
a. Extracción liquida presurizada (ELP): 31
b. Purificación de extractos crudos a través del uso de resinas no iónicas macroporosas 33

c. Determinación de polifenoles totales 35

d. Determinación de capacidad antioxidante por DPPH 36

e. Determinación de capacidad antioxidante por ORAC 37

f. Determinación de Azúcares Reductores 38

g. Cuantificación de polifenoles específicos 38

3.1.6. Metodología de análisis estadístico para el proceso integrado de extracción - purificación.....40

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 42

V. CONCLUSIONES.....61

VI. RECOMENDACIONES.....62

VII. REFERENCIAS.....63

Contenido de Tablas

Tabla 1. Perfil polifenólico presente en hojas de olivo de diferentes regiones. 12

Tabla 2. Análisis de los costes de fabricación (CM) para la obtención de extractos polifenólicos, mediante diferentes métodos de extracción utilizando mezclas agua-etanol (30 %). 22

Tabla 3. Parámetros óptimos considerados para la recuperación de polifenoles durante el proceso ELP..... 23

Tabla 4. Polaridad de algunos solventes usados en extracción 27

Tabla 5. Arreglo factorial 2x3x2 considerando el uso de etanol en la ELP 40

Tabla 6. Arreglo factorial 2x3x2 considerando el uso de glicerol en la ELP-PR..... 40

Tabla 7. Contenido de polifenoles de los extractos obtenidos 43

Tabla 8. Caracterización de capacidad antioxidante presente en los extractos de hojas de olivo 44

Tabla 9. Contenido de azúcares presentes en los extractos de hojas de olivo 46

Tabla 10. Perfil de polifenoles de los extractos obtenidos..... 49

Tabla 11. Contenido de polifenoles de los extractos purificados 52

Tabla 12. Caracterización de capacidad antioxidante presente en los extractos de hojas de olivo 53

Tabla 13. Perfil de polifenoles de los extractos purificados..... 55

Contenido de Figuras

Figura 1. Estructura química de los polifenoles 11
Figura 2. Interacciones intermoleculares entre solvente y polifenoles..... 18
Figura 3. Adsorción dinámica de polifenoles..... 26
Figura 4. Diseño experimental para la obtención de polifenoles..... 32
Figura 5. Sistema del proceso de extracción liquida presurizada 32
Figura 6. Sistema de purificación con resinas..... 33
Figura 7. Etapas del proceso de purificación 34
Figura 8. Esquema del proceso de purificación de los diferentes extractos crudos... 34
Figura 9. Esquema del proceso de determinación de polifenoles..... 35
Figura 10. Curva de calibración de ácido gálico 36
Figura 11. Esquema del proceso UHPL para el análisis de polifenoles 39
Figura 12. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de ácidos fenólicos..... 56
Figura 13. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de estilbenos. 57
Figura 14. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de estilbenos. 58
Figura 15. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de flavonoles 59
Figura 16. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de flavonoles 60

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción formulación del problema

En Perú se cultiva ~21000 ha de árbol de olivo, siendo Arequipa, Tacna y Moquegua las regiones que representan la mayor proporción de área cultivada con 73 %, 20 % y 5 % respectivamente (MINAGRI, 2020). Si bien este cultivo es reconocido por el contenido de aceite presente en su fruto (aceituna), la producción de ambos genera diferentes remanentes o residuos agroindustriales tales como piel, semillas de la baya y las hojas propias del árbol del olivo (Gullón et al., 2018; Ouazzane et al., 2017; Özcan & Matthäus, 2017). Además, las hojas de olivo son residuos agroindustriales no aprovechado, lo cual representa un problema de gestión ambiental. Sin embargo, este residuo debido a su composición ha demostrado ser una fuente natural rica en polifenoles, cuyas propiedades bioactivas han despertado el interés de la industria farmacéutica y alimentaria (Zuntar et al., 2019).

A la fecha diversos trabajos de investigación han reportado el uso de técnicas de extracción convencional a condiciones atmosféricas, las cuales permiten la recuperación de los polifenoles presentes en las hojas de olivo. Sin embargo, el uso de solventes tóxicos no amigables con el medio ambiente tales como acetona, metanol y hexano; y tiempos prolongados de proceso (> 4 h), los cuales favorecen la hidrolisis y oxidación de estos compuestos, limitando su uso a nivel industrial (Ameer et al., 2017). En ese sentido, diversos trabajos han propuesto el uso de agua pura bajo condiciones subcríticas (100 – 250 °C) con tiempos relativamente cortos (20 min) para la recuperación de polifenoles a partir de residuos agroindustriales (Kronholm et al., 2007; Tahir, 2015). Sin embargo, las altas temperaturas de proceso (T° > 150 °C) conllevan a la degradación de polifenoles y originan la formación de compuestos de Maillard potencialmente cancerígenos como el hidroximetilfurfural (HMF) (Mariotti-Celis et al., 2018). Por ello, la incorporación de co-solventes alternativos como el etanol ha permitido reducir las temperaturas de operación y mejorar los rendimientos de extracción (Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019). Sin embargo, el uso de glicerol, un subproducto de la industria del biodiesel, reconocido como un

solvente de grado alimentario, ha permitido una mayor recuperación de polifenoles en comparación con el uso de etanol bajo condiciones subcríticas (Huamán-Castilla et al., 2020).

Por otro lado, los procesos de extracción subcrítica también podrían incrementar la recuperación de compuestos no deseados (proteínas, carbohidratos y azúcares), los cuales limitan el uso de los extractos en futuras aplicaciones tecnológicas (Mariotti-Celis et al., 2018). En ese sentido, la purificación con resinas macroporosas (PR) es una tecnología complementaria y alternativa a bajo costo que permite la eliminación de estos compuestos no deseados con la finalidad de obtener extractos puros ricos en polifenoles (Huaman-Castilla et al., 2019). Sin embargo, el uso de cosolventes como el etanol (>30 %) en extracción afecta significativamente la recuperación de polifenoles durante la purificación, cuyas pérdidas podrían alcanzar más del 60 % del rendimiento total (Huaman-Castilla et al., 2018). No obstante, el uso de glicerol podría afectar la recuperación de polifenoles durante la purificación con resinas macroporosas. Por ello, el estudio de un proceso integrado de extracción/purificación para la recuperación de polifenoles de las hojas de olivo, debe considerar el relevante rol de la polaridad del cosolvente, que permita obtener extractos polifenólicos purificados inocuos con una amplia gama de aplicaciones tecnológicas.

Formulación del problema

En base a los párrafos anteriores, podemos mencionar que es necesario estudiar y comprender ¿Cómo el uso de cosolventes (etanol y glicerol) y temperaturas moderadas (< 90 °C) pueden mejorar el rendimiento y la selectividad de familias específicas de polifenoles presentes en las hojas de olivo? Además, ¿Cuál es el efecto del uso de estos cosolventes sobre la recuperación de polifenoles durante una subsiguiente etapa de purificación? Estos análisis permitirán entender las diferentes interacciones tales como polifenol - solvente y polifenol – resina con la finalidad mejorar durante el proceso integrado de extracción – purificación, considerando que estos extractos polifenólicos podrían presentar potenciales aplicaciones tecnológicas y nutraceúticas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el rendimiento y la selectividad de los extractos de polifenoles obtenidos de las hojas de olivo usando glicerol y etanol como cosolventes alternativos a través de la extracción liquida presurizada y purificación con resinas macroporosas como procesos integrados.

1.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los solventes en extracción (etanol, glicerol y agua) sobre la capacidad antioxidante (DPPH y ORAC) de los extractos obtenidos de hojas de olivo a través de un proceso integrado de extracción/purificación.

- Evaluar el efecto de los solventes en extracción (etanol, glicerol y agua) sobre el contenido de polifenoles totales y perfil de polifenoles de los extractos obtenidos de hojas de olivo a través de un proceso integrado de extracción/purificación.

- Evaluar el efecto de la polaridad de los solventes de extracción (etanol, glicerol y agua) sobre la reducción y/o eliminación de compuestos no deseados (azúcares reductores).

1.3. Justificación e importancia

Los métodos de extracción convencional a atmosféricas tales como la maceración y extracción Soxhlet son las técnicas más utilizadas para recuperar polifenoles comercialmente, debido a su fácil escalamiento a nivel industrial. Sin embargo, el uso de solventes tóxicos no amigables con el medio ambiente tales como metanol, acetona, hexano entre otros limita el uso de los extractos como futuros agentes nutraceúticos. Además, los prolongados tiempos de proceso y los grandes volúmenes de solventes repercuten directamente no solo en los costos de producción sino también afectan negativamente el medio ambiente. Frente a este escenario, la búsqueda de solventes inocuos amigables con el medio ambiente combinado con tecnologías alternativas como la extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas, permitiría reducir los tiempos de proceso, consumo de solvente y obtener extractos purificados de grado alimentario, consecuente se podría desarrollar un nuevo proceso sustentable con potenciales aplicaciones tecnológicas.

A la fecha los procesos de extracción y purificación se han estudiado de manera independiente, considerando solo el rendimiento de polifenoles totales o específicos, mientras que el efecto de la integración de ambos procesos, la temperatura de extracción y la polaridad del solvente son factores que aún no han sido considerados al momento de la recuperación de los polifenoles presentes en las hojas de olivo. Por ello, el aprovechamiento de este residuo agroindustrial como una fuente natural, de bajo costo rico en polifenoles podría no solo revalorizar este residuo, sino también proponer nuevas alternativas para el aprovechamiento de otros residuos agroindustriales.

Entonces para un escalamiento a nivel industrial es necesario la optimización de ambos procesos en forma integrada con la finalidad de evaluar no solo el rendimiento global en la recuperación de polifenoles, sino también la reducción en la formación de compuestos no deseados. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación propone desarrollar un proceso integrado limpio de extracción subcrítica integrado a un proceso de purificación con

resinas macroporosas, que permita obtener a partir de las hojas de olivo, extractos polifenólicos purificados inocuos con potenciales aplicaciones para la industria farmacéutica y alimentaria.

1.4. Hipótesis

Es posible mejorar la recuperación y selectividad de los polifenoles presentes en las hojas de olivo mediante la aplicación de tecnologías combinadas de extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas, considerando el relevante rol de la composición del solvente y estructura química del polifenol durante el proceso integrado.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Diversos estudios previos han demostrado el efecto positivo de los polifenoles de las hojas de olivo en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo tales como; cáncer, arterioesclerosis, entre otros, los cuales han despertado el interés de la industria alimentaria y farmacéutica (Omar, 2010; Özcan & Matthäus, 2017; Rodríguez et al., 2008) .

Según Vergara-Salinas et al. (2013), la extracción con líquidos presurizados (ELP) es una alternativa que supera ampliamente a la extracción convencional para la recuperación de polifenoles. En este método, el solvente líquido (agua pura) se somete a presiones entre 10 y 15 MPa y temperaturas entre 60 y 250 °C. Donde los incrementos de temperatura incrementan la energía cinética del solvente mejorando la ruptura de la matriz vegetal y su difusión dentro de ella. Asimismo, el efecto de la temperatura y altas presiones no solo permiten que el solvente se mantenga en estado líquido, sino también reducen la polaridad del solvente mejorando la solubilidad de los polifenoles. No obstante, aún es un tema pendiente por resolver el uso de cosolventes alternativos como el etanol y glicerol en el proceso de extracción en otros residuos agroindustriales como las hojas de olivo. Esto permitiría no solo reducir las temperaturas de proceso, sino también podría mejorar significativamente la recuperación de polifenoles.

Mariotti-Celis et al. (2018), reportaron que el uso de etanol como cosolvente en la ELP no solo permitía reducir las temperaturas de operación de 130 a 90 °C, sino también mejoraba en 65 % más la recuperación de polifenoles en orujo de uva en comparación con el uso de agua pura bajo las mismas condiciones. No obstante, el uso de etanol (15 %, p/p) en la ELP redujo la recuperación global de polifenoles totales (~20 %) durante la purificación con resinas macroporosas (PR). No obstante, la distribución oligomérica de los polifenoles de alto peso molecular con grado de polimerización mayor a 10 no fue afectada por el proceso integrado, mientras que los compuestos no deseados tales como HMF y azúcares reductores fueron reducido en un 95 %.

No obstante, el efecto del uso otros cosolventes alternativos en extracción como el glicerol y su efecto en la subsiguiente etapa de purificación de polifenoles aún no ha sido definido y podría permitir mejorar el rendimiento global en la recuperación de polifenoles.

Huamán-Castilla et al. (2019) reportaron que la estructura química del polifenol y la polaridad del solvente juegan un papel importante durante el proceso integrado de ELP – PR, debido a que diferentes familias de polifenoles según su estructura química presentan una diferente afinidad por una concentración determinada de etanol en la ELP y diferente interacción con la superficie de la resina durante purificación. Sin embargo, el uso de altas concentraciones de etanol (> 50 %) afecta significativamente la recuperación de ácidos fenólicos durante la purificación, mientras que los flavonoles presentaron altos rendimientos a altas concentraciones de etanol. Por lo tanto, al momento de estudiar otros residuos agroindustriales es importante relacionar la importancia del rol de la polaridad del solvente y definir las diferentes estructuras de sus polifenoles, con la finalidad de optimizar el proceso ELP-PR. En ese sentido, el estudio de otros cosolventes como el glicerol en un proceso integrado debe incluir un análisis del posible comportamiento de las diferentes interacciones polifenol – solvente y polifenol resina, considerando el relevante rol de la composición del solvente de extracción y temperatura de proceso.

Huamán-Castilla et al. (2020) estudiaron 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). 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. No

obstante, el efecto del uso de glicerol sobre el rendimiento global de polifenoles en una subsiguiente etapa como la purificación con resinas aún no ha sido definido.

Dobroslavić et al. (2022) estudiaron el efecto de los parámetros de proceso de extracción subcrítica (solvente, temperatura, número de ciclos de extracción y tiempo de extracción estático) sobre las propiedades bioactivas de la hoja de laurel (Laurus nobilis L.). Los resultados indican que las condiciones óptimas del proceso de extracción fueron etanol al 50 %, 150 °C, un ciclo de extracción y 5 min de tiempo estático. El extracto polifenólico obtenido bajo estas condiciones óptimas presenta altas concentraciones de polifenoles, capacidad antioxidante comparado con el uso de agua pura bajo las mismas condiciones. El análisis cromatográfico mostro 29 compuestos, entre los cuales los flavonoles (rutina y quercetina-3-glucósido) fueron los más abundantes. Los resultados evidencian que la técnica extracción subcrítica es un método y verde eficiente para obtener extractos de hojas de laurel ricos en polifenoles con una actividad antioxidante relativamente alta.

Rivera-Tovar et al. (2021) realizaron un proceso de optimización de respuesta múltiple de la extracción de líquidos presurizados (ELP) para obtener extractos polifenólicos presentes en hojas de maqui (Aristotelia chilensis Stuntz). El contenido de polifenoles totales (TPC), la capacidad antioxidante (AC) y la concentración de polifenoles totales de los extractos de hoja de maqui fueron calculadas con una precisión menor al 8% (RSD) en todos los niveles de extracción evaluados. Las condiciones óptimas de ELP (200 °C, 23 % Etanol y 3 ciclos) que priorizaron TPC y AC por igual recuperó ~3 veces más TPC (205.14 mg GAE/g hojas) que los extractos de hoja de maqui obtenidos por maceración. Se encontró por optimización de respuesta múltiple que las hojas de maqui combinado con la HPLE permiten recuperar altas concentraciones de quercetina y catequina.

2.2. Bases teóricas sobre el trabajo de investigación

1.2.1. Hojas de olivo

En la actualidad el cultivo del árbol del olivo se ha intensificado en el mundo cuya área superficial alcanza ~7 millones de ha (FAO, 2019). Europa, Asia y América presentan los mayores porcentajes de siembra de este cultivo con 65 %, 19 % y 15 % respectivamente (FAO, 2019). En América latina, Perú cultiva ~21000 ha de árbol de olivo donde las regiones de Tacna y Arequipa representan el 73 % y 20 % del área cultivada de este árbol (MINAGRI, 2020).

La aceituna es el fruto característico del árbol del olivo, el procesamiento para la obtención de aceite de este fruto puede generar grandes cantidades de residuos agroindustriales tales como pulpa, piel y semilla, los cuales representan entre 30 % y 40 % del peso seco del fruto fresco (Ouazzane et al., 2017). Por otro lado, las hojas de olivo también son considerados residuos agroindustriales, los cuales son derivados de la producción de aceite de oliva y de la poda del mismo árbol (Gullón et al., 2018; Özcan & Matthäus, 2017), Estos residuos no tienen aplicaciones industriales y generalmente se queman o simplemente se dejan en el campo para fines de fertilización constituyendo para ambos casos problemas de gestión ambiental (Zuntar et al., 2019).

Estas hojas de olivo presentan concentraciones importantes de polifenoles entre 30.8 y 57.2 mg/g de hoja de olivo seca (Ben Salah & Abdelmelek, 2012), cuyas familias de polifenoles tales como oleuropeosidos, flavonoles, flavonas, flavanoles y fenoles sustituidos han demostrado diferentes aplicaciones tecnológicas, bioactivas y nutraceúticas (Altiok et al., 2008; Zuntar et al., 2019).

1.2.2. Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios (Figura 1), que presentan un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo en su estructura química (Yu & Ahmedna, 2013). Estos compuestos presentan un peso molecular relativamente alto (200 Da - 3500 kDa) y una compleja estructura química

que puede variar de simples monómeros a complejos polímeros (Huaman-Castilla et al., 2017; Obreque-Slier et al., 2011).

Actualmente, los polifenoles presentan una gran demanda para producir ingredientes funcionales para las industrias alimenticia, nutracéutica y farmacéutica (Grand View Research, 2019). Por ello, el precio de los polifenoles purificados se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Por ejemplo, el precio de la quercetina (≥ 95 %) es de 55,37 US$ por 10 gramos, el resveratrol (≥ 99 %) es de 141,15 US$ por 100 miligramos y la epigalocatequina (≥ 95 %) es de 105,15 US$ por 50 miligramos (SIGMA ALDRICH, 2023).

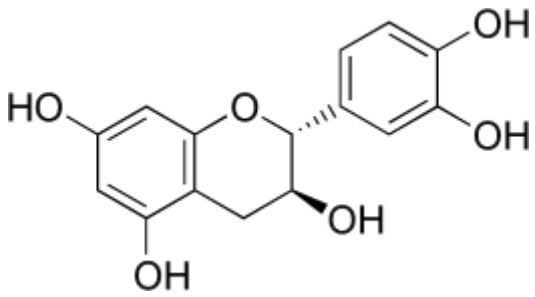


Figura 1. Estructura química de los polifenoles

Las concentraciones de perfil de polifenoles presente en las hojas de olivo son descritos en la Tabla 01, los cuales fueron obtenidos a través de un análisis de cromatografía liquida acoplada a un detector masa de triple cuadrupolo (MS/MS) (Zhang et al., 2022).

Tabla 1. Perfil polifenólico presente en hojas de olivo de diferentes regiones.

Polifenoles	**España** (mg/kg)	**Italia** (mg/kg)	**China** (mg/kg)
Hidroxitirosol	138,59	303,84	66,82
Esculina	1,83	13,65	15,63
Cumarina	5,04	16,08	8,19
Ácido clorogénico	0,52	2,45	1,37
Ácido	0,35	0,68	0,36
Luteolina	64,45	280,95	67,09
Rutina	380,13	558,69	71,14
Quercetina	64,79	155,25	82,85
Apigenina	249,01	331,09	269,13
Kaempferol	469,51	2189,56	621,88
Oleuropeina	1134,76	21178,45	524,89

Fuente: Los resultados son el promedio de 4 repeticiones (Zhang et al., 2022).

1.2.3. Usos y perspectivas de los polifenoles como compuestos bioactivos

Las diferentes familias de polifenoles tales como oleuropeosidos, flavonoles y flavanoles presentes en las hojas de olivo son compuestos reconocidos como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) (Shi et al., 2004), los cuales presentan diferentes propiedades nutraceúticas y tecnológicas.

Por ejemplo, la oleuropeina es el principal polifenol de las hojas de olivo, el cual ha mostrado efectos anticarcinogénicos, antiinflamatorios y antioxidantes debido a que mejora la actividad mitocondrial a través de la

regulación de enzimas específicas tales como angiontensina tipo II para enfermedades coronarias, así como glucosa y amilasa para enfermedades diabéticas (Sun et al., 2017).

Los flavonoles como la quercetina, inhiben la liberación de histamina, por lo tanto, ellos muestran actividad antiinflamatoria y antialérgica (Shi et al., 2004)(Mlcek et al., 2016). A su vez, los flavanoles (e.g., catequina) pueden modular la astringencia debido a que interactúan con proteínas específicas de la saliva (prolina) (Kennedy, 2008), y recientemente se ha demostrado que son útiles para recuperar proteínas de suero de soja (Xu et al., 2019).

Por ello, dado el amplio espectro de aplicaciones de los polifenoles presentes en las hojas de olivo, el desarrollo y la optimización de tecnologías sostenibles de extracción y purificación que permita obtener extractos ricos en familias específicas de polifenoles es altamente deseable.

1.2.4. Extracción de polifenoles por diferentes tecnologías

En general, 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 diferentes métodos de extracción han sido desarrollados, los cuales se pueden clasificar en métodos convencionales o extracciones atmosféricas (1 atm) cuyas temperaturas no superan el umbral de los 80 °C y los métodos alternativos que operan a diferentes temperaturas (60 – 250 °C) y presiones relativas subcríticas y supercríticas entre 2 y 20 atm, respectivamente (Ameer et al., 2017).

No obstante, la extracción de estos compuestos fenólicos también es influenciada por su naturaleza química, tamaño de partícula, tiempo de almacenamiento y sustancias interferentes tales como carbohidratos, azúcares, proteínas entre otros (Naczk & Shahidi, 2004). Por ello, la correcta elección del método de extracción no solo debe considerar los rendimientos

en la recuperación de polifenoles, sino también la reutilización de los solventes orgánicos, la inocuidad del extracto y el impacto ambiental con la finalidad de desarrollar procesos sustentables (Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019).

a. Extracción convencional (sólido-líquido).

La extracción convencional (sólido-líquido) utiliza solventes orgánicos para obtener extractos ricos en polifenólicos de diferentes matrices vegetales (Babbar et al., 2014; Do et al., 2014; Fontana et al., 2017). Si bien diferentes solventes tales como acetona, metanol y hexano han dado buenos resultados en la recuperación de estos compuestos, son las característica químicas de los polifenoles los que finalmente definen el solvente apropiado para su recuperación (Ameer et al., 2017; Galanakis et al., 2013). Por ejemplo, una extracción convencional a 20 °C con una solución de acetona (65 %) es más eficiente para obtener flavanoles (Alberti et al., 2014). Mientras que una solución de metanol al 50 % bajo las mismas condiciones de operación, es más eficiente para obtener flavonoles. Sin embargo, cuando la temperatura de esta mezcla se incrementa a 50 °C, la extracción es más selectiva para los estilbenos (Kwak et al., 2017; Soural et al., 2015).

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).

No obstante, la extracción convencional, es una técnica tradicional que 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.

b. Tecnologías alternativas (Green Technologies)

Ultrasonido: El uso de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) con mezclas de agua – cosolvente es una alternativa segura y de bajo costo ampliamente utilizada para la extracción de polifenoles a partir de residuos de origen vegetal (F. Li et al., 2017; Zuin & Ramin, 2018). El mecanismo de extracción implica la formación de burbujas de cavitación, las cuales colapsan cerca de las paredes celulares del tejido vegetal, esto favorece una mejor difusión del solvente en la matriz celular, mejorando la velocidad de transferencia de masa e incrementando la solubilidad de los polifenoles (Medina-Torres et al., 2017).

Si bien la EAU aumenta significativamente el rendimiento de extracción en comparación con la extracción convencional, el tipo de solvente, la intensidad de la onda sonora, el tiempo de exposición a la frecuencia del sonido, la temperatura del proceso y la granulometría del producto son variables que afectan este proceso en la recuperación de polifenoles totales y polifenoles específicos (de Souza et al., 2018; Zuin & Ramin, 2018). Por ejemplo, un cambio de temperatura (20 – 60 °C) y etanol (70 – 90 %) combinado con 40 kHz y 30 min de tiempo de extracción incrementa la recuperación de polifenoles totales en ~35 % de hojas de olivo (Arteaga-Crespo et al., 2020). Por otro lado, Giacometti et al. (2018) encontraron que el uso de 80 % de etanol a 60 °C combinado con una frecuencia de 20 kHz, tiempo de 10min y 10 ciclos de extracción permite recuperar 30 % más oleuropeina que la extracción convencional. Por lo tanto, variables como la polaridad solvente y temperatura son parámetros importantes para una selectiva recuperación de polifenoles específicos a través de la EAU.

No obstante, la EAU es una tecnología limpia que usa cortos tiempos de proceso y relativos pequeños volúmenes de solvente, no es un método selectivo, debido a que su proceso no solo permite recuperar polifenoles sino también extrae compuestos no deseados tales como azúcares, carbohidratos, proteínas entre otros (de Souza et al., 2018; Medina-Torres et al., 2017). Por lo tanto, es necesaria la integración de tecnologías de purificación que

permitan obtener extractos polifenólicos inocuos libres de compuestos no deseados.

Extracción liquida presurizada (ELP): 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 y 80 % comparado con la extracción por ultrasonido (Ameer et al., 2017; Plaza & Turner, 2015b).

La ELP es reconocida como una tecnología limpia debido al uso de solventes de grado alimentario y amigables con el medio ambiente tales como agua, etanol y glicerol (Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, Martínez-Cifuentes, et al., 2019). Los parámetros de operación tales como temperatura (70 – 250 °C), presión o condiciones subcríticas (1.01 MPa) y composición de solvente pueden afectar los rendimientos en la recuperación de polifenoles (Plaza et al., 2010; Plaza & Turner, 2015a).

Según Vergara-Salinas et al. (2012) y Plaza & Turner (2015) mencionan que entender el funcionamiento de este sistema de ELP (Figura 2) es relativamente sencillo y puede ser analizado por etapas:

i) Primero, la muestra debe ser sometida a un proceso de reducción de tamaño para facilitar su acondicionamiento dentro de la celda de extracción y permiten una rápida difusión del solvente dentro de su matriz
ii) Segundo, tierra diatomea o arena de cuarzo es usada como agente dispersante, las cuales se mezclan con la muestra. Esto permite mejorar los fenómenos de transferencia de masa.
iii) Tercero, el sistema inyecta un determinado volumen de solvente, el cual satura la celda de extracción a una determinada temperatura, la cual ha sido previamente definida.
iv) Cuarto, el sistema inyecta nitrógeno (pureza > 99.9 %) dentro de la celda de extracción que permite que la presión alcance valores de

hasta 10 atm. Esto permite que el solvente se mantenga en estado líquido e incrementa su energía cinética, dando lugar a la ruptura de la matriz celular y solubilidad de los polifenoles.

Las altas presiones (~10 MPa) mantienen el solvente en estado líquido, reduciendo significativamente su polaridad, favoreciendo su difusión en la matriz vegetal mejorando la extractabilidad de los polifenoles (Plaza & Turner, 2015b). No obstante la ELP es influenciada por las características del solvente, la temperatura de extracción y la estructura química de polifenoles (Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019).

Impacto de las variables de proceso sobre la recuperación de polifenoles durante la ELP

Si bien la ELP tiene como objetivo principal obtener altos rendimientos en la obtención, es necesario definir cuidadosamente como las variables de proceso pueden afectar este objetivo, las cuales están definidas como (i) composición del solvente, (ii) presión y (iii) temperatura.

i) Solvente:

Los polifenoles son metabolitos secundarios que presentan anillos aromáticos (fracción no polar) y uno o más grupos hidroxilo (fracción polar) en su estructura química (Vijayalaxmi et al., 2015). Por ello, los solventes a utilizar para la recuperación de estos compuestos deben presentar también dos fracciones polares con la finalidad de mejorar las interacciones intermoleculares y la solubilidad de los polifenoles (Cheigh et al., 2015). Por ejemplo, la molécula de etanol presenta una mayor habilidad para interactuar con los polifenoles en comparación con el agua, debido a la presencia de dos fracciones polares en su estructura química (Figura 2).

Otro aspecto importante a considerar para elección del solvente es su polaridad, la cual por lo general se define en términos de su constante dieléctrica (Ɛ) y permite clasificarlos como solventes no polares, polaridad intermedia y polares (Åkerlöf, 1932; Jouyban & Soltanpour, 2010) (Figura 5). Sin embargo, este parámetro no considera las interacciones intermoleculares entre el soluto y el solvente. Por ello, para una correcta

interpretación de la polaridad del solvente se debe incluir todas las posibles interacciones intermoleculares entre las moléculas del soluto y las moléculas del solvente (Katritzky et al., 2004; Reichardt, 1994).

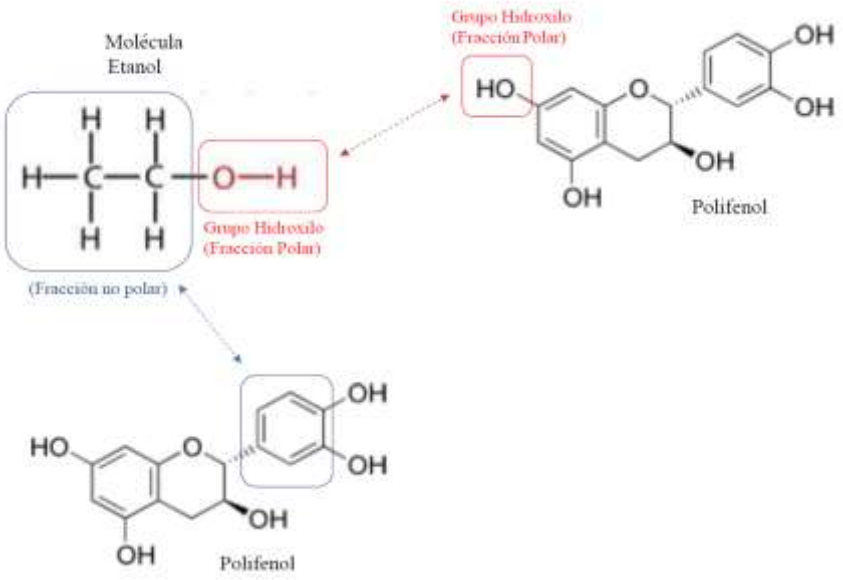


Figura 2. Interacciones intermoleculares entre solvente y polifenoles

Los parámetros Kamlet-Taft permiten comprender la habilidad del solvente para interactuar con los polifenoles mediante la formación de enlaces tipo puentes de hidrogeno, los cuales se expresan como polaridad/polarizabilidad (π*) y acidez (α) respectivamente (Jessop, 2011).

En ese sentido, el agua pura y el etanol son reconocidos como solventes próticos (polares) debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura química (Jessop et al., 2012). Si bien en condiciones atmosféricas a 30 °C el agua presenta una polaridad mayor (π*: 1,14) que el etanol (π*: 0,51), la capacidad de ambos disolventes para formar puentes de hidrógeno (α) es relativamente similar, siendo 0,98 para el etanol y 1,02 para el agua (Jessop et al., 2012).

Sin embargo, cuando la temperatura se incrementa de 30 a 200 °C la habilidad del agua y del etanol para formar puentes hidrogeno (α) disminuye en 60 y 80 %, respectivamente. Esto permite que ambos solventes se comporten como solventes apróticos (no polares) favoreciendo las interacciones dipolo-dipolo inducido y fuerzas de interacción de London con la fracción no polar de los

polifenoles, consecuentemente la solubilidad de estos compuestos se incrementa (Galanakis et al., 2013; Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, et al., 2019; Mariotti-Celis et al., 2018)

ii) Presión:

Las altas presiones usadas para la ELP (~1.01 MPa) permiten mantener el estado líquido de los diferentes solventes usados para la recuperación de polifenoles tales como agua, etanol, glicerol entro otros (Ameer et al., 2017; Q. W. Zhang et al., 2018). Esto permite reducir los fenómenos de oxidación e hidrolisis de los compuestos fenólicos, consecuentemente un mayor incremento en la recuperación de estos compuestos es favorecido (Vergara-Salinas et al., 2013; Vergara-Salinas, Pérez-Jiménez, et al., 2012). Además, cuando la presión es constante las interacciones intermoleculares entre los grupos funcionales de los polifenoles y el solvente no son afectados(Plaza & Turner, 2015a)(Carr et al., 2011).

iii) Temperatura:

El proceso ELP presenta cambios de temperatura de 70 a 220°C bajo condiciones subcríticas (10 atm), esto permite que los solventes permanezcan en estado líquido y no afecten mediante reacciones de hidrolisis y oxidación la concentración de compuestos bioactivos (Plaza & Turner, 2015a). Los cambios de temperatura incrementan la energía cinética del solvente dentro del sistema de ELP favoreciendo la ruptura de la matriz vegetal y solubilidad de los polifenoles (Vergara-Salinas et al., 2013).

Sin embargo, diversos trabajos han demostrado que los cambios de temperatura > 100°C pueden promover la hidrolisis de aquellos polifenoles con grado de polimerización mayor a 10. Por ejemplo, Vergara-Salinas et al. (2013) encontraron que los cambios de 100 a 150°C disminuyen el contenido de antocianinas así como también favorece la hidrolisis de los oligómeros de polifenoles incrementando la concentración de los monómeros de polifenoles. Si bien el uso de agua pura en la ELP ha sido ampliamente estudiada en la recuperación de polifenoles, el uso de temperaturas extremas (≥ 120 °C) afectan significativamente la composición química de los extractos debido a la hidrólisis del polifenol y la formación de compuestos tóxicos (compuestos

de Maillard como hydroxymethylfurfural, HMF) (Mariotti-Celis et al., 2018; Vergara-Salinas et al., 2013). Por ello, el uso de cosolventes como el etanol y glicerol permite no solo reducir la polaridad del solvente mejorando significativamente la recuperación de polifenoles, sino también reducen la recuperación de azúcares y la formación de HMF (Gui et al., 2016; Marcus, 2018; Monrad et al., 2010; Otero-Pareja et al., 2015; Tangkhavanich et al., 2014; Wijngaard & Brunton, 2009).

Si bien, el glicerol ha demostrado ser un mejor cosolvente que el etanol para recuperar polifenoles en la ELP debido a su habilidad para formar enlaces hidrogeno con los grupos hidroxilo de los polifenoles de orujo de uva (Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019), su uso sobre la selectividad de polifenoles específicos de la hoja de olivo aún no ha sido reportado. Esto permitiría mejorar las estrategias de operación para un futuro escalamiento a nivel industrial, considerando el relevante rol de la polaridad del solvente en este tipo de procesos.

No obstante, al igual que la extracción convencional y ultrasonidos la ELP es un proceso no selectivo que permite no solo la recuperación de polifenoles, sino también permite recuperar compuestos no deseados como azúcares, carbohidratos, proteínas entre otros, lo que complica el manejo de los extractos en operaciones posteriores (ej., atomización) y la formulación de alimentos funcionales y nutraceúticos.

Por lo tanto, la optimización de este proceso para la recuperación de polifenoles de hojas de olivo y su posterior integración de las técnicas de separación posteriores deben considerarse para obtener extractos purificados libres de compuestos no deseados.

Impacto de la ELP sobre otras tecnologías en la recuperación de polifenoles

La combinación de tiempo y temperatura en el proceso ELP permite mejorar los rendimientos de extracción de polifenoles en comparación con procesos tradicionales a condiciones atmosféricas y alternativos como el ultrasonido. Por ejemplo, Mariotti-Celis et al. (2018) encontraron que el uso de etanol (15 %) a 90 °C bajo condiciones subcríticas (1.01 MPa) permite recuperar 35 % más contenido de polifenoles de orujo de uva en comparación con el uso de

acetona (60 %) a 30 °C por un periodo de 2 h bajo condiciones atmosféricas. Comportamiento similar fue reportado por Ko et al. (2011) quienes observaron en residuos de cebolla, que el uso de agua pura a 165°C recupero 8 veces más contenido de polifenoles en comparación con un proceso convencional (metanol: 15 %, 60 °C, 2 h). Interesantemente, bajo condiciones subcríticas el uso de 50 % de etanol fue 2 veces más eficiente que el uso de agua pura en la recuperación de polifenoles presentes en los residuos de té (Rajapaksha & Shimizu, 2022).

Si bien algunos trabajos reportan ventajas de la ELP sobre la extracción asistida por ultrasonido o viceversa, ambas tecnologías hacen uso de solventes amigables con el medio ambiente y han mostrado buenos rendimientos en la recuperación de polifenoles (Ameer et al., 2017; Carr et al., 2011).

Sin embargo, la correcta elección de un determinado sistema de extracción debe ser analizada desde un punto de vista de costos de producción. Por ello, Santos, Veggi and Meireles (2010, 2012) demostraron que el uso de cortos tiempos de proceso y bajos volúmenes de solvente en la ELP permite reducir en 9, 7 y 6 veces los costos de proceso en comparación con la extracción Soxhlet, ultrasonido y convencional (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de los costes de fabricación (CM) para la obtención de extractos polifenólicos, mediante diferentes métodos de extracción utilizando mezclas agua-etanol (30 %).

Técnica	**Condiciones de proceso**	**Capacidad del Extractor (m^3)**	**Costos de fenoles totales (US$/g)**
Convencional	30°C – 2h	0.05	3.80
		0.10	2.50
		0.30	1.58
Soxhlet	30°C – 8h	0.05	9.23
		0.10	5.50
		0.30	2.38
Ultrasonido	30°C – 2h	0.05	3.70
		0.10	2.46
		0.30	1.86
ELP	120°C – 0.15h	0.05	0.32
		0.10	0.29
		0.30	0.26

Fuente: Santos et al. (2012)

La ELP puede obtener de manera eficiente extractos de polifenoles a partir de diferentes matrices naturales. Sin embargo, durante la ELP optimizar el rendimiento, pureza, formación de compuestos tóxicos y selectividad de polifenoles específicos es aún un desafío. En ese sentido, los trabajos desarrollados a la fecha consideran a la temperatura y composición de solvente como variables de diseño y operación (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros óptimos considerados para la recuperación de polifenoles durante el proceso ELP.

Variables de proceso			**Variables respuesta**		**Referencias**
Matriz	Solvente (% v/v)	T (°C)	Polifenoles totales (mg GAE/gds)	Polifenoles específicos (µg/gds)	
Cebolla	Agua	110 – 190	n.s.	Quercetina: 4 - 14	Ko et al. (2011)
Thymus vulgaris	Agua	50 - 200	131 - 247	Ácido gálico: 1 - 8 Quercetina: 0.5 - 3.3	Vergara-Salinas et al. (2012)
Piel y semilla de uva	Agua	80 - 120	41 - 58 44 - 124	n.d.	Duba et al. (2015)
Orujo de uva	Etanol (0 – 15%)	65 - 90	5.28 -11.51	n.d.	Mariotti-Celis et al. (2018)
Borra de café	Etanol (0 – 15%)	65 to 90	8.21 - 13.87	Epicatequina: 429,8	Mariotti-Celis et al. (2018)
Semillas de loto	Agua pura	100 – 180	85 - 90	n.d.	Yan et al. (2020)
Té verde	Etanol (50%)	90 – 12 5	72.35 146.42	n.d.	Rajapaksha & Shimizu (2022)

n.d: no detectado

1.2.5. Purificación de extractos polifenólicos

Si bien, los extractos ricos en polifenoles presentan propiedades específicas para la salud relacionadas con el estrés oxidativo (Cory et al., 2018; Huaman-Castilla et al., 2017), durante ELP otros compuestos presentes de forma natural en las matrices vegetales tales azúcares reductores también pueden extraerse (de Souza et al., 2018; Mariotti-Celis, Martínez-Cifuentes, Huamán-Castilla, Pedreschi, et al., 2018a; Medina-Torres et al., 2017). En consecuencia, se deben aplicar otros procesos de purificación con la finalidad de eliminar y/o reducir la presencia de estos compuestos no deseados. El método de adsorción/desorción en columnas empacadas con resinas macroporosas no iónicas es uno de los más utilizados en la separación y purificación de polifenoles a partir de productos naturales, debido a su fácil operación, alta eficiencia, bajo costo, amigable con el medio ambiente, fácil escalamiento y regeneración (Altiok et al., 2008; Jampani et al., 2014; H. Li et al., 2017). Durante la etapa de adsorción, los polifenoles se retienen en la columna empacada de acuerdo con su afinidad con las resinas macroporosas. Luego, después de una etapa de lavado con agua; los polifenoles son desorbidos y/o recuperados normalmente utilizando soluciones hidroalcohólicas (Mariotti-Celis, Martínez-Cifuentes, Huamán-Castilla, Pedreschi, et al., 2018a).

En investigaciones previas en orujo de uva, el uso de una solución de etanol mayor al 30 % en extracción (ELP) reduce significativamente la adsorción de polifenoles totales en la subsiguiente etapa de purificación, afectando su recuperación global; sin embargo, algunos polifenoles específicos como los flavonoles aumentaron su rendimiento global (Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019; Mariotti-Celis, Martínez-Cifuentes, Huamán-Castilla, Pedreschi, et al., 2018a). Por lo tanto, el rol de la polaridad del solvente debería ser estudiado en el proceso simultáneo de extracción y purificación, con la finalidad de establecer parámetros óptimos en la recuperación selectiva de polifenoles específicos de las hojas de olivo, esto permitirá no solo revalorizar este residuo agroindustrial, sino también abrirá un nuevo enfoque para su escalamiento a nivel industrial.

Proceso de adsorción dinámica

Las resinas no polares presentan la misma estructura química (poliestireno divinilbenceno: PVB), que pueden preacondicionarse siguiendo el procedimiento estándar proporcionado por el fabricante antes de la prueba a escala de laboratorio.

La resina se empaqueta dentro de una columna de vidrio para las pruebas de adsorción y desorción. Luego, una solución de extracto crudo rica en polifenoles se pasa a través de una columna empacada a diferentes velocidades de flujo (0.1 - 5 mL/min) y temperaturas (20 – 40 °C) para recolectar diferentes fracciones de la corriente de salida a diferentes intervalos de tiempo (min).

Las curvas de adsorción se obtienen representando la concentración Ct/C_0 frente al tiempo, donde Ct y C_0 son la concentración de adsorbato de entrada y salida, respectivamente. El punto de ruptura (tb) se determina cuando la concentración de adsorbato alcanza ~10 % de C0, el tiempo de saturación (te), se estima cuando la concentración de adsorbato alcanza ~95 % de C0. Finalmente, la capacidad de adsorción se calcula a partir de la siguiente ecuación (Arsuaga et al., 2014) (Figura 3).

$$q = \frac{QC_0}{W}\int_{t=0}^{t=t_e}\left(1-\frac{C}{C_0}\right)dt$$

Donde, q es la capacidad de adsorción (mg/g), Q es el caudal (mL/min), C_0 es la concentración inicial de polifenoles, t_e es el tiempo de saturación (min), C es la concentración de polifenoles al tiempo de saturación (te).

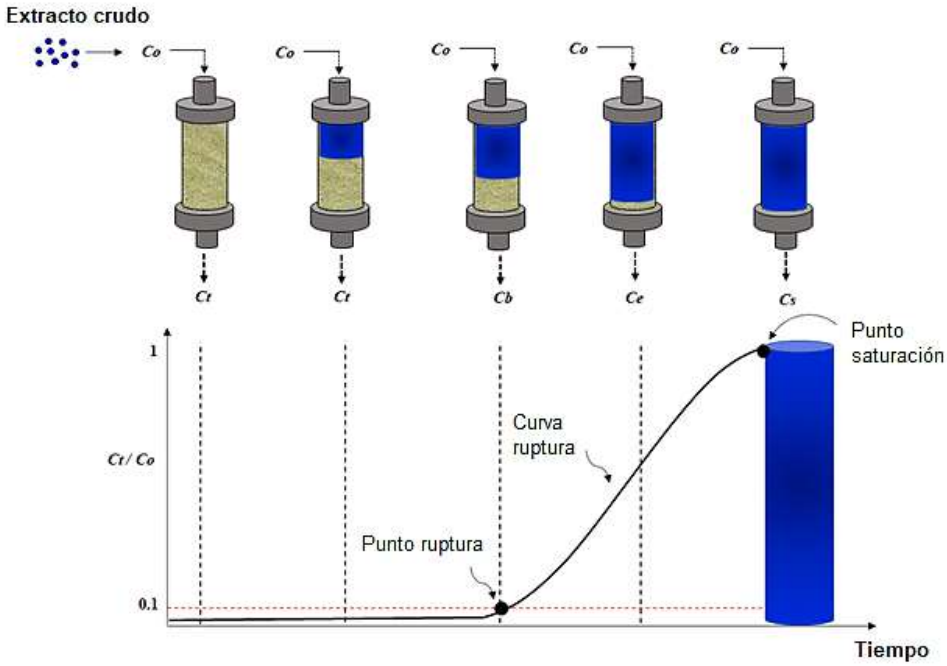


Figura 3. Adsorción dinámica de polifenoles

Para determinar la capacidad de desorción se desorben los polifenoles adsorbidos en la resina utilizando etanol como eluyente (entre 60 – 80 %) a un caudal entre 1 - 5 mL/min. Se recogen diferentes fracciones de la corriente de salida a diferentes intervalos de tiempo (min). Finalmente, las concentraciones de la corriente de salida se representan frente al tiempo para observar el fenómeno de desorción dinámica.

1.2.6. Rol de la polaridad del solvente

Los polifenoles son moléculas que presentan anillos aromáticos (fracción no polar) y uno o más grupos hidroxilo (fracción polar) en su estructura química (Vijayalaxmi et al., 2015). Estas características químicas y las características del solvente explican la solubilidad de los polifenoles durante el proceso de extracción (Cheigh et al., 2015). Aunque la polaridad generalmente es expresada en términos de su constante dieléctrica (Ɛ), este parámetro no considera las interacciones intermoleculares entre el soluto y el solvente. Por lo tanto, una definición correcta de la polaridad del solvente debe incluir todas las posibles interacciones intermoleculares entre las moléculas de soluto y las moléculas de solvente (Katritzky et al., 2004; Reichardt, 1994).

Los parámetros solvatocrómicos de Kamlet-Taft permiten comprender la afinidad del solvente por un compuesto específico y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con este compuesto, que se expresan como polaridad/polarizabilidad (π *) y acidez (α) respectivamente (Jessop, 2011). La Tabla 04, muestra que el agua pura, el etanol y glicerol son reconocidos como solventes próticos debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura química (Jessop et al., 2012). Tal es así que, bajo condiciones atmosféricas a 30°C, el agua presenta una polaridad más alta (π*: 1.14) que el etanol (π*: 0.71) y glicerol (π*: 0.51). No obstante, la capacidad del glicerol para formar enlaces hidrogeno (α: 1.21) es relativamente mayor en comparación con el agua (α: 1.07) y etanol (α: 0.98) (Jessop et al., 2012). Por ello, algunos polifenoles son altamente solubles en mezclas de agua - glicerol y agua – etanol debido a la capacidad del etanol y glicerol para modular la polaridad del solvente y formar un alto número de interacciones intermoleculares con los grupos funcionales de polifenoles (Galanakis et al., 2013; Huamán-Castilla et al., 2020). Por lo tanto, la optimización del proceso integrado de extracción y purificación de los polifenoles presentes en las hojas de olivo requiere estudios específicos complementarios que consideren la estructura química del polifenol y el relevante rol del solvente de extracción.

Tabla 4. Polaridad de algunos solventes usados en extracción

Solvente	**α**	**β**	**π***
Agua	1,17	0,14	1,09
Etanol	0,83	0,75	0,51
Glicerol	1,21	0,51	0,62
Metanol	0,93	0,66	0,58

α: es el parámetro de acidez, β: es el parámetro de basicidad y π*: es el parámetro de polaridad/polarizabilidad

Fuente: Jessop et al. (2012)

2.3. Definición de términos

EAG:	Equivalente de ácido gálico, el cual hace referencia al polifenol mayoritario presente en los extractos
DPPH:	Reactivo 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl, el cual es usado para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos
ORAC:	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, método para determinar la capacidad de los polifenoles para reducir los radicales oxígenos.
ELP:	Extracción liquida presurizada, tecnología alternativa limpia que permite recuperar compuestos bioactivos
Azúcares:	Contenido de glucosa y fructosa presente en los extractos
nm:	Nanómetros
°C:	Grados Celsius
g:	Gramos
kg:	Kilogramos
L:	Litro
mL:	Mililitros
µL:	Microlitro
Kcal:	Kilocalorías
mg:	Miligramos
µg:	Microgramos
v:	Volumen
min:	Minutos
ppm:	Partes por millón

III. METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación realizo las etapas de extracción y purificación, así como los análisis que comprenden a polifenoles totales, capacidad antioxidante y compuestos no deseados en el laboratorio de extracción de compuestos de alto valor (LECAV) de la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial; Mientras que el análisis de perfil de polifenoles fue realizado en el laboratorio de contaminantes orgánicos de la Universidad Nacional de Moquegua – Ilo, así como el análisis de azúcares reductores fue realizado en los laboratorios de la Universidad Nacional de Juliaca.

3.1. Procedimientos

3.1.1. Materia prima

Se utilizaron 10 kg de hojas de olivo que fueron proveídos de las plantaciones de la empresa OLIVERS de la provincia de Islay, en el mes de mayo, Región de Arequipa, (Perú). Las hojas de olivo fueron obtenidas de la poda que se realiza anualmente como parte de las labores culturales, una vez recolectadas fueron protegidas en papel de seda blanco de 35 g. Luego, las muestras fueron colocadas dentro de cajas de cartón corrugado con la finalidad de protegerlas de la luz y evitar daños físicos, para ser secadas a temperatura ambiente y seguidamente molidas para su posterior extracción y análisis.

3.1.2. Materiales

- 03 Matraces Erlenmeyer (50, 100 y 250 mL)
- 02 Micropipetas (50 y 100 µL)
- 02 Pipetas de vidrio (1 y 10 mL)
- 03 Probetas de vidrio (50, 100, 250 mL)
- 30 Tubos de ensayo
- 03 Vasos de precipitados de vidrio (50, 100, 250 mL)
- Fiola (10, 250 y 500 ml)
- Piceta (250 y 500ml)
- Papel absorbente
- Pack of six 10-mL cells for ASE 150/350

- Resina macroporosa HP-20
- botellas ámbar 200 ml
- Balón de 20 kg de nitrógeno (Pureza > 99,5%)

3.1.3. Equipos

- Balanza analítica (RADWAG AS22OC2)
- Espectrofotómetro UV-visible doble haz 4419 (Modelo HJD005)
- Congeladora vertical (Marca Bosch)
- Agitador magnético con temperatura (Modelo IKA C-MAG HS-7)
- Extractor de solvente acelerado Dionex ASE 150 de Thermo Scientific
- Columnas de vidrio de alta presión (150 mm x 40 mm)
- Lector multimodal de microplacas
- Molino de mano (Marca Bosch MS6CA4120)
- Unidad UHPLC – DAD (Agilent 1290 Infinity II, USA)

3.1.4. Insumos y Reactivos

- Trolox (>97 % de pureza)
- DPPH (0.1 mM)
- Reactivo Fenol Folinciocalteu (2 N)
- Etanol grado HPLC (>99 % de pureza)
- Glicerol Q.P (>98 % de pureza)
- Hidróxido de sodio(0,1N)
- Fenolftaleína
- Agua destilada.
- Tierra de Diatomeas
- Carbonato de sodio (10%, p/p)
- Ácido gálico (0.8 g/L)
- Acetonitrilo
- Ácido fórmico
- Metanol grado HPLC
- Catequina (≥98 %)

- Epicatequina (≥98 %)
- Kaempferol (≥98 %)
- Rutina (≥98 %)
- Quercitrina (≥98 %)
- Procianidina A2 (≥97 %)
- Procianidina B2 (≥97 %)
- Resveratrol (≥98 %)
- Ácido cafeico (≥99 %)
- Ácido vanilico (≥99 %)

3.1.5. Métodos

El presente proyecto se dividió en 2 etapas tales como extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas, ambas etapas fueron analizadas de forma individual y de manera integrada (combinando extracción – purificación).

a. Extracción liquida presurizada (ELP):

Siguiendo un diseño experimental factorial completo, la ELP extrajo los polifenoles presentes en las hojas de olivo mediante la adición de diferentes mezclas de solventes tales como agua-glicerol (0-30 %, p/p) y agua-etanol (0-30 %, p/p) a diferentes temperaturas de extracción (50 y 70 °C) (Figura 4). El rango experimental de estudio para los niveles de solvente y los parámetros de proceso, se definieron en base a investigaciones previas de procesos de extracción (Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019).

Entonces, ~10 g de hojas de olivo (base seca) se colocaron en una celda de extracción de 100 mL de un sistema de líquidos presurizados (ASE150: Dionex, Thermofisher). Los parámetros de extracción fueron los siguientes: presión 10 MPa, un ciclo de extracción, 150 % de volumen de lavado, 250 s de tiempo de purga de nitrógeno y 5 minutos de tiempo de extracción estático. Estas condiciones permitieron obtener una relación muestra solida: volumen de extracto de 1:10 (Figura 5).

Después de la extracción, los extractos crudos fueron envasados en viales ámbar y almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis.

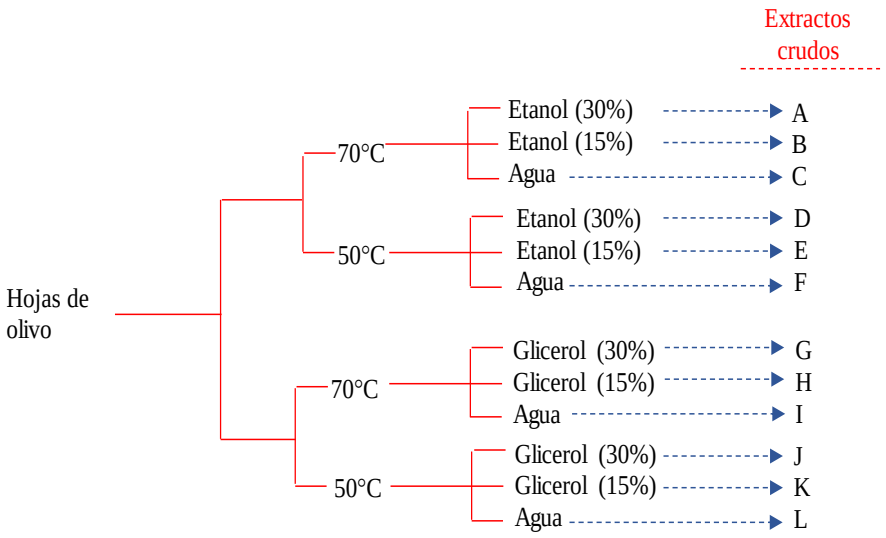


Figura 4. Diseño experimental para la obtención de polifenoles

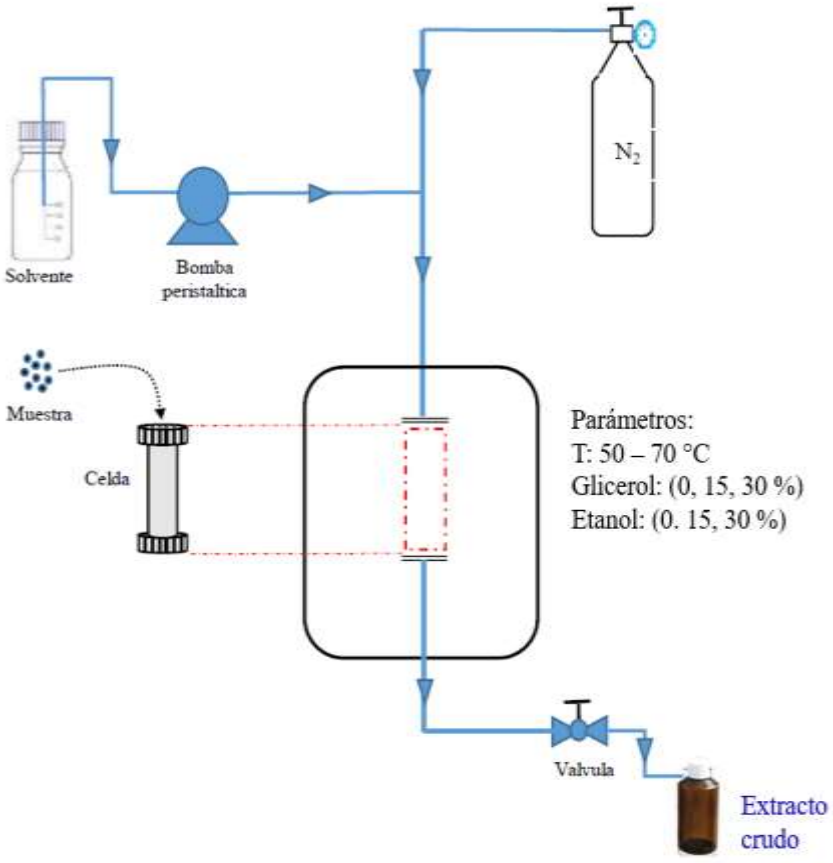


Figura 5. Sistema del proceso de extracción liquida presurizada

b. Purificación de extractos crudos a través del uso de resinas no iónicas macroporosas

Todos los extractos crudos obtenidos fueron purificados a 30 °C en un sistema especialmente armado para este fin (Figura 6), con la finalidad de obtener extractos purificados libres de compuestos no deseados (azúcares).

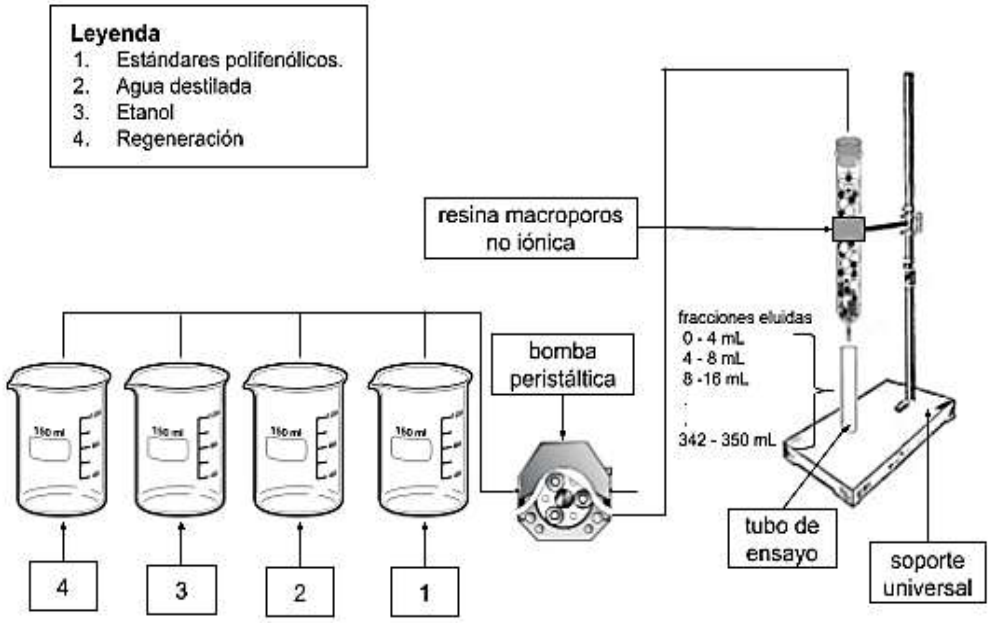


Figura 6. Sistema de purificación con resinas

El proceso de purificación consistió de 4 etapas (adsorción, lavado, desorción y regeneración) (Figura 7). Los parámetros de este proceso, se definieron en base a investigaciones previas en procesos integrados de extracción/purificación (Huaman-Castilla, Martinez, et al., 2019; Mariotti-Celis, Martínez-Cifuentes, Huamán-Castilla, Pedreschi, et al., 2018a). En resumen, ~30 mL de extracto crudo con un caudal constante de 3 mL/min fueron pasados a través de una columna de vidrio (Ø: 25 mm; h: 100 mm) empaquetada con ~18 g de resina macroporosa no iónica HP-20 (Diaion, Tokio, Japón). Luego, 100 mL de agua destilada fueron pasados para la etapa de lavado. Después, la etapa de desorción mediante el uso de etanol al 80 % permitió recuperar los polifenoles retenidos en la resina (Figura 8). Finalmente, la columna fue regenerada utilizando 100 mL de agua destilada, 100 mL de NaOH (1N) y 100 ml de HCl (2N). los extractos purificados fueron almacenados en viales ámbar a -20 ° C para su posterior análisis.

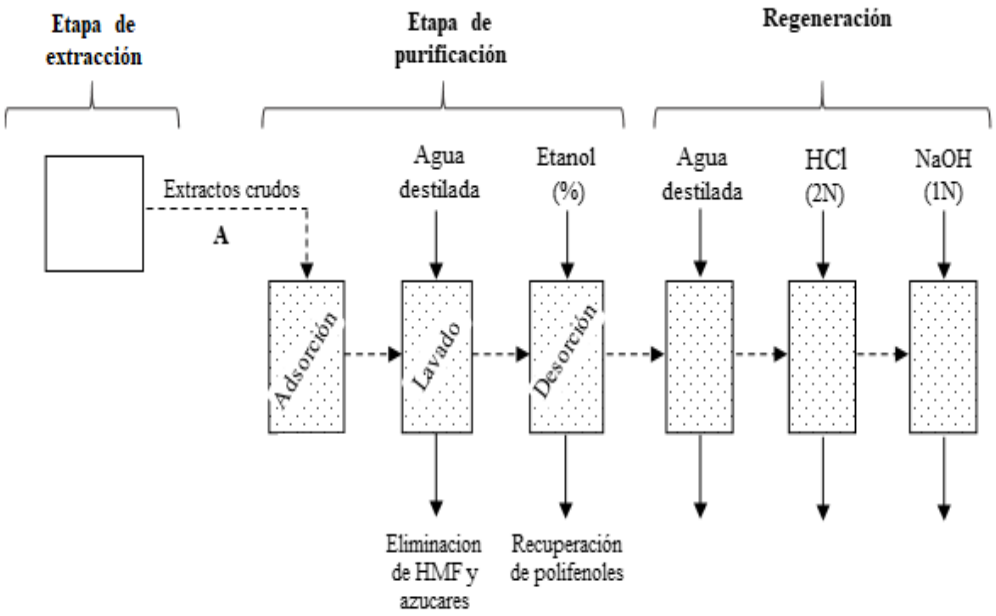


Figura 7. Etapas del proceso de purificación

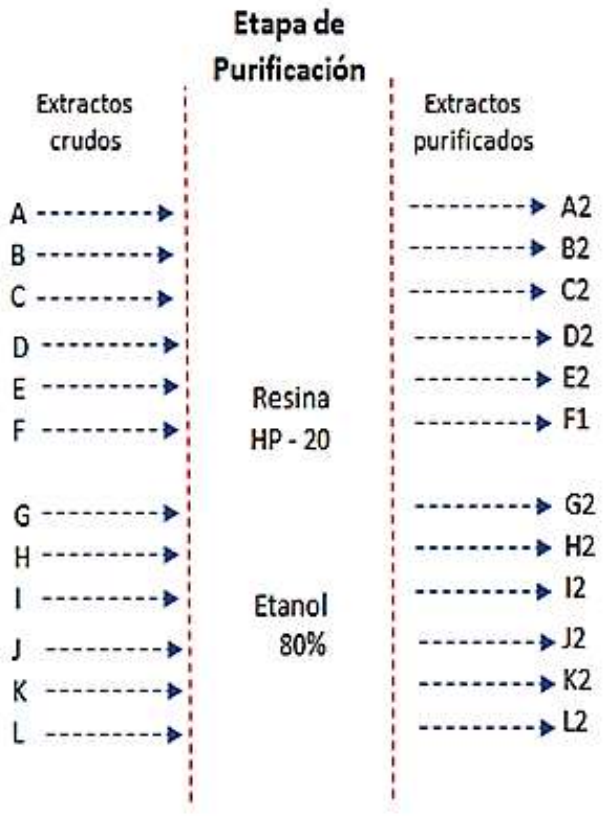


Figura 8. Esquema del proceso de purificación de los diferentes extractos crudos

c. Determinación de polifenoles totales

El contenido polifenoles totales (CPT) de los extractos crudos y purificados de hojas de olivo fue determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965). Un volumen de 3.75 mL de agua destilada, 0.5 mL de extracto de crudo y/o purificado y 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) fueron mezclados con 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (10% p / v). La absorbancia fue medida a 765 nm (Espectrómetro UV 1240, Shimadzu, Kioto, Japón) después un tiempo de reacción de 1 h a temperatura ambiente (Figura 9).

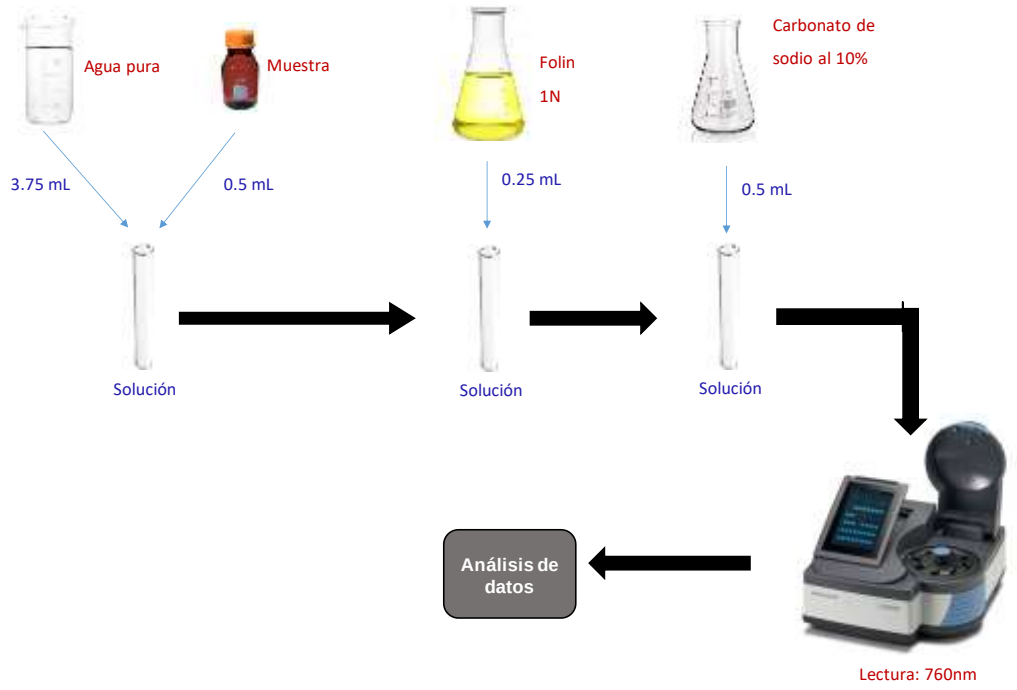


Figura 9. Esquema del proceso de determinación de polifenoles

En paralelo una curva estándar bajo las condiciones fue realizada con la finalidad de expresar los resultados como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por gramo de hoja de olivo (Figura 10).

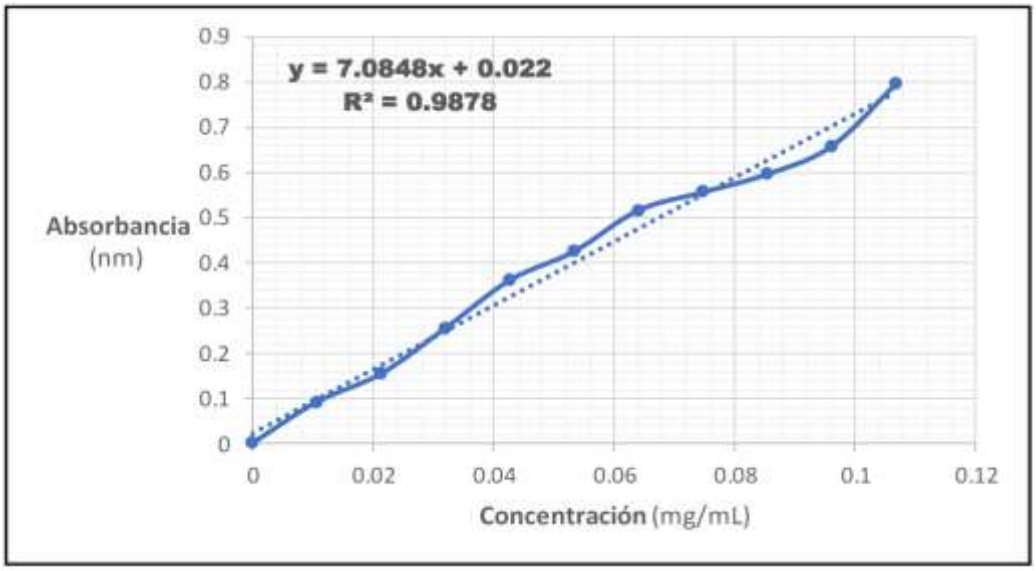


Figura 10. Curva de calibración de ácido gálico

d. Determinación de capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó utilizando el método de inhibición del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) (Brand-Williams et al., 1995). En resumen, se mezclaron 0.1 mL de extracto con 3,9 ml de solución DPPH (0,1 mM), luego la solución se incubo a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. La reducción de DPPH se determinó a 517 nm (espectrómetro UV 1240, Shimadzu, Kioto, Japón). La IC_{50} (mg/mL), definida como la concentración de extracto efectivo necesario para inhibir el 50 % de la actividad del radical DPPH.

El porcentaje de inhibición (capacidad secuestrada de radicales libres) para cada concentración de muestra, se determina empleando la siguiente formula:

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

Donde:

Ac= Absorbancia de las muestras (promedio del 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 él % 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 necesarias para reducción en un 50 % la actividad radical DPPH:

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

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

e. Determinación de capacidad antioxidante por ORAC

Los análisis ORAC de los extractos obtenidos se realizó en un fluorómetro de microplacas de acuerdo a la metodología propuesta por Chirinos et al. (2008). AAPH fue utilizado como generador de radicales peroxilo, trolox como estándar y fluoresceína como emisor de fluorescencia. Previamente soluciones de fluoresceína 48 nM y una solución de AAPH 153nM fueron diluidos en una solución buffer de PBS (pH 7,4). En resumen, 25 µL de muestra (blanco), estándar de Trolox o muestra diluida fueron mezcladas, las cuales fueron incubadas durante 10 minutos a 37 °C antes de la inyección automática en el lector de microplacas. La fluorescencia se midió a 485 nm (λ: excitación) y a 520 nm (λ: emisión) cada minuto durante 50 min. Los valores ORAC finales fueron calculados utilizando el área bajo la curva y fueron expresados como µmol de ET por gramo de hoja de olivo.

f. Determinación de Azúcares Reductores

La cuantificación de sacarosa y fructuosa se hizo según la metodología de Wilson et al., (1981). Se tomó 2 ml de extractos y 3 mL de agua ultra pura fueron mezclados. Luego, 3 mL de la mezcla fue filtrada mediante un filtro de 0,22 µm (nylon). Luego, se tomaron 300 µL de la muestra diluida filtrada y se mezcló con 700 µL de acetonitrilo para hacer el análisis en el equipo HPLC equipado con un detector IR. 20µL fueron inyectados a 1 mL/min. La separación cromatográfica se realizó en fase Normal a 30ºC, usando una columna LiChroCART® 250-4 Purospher® STAR NH2 (5 µm) a 40ºC. La fase móvil es de Acetonitrilo/agua (70/30%) (Merck, USA) para después ser analizada por el detector IR.

g. Cuantificación de polifenoles específicos

La cuantificación de polifenoles se realizó utilizando la metodología propuesta por Maldonado et al. (2022) con algunas modificaciones. Muestras de 100 uL de la elución previamente obtenida fue diluida con Metanol grado HPLC (1/10) y se filtraron a través de un filtro (jeringa) de 0.22 µm. Luego, 2 uL de las muestras fueron inyectadas en un UHPLC (Agilent 1290 Infinity II, USA) conectado a un 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 conformada por 0.1% ácido fórmico en agua miliQ (A) y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (B), 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 (Figura 11).

Diferentes estándares de polifenoles fueron previamente diluidos para construir las curvas de calibración. Las curvas se obtuvieron trazando las áreas de los picos frente a diez concentraciones diferentes de soluciones estándar entre 0,3 y 20 µg/mL. (λ: 270 nm Rutina, Quercitrina; λ: 280 nm, Catequina, Procianidina B2, Epicatequina, ácido vanilico, Procianidina A2; λ: 324 nm, Ácido Cafeico, Resveratrol y λ: 373 nm, Kaempferol). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en µg del polifenol específico por gramo en base seca.

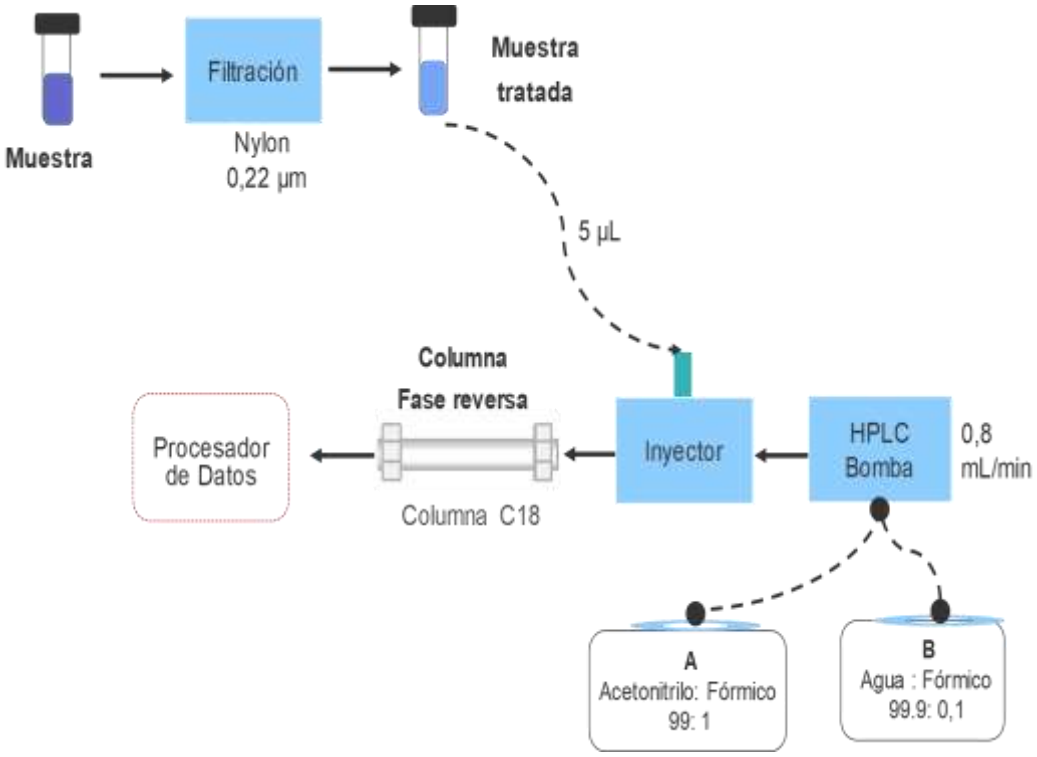


Figura 11. Esquema del proceso UHPL para el análisis de polifenoles

3.1.6. Metodología de análisis estadístico para el proceso integrado de extracción - purificación

Un total de 48 pruebas fueron conducidas mediante un diseño multifactorial completo con la finalidad de evaluar el efecto de los factores en estudio tales como temperatura, concentración de solvente en extracción y concentración de eluyente en purificación sobre las variables respuesta (polifenoles totales, capacidad antioxidante y azúcares reductores) (*p valor < 0,05*) (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Arreglo factorial 2x3x2 considerando el uso de etanol en la ELP

Factores estudio			Variables respuesta		
Solvente	**Solvente de extracción (%)**	**Temperatura °C**	**Polifenoles totales**	**Capacidad antioxidante**	**Azúcares reductores**
Etanol	0	50			
Etanol	15	50			
Etanol	30	50			
Etanol	0	70			
Etanol	15	70			
Etanol	30	70			
Glicerol	0	50			
Glicerol	15	50			
Glicerol	30	50			
Glicerol	0	70			
Glicerol	15	70			
Glicerol	30	70			

Tabla 6. Arreglo factorial 2x3x2 considerando el uso de glicerol en la ELP-PR

Factores estudio				Variables respuesta		
Solvente	**Solvente de extracción (%)**	**Temperatura °C**	**Eluyente en purificación (%)**	**Polifenoles totales**	**Capacidad antioxidante**	**Azúcares reductores**
Etanol	0	50	50			
Etanol	15	50	50			
Etanol	30	50	50			
Etanol	0	70	70			
Etanol	15	70	70			
Etanol	30	70	70			
Glicerol	0	50	50			
Glicerol	15	50	50			
Glicerol	30	50	50			
Glicerol	0	70	70			
Glicerol	15	70	70			
Glicerol	30	70	70			

Los modelos estadísticos usados se muestran a continuación:

Modelo factorial para la ELP

$$y = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + (\alpha\beta\delta)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde: γ representa a la variable de respuesta, μ es la media global de todos los tratamientos, α es el tipo de solvente, β representa la concentración del solvente, δ es la temperatura de extracción, así como las interacciones de dichos factores y ε representa el error experimental.

Modelo factorial para la ELP-RP

$$y = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + (\alpha\beta\delta)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde: γ representa a la variable de respuesta, μ es la media global de todos los tratamientos, α es el tipo de solvente, β representa la concentración del solvente, δ es la temperatura de extracción, así como las interacciones de dichos factores y ε representa el error experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Efecto del uso de solventes sobre la recuperación de compuestos antioxidantes durante el proceso de extracción liquida presurizada (ELP)

1.2.1. Determinación de Polifenoles Totales

Si bien diversos estudios promueven el uso de agua pura para la obtención de polifenoles mediante la extracción liquida presurizada, es necesario mejorar los rendimientos en extracción mediante el uso de co-solventes de grado alimentario. En ese sentido, el uso de etanol y glicerol fueron más efectivos para recuperar importantes concentraciones de compuestos fenólicos entre 7.52 y 15,29 mg EAG/gss comparado con el uso de agua cuyas concentraciones varían entre 6.19 y 7.34 mg EAG/gss (*p valor > 0,05*) (Tabla 7). Comportamiento similar fue reportado por Xynos et al. (2014) quienes observaron que el uso de 100% de etanol a 40 °C en la ELP permite recuperar un 48 % más contenido de polifenoles en comparación con el uso de agua bajo las mismas condiciones. Si bien la molécula de agua solo favorece interacciones polares con los grupos hidroxilos de los polifenoles, la molécula de etanol presenta una fracción polar y no polar dentro de su estructura química que le permite realizar interacciones intermoleculares con los grupos hidroxilos y aromáticos presentes en los polifenoles (Galanakis et al., 2013; Huaman-Castilla et al., 2019).

Interesantemente, bajo condiciones de ELP, el etanol mostro un mejor comportamiento para la recuperación de polifenoles a altas temperaturas (70 °C) comparado con el glicerol (*p valor < 0,05*). Por ejemplo, cuando la concentración de etanol se incrementa de 15 a 30 % la recuperación de polifenoles mejora en 40 % comparado con el uso de glicerol bajo las mismas condiciones (Tabla 7). Al respecto, algunos trabajos han reportado que el glicerol presenta una estructura química con tres grupos funcionales hidroxilo capaces de formar puentes hidrogeno con los grupos hidroxilo de los polifenoles, cuyos rendimientos superan ampliamente al uso de agua pura en la ELP (Huamán-Castilla et al., 2020; Huaman-Castilla, Martinez,

et al., 2019). No obstante, de acuerdo con nuestros resultados la bipolaridad de la estructura química del etanol permite una mayor eficiencia para la recuperación de estos compuestos bioactivos. Bajo estas consideraciones, la mejor condición para recuperar polifenoles totales fue establecida a 70°C con 30% de etanol (15,29 mg EAG/gss).

Tabla 7. Contenido de polifenoles de los extractos obtenidos

Descripción		50 °C		70 °C	
		CPT (mg EAG/gss)		CPT (mg EAG/gss)	
		Promedio	SD	Promedio	SD
Etanol (%)	0	$6,31^{A,a}$	±0,05	$7,34^{B,b}$	±0,20
	15	$7,52^{B,a}$	±0,14	$10,61^{D,b}$	±0,29
	30	$11,54^{E,a}$	±0,55	**$15,29^{E,b}$**	±0,09
Glicerol (%)	0	$6,19^{A,a}$	±0,58	$6,60^{A,a}$	±0,01
	15	$8,94^{C,a}$	±0,01	$8,46^{C,a}$	±0,19
	30	$9,61^{D,a}$	±0,03	$10,27^{D,b}$	±0,15

Contenido de polifenoles totales (CPT) se expresó como mg de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias entre columnas mientras que las letras mayúsculas indican diferencias entre filas.

1.2.2. Determinación de Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos fue relacionada con su habilidad para inhibir el radical DPPH, un compuesto altamente inestable con capacidad de aceptar átomos de hidrogeno por parte de compuestos antioxidantes como los polifenoles. De acuerdo con nuestros resultados, bajo condiciones subcríticas (ELP) los cambios de temperatura de 50 a 70 °C reducen la cantidad de extracto necesario para inhibir el radical DPPH en 29, 23 y 16 % mediante el uso de etanol (30 %), glicerol (30 %) y agua pura (*p valor < 0,05*) (Tabla 8). Este efecto de la temperatura fue reportado por Xynos et al. (2014) quienes observaron que los cambios de 40 a 62 °C usando mezclas agua – etanol (50 %) reducen en 14 % el volumen necesario de extracto para inhibir el radical DPPH. Los incrementos de temperatura bajo condiciones subcríticas permiten acelerar la energía cinética del solvente favoreciendo la ruptura de la matriz vegetal, consecuentemente una mayor proporción de polifenoles es

liberado al solvente (Mariotti-Celis et al., 2013). Por ello, nuestra mejor condición fue establecida con 30 % de etanol a 70 °C (IC50: 5,49) (Tabla 8). Entonces, al tener una mayor cantidad de polifenoles menor será la cantidad de extracto necesario para inhibir al radical DPPH.

Tabla 8. Caracterización de capacidad antioxidante presente en los extractos de hojas de olivo

Descripción		**50 °C**		**70 °C**	
		DPPH IC_{50} (mg/mL)	ORAC (µmol ET/gss)	DPPH IC_{50} (mg/mL)	ORAC (µmol ET/gss)
		Promedio SD	Promedio SD	Promedio SD	Promedio SD
Etanol (%)	0	$23{,}10^{D,a}$ ±0,55	$245{,}14^{A,a}$ ±11,2	$19{,}82^{D,b}$ ±0,18	$576{,}88^{B,b}$ ±21,3
	15	$11{,}36^{B,a}$ ±0,23	$635{,}39^{C,a}$ ±19,3	$8{,}69^{B,b}$ ±0,09	$850{,}63^{E,b}$ ±28,4
	30	$7{,}63^{A,a}$ ±0,21	$805{,}15^{E,a}$ ±22,4	**5,49**^{A,b} ±0,11	**1259,64**^{F,b} ±33,2
Glicerol (%)	0	$28{,}28^{E,a}$ ±0,67	$363{,}13^{B,a}$ ±12,8	$25{,}77^{E,b}$ ±0,32	$451{,}31^{A,b}$ ±17,9
	15	$18{,}71^{C,a}$ ±0,11	$571{,}08^{C,a}$ ±37,6	$15{,}48^{D,b}$ ±0,10	$682{,}72^{C,b}$ ±11,8
	30	$11{,}87^{B,a}$ ±0,09	$705{,}17^{D,a}$ ±22,8	$9{,}07^{C,a}$ ±0,08	$731{,}49^{D,a}$ ±8,88

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0{,}05$). Las letras minúsculas indican diferencias entre columnas mientras que las letras mayúsculas indican diferencias entre filas.

Los métodos DPPH y ORAC evalúan la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en las hojas de olivo para inhibir un radical específico. El método DPPH evalúa la capacidad de los polifenoles para neutralizar el compuesto DPPH, que es un radical libre que difiere de otras especies reactivas generadas biológicamente; mientras el método ORAC mide la capacidad de los polifenoles para neutralizar los radicales peroxilo, los cuales son similares a los radicales libres generados dentro de un organismo (Marinova & Batchvarov, 2011; Roy et al., 2010; Thaipong et al., 2006). Por ello, estos trabajos de investigación mencionan que es importante que ambas mediciones sean realizadas (DPPH y ORAC) con la finalidad de contrastar resultados. Los extractos obtenidos con 30 % de

etanol, 30 % de glicerol y agua pura a 70 °C bajo las mismas condiciones presentaron los valores de ORAC más altos, con 1259, 731 y 576 µMTE/g, respectivamente (Tabla 8). Contrario al comportamiento de los resultados de DPPH, los valores ORAC tienen una relación directa con el contenido de polifenoles, cuanto mayor sea la capacidad antioxidante ORAC mayor es la concentración de polifenoles presentes en el extracto (Davalos et al., 2004; Roy et al., 2010).

1.2.3. Determinación de azúcares reductores

Independiente de la temperatura, el uso de glicerol permitió recuperar entre 2,98 y 13,25 mg/gss de azúcares reductores; mientras que el uso de etanol recupero entre 6,18 y 13.71 mg/gss (*p valor < 0,05*) (Tabla 9). Por ejemplo, cuando el contenido de etanol incrementa de 0 a 30 % a 70 °C reduce la presencia de fructosa y glucosa en 34 y 40 % respectivamente; mientras que los incrementos de glicerol (0 – 30 %) reduce el contenido en 77 y 70 % para fructosa y glucosa respectivamente (*p valor < 0,05*) (Tabla 9). Comportamiento similar fue reportado por Huaman-Castilla et al. (2019) quienes observaron que la adición de etanol de 15 % a 50 % reduce en 60 % la extracción de azúcares reductores (glucosa y fructosa). Al respecto, durante el proceso de extracción la adición de solventes de polaridad intermedia como el etanol reduce la habilidad de los azúcares reductores (compuestos polares) para establecer puentes hidrogeno con las moléculas de agua (Alves et al., 2007), consecuentemente una menor concentración de estos compuestos es recuperado.

Por otro lado, las altas concentraciones de glicerol (30 %) a 70 °C fueron 67 y 50 % más efectivas para reducir el contenido de fructosa y glucosa en comparación con el uso de etanol (30 %) bajo las mismas condiciones (*p valor < 0,05*) (Tabla 9). Probablemente, la presencia de tres grupos hidroxilo en la estructura del glicerol le permita una mayor habilidad para formar puentes hidrogeno con las moléculas de agua reduciendo las interacciones azúcares – agua.

Tabla 9. Contenido de azúcares presentes en los extractos de hojas de olivo

Descripción		50 °C		70 °C	
		Fructosa	Glucosa	Fructosa	Glucosa
		Promedio SD	Promedio SD	Promedio SD	Promedio SD
Etanol (%)	0	$11,28^{A,a}$ ±1,25	$9,38^{A,a}$ ±0,39	$13,71^{A,b}$ ±0,48	$11,89^{A,b}$ ±1,18
	15	$9,16^{A,a}$ ±0,15	$8,53^{A,a}$ ±1,09	$12,69^{B,b}$ ±0,18	$9,42^{B,b}$ ±0,48
	30	$8,02^{B,a}$ ±0,17	$6,18^{B,a}$ ±0,11	$9,12^{C,b}$ ±0,09	$7,11^{C,b}$ ±0,22
Glicerol (%)	0	$11,69^{A,a}$ ±1,09	$10,02^{A,a}$ ±0,28	$13,25^{A,b}$ ±0,37	$11,91^{A,b}$ ±1,09
	15	$7,67^{B,a}$ ±0,19	$5,39^{C,a}$ ±0,09	$6,67^{B,b}$ ±0,21	$5,02^{B,a}$ ±0,38
	30	$5,83^{C,a}$ ±0,06	$3,56^{D,a}$ ±0,05	$2,98^{D,b}$ ±0,10	$3,51^{D,b}$ ±0.11

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las letras minúsculas indican diferencias entre columnas mientras que las letras mayúsculas indican diferencias entre filas.

1.2.4. Determinación del Perfil de polifenoles

Con el fin de encontrar las mejores condiciones del proceso de extracción liquido presurizado (ELP) para la recuperación de familias específicas de polifenoles tales como flavanoles, flavonoles, estilbenos, secoiridoides, fenoles simples y ácidos fenólicos presentes en las hojas de olivo, considerando parámetros de proceso como la temperatura de extracción (90, 120 y 150 °C) y diferentes mezclas agua-etanol y agua-glicerol (0, 15 y 30 %).

a. Ácidos fenólicos

El contenido de ácidos fenólicos varía entre 21 y 104 μg/gss y de 19 a 92 μg/gdp con el uso de etanol y glicerol respectivamente (Tabla 10). Los incrementos de temperatura favorecen la extracción de estos compuestos para todas las condiciones establecidas. Por ejemplo, cuando la temperatura incrementa de 50 a 70 °C con 30 % de solvente (etanol y glicerol) el contenido total de ácidos fenólicos mejora en 32 % (Tabla 10). Este efecto de la temperatura fue reportado por (García-

Marino et al., 2006) quienes reportaron que cambios de 100 a 150 °C usando agua pura bajo condiciones subcríticas mejora en ~8 veces la recuperación de ácidos fenólicos. Entonces, los cambios de temperatura favorecen la aceleración de las moléculas del solvente favoreciendo una mayor interacción intermolecular con los grupos funcionales de los polifenoles.

Por otro lado, el tipo de solvente es otro factor importante en la recuperación de estos compuestos. Por ejemplo, si fijamos la temperatura a 70 °C, el uso de etanol al 30 % permite un 17 y 98 % más recuperación de ácidos fenólicos en comparación con el uso glicerol (30 %) y agua pura bajo las mismas condiciones respectivamente (Tabla 10). Al respecto, Jessop et al. (2012) mencionan que el agua pura presenta una mayor polaridad (π^*: 0,98) comparado con el etanol (π^*: 0,27). Entonces, considerando que cuanto mayor es la polaridad intermolecular mayor es la habilidad que tiene el solvente para establecer enlaces hidrogeno con otras moléculas (Jessop, 2011). Por ello, la adición de etanol disminuye la polaridad del solvente favoreciendo las interacciones intermoleculares (dipolo-dipolo y fuerzas de dispersión de London) (Galanakis et al., 2013).

De acuerdo con nuestros resultados, la recuperación de ácidos fenólicos específicos como gálico, vanílico y cafeico aumentó con la temperatura y las concentraciones de etanol. Por ello, la mejor condición de ELP fue establecida con 30 % de etanol a 70 °C (Tabla 10). Estas condiciones permitieron recuperar 53 y 46 % más contenido de ácido gálico en comparación con ácido vanilico y cafeico bajo las mismas condiciones (Tabla 10).

b. Flavanoles

Bajo condiciones subcríticas (10 MPa), el contenido de flavanoles varía entre 198 y 329 μg/gss y de 174 a 269 μg/gdp con el uso de etanol y glicerol respectivamente (Tabla 10). De acuerdo con nuestros resultados, cuando la temperatura incrementa de 50 a 70 °C el contenido

de flavanoles aumentó en 26 % y 16 % veces usando etanol y glicerol respectivamente (Tabla 10). Estudios similares muestran el efecto positivo de la temperatura cuando utilizaron agua pura a altas temperaturas (de 100 a 200 °C) recuperando ~2 veces más contenido de flavanoles (Mauromoustakos et al., 2009; Vergara-Salinas et al., 2012).

Similar al comportamiento de ácidos fenólicos, el etanol fue el solvente que mayor recuperación de flavanoles para todas las condiciones de proceso. Por ejemplo, si fijamos la temperatura a 70°C el uso de etanol a 70 °C recupero 35 y 25 % más contenido de flavanoles en comparación con el uso de glicerol (30 %) y agua pura respectivamente (Tabla 8). Asimismo, la recuperación de flavanoles específicos como catequina y epicatequina aumentó con la temperatura y las concentraciones de etanol (Tabla 10). Los extractos obtenidos al con 30 % de etanol a 70 °C presentaron una alta concentración de catequina (~14 %) en comparación con epicatequina bajo las mismas condiciones (Tabla 10).

c. Estilbenos

El uso de mezclas agua-etanol y agua-glicerol favorece la recuperación de resveratrol (estilbeno), cuyas concentraciones varían de 42 a 49 μg/gss y entre 36 y 54 μg/gss para etanol y glicerol, respectivamente (Tabla 10). Las altas temperaturas (70 °C) y altas concentraciones de etanol y glicerol permitieron las más altas concentraciones de este compuesto. Sin embargo, el uso de 30% de etanol fue 1.7 veces más efectivo para recuperar estilbenos comparado con el uso de glicerol bajo las mismas condiciones (Tabla 10). Este comportamiento del etanol concuerda con los hallazgos reportados por Karacabey & Mazza (2008) quienes observaron que cambios de 30 a 80 % de etanol incrementan 2.7 veces la recuperación de resveratrol bajo condiciones atmosféricas (30 °C). Similar al comportamiento de ácidos fenólicos y flavanoles, la reducción de la polaridad en los solventes favorece la recuperación de estos compuestos en particular.

Tabla 10. Perfil de polifenoles de los extractos obtenidos

	50 °C					70 °C				
		15 %		30 %			15 %		30 %	
Ácidos fenólicos	**Agua pura**	**Etanol**	**Glicerol**	**Etanol**	**Glicerol**	**Agua pura**	**Etanol**	**Glicerol**	**Etanol**	**Glicerol**
Gálico	45.7 ±1.1	49.9 ±1.2	46.2 ±3.5	78.5 ±3.3	70.4 ±2.8	59.3 ±2.2	73.2 ±1.9	68.8 ±2.3	104.2 ±8.2	92.2 ±3.6
Cafeico	11.1 ±2.2	22.5 ±3.2	19.2 ±2.2	28.5 ±5.1	23.4 ±1.7	16.1 ±1.7	31.3 ±2.7	28.3 ±1.6	43.3 ±3.9	33.4 ±1.9
Vanilico	15.1 ±4.3	21.4 ±3.3	23.3 ±4.3	46.4 ±3.9	36.9 ±4.5	21.1 ±4.3	28.7 ±2.1	25.2 ±2.5	56.2 ±2.4	47.6 ±3.8
Σ:	**71.90**	**94.80**	**88.70**	**153.40**	**130.70**	**96.40**	**133.20**	**122.30**	**203.70**	**173.20**
Estilbenos										
Resveratrol	33.5 ±3.3	42.9 ±2.1	35.9 ±4.1	66.7 ±3.9	55.1 ±4.7	38.4 ±6.3	54.9 ±5.2	46.9 ±3.3	94.4 ±5.9	53.7 ±4.8
Flavanoles										
Catequina	79.0 ±6.6	110.0 ±8.1	98.0 ±7.6	148.6 ±9.9	122.6 ±11.6	120.3 ±10.1	158.6 ±8.3	131.8 ±9.8	176.9 ±11.2	156.5 ±7.6
Epicatequina	69.7 ±5.8	88.4 ±6.7	76.7 ±8.3	112.7 ±8.4	91.8 ±5.9	95.3 ±7.1	129.2 ±10.2	106.8 ±9.1	152.8 ±12.4	112.8 ±9.8
Σ:	**148.70**	**198.40**	**174.70**	**261.30**	**214.40**	**215.60**	**287.80**	**238.60**	**229.70**	**269.30**
Flavonoles										
Quercitina	59.6 ±3.9	78.2 ±6.8	118.8 ±5.8	61.2 ±7.8	147.9 ±10.8	91.4 ±6.2	131.7 ±9.8	155.5 ±11.8	118.2 ±12.7	194.4 ±10.8
Kaempferol	30.0 ±4.6	72.9 ±4.7	121.5 ±9.5	59.6 ±6.7	158.3 ±11.2	79.9 ±7.8	125.2 ±10.2	162.4 ±9.8	102.9 ±8.8	202.5 ±11.6
Σ:	**89.60**	**151.10**	**240.30**	**200.80**	**305.20**	**171.30**	**256.90**	**217.90**	**281.10**	**396.90**
Secoiridoides										
Oleuropeina	417.5 ±24.6	522.6 ±33.6	457.8 ±14.7	620.5 ±12.4	595.8 ±18.3	563.6 ±44.7	960.3 ±34.4	810.2 ±24.3	1312.5 ±28.6	949.9 ±44.6

d. Flavonoles

Contrario al comportamiento de otras familias de polifenoles, si bien los incrementos de temperatura mejoran la recuperación de flavonoles, el uso de concentraciones mayores del 15 % de etanol desfavorece la recuperación de flavonoles en 10 y 20 % para quercetina y kaempferol respectivamente (Tabla 10). Contrariamente, los incrementos de glicerol de 15 a 30 % combinados con altas temperaturas (70 °C) favorecen en 25 % la recuperación de quercetina y kaempferol (Tabla 10). Al respecto, Wijngaard & Brunton (2009) observaron una tendencia similar en la recuperación de flavonoles cuando altas concentraciones de etanol (≥ 50 %) fueron usadas bajo condiciones subcriticas. Este comportamiento podría explicarse por las interacciones competitivas de las moléculas de etanol, agua y flavonol. La presencia de grupos carbonilo tipo cetona en la estructura de los flavonoles favorece su solubilidad en agua. Entonces, a medida que aumenta la concentración de etanol en el solvente, las interacciones etanol-agua se ven más favorecidas que las interacciones flavonol-agua, lo que disminuiría la solubilidad de los flavonoles, reduciendo su recuperación durante la extracción.

Por otro lado, el glicerol es una molécula que presenta una mayor habilidad para formar interacciones tipo puentes de hidrogeno debido a la presencia de 3 grupos funcionales (OH) en su estructura química (Jessop et al., 2012). Esto favorece la habilidad de interactuar del glicerol con flavonoles, consecuentemente la recuperación de flavonoles se ve favorecida.

e. Secoiridoides

El contenido de oleuropeina es favorecido con los cambios de temperatura combinados con al tas concentraciones de glicerol y etanol (Tabla 10). Por ejemplo, a 70 °C cuando el contenido de glicerol incrementa de 15 a 30 % la recuperación de oleuropeina mejora en 26 y 17 % con etanol y glicerol respectivamente (Tabla 10). La oleuropeína

es un glucósido secoiridoide fenólico que consiste en hidroxitirosol, ácido elenólico y una molécula de glucosa. Este compuesto es el compuesto bioactivo más dominante en las hojas de olivo (Topuz & Bayram, 2022). Bajo condiciones atmosféricas a 70 °C usando ultrasonido y mezclas agua-etanol se reportaron rendimientos que varían de 300 a 700 ug/gss de oleuropeina (Cifá et al., 2018). Probablemente, el uso de líquidos presurizados además de favorecer la ruptura de la matriz vegetal mejora las interacciones intermoleculares entre el solvente y polifenoles, consecuentemente una mayor recuperación será reportada.

4.2. Impacto del uso de solventes sobre la recuperación de compuestos antioxidantes durante el proceso integrado de extracción liquida presurizada (ELP) y purificación con resinas (PR).

1.2.1. Determinación de Polifenoles Totales

Con el fin de encontrar las mejores condiciones operativas óptimas en un proceso de extracción y purificación, es necesario evaluar el contenido de polifenoles presentes después de haber realizado el proceso integrado (ELP-PR).

De acuerdo con nuestros resultados el proceso integrado (ELP-PR) tuvo un efecto negativo sobre el contenido de polifenoles con contenidos que varían de 4,39 a 11,79 mg/gss y entre 4,63 y 8,82 mg/gss cuando etanol y glicerol fueron usados como solventes en extracción, respectivamente (Tabla 11).

Independiente de la temperatura el contenido de polifenoles disminuyo significativamente. Por ejemplo, El uso de 15 y 30 % de etanol en extracción redujo en 18 % y 29 % el contenido de polifenoles presentes en los extractos purificados (*p valor < 0,05*) (Tabla 11). Interesantemente, el uso de glicerol al 15 y 30 % disminuye en 13 y 14 % la presencia de polifenoles en los extractos purificados (Tabla 11). Huaman-Castilla et al. (2019) observaron un comportamiento cuando etanol fue usado en

extracción durante la PR, argumentando que probablemente los compuestos de conforme se incrementa la concentración de etanol en el extracto se favorecen interacciones polifenol – solvente antes que las interacciones polifenol – resina, consecuentemente, cuanto mayor sea el contenido de etanol en los extractos crudos, menor será el contenido de polifenoles en los extractos purificados. Por otro lado, el uso de glicerol mostro una menor perdida de polifenoles con respecto al uso de etanol (Tabla 11). Probablemente, a diferencia la estructura química de la superficie de la resina (grupos aromáticos) favorece más las interacciones con los polifenoles, mientras que las interacciones glicerol – solvente son debilitadas, consecuentemente una mayor proporción de polifenoles es recuperada.

Tabla 11. Contenido de polifenoles de los extractos purificados

Descripción		**ELP (50 °C) - PR**		**ELP (70 °C) - PR**	
		CPT (mg AGE/gss)		CPT (mg AGE/gss)	
		Promedio	SD	Promedio	SD
Etanol (%)	0	$4{,}39^{A,a}$	±0,13	$6{,}32^{A,b}$	±0,14
	15	$5{,}63^{B,a}$	±0,21	$8{,}68^{C,b}$	±0,48
	30	$8{,}72^{D,a}$	±0,45	$11{,}79^{D,b}$	±0,09
Glicerol (%)	0	$4{,}63^{A,a}$	±0,08	$5{,}79^{A,b}$	±0,12
	15	$7{,}59^{C,a}$	±0,09	$7{,}35^{B,a}$	±0,18
	30	$8{,}37^{D,a}$	±0,11	$8{,}82^{C,b}$	±0,23

Contenido de polifenoles totales (CPT) se expresó como mg de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0{,}05$). Las letras minúsculas indican diferencias entre columnas mientras que las letras mayúsculas indican diferencias entre filas.

1.2.2. Capacidad antioxidante en los extractos purificados

Similar al comportamiento de polifenoles, la capacidad antioxidante medida por DPPH y ORAC fueron afectados debido a pérdidas durante el proceso de purificación. Por ejemplo, cuando etanol fue usado como solvente en extracción la recuperación de polifenoles después de la purificación con resinas incremento en 15 y 28 % los valores de DPPH respectivamente (*p valor < 0,05*) (Tabla 12). Mientras, cuando concentraciones de glicerol al 15 y 30 % fueron usados los promedios de

DPPH incrementaron en 16 y 24 % respectivamente (*p valor < 0,05*) (Tabla 12). El valor de DPPH relaciona la cantidad de solvente necesario para inhibir el radical (DPPH) presente en la solución. Por ello, cuanto más alto es el valor DPPH menor es la capacidad antioxidante del extracto purificado.

Tabla 12. Caracterización de capacidad antioxidante presente en los extractos de hojas de olivo

Descripción		**ELP (50 °C) - PR**		**ELP (70 °C) - PR**	
		DPPH IC_{50} (mg/mL)	ORAC (µmol ET/gss)	DPPH IC_{50} (mg/mL)	ORAC (µmol ET/gss)
		Promedio SD	Promedio SD	Promedio SD	Promedio SD
Etanol (%)	0	$33,86^{E,a}$ ±0,55	$180,06^{A,a}$ ±11,2	$22,99^{D,b}$ ±0,18	$392,73^{A,b}$ ±21,3
	15	$14,52^{B,a}$ ±0,23	$412,43^{C,a}$ ±19,3	$11,14^{B,b}$ ±0,09	$565,37^{C,b}$ ±28,4
	30	$8,10^{A,a}$ ±0,21	$527,17^{D,a}$ ±22,4	$7,34^{A,b}$ ±0,11	$913,27^{E,b}$ ±33,2
Glicerol (%)	0	$31,62^{D,a}$ ±0,67	$329,18^{B,a}$ ±12,8	$29,24^{E,b}$ ±0,32	$385,79^{A,b}$ ±17,9
	15	$20,62^{C,a}$ ±0,11	$422,16^{C,a}$ ±37,6	$18,04^{D,b}$ ±0,10	$531,06^{B,a}$ ±11,8
	30	$13,05^{B,a}$ ±0,09	$597,59^{E,a}$ ±22,8	$11,27^{C,a}$ ±0,08	$515,17^{D,a}$ ±8,88

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05). Las letras minúsculas indican diferencias entre columnas mientras que las letras mayúsculas indican diferencias entre filas.

Contrario al comportamiento de DPPH, la capacidad antioxidante expresada como ORAC en todos los extractos disminuyo después de haber realizado la purificación. Por ejemplo, el uso de etanol al 15 y 30 % desfavorece en 26 y 35 % los valores ORAC de los extractos purificados respectivamente (*p valor < 0,05*) (Tabla 12). Mientras la presencia de 15 y 30 % de glicerol en los extractos redujo en 22 y 29 % la capacidad antioxidante en los extractos purificados (*p valor < 0,05*) (Tabla 12).

1.2.3. Determinación del contenido de azúcares reductores

Todos los extractos purificados estaban libres de azúcares reductores. El uso de resinas no iónicas favorece las interacciones con compuestos no polares (p. ej., polifenoles), mientras que los compuestos polares como los azúcares no son adsorbidos facilitando su eliminación (Mariotti-Celis et al., 2018; Reichardt, 1994).

1.2.4. Determinación del contenido de polifenoles específicos presentes en los extractos purificados

Si bien todos los extractos purificados estaban libres de azúcares reductores, es posible el uso de estos extractos en futuras aplicaciones nutraceúticas. No obstante, para un escalamiento es necesario identificar un proceso selectivo considerando cada familia en particular.

a. Ácidos fenólicos

Un aumento en el contenido de etanol y glicerol en los extractos (15 – 30 %) disminuyó la recuperación de ácidos fenólicos durante la RP (Tabla 13). Por ejemplo, los extractos obtenidos a 70 °C con adiciones de etanol del 15 y 30 % presentaron pérdidas del 17 % y 28 % de ácidos fenólicos respectivamente: mientras con el uso glicerol el contenido de ácidos fenólicos se redujo en 20 y 29 % después de la RP (Figura 12). La condición global de ELP-PR fue establecida con 15 % de etanol a 70 °C combinada con etanol al 80 % en purificación, esto permitió la mayor recuperación de ácidos fenólicos, siendo el ácido gálico el polifenol más abundante (Tabla 13).

Probablemente los compuestos de interés se estabilizan más por las interacciones con el solvente que por las interacciones con la superficie de la resina. Por lo tanto, cuanto mayor sea el contenido de etanol en los extractos crudos, menor será el contenido de polifenoles en los extractos purificados (Figura 12).

Tabla 13. Perfil de polifenoles de los extractos purificados

	ELP - PR					ELP - PR				
	Agua pura	(50 °C-15 %) – (80 %)		(50 °C-30 %) – (80 %)		Agua pura	(70 °C-15 %) – (80 %)		(70 °C-30 %) – (80 %)	
Ácidos fenólicos (ug/gss)		**Etanol**	**Glicerol**	**Etanol**	**Glicerol**		**Etanol**	**Glicerol**	**Etanol**	**Glicerol**
Gálico	37.3 ±2.1	37.3 ±1.7	33.6 ±3.8	54.4 ±1.9	51.6 ±2.5	41.8 ±3.5	61.3 ±1.6	57.1 ±1.5	75.5 ±4.5	67.0 ±2.5
Cafeico	ND	16.7 ±2.5	14.8 ±3.5	20.6 ±4.2	15.6 ±1.5	6.8 ±1.4	27.5 ±2.6	20.6 ±1.2	31.3 ±2.4	24.2 ±2.1
Vanilico	8.1 ±1.7	16.2 ±1.7	18.2 ±2.7	33.5 ±3.0	23.5 ±1.6	11.5 ±2.2	22.1 ±1.3	20.2 ±1.9	40.1 ±0.9	32.1 ±1.8
Σ:	**85.40**	**80.20**	**56.60**	**108.50**	**89.70**	**60.10**	**110.90**	**97.90**	**146.90**	**123.30**
Estilbenos (ug/gss)										
Resveratrol	21.3 ±4.4	36.3 ±2.4	27.7 ±1.9	43.8 ±2.5	37.6 ±1.8	20.8 ±2.1	43.9 ±4.2	38.6 ±1.9	63.3 ±4.2	35.4 ±3.3
Flavanoles (ug/gss)										
Catequina	63.8 ±5.1	92.9 ±3.6	79.8 ±4.6	102.3 ±2.8	86.4 ±6.2	96.2 ±5.8	133.1 ±3.9	110.5 ±2.6	93.1 ±3.7	113.6 ±2.9
Epicatequina	57.7 ±3.2	70.5 ±1.8	62.4 ±1.1	78.9 ±2.0	64.4 ±4.8	82.7 ±2.6	109.6 ±3.3	89.4 ±2.6	84.2 ±3.8	82.7 ±3.5
Σ:	**121.50**	**162.40**	**142.20**	**180.20**	**150.80**	**178.90**	**242.70**	**199.90**	**177.30**	**195.30**
Flavonoles (ug/gss)										
Quercitina	37.2 ±2.1	70.7 ±3.6	106.9 ±1.9	61.2 ±7.8	111.3 ±1.4	57.3 ±2.8	116.8 ±2.1	139.6 ±1.2	106.9 ±1.9	175.3 ±4.2
Kaempferol	17.3 ±1.3	58.8 ±2.3	104.1 ±1.2	54.7 ±2.3	140.6 ±2.4	50.9 ±2.7	107.6 ±3.2	141.5 ±2.7	91.8 ±4.8	178.6 ±3.2
Σ:	**54.50**	**129.50**	**211.00**	**115.90**	**251.90**	**107.20**	**213.40**	**251.10**	**198.70**	**253.90**
Secoiridoides (ug/gss)										
Oleuropeina	371.1 ±6.5	426.9 ±13.2	371.6 ±5.8	416.8 ±6.4	404.8 ±7.7	503.3 ±14.8	779.3 ±15.5	662.1 ±15.4	867.1 ±15.9	642.1 ±20.8

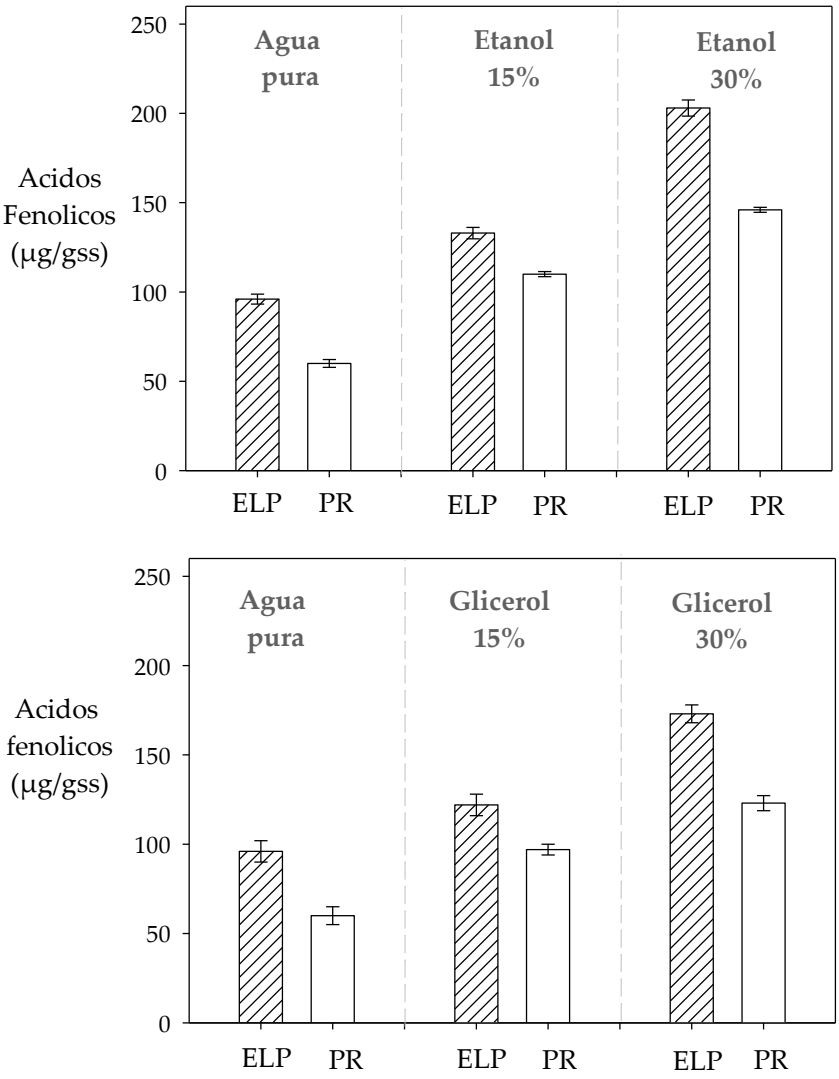


Figura 12. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de ácidos fenólicos

b. Estilbenos

Durante la PR, la recuperación de estilbenos expresado como resveratrol disminuyó cuando la concentración de etanol y glicerol aumentó en los extractos crudos (Tabla 13). Por ejemplo, los extractos obtenidos a 70 °C con concentraciones de etanol del 15 y 30 % presentaron perdidas de estilbenos de 18 y 32 % respectivamente; mientras que las concentraciones de glicerol de 15 y 30 % presentes en disminuyeron un 19 y 35 % el contenido de resveratrol después del proceso de purificación (Figura 13). Al igual que los ácidos fenólicos,

los estilbenos probablemente se estabilizan más por las interacciones con el solvente que por las interacciones con la superficie de la resina, lo que explicaría el comportamiento observado.

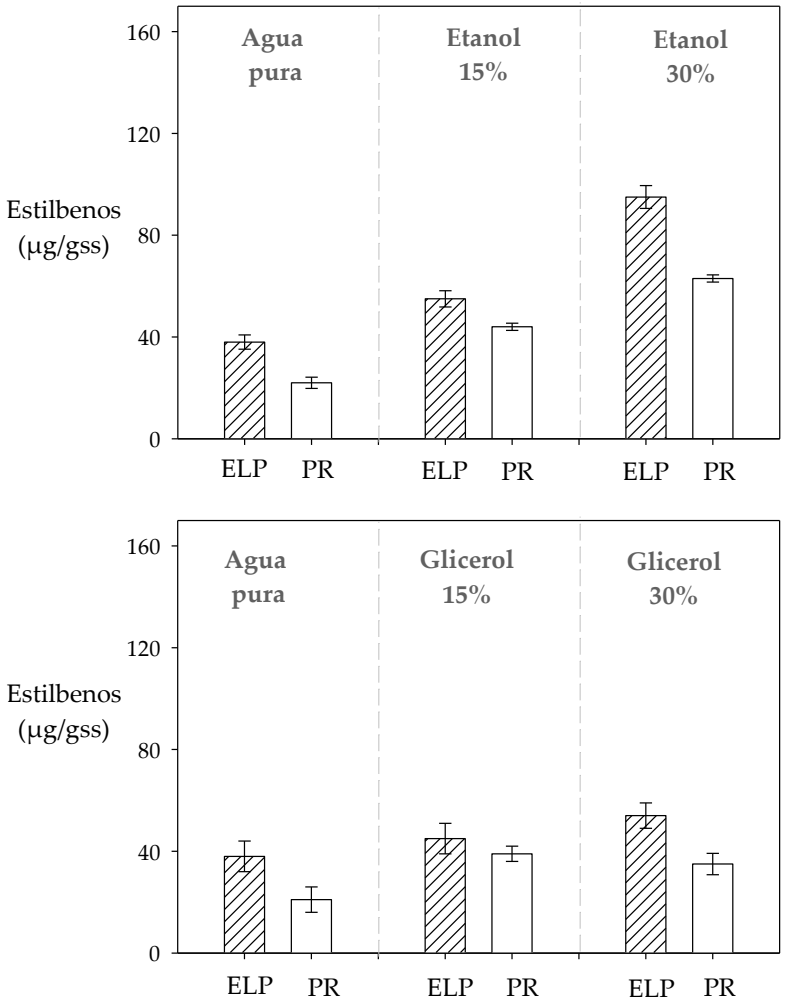


Figura 13. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de estilbenos.

c. Flavanoles

Durante la PR, la adsorción de flavanoles se vio favorecida con bajas concentraciones de etanol y glicerol (Tabla 13). Por ejemplo, en esta etapa, los extractos obtenidos a 70 °C con concentraciones de etanol de 15 y 30 %, presentaron recuperaciones de flavanoles del 84 y 77% respectivamente; mientras que con glicerol al 15 y 30 % la recuperación alcanzo el 80 y 70 % respectivamente (Figura 14). La mejor condición

global (ELP-PR) fue establecida con 15 % de etanol a 70 °C combinado con 80 % de etanol en purificación. Esto permitió una mayor recuperación de catequina comparado con epicatequina (Tabla 13). Al respecto, Mariotti-Celis et al. (2018) observaron un comportamiento similar durante la PR, donde el uso de bajas concentraciones de etanol en extracción (15 %) favorece una mayor recuperación de polifenoles durante la purificación. La resina HP-20 es una resina adsorbente con grupos aromáticos en la superficie. Probablemente la estabilidad entre los anillos aromáticos de catequina y los anillos aromáticos en la superficie de la resina, son más estables que las interacciones entre la mezcla de etanol/agua y el compuesto de interés después de un determinado umbral de polaridad.

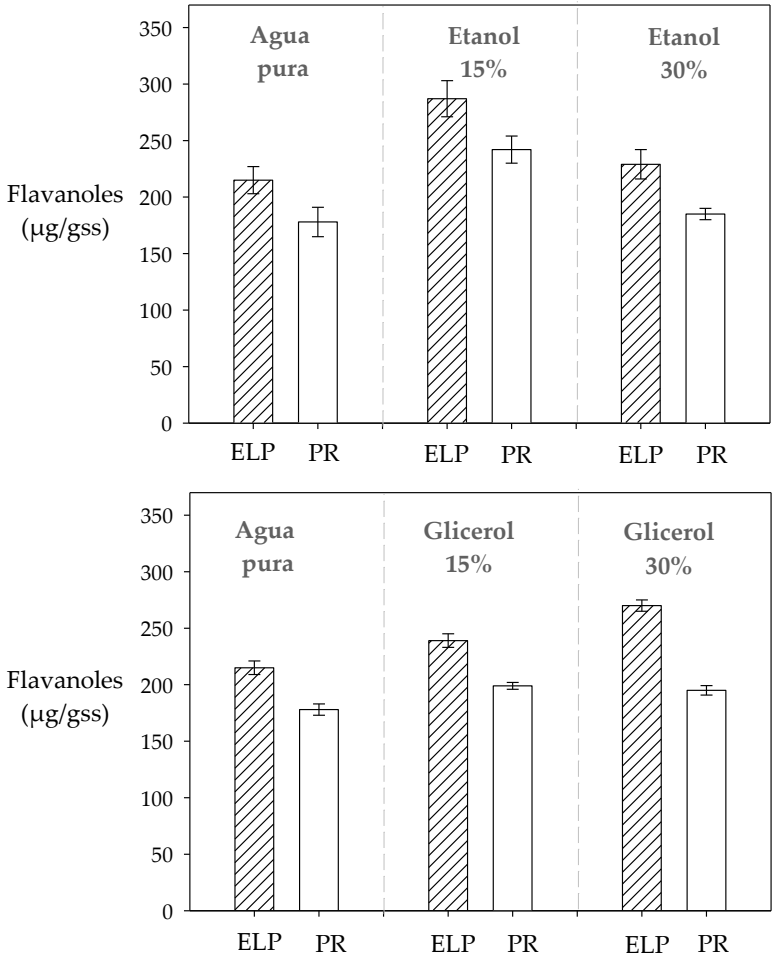


Figura 14. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de estilbenos.

d. Flavonoles

La recuperación de flavonoles después de la PR fue afectado por las altas concentraciones de etanol y glicerol (Tabla 13). Por ejemplo, después de PR, los extractos obtenidos a 70 °C con concentraciones de etanol de 15 y 30 % presentaron recuperaciones de flavonoles de 83 y 72 % respectivamente; mientras el uso de glicerol permitió recuperar un 71 y 62 % (Figura 15). Entonces, los altos niveles de etanol y glicerol en los extractos crudos reducen la relativa estabilidad de los flavonoles en el solvente, favoreciendo su adsorción en la superficie de la resina.

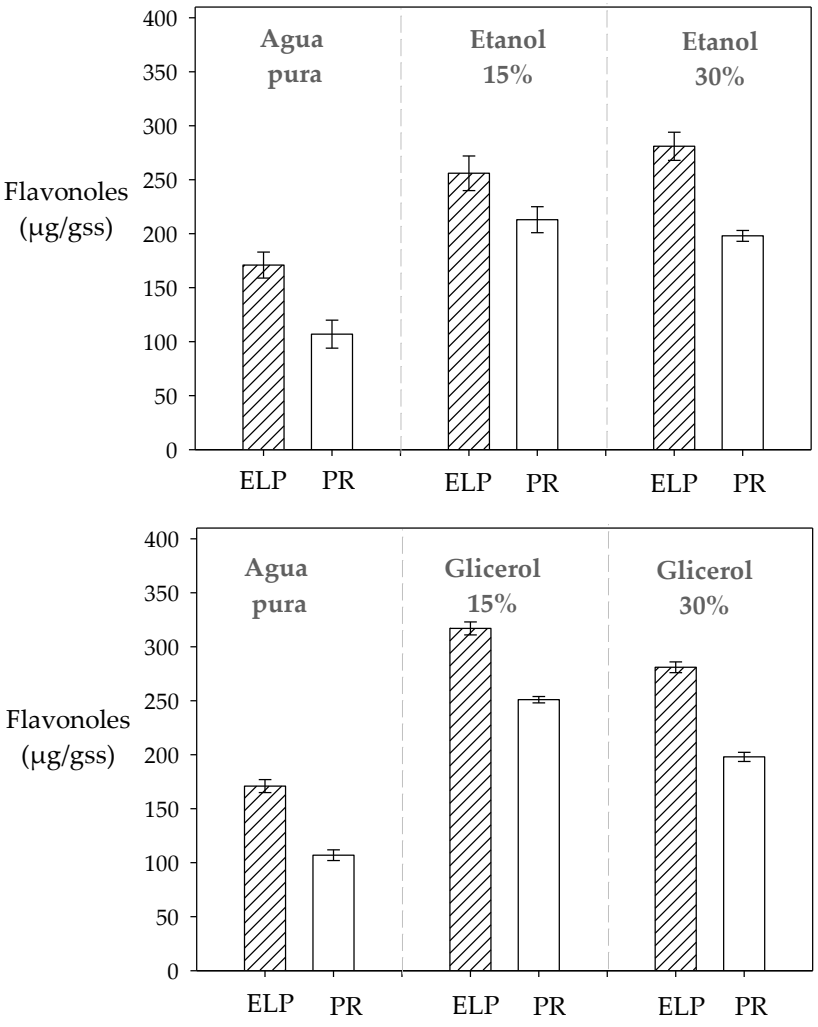


Figura 15. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de flavonoles.

e. Secoiridoides (oleuropeina)

La oleuropeina es el compuesto más abundante en las hojas de olivo. Cuando el contenido de glicerol y etanol incrementa en los extractos, la purificación se ve desfavorecida (Figura 16). Por ejemplo, después de PR, los extractos obtenidos a 70 °C con concentraciones de etanol de 15 y 30 % presentaron recuperaciones de oleuropeina de 81 y 66 % respectivamente; mientras el uso de glicerol permitió recuperar un 79 y 67 % (Figura 16). La mejor condición global (ELP-PR) fue establecida con 15 % de etanol a 70 °C combinado con 80 % de etanol en purificación.

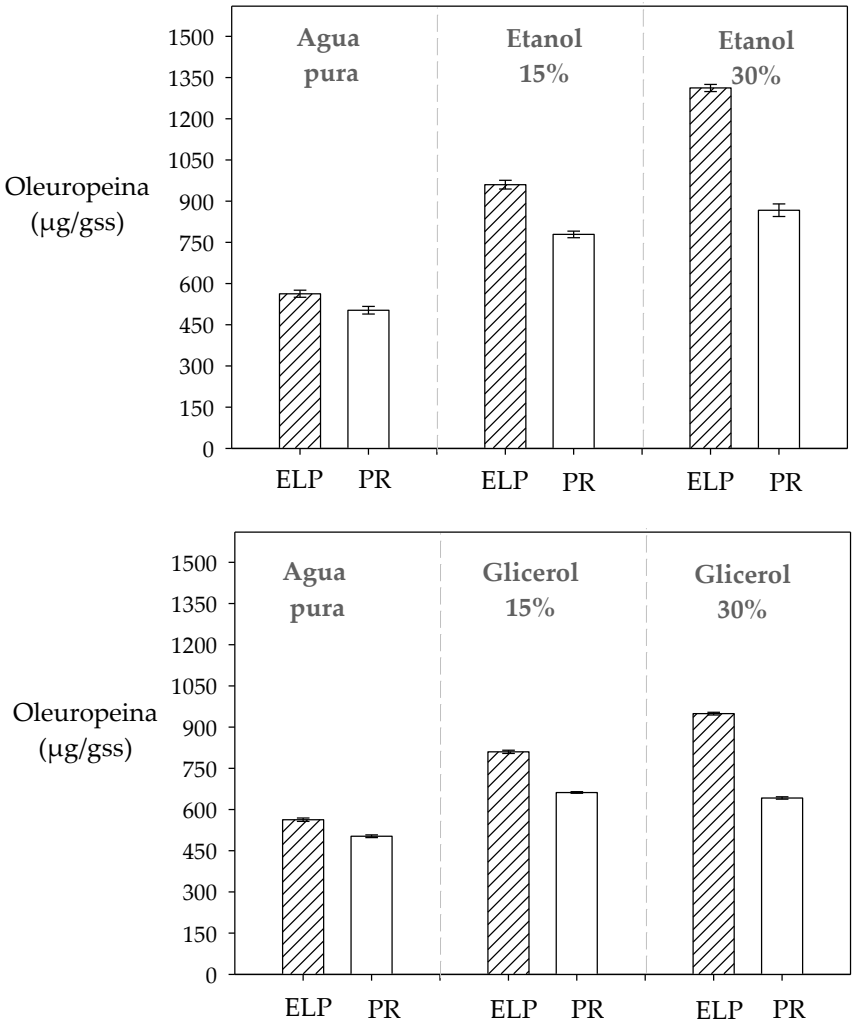


Figura 16. Impacto del proceso integrado ELP – PR sobre el contenido de flavonoles.

V. CONCLUSIONES

- Durante la ELP, el uso de etanol al 30% fue más eficiente para la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante (15,29 mg EAG/gss; IC50: 5,49 mg/mL; 1259,64 µmol ET/gss) en comparación con otros solventes (glicerol y agua). Sin embargo, cuando el proceso combinado ELP-PR fue usado los extractos que fueron purificados redujeron su capacidad antioxidante en ~30 %.
- Bajo condiciones subcríticas de ELP, la adición de altas concentraciones de etanol (30%) permitieron obtener extractos con altas concentraciones de polifenoles (15,29 mg EAG/gss) y perfil con diferentes familias de polifenoles tales como ácidos fenólicos (203,7 µg/gss), flavanoles (229,7 µg/gss), flavonoles (281,1 µg/gss), estilbenos (94,4 µg/gss) y secoiridoides (1312,5 µg/gss). Interesantemente, cuando el proceso combinado ELP-PR fue realizado, los extractos purificados redujeron su contenido de polifenoles en 30%; mientras que la concentración de familias especificas fue reducidas entre un 20 y 30%.
- Bajo condiciones subcríticas, el incremento de etanol 0 a 30% permitió reducir en 34 y 40 % el contenido de glucosa y fructosa respectivamente. Sin embargo, la presencia de los azúcares fue eliminado durante el proceso de purificación debido a que las resinas son componentes no polares y no pueden interactuar con los azúcares.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso de solventes alternativos ecológicos y de bajo costo como el glicerol y los solventes eutécticos profundos (DES) (glicerol, etanol e isopropanol combinados con cloruro de colina, ácido cítrico, ácido láctico) para mejorar la recuperación de familias específicas de polifenoles en un proceso integrado HPLE-RP.

- Aplicar balances de masa para definir el destino de los polifenoles no recuperados y, por lo tanto, agregar otras tecnologías verdes, como la tecnología de membranas, para minimizar las pérdidas de polifenoles en el proceso HPLE-RP.

- Evaluar las propiedades texturales y la dinámica de adsorción/desorción de diferentes resinas macroporosas para mejorar la recuperación de polifenoles durante la purificación.

VII. REFERENCIAS

Åkerlöf, G. (1932). Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures. *Journal of the American Chemical Society*, *54*(11), 4125–4139. https://doi.org/10.1021/ja01350a001

Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, *149*, 151–158. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.086

Altiok, E., Bayçin, D., Bayraktar, O., & Ülkü, S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (Olea europaea L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, *62*(2), 342–348. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.022

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

Arsuaga, J. M., Aguado, J., Arencibia, A., & López-Gutiérrez, M. S. (2014). Aqueous mercury adsorption in a fixed bed column of thiol functionalized mesoporous silica. *Adsorption*, *20*(2–3), 311–319. https://doi.org/10.1007/s10450-013-9586-4

Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from Ilex guayusa Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, *6*(1), 0–7. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043

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

Ben Salah, M., & Abdelmelek, H. (2012). Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal Chemistry*, *2*(5), 107–111. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000124

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, Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.*, *28*, 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Carr, A. G., Mammucari, R., & Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, *172*(1), 1–17. https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.007

Cheigh, C. I., Yoo, S. Y., Ko, M. J., Chang, P. S., & Chung, M. S. (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

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

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

Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, *5*(September), 1–9. https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087

Davalos, A., Gómez, C., & Begoña, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC − Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 48–54.

de Souza, C. G., Rodrigues, T. H. S., e Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. V., & de Brito, E. S. (2018). Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(4), 1362–1368. https://doi.org/10.1002/jsfa.8601

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

Dobroslavić, E., Elez Garofulić, I., Šeparović, J., Zorić, Z., Pedisić, S., & Dragović-Uzelac,

V. (2022). Pressurized Liquid Extraction as a Novel Technique for the Isolation of Laurus nobilis L. Leaf Polyphenols. *Molecules*, *27*(16). https://doi.org/10.3390/molecules27165099

Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. Ben, Perego, P., & Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, *94*, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.001

FAO. (2019). Agricultural Data. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultive Olive from Peru. *Disponível: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acessado em 29/01/2019*.

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

Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., & Gekas, V. (2013). A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties*, *16*(2), 382–396. https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750

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*, *24*, 1–19. https://doi.org/10.3390/molecules24010165

García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., & García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2 SPEC. ISS.), 44–50. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.054

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

Grand View Research. (2019). *Polyphenols Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Grape Seed, Green Tea, Cocoa), By Application (Beverages, Food, Feed, Dietary Supplements, Cosmetics), And Segment Forecasts, 2019 - 2025*. Grand View Research. https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/polyphenols-market-analysis

Gui, J., Ding, H., Wang, Y., Gao, Y., Han, X., Liu, S., & Liu, D. (2016). Subcritical ethanol extraction of flavonoids from Moringa oleifera leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, *218*, 152–158.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.058

Gullón, B., Gullón, P., Eibes, G., Cara, C., De Torres, A., López-Linares, J. C., Ruiz, E., & Castro, E. (2018). Valorisation of olive agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds. *Science of the Total Environment*, *645*, 533–542. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.155

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., Mariotti-Celis, M. S., & Perez-Correa, J. R. (2017). Polyphenols of Carménère Grapes. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, *14*(3), 176–186. https://doi.org/10.2174/1570193X14666170206151439

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). https://doi.org/10.3390/molecules24173145

Jampani, C., Naik, A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2014). Purification of anthocyanins from jamun (Syzygium cumini L.) employing adsorption. *Separation and Purification Technology*, *125*, 170–178. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.047

Jessop, P. G. (2011). Searching for green solvents. *Green Chemistry*, *13*(6), 1391–1398. https://doi.org/10.1039/c0gc00797h

Jessop, P. G., Jessop, D. A., Fu, D., & Phan, L. (2012). Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chemistry*, *14*(5), 1245–1259. https://doi.org/10.1039/c2gc16670d

Jouyban, A., & Soltanpour, S. (2010). Prediction of dielectric constants of binary solvents at various temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, *55*(9), 2951–2963. https://doi.org/10.1021/je1000632

Karacabey, E., & Mazza, G. (2008). Optimization of solid-liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (Vitis vinifera). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6318–6325. https://doi.org/10.1021/jf800687b

Katritzky, A. R., Fara, D. C., Yang, H., Tämm, K., Tamm, T., & Karelson, M. (2004). Quantitative Measures of Solvent Polarity. *Chemical Reviews*, *104*(1), 175–198. https://doi.org/10.1021/cr020750m

Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigacion Agraria*, *35*(2), 77–90. https://doi.org/10.4067/S0718-

16202008000200001

Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., & Chung, M. S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*, *102*(4), 327–333. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.008

Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *26*(5), 396–412. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.03.004

Kwak, J. H., Seo, J. M., Kim, N. H., Arasu, M. V., Kim, S., Yoon, M. K., & Kim, S. J. (2017). Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (Allium cepa L.) varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(6), 1387–1391. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.014

Li, F., Chen, G., Zhang, B., & Fu, X. (2017). Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents. *Food Research International*, *100*(August), 19–30. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.035

Li, H., Liu, Y., Yi, Y., miao, Q., Liu, S., Zhao, F., Cong, W., Wang, C., & Xia, C. (2017). Purification of quercetin-3-O-sophoroside and isoquercitrin from Poacynum hendersonii leaves using macroporous resins followed by Sephadex LH-20 column chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1048*, 56–63. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.041

Maldonado, I., Vega Quispe, A. P., Merma Chacca, D., & Zirena Vilca, F. (2022). Optimization of the elimination of antibiotics by Lemna gibba and Azolla filiculoides using response surface methodology (RSM). *Frontiers in Environmental Science*, *10*(August), 1–13. https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.940971

Marcus, Y. (2018). Extraction by Subcritical and Supercritical Water, Methanol, Ethanol and Their Mixtures. *Separations*, *5*(1), 4. https://doi.org/10.3390/separations5010004

Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*.

Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Pedreschi, F., Iglesias-Rebolledo, N., & Pérez-Correa, J. R. (2018b). 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). https://doi.org/10.1111/ijfs.13684

Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Vargas-González, M.,

Pedreschi, F., & Pérez-Correa, J. R. (2018). The antioxidant and safety properties of spent coffee ground extracts impacted by the combined hot pressurized liquid extraction–resin purification process. *Molecules*, *23*(1). https://doi.org/10.3390/molecules23010021

Mauromoustakos, A., Monrad, J. K., Howard, L. R., Srinivas, K., & King, J. W. (2009). Subcritical Solvent Extraction of Procyanidins from Dried Red Grape Pomace † . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4014–4021. https://doi.org/10.1021/jf9028283

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

MINAGRI. (n.d.). *CULTIVO DE OLIVO (Olea europaea)*. 2020. https://www.agrorural.gob.pe/wp-content/uploads/transparencia/dab/material/ficha tecnica olivo.pdf

Mlcek, J., Jurikova, T., Skrovankova, S., & Sochor, J. (2016). Quercetin and its anti-allergic immune response. *Molecules*, *21*(5), 1–15. https://doi.org/10.3390/molecules21050623

Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2010). Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(5), 2862–2868. https://doi.org/10.1021/jf904087n

Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1–2), 95–111. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059

Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., & López-Solís, R. (2011). Precipitation of low molecular weight phenolic compounds of grape seeds cv. Carménère (Vitis vinifera L.) by whole saliva. *European Food Research and Technology*, *232*(1), 113–121. https://doi.org/10.1007/s00217-010-1365-9

Omar, S. H. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *18*(3), 111–121. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2010.05.005

Otero-Pareja, M. J., Casas, L., Fernández-Ponce, M. T., Mantell, C., & De La Ossa, E. J. M. (2015). Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*, *20*(6), 9686–9702. https://doi.org/10.3390/molecules20069686

Ouazzane, H., Laajine, F., El Yamani, M., El Hilaly, J., Rharrabti, Y., Amarouch, M. Y., & Mazouzi, D. (2017). Olive mill solid waste characterization and recycling

opportunities: A review. *Journal of Materials and Environmental Science*, *8*(8), 2632–2650.

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

Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, *43*(10), 2341–2348. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.036

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

Plaza, M., & Turner, C. (2015b). 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

Rajapaksha, S., & Shimizu, N. (2022). Pilot-scale extraction of polyphenols from spent black tea by semi-continuous subcritical solvent extraction. *Food Chemistry: X*, *13*(November 2021), 100200. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100200

Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, *94*(8), 2319–2358.

Rivera-Tovar, P. R., Torres, M. D., Camilo, C., Mariotti-Celis, M. S., Domínguez, H., & Pérez-Correa, J. R. (2021). Multi-response optimal hot pressurized liquid recovery of extractable polyphenols from leaves of maqui (Aristotelia chilensis [Mol.] Stuntz). *Food Chemistry*, *357*(October 2020). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129729

Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., & Fernández-Bolaños, J. (2008). Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5261–5269. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.027

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

Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., & Juneja, L. R. (2010). ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *61*(2), 109–124.

https://doi.org/10.3109/09637480903292601

Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2010). Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (Myrciaria cauliflora) skins: Yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, *101*(1), 23–31. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.005

Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, *108*(3), 444–452. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., & Kakuda, Y. (2004). Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food*, *6*(4), 291–299. https://doi.org/10.1089/109662003772519831

SIGMA ALDRICH. (2020). *Catalog Products*. http://www.sigmaaldrich.com/

Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158. https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5

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

Soural, I., Vrchotová, N., Tříska, J., Balík, J., Horník, Š., Cuřínová, P., & Sýkora, J. (2015). Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of Vitis vinifera L. *Molecules*, *20*(4), 6093–6112. https://doi.org/10.3390/molecules20046093

Sun, W., Frost, B., & Liu, J. (2017). Oleuropein, unexpected benefits! *Oncotarget*, *8*(11), 17409. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6119.Oncotarget

Tahir, A. S. I. T. M. (2015). Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass : A review of recent work. *Global J. Environ.Sci.Manage.*, *1*(3), 255–264. https://doi.org/10.7508/gjesm.2015.03.008

Tangkhavanich, B., Kobayashi, T., & Adachi, S. (2014). Effects of repeated treatment on the properties of rice stem extract using subcritical water, ethanol, and their mixture. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *20*(4), 2610–2614. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.10.048

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 669–675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003

Topuz, S., & Bayram, M. (2022). Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (Olea europaea L.): Antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein

and oleuropein extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(6), 0–2. https://doi.org/10.1111/jfpp.15697

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

Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorised thyme (Thymus vulgaris). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the press. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 10920–10929. https://doi.org/doi.org/10.1021/jf3027759

Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2015). Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(5), 2761–2769. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1295-9

Wijngaard, H., & Brunton, N. (2009). The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(22), 10625–10631. https://doi.org/10.1021/jf902498y

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.

Xu, Z., Hao, N., Li, L., Zhang, Y., Yu, L., Jiang, L., & Sui, X. (2019). Valorization of Soy Whey Wastewater: How Epigallocatechin-3-gallate Regulates Protein Precipitation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, acssuschemeng.9b03208. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03208

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. L. (2014). Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, *122*, 323–330. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.10.040

Yan, Z., Zhang, H., Dzah, C. S., Zhang, J., Diao, C., Ma, H., & Duan, Y. (2020). Subcritical water extraction, identification, antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols from lotus seedpod. *Separation and Purification Technology*, *236*(301), 116217. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116217

Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal*

of Food Science and Technology, *48*(2), 221–237. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x

Zhang, C., Zhang, J., Xin, X., Zhu, S., Niu, E., Wu, Q., Li, T., & Liu, D. (2022). Changes in Phytochemical Profiles and Biological Activity of Olive Leaves Treated by Two Drying Methods. *Frontiers in Nutrition*, *9*(April). https://doi.org/10.3389/fnut.2022.854680

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, *13*(1), 1–26. https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x

Zuin, V. G., & Ramin, L. Z. (2018). Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. *Topics in Current Chemistry*, *376*(1). https://doi.org/10.1007/s41061-017-0182-z

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.

ANEXOS

Anexo 1: Determinación de polifenoles totales.

Solvente	TRATAMIENTO, % solvente, T°, repetición	ABSORBANCIA A 765 NM			mgEAG/mL			Corregido (FD) mgEAG/mL			Concentración mgEAG/gss		
					R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Etanol	30%, 70°, 1	0.614	0.592	0.588	0.094	0.090	0.090	1.502	1.447	1.437	15.750	15.173	15.068
	30%, 70°, 2	0.612	0.595	0.579	0.094	0.091	0.088	1.497	1.455	1.415	15.697	15.252	14.832
	15%, 70°, 1	0.429	0.436	0.407	0.065	0.066	0.062	1.039	1.057	0.984	10.898	11.082	10.321
	15%, 70°, 2	0.419	0.428	0.405	0.063	0.065	0.061	1.014	1.037	0.979	10.635	10.871	10.268
	H2O, 70°, 1	0.313	0.293	0.297	0.047	0.044	0.044	0.749	0.699	0.709	7.855	7.331	7.436
	H2O, 70°, 2	0.306	0.278	0.271	0.046	0.041	0.040	0.732	0.662	0.644	7.672	6.937	6.754
	30%, 50°, 1	0.458	0.469	0.454	0.070	0.071	0.069	1.112	1.140	1.102	11.658	11.947	11.553
	30%, 50°, 2	0.467	0.434	0.434	0.071	0.066	0.066	1.135	1.052	1.052	11.894	11.029	11.029
	15%, 50°, 1	0.305	0.311	0.311	0.046	0.047	0.047	0.729	0.744	0.744	7.645	7.803	7.803
	15%, 50°, 2	0.304	0.301	0.333	0.045	0.045	0.050	0.727	0.719	0.799	7.619	7.540	8.380
	H2O, 50°, 1	0.259	0.268	0.264	0.038	0.040	0.039	0.614	0.637	0.627	6.439	6.675	6.570
	H2O, 50°, 2	0.285	0.231	0.219	0.042	0.034	0.032	0.679	0.544	0.514	7.121	5.704	5.390
Glicerol	30%, 70°, 1	0.401	0.407	0.413	0.061	0.062	0.062	0.970	0.984	0.999	10.171	10.321	10.478
	30%, 70°, 2	0.402	0.403	0.403	0.061	0.061	0.061	0.971	0.974	0.974	10.184	10.214	10.212
	15%, 70°, 1	0.280	0.363	0.364	0.042	0.055	0.055	0.667	0.874	0.877	6.990	9.167	9.193
	15%, 70°, 2	0.318	0.344	0.351	0.048	0.052	0.053	0.762	0.827	0.844	7.986	8.668	8.852
	H2O, 70°, 1	0.319	0.233	0.250	0.048	0.034	0.037	0.764	0.549	0.592	8.010	5.756	6.203
	H2O, 70°, 2	0.316	0.271	0.209	0.047	0.040	0.031	0.756	0.644	0.489	7.924	6.754	5.128
	30%, 50°, 1	0.385	0.356	0.377	0.058	0.054	0.057	0.929	0.857	0.909	9.744	8.983	9.534
	30%, 50°, 2	0.366	0.453	0.358	0.055	0.069	0.054	0.882	1.100	0.862	9.245	11.527	9.036
	15%, 50°, 1	0.333	0.401	0.333	0.050	0.061	0.050	0.799	0.969	0.799	8.380	10.164	8.380
	15%, 50°, 2	0.329	0.410	0.319	0.049	0.062	0.048	0.789	0.992	0.764	8.275	10.400	8.013
	H2O, 50°, 1	0.249	0.256	0.227	0.037	0.038	0.033	0.589	0.607	0.533	6.176	6.360	5.586
	H2O, 50°, 2	0.270	0.270	0.224	0.040	0.040	0.033	0.642	0.642	0.527	6.727	6.727	5.521

Anexo 2: Determinación de capacidad antioxidante DPPH (Etanol)

Descripción	ABSORBANCIA A 517 NM			%inhibición			**IC50 (mg/ml)**		
Condiciones	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
30%, 70°C, 1	0.098	0.058	0.058	71.077	82.882	82.882	9.0838	5.2649	6.2508
	0.147	0.145	0.133	58.682	57.206	60.748			
	0.241	0.1235	0.224	28.874	63.551	33.891			
30%, 70°C, 2	0.058	0.059	0.059	82.882	82.587	82.587	7.6866	7.2917	5.9566
	0.145	0.142	0.126	57.206	58.091	62.814			
	0.235	0.231	0.226	30.644	31.825	33.301			
15%, 70°C, 1	0.06	0.061	0.061	82.292	81.997	81.997	9.0385	8.4794	3.4866
	0.133	0.1229	0.128	60.748	63.728	62.223			
	0.27	0.268	0.196	20.315	20.905	42.154			
15%, 70°C, 2	0.061	0.062	0.061	81.997	81.702	81.997	12.3521	8.3595	9.4836
	0.221	0.1232	0.14	34.776	63.640	58.682			
	0.267	0.265	0.272	21.200	21.790	19.725			
H2O, 70°C, 1	0.161	0.158	0.154	52.484	53.369	54.550	22.7054	22.2463	21.7745
	0.291	0.286	0.287	14.117	15.593	15.298			
	0.309	0.309	0.307	8.805	8.805	9.395			
H2O, 70°C, 2	0.168	0.16	0.171	50.418	52.779	49.533	23.7416	22.5135	24.0702
	0.291	0.286	0.281	14.117	15.593	17.068			
	0.301	0.306	0.302	11.166	9.690	10.871			
30%, 50°C, 1	0.057	0.058	0.058	83.178	82.882	82.882	7.7483	4.3509	4.9998
	0.120	0.178	0.193	64.496	47.467	43.040			
	0.259	0.162	0.156	23.561	52.189	53.960			
30%, 50°C, 2	0.058	0.057	0.058	82.882	83.178	82.882	9.0746	9.3401	9.3237
	0.173	0.169	0.169	49.828	50.123	50.123			
	0.237	0.244	0.243	30.054	27.988	28.283			
15%, 50°C, 1	0.097	0.087	0.078	71.372	74.324	76.980	14.9236	14.4758	13.8310
	0.231	0.238	0.232	31.825	29.759	31.530			
	0.285	0.278	0.279	17.364	17.954	17.659			
15%, 50°C, 2	0.083	0.071	0.077	75.504	79.046	77.275	10.0443	6.2137	10.2053
	0.124	0.238	0.134	63.227	29.759	60.453			
	0.282	0.128	0.281	16.773	62.223	17.068			
H2O, 50°C, 1	0.187	0.172	0.176	44.811	49.238	48.057	26.9618	24.2511	24.9218
	0.29	0.286	0.286	14.412	15.593	15.593			
	0.305	0.305	0.304	9.985	9.985	10.280			
H2O, 50°C, 2	0.183	0.183	0.184	45.991	45.991	45.696	26.1328	26.2704	10.3090
	0.297	0.292	0.196	12.346	13.822	42.154			
	0.309	0.302	0.1309	8.805	10.871	61.367			

Anexo 3: Determinación de capacidad antioxidante DPPH (glicerol)

Descripción	ABSORBANCIA A 517 NM			%inhibición			**IC50 (mg/ml)**		
Condiciones	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
30%, 70°C, 1	0.098	0.103	0.083	70.482	68.976	75.000	10.875	10.983	9.582
	0.111	0.147	0.135	66.566	55.723	59.337			
	0.288	0.289	0.295	13.253	12.952	11.145			
30%, 70°C, 2	0.1	0.105	0.103	69.880	68.373	68.976	7.8243	8.724	9.8058
	0.144	0.143	0.144	56.627	56.928	56.627			
	0.293	0.284	0.288	11.747	14.458	13.253			
15%, 70°C, 1	0.109	0.104	0.105	67.169	68.675	68.373	17.092	16.667	16.752
	0.262	0.258	0.259	21.084	22.289	21.988			
	0.282	0.285	0.284	15.060	14.157	14.458			
15%, 70°C, 2	0.109	0.115	0.117	67.169	65.361	64.759	14.204	12.865	17.962
	0.167	0.1269	0.266	49.699	61.777	19.880			
	0.288	0.289	0.291	13.253	12.952	12.349			
H2O, 70°C, 1	0.159	0.152	0.162	52.108	54.217	51.205	22.801	21.927	23.264
	0.281	0.282	0.284	15.361	15.060	14.458			
	0.305	0.304	0.304	8.133	8.434	8.434			
H2O, 70°C, 2	0.2153	0.1852	0.153	35.151	44.217	53.916	34.467	27.512	23.251
	0.3275	0.3278	0.374	1.355	1.265	-12.651			
	0.303	0.297	0.3	8.735	10.542	9.639			
30%, 50°C, 1	0.102	0.095	0.098	69.277	71.386	70.482	10.782	11.630	12.110
	0.244	0.237	0.238	26.506	28.614	28.313			
	0.287	0.285	0.279	13.554	14.157	15.964			
30%, 50°C, 2	0.102	0.093	0.102	69.277	71.988	69.277	11.726	11.173	12.923
	0.227	0.222	0.235	31.627	33.133	29.217			
	0.287	0.279	0.285	13.554	15.964	14.157			
15%, 50°C, 1	0.131	0.126	0.12	60.542	62.048	63.855	19.350	18.742	18.415
	0.27	0.268	0.275	18.675	19.277	17.169			
	0.294	0.286	0.29	11.446	13.855	12.651			
15%, 50°C, 2	0.116	0.1135	0.126	65.060	65.813	62.048	18.399	18.041	19.267
	0.281	0.276	0.283	15.361	16.867	14.759			
	0.306	0.301	0.306	7.831	9.337	7.831			
H2O, 50°C, 1	0.178	0.177	0.173	46.386	46.687	47.892	25.567	25.445	26.830
	0.304	0.303	0.305	8.434	8.735	8.133			
	0.324	0.319	0.318	2.410	3.916	4.217			
H2O, 50°C, 2	0.153	0.155	0.15	53.916	53.313	54.819	28.354	29.530	32.643
	0.38	0.293	0.3293	14.232	11.747	0.813			
	0.438	0.315	0.32	11.625	5.120	3.614			

Anexo 4: Determinación de capacidad antioxidante ORAC (etanol)

Condiciones										Promedio µMeq trolox/gr
	R1	R2	R3	µmoles eq trolox/L (uM)			µmoles eq trolox/gr de materia seca			
30%, 70°C, 1	32.570	30.830	33.000	130280.00	123320.00	132000.00	1,366.25	1,293.265	1,384.293	1,347.938
30%, 70°C, 2	26.380	26.990	30.400	105520.00	107960.00	121600.00	1,106.60	1,132.195	1,275.240	1,171.347
15%, 70°C, 1	20.060	20.470	21.420	80240.00	81880.00	85680.00	841.53	858.733	898.586	866.284
15%, 70°C, 2	21.460	19.440	21.420	85840.00	77760.00	85680.00	900.21	815.483	898.541	871.414
H2O, 70%, 1	27.850	28.470	29.650	55700.00	56940.00	59300.00	584.14	597.152	621.902	601.067
H2O, 70%, 2	26.430	25.920	26.700	52860.00	51840.00	53400.00	554.36	543.666	560.026	552.685
30%, 50°C, 1	39.360	36.380	39.320	78720.00	72760.00	78640.00	825.54	763.039	824.703	804.428
30%, 50°C, 2	38.260	37.430	39.970	76520.00	74860.00	79940.00	802.46	785.054	838.328	808.615
15%, 50°C, 1	29.620	32.110	29.540	59240.00	64220.00	59080.00	621.27	673.500	619.595	638.122
15%, 50°C, 2	31.010	30.030	29.450	62020.00	60060.00	58900.00	650.41	629.860	617.695	632.656
H2O, 50°C, 1	24.600	25.430	24.790	24600.00	25430.00	24790.00	257.99	266.697	259.985	261.558
H2O, 50°C, 2	22.490	21.180	21.760	22490.00	21180.00	21760.00	235.85	222.116	228.199	228.723

Anexo 5: Determinación de capacidad antioxidante ORAC (glicerol)

MUESTRAS										Promedio µMeq trolox/gr
	R	R	R	µmoles eq trolox/L (uM)			µmoles eq trolox/gr de materia seca			
30%, 70°C, 1	33.670	33.600	33.420	67340.00	67200.00	66840.00	706.213	704.745	700.970	703.976
30%, 70°C, 2	36.510	36.420	35.630	73020.00	72840.00	71260.00	765.789	763.901	747.331	759.007
15%, 70°C, 1	33.710	34.930	35.560	67420.00	69860.00	71120.00	707.059	732.649	745.863	728.524
15%, 70°C, 2	30.760	31.120	29.220	61520.00	62240.00	58440.00	645.171	652.722	612.870	636.921
H2O, 70%, 1	21.640	24.730	21.440	43280.00	49460.00	42880.00	453.871	518.680	449.677	474.076
H2O, 70%, 2	21.940	20.490	21.480	43880.00	40980.00	42960.00	460.186	429.773	450.538	446.832
30%, 50°C, 1	32.360	31.380	31.320	64720.00	62760.00	62640.00	678.743	658.188	656.930	664.620
30%, 50°C, 2	36.260	34.430	35.970	72520.00	68860.00	71940.00	760.545	722.161	754.462	745.723
15%, 50°C, 1	29.620	29.540	24.750	59240.00	59080.00	49500.00	621.279	619.601	519.131	586.670
15%, 50°C, 2	25.790	28.310	25.350	51580.00	56620.00	50700.00	540.950	593.808	531.721	555.493
H2O, 50°C, 1	15.430	17.100	16.380	30860.00	34200.00	32760.00	323.628	358.654	343.553	341.945
H2O, 50°C, 2	18.770	19.800	16.400	37540.00	39600.00	32800.00	393.681	415.284	343.972	384.312

Anexo 6: Determinación de azúcares reductores

Descripción			Condiciones	peso g	R1	R2	R1	R2
					mg/L	mg/L	mg AE/gss	mg AE/gss
EXTRACTOS CRUDOS	Etanol	Fructuosa	H2O, 50°	10.0023	994.56	1134.56	10.43	11.90
			15%, 50°	10.0023	846.59	889.87	8.88	9.33
			30%, 50°	10.0026	794.56	734.56	8.33	7.70
			H2O, 70°	10.0024	1314.66	1222.18	13.79	12.82
			15%, 70°	10.0024	1085.55	1115.55	11.38	11.70
			30%, 70°	10.0025	817.11	915.72	8.57	9.60
	Glicerol		H2O, 70°	10.0023	999.60	1023.23	10.48	10.73
			15%, 70°	10.0024	638.85	858.96	6.70	9.01
			30%, 70°	10.0024	546.78	611.77	5.73	6.42
			H2O, 50°	10.0027	1229.11	1325.33	12.89	13.90
			15%, 50°	10.0022	606.67	715.22	6.36	7.50
			30%, 50°	10.0023	323.35	405.33	3.39	4.25
EXTRACTOS CRUDOS	Etanol	Glucosa	H2O, 70°	10.0023	1267.99	928.55	13.30	9.74
			15%, 70°	10.0023	856.44	934.22	8.98	9.80
			30%, 70°	10.0026	714.91	712.74	7.50	7.47
			H2O, 50°	10.0024	745.55	1044.77	7.82	10.96
			15%, 50°	10.0024	712.33	918.54	7.47	9.63
			30%, 50°	10.0025	546.89	632.40	5.74	6.63
	Glicerol		H2O, 70°	10.0023	992.65	1292.56	10.41	13.56
			15%, 70°	10.0024	516.77	510.16	5.42	5.35
			30%, 70°	10.0024	314.89	351.27	3.30	3.68
			H2O, 50°	10.0027	924.53	994.76	9.70	10.43
			15%, 50°	10.0022	581.88	872.82	6.10	9.15
			30%, 50°	10.0023	269.56	404.34	2.83	4.24

Anexo 7: Contenido de polifenoles en los extractos purificados

Solvente	TRATAMIENTO	ABSORBANCIA A 765 NM			mgEAG/mL			Concentración mgEAG/gss		
					R1	R2	R3	R1	R2	R3
Etanol	30%, 70°, 1	0.654	0.625	0.653	0.100	0.096	0.100	13.124	12.530	13.104
	30%, 70°, 2	0.523	0.617	0.463	0.080	0.094	0.070	10.438	12.366	9.210
	15%, 70°, 1	0.535	0.453	0.422	0.082	0.069	0.064	10.686	9.000	8.371
	15%, 70°, 2	0.423	0.394	0.397	0.064	0.059	0.060	8.385	7.797	7.858
	H2O, 70°, 1	0.215	0.209	0.382	0.032	0.031	0.058	4.129	4.006	7.551
	H2O, 70°, 2	0.236	0.237	0.364	0.035	0.035	0.055	4.559	4.580	7.182
	30%, 50°, 1	0.454	0.561	0.457	0.069	0.086	0.069	9.024	11.218	9.096
	30%, 50°, 2	0.459	0.311	0.394	0.070	0.047	0.059	9.124	6.104	7.796
	15%, 50°, 1	0.392	0.206	0.237	0.059	0.030	0.035	7.756	3.946	4.588
	15%, 50°, 2	0.300	0.312	0.289	0.045	0.047	0.043	5.870	6.116	5.645
	H2O, 50°, 1	0.221	0.231	0.218	0.032	0.034	0.032	4.252	4.451	4.190
	H2O, 50°, 2	0.231	0.231	0.235	0.034	0.034	0.035	4.457	4.446	4.547
Glicerol	30%, 70°, 1	0.382	0.395	0.402	0.058	0.060	0.061	7.551	7.817	7.961
	30%, 70°, 2	0.448	0.423	0.497	0.068	0.064	0.076	8.911	8.389	9.907
	15%, 70°, 1	0.347	0.389	0.411	0.052	0.059	0.062	6.834	7.694	8.145
	15%, 70°, 2	0.331	0.437	0.321	0.050	0.066	0.048	6.506	8.678	6.301
	H2O, 70°, 1	0.229	0.289	0.345	0.034	0.043	0.052	4.415	5.645	6.792
	H2O, 70°, 2	0.257	0.311	0.346	0.038	0.047	0.052	4.989	6.096	6.813
	30%, 50°, 1	0.435	0.463	0.423	0.066	0.070	0.064	8.641	9.211	8.391
	30%, 50°, 2	0.411	0.400	0.402	0.062	0.060	0.061	8.145	7.914	7.961
	15%, 50°, 1	0.411	0.417	0.411	0.062	0.063	0.062	8.145	8.268	8.151
	15%, 50°, 2	0.318	0.312	0.437	0.048	0.047	0.066	6.240	6.117	8.678
	H2O, 50°, 1	0.212	0.217	0.298	0.031	0.032	0.044	4.067	4.170	5.829
	H2O, 50°, 2	0.142	0.233	0.335	0.020	0.034	0.050	2.633	4.497	6.588

Anexo 8: Capacidad antioxidante DPPH (Etanol) para los extractos purificados

Descripción	ABSORBANCIA A 517 NM			% inhibición			**IC50 (mg/ml)**		
Condiciones	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
30%, 70°C, 1	0.098	0.078	0.081	62.476	70.134	68.985	6.6278	7.2886	7.5225
	0.133	0.154	0.167	49.075	41.034	36.056			
	0.205	0.324	0.344	21.506	24.059	19.717			
30%, 70°C, 2	0.071	0.07	0.069	72.814	73.197	73.580	5.5090	5.4663	5.5494
	0.121	0.126	0.126	53.669	51.755	51.755			
	0.197	0.191	0.196	24.569	26.867	24.952			
15%, 70°C, 1	0.101	0.076	0.089	61.327	70.900	65.922	9.1956	13.2361	11.7565
	0.112	0.202	0.085	57.116	52.655	37.454			
	0.158	0.156	0.155	39.502	40.268	40.651			
15%, 70°C, 2	0.102	0.089	0.0892	60.944	65.922	65.846	12.0708	13.0949	13.3921
	0.097	0.123	0.11	62.859	52.904	57.881			
	0.211	0.234	0.267	19.209	10.402	22.234			
H2O, 70°C, 1	0.135	0.133	0.131	48.309	49.075	49.840	19.2799	18.9356	18.7925
	0.175	0.174	0.174	32.993	33.376	33.376			
	0.218	0.217	0.209	16.528	16.911	19.974			
H2O, 70°C, 2	0.201	0.211	0.167	23.038	39.209	36.056	25.8491	23.2827	19.8385
	0.277	0.311	0.256	16.063	19.081	21.978			
	0.345	0.453	0.456	12.100	13.452	14.601			
30%, 50°C, 1	0.078	0.076	0.078	70.134	70.900	70.134	8.1706	8.2161	8.3489
	0.251	0.267	0.289	43.893	22.314	30.657			
	0.478	0.466	0.567	13.025	18.430	17.103			
30%, 50°C, 2	0.098	0.085	0.07	62.476	67.454	73.197	8.3689	7.9458	7.6073
	0.233	0.189	0.167	40.785	27.632	36.056			
	0.499	0.467	0.456	11.066	18.813	14.601			
15%, 50°C, 1	0.098	0.187	0.075	62.476	28.398	71.283	16.7684	20.8865	15.8390
	0.231	0.291	0.234	51.551	41.423	30.402			
	0.211	0.489	0.345	19.209	27.237	22.100			
15%, 50°C, 2	0.075	0.077	0.073	71.283	70.517	72.049	11.1843	11.1399	11.2258
	0.133	0.131	0.135	49.075	49.840	48.309			
	0.185	0.184	0.186	29.164	29.547	28.781			
H2O, 50°C, 1	0.151	0.149	0.149	42.183	42.948	42.948	24.7189	22.8991	24.6948
	0.216	0.233	0.188	17.294	10.785	28.015			
	0.211	0.234	0.198	19.209	10.402	24.186			
H2O, 50°C, 2	0.2117	0.151	0.153	18.941	42.183	41.417	83.9798	23.2944	23.5872
	0.248	0.186	0.186	5.041	28.781	28.781			
	0.225	0.216	0.219	13.848	17.294	16.146			

Anexo 9: Capacidad antioxidante DPPH (Glicerol) para los extractos purificados

Descripción	ABSORBANCIA A 517 NM			% inhibición			**IC50 (mg/ml)**		
Condiciones	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
30%, 70°C, 1	0.076	0.078	0.076	70.900	70.134	70.900	10.764	10.762	10.776
	0.126	0.121	0.121	51.755	53.669	53.669			
	0.182	0.185	0.187	30.313	29.164	28.398			
30%, 70°C, 2	0.079	0.078	0.079	69.751	70.134	69.751	10.999	10.948	10.949
	0.124	0.129	0.125	52.521	50.606	52.138			
	0.186	0.181	0.184	28.781	30.696	29.547			
15%, 70°C, 1	0.128	0.127	0.127	50.989	51.372	51.372	18.115	17.936	17.828
	0.168	0.166	0.164	35.673	36.439	37.205			
	0.205	0.2	0.201	21.506	23.421	23.038			
15%, 70°C, 2	0.135	0.129	0.133	48.309	50.606	49.075	19.724	18.271	19.007
	0.172	0.169	0.172	34.142	35.290	34.142			
	0.201	0.208	0.211	23.038	20.357	19.209			
H2O, 70°C, 1	0.138	0.13	0.137	47.160	50.223	47.543	20.249	29.087	29.695
	0.188	0.187	0.174	28.015	28.398	33.376			
	0.219	0.213	0.215	16.146	18.443	17.677			
H2O, 70°C, 2	0.112	0.234	0.215	57.116	60.402	47.677	32.773	32.298	31.375
	0.274	0.256	0.245	44.914	31.978	26.190			
	0.312	0.345	0.312	19.464	12.100	19.464			
30%, 50°C, 1	0.082	0.092	0.098	68.602	64.773	62.476	13.158	13.419	12.819
	0.155	0.143	0.139	40.651	45.246	46.777			
	0.207	0.211	0.184	20.740	19.209	29.547			
30%, 50°C, 2	0.098	0.086	0.084	62.476	67.071	67.837	13.651	11.902	13.367
	0.154	0.122	0.155	41.034	53.287	40.651			
	0.186	0.201	0.211	28.781	23.038	19.209			
15%, 50°C, 1	0.089	0.122	0.098	65.922	53.287	62.476	24.672	23.655	19.234
	0.104	0.112	0.122	60.179	57.116	53.287			
	0.345	0.289	0.201	12.100	10.657	23.038			
15%, 50°C, 2	0.078	0.167	0.134	70.134	36.056	48.692	12.435	25.354	19.010
	0.144	0.198	0.211	44.863	24.186	19.209			
	0.203	0.199	0.278	22.272	13.803	16.445			
H2O, 50°C, 1	0.167	0.182	0.189	36.056	30.313	27.632	27.369	22.485	35.142
	0.21	0.205	0.267	19.592	21.506	12.234			
	0.23	0.341	0.24	11.934	13.568	8.105			
H2O, 50°C, 2	0.188	0.192	0.174	28.015	26.484	33.376	24.918	25.407	30.400
	0.217	0.211	0.213	16.911	19.209	18.443			
	0.312	0.314	0.229	9.464	10.230	12.317			

Anexo 10: Determinación de capacidad antioxidante ORAC (etanol) para el proceso ELP-PR

MUESTRAS										Promedio µMeq trolox/gr
	R1	R2	R3	µmoles eq trolox/L (uM)			µmoles eq trolox/gr de materia seca			
30%, 70°C, 1	19.830	21.032	17.140	31728.00	33651.20	27424.00	831.834	882.256	718.993	811.028
30%, 70°C, 2	19.456	27.534	25.635	31129.60	44054.40	41016.00	816.15	1155.02	1075.35	1,015.508
15%, 70°C, 1	10.230	11.120	11.982	16368.00	17792.00	19171.20	429.157	466.493	502.654	466.101
15%, 70°C, 2	11.345	10.254	11.630	18152.00	16406.88	18608.00	475.91	430.15	487.86	464.642
H2O, 70%, 1	22.900	21.830	23.653	14312.50	13643.75	14783.13	375.252	357.718	387.591	373.520
H2O, 70%, 2	24.780	28.873	21.762	15487.50	18045.63	13601.25	406.06	473.13	356.60	411.930
30%, 50°C, 1	35.667	30.520	31.255	22291.88	19075.00	19534.38	584.441	500.102	512.146	532.230
30%, 50°C, 2	31.563	29.997	34.030	19726.88	18748.13	21268.75	517.19	491.53	557.61	522.109
15%, 50°C, 1	25.351	31.110	22.345	15844.38	19443.75	13965.63	415.415	509.785	366.157	430.452
15%, 50°C, 2	24.450	29.230	18.530	15281.25	18268.75	11581.25	400.64	478.97	303.64	394.416
H2O, 50°C, 1	34.530	36.510	33.010	6906.00	7302.00	6602.00	181.066	191.449	173.096	181.871
H2O, 50°C, 2	33.550	35.900	33.570	6710.00	7180.00	6714.00	175.92	188.24	176.03	180.063

Anexo 11: Determinación de capacidad antioxidante ORAC (glicerol) para el proceso ELP-PR

MUESTRAS										Promedio µMeq trolox/gr
	R	R	R	µmoles eq trolox/L (uM)			µmoles eq trolox/gr de materia seca			
30%, 70°C, 1	33.520	37.660	31.870	20950.00	23537.50	19918.75	549.271	617.111	522.234	562.872
30%, 70°C, 2	37.250	32.850	33.360	23281.25	20531.25	20850.00	610.40	538.30	546.65	565.117
15%, 70°C, 1	20.520	21.850	19.390	12825.00	13656.25	12118.75	336.252	358.046	317.735	337.344
15%, 70°C, 2	20.180	19.650	19.630	12612.50	12281.25	12268.75	330.67	321.99	321.66	324.775
H2O, 70%, 1	15.177	20.990	16.634	9485.63	13118.75	10396.25	248.686	343.936	272.560	288.394
H2O, 70%, 2	16.250	17.352	18.243	10156.25	10845.00	11401.88	266.28	284.34	298.94	283.187
30%, 50°C, 1	39.230	38.590	37.210	24518.75	24118.75	23256.25	642.844	632.356	609.743	628.314
30%, 50°C, 2	38.300	35.490	29.990	23937.50	22181.25	18743.75	627.60	581.56	491.43	566.865
15%, 50°C, 1	19.140	29.330	27.900	11962.50	18331.25	17437.50	313.641	480.622	457.189	417.151
15%, 50°C, 2	27.850	24.752	25.600	17406.25	15470.00	16000.00	456.37	405.61	419.50	427.162
H2O, 50°C, 1	53.563	40.352	55.637	13390.75	10088.00	13909.30	351.071	264.481	364.666	326.739
H2O, 50°C, 2	59.672	42.354	49.763	14918.00	10588.50	12440.83	391.11	277.60	326.17	331.627

Anexo 12: Determinación de polifenoles específicos en los extractos obtenidos durante la ELP

Solvent	Process conditions	Target polyphenols								
		Gallic	Caffeic	Vanillic	Resveratrol	Catechin	Epicatechin	Quercetin	Kaempferol	Oleuripein
		ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss
Etanol	50-0	45.720	11.864	15.938	33.273	80.232	70.134	60.475	30.038	419.466
	50-0	46.022	10.452	14.288	34.028	78.243	68.974	58.527	30.028	416.475
	50-15	48.774	22.744	21.844	43.028	110.783	89.464	79.476	73.475	524.667
	50-15	51.143	20.923	20.836	41.932	111.365	87.025	77.462	72.019	521.048
	50-30	78.288	29.365	47.293	67.243	149.938	113.465	62.783	60.453	622.084
	50-30	79.199	27.846	45.726	65.912	147.283	111.364	60.102	58.224	619.462
	70-0	59.983	16.833	22.492	39.453	122.036	96.365	93.029	81.027	565.772
	70-0	58.344	15.623	19.927	37.184	120.035	94.263	90.454	78.546	561.827
	70-15	73.988	32.576	30.211	55.364	159.657	131.374	132.735	126.826	964.364
	70-15	72.122	30.124	27.635	54.145	156.821	128.387	130.822	125.011	957.573
	70-30	105.149	44.983	57.882	95.634	178.232	153.746	119.462	103.766	1345.255
	70-30	103.762	42.012	55.023	93.647	176.025	151.435	117.045	101.255	1302.475
Glicerol	50-15	46.763	20.354	23.788	36.747	99.355	78.365	120.836	122.345	459.223
	50-15	45.332	19.231	22.928	34.263	97.025	75.354	118.026	120.883	457.028
	50-30	71.231	24.982	38.238	57.364	124.028	92.375	147.234	160.455	596.263
	50-30	68.993	22.045	35.132	54.355	122.036	90.625	148.234	158.377	596.253
	70-15	69.763	29.298	26.187	47.236	132.647	108.465	157.025	164.928	823.465
	70-15	67.122	26.702	24.263	45.723	131.074	106.288	155.223	163.022	798.025
	70-30	92.195	35.274	49.364	54.827	158.035	113.477	195.566	203.663	965.374
	70-30	93.112	33.036	46.126	52.015	156.035	112.024	193.466	201.899	935.332

Anexo 13: Determinación de polifenoles específicos en los extractos purificados obtenidos durante la ELP-PR

Solvent	Process conditions	Target polyphenols								
		Gallic	Caffeic	Vanillic	Resveratrol	Catechin	Epicatechin	Quercetin	Kaempferol	Oleuripein
		ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss	ug/gss
Etanol	50-0	37.847	ND	6.786	18.234	67.384	59.837	35.677	18.274	375.635
	50-0	36.756	ND	9.233	24.456	60.263	55.566	38.726	16.375	366.364
	50-15	41.283	15.673	16.772	34.564	90.273	71.827	71.253	57.111	438.264
	50-15	42.374	17.873	15.455	38.023	95.364	69.264	70.273	60.364	415.662
	50-30	55.365	21.637	31.354	42.365	100.275	77.374	55.465	56.782	421.264
	50-30	53.465	19.635	35.667	45.273	104.274	80.264	54.264	51.264	412.333
	70-0	43.465	5.892	11.264	22.345	100.264	84.556	59.264	52.838	506.365
	70-0	40.254	7.893	9.827	19.374	92.028	80.788	55.264	48.933	500.264
	70-15	61.776	29.364	21.674	43.664	130.263	110.928	118.253	109.827	768.384
	70-15	60.837	25.667	22.364	44.264	135.782	108.364	115.263	105.274	790.274
	70-30	78.645	32.837	39.889	66.263	125.667	111.677	107.663	88.374	878.284
	70-30	72.344	29.375	40.334	60.253	120.365	106.892	106.273	95.264	855.827
Glicerol	50-15	31.266	15.112	17.364	28.365	80.273	62.344	105.726	105.667	375.663
	50-15	35.887	14.563	19.024	26.992	79.263	63.998	107.273	102.364	367.465
	50-30	50.837	14.566	24.568	38.283	88.273	67.834	110.263	138.928	399.274
	50-30	52.465	16.777	22.365	37.012	84.550	60.928	112.372	142.364	410.264
	70-15	57.822	21.354	19.554	37.883	112.364	87.655	138.827	142.364	658.264
	70-15	56.332	19.888	20.881	39.263	108.566	91.223	140.274	140.556	665.789
	70-30	68.894	22.736	33.263	36.375	111.566	80.263	178.274	176.322	627.384
	70-30	65.233	25.667	30.882	34.475	115.677	85.264	172.334	180.988	656.899

Anexo 14: Análisis de varianza para polifenoles totales para el proceso ELP - Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	15.469	1	15.469	87.29	0.0000
B: Concentración	116.483	2	58.2414	328.65	0.0000
C: Temperatura	13.4251	1	13.4251	75.76	0.0000
INTERACCIONES					
AB	8.78698	2	4.39349	24.79	0.0001
AC	4.13174	1	4.13174	23.32	0.0004
BC	3.04956	2	1.52478	8.60	0.0048
ABC	0.696729	2	0.348365	1.97	0.1826
RESIDUOS	2.12656	12	0.177213		
TOTAL (CORREGIDO)	164.168	23			

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

Pruebas de comparación por Solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Solvente	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Glicerol	12	8.01133	0.121523	X
Etanol	12	9.617	0.121523	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Etanol - Glicerol	*	1.60567	0.374449

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Concentración de solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
0	8	6.0735	0.148834	X
15	8	8.90125	0.148834	X
30	8	11.4678	0.148834	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
0 - 15	*	-2.82775	0.563085
0 - 30	*	-5.39425	0.563085
15 - 30	*	-2.5665	0.563085

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Temperatura
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
50	12	8.06625	0.121523	X
70	12	9.56208	0.121523	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
50 - 70	*	-1.49583	0.374449

* indica una diferencia significativa.

Anexo 15: Análisis de varianza para capacidad antioxidante (DPPH) para el proceso ELP

Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	292.785	1	292.785	166.34	0.0000
B: Concentración	1375.47	2	687.734	390.73	0.0000
C: Temperatura	106.282	1	106.282	60.38	0.0000
INTERACCIONES					
AB	33.9331	2	16.9665	9.64	0.0032
AC	6.65424	1	6.65424	3.78	0.0254
BC	29.3461	2	14.673	8.34	0.0054
ABC	74.5559	2	37.2779	21.18	0.0001
RESIDUOS	21.1215	12	1.76012		
TOTAL (CORREGIDO)	1940.15	23			

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

Pruebas de comparación por Solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Solvente	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Glicerol	12	12.4149	0.382984	X
Etanol	12	19.4004	0.382984	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Etanol - Glicerol	*	6.98553	1.18009

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Concentración de solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
30	8	8.49396	0.469058	X
15	8	12.9253	0.469058	X
0	8	26.3036	0.469058	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
0 - 15	*	13.3783	1.77459
0 - 30	*	17.8097	1.77459
15 - 30	*	4.43135	1.77459

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Temperatura
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
70	12	13.8033	0.382984	X
50	12	18.012	0.382984	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
50 - 70	*	4.20876	1.18009

* indica una diferencia significativa

Anexo 16: Análisis de varianza para capacidad antioxidante (ORAC) para el proceso ELP

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	21860.2	1	21860.2	10.75	0.0066
B: Concentración	522683.	2	261341.	128.57	0.0000
C: Temperatura	38834.7	1	38834.7	19.11	0.0009
INTERACCIONES					
AB	25632.8	2	12816.4	6.31	0.0134
AC	111760.	1	111760.	54.98	0.0000
BC	38196.2	2	19098.1	9.40	0.0035
ABC	19234.8	2	9617.42	4.73	0.0305
RESIDUOS	24392.0	12	2032.67		
TOTAL (CORREGIDO)	802594.	23			

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

Pruebas de comparación por Solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Solvente	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Glicerol	12	421.629	13.015	X
Etanol	12	481.989	13.015	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Etanol - Glicerol	*	60.3603	40.1032

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Concentración de solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
0	8	297.166	15.94	X
15	8	407.755	15.94	X
30	8	650.505	15.94	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
0 - 15	*	-110.589	60.3058
0 - 30	*	-353.339	60.3058
15 - 30	*	-242.75	60.3058

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Temperatura
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
50	12	411.583	13.015	X
70	12	492.035	13.015	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
50 - 70	*	-80.4516	40.1032

* indica una diferencia significativa.

Anexo 17: Análisis de varianza para polifenoles totales, para el proceso ELP-PR

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	0.235818	1	0.235818	0.21	0.0125
B: Concentración	36.9567	2	18.4784	16.60	0.0004
C: Temperatura	13.1054	1	13.1054	11.77	0.0050
INTERACCIONES					
AB	6.58142	2	3.29071	2.96	0.0163
AC	12.1738	1	12.1738	10.93	0.0063
BC	0.994508	2	0.497254	0.45	0.0083
ABC	1.39889	2	0.699445	0.63	0.5502
RESIDUOS	13.3618	12	1.11349		
TOTAL (CORREGIDO)	84.8084	23			

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

Pruebas de comparación por Solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Solvente	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Etanol	12	7.42817	0.304615	X
Glicerol	12	7.62642	0.304615	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Etanol - Glicerol	*	5.45653	1.12009

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Concentración de solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
0	8	6.1865	0.373076	X
15	8	7.21713	0.373076	X
30	8	9.17825	0.373076	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
0 - 15		-1.03062	1.41146
0 - 30	*	-2.99175	1.41146
15 - 30	*	-1.96113	1.41146

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Temperatura
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
50	12	6.78833	0.304615	X
70	12	8.26625	0.304615	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
50 - 70	*	-1.47792	0.938615

* indica una diferencia significativa.

Anexo 18: Análisis de varianza para capacidad antioxidante (DPPH), para el proceso ELP-PR

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	243.509	1	243.509	159.38	0.0000
B: Concentración	1179.93	2	589.967	386.14	0.0000
C: Temperatura	36.9855	1	36.9855	24.21	0.0004
INTERACCIONES					
AB	37.9601	2	18.98	12.42	0.0012
AC	3.45762	1	3.45762	2.26	0.0000
BC	3.35466	2	1.67733	1.10	0.0000
ABC	3.99703	2	1.99852	1.31	0.3063
RESIDUOS	18.3341	12	1.52784		
TOTAL (CORREGIDO)	1527.53	23			

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

Pruebas de comparación por Solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Solvente	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Etanol	12	14.4295	0.356819	X
Glicerol	12	20.8002	0.356819	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Etanol - Glicerol	*	-6.37063	1.09947

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Concentración de solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
30	8	9.61739	0.437013	X
15	8	16.5366	0.437013	X
0	8	26.6906	0.437013	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
0 - 15	*	10.1541	1.65335
0 - 30	*	17.0732	1.65335
15 - 30	*	6.91916	1.65335

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Temperatura
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
70	12	16.3735	0.356819	X
50	12	18.8563	0.356819	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
50 - 70	*	2.48279	1.09947

* indica una diferencia significativa.

Anexo 19: Análisis de varianza para capacidad antioxidante (ORAC), para el proceso ELP-PR

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente	21860.2	1	21860.2	10.75	0.0066
B: Concentración	522683.	2	261341.	128.57	0.0000
C: Temperatura	38834.7	1	38834.7	19.11	0.0009
INTERACCIONES					
AB	25632.8	2	12816.4	6.31	0.0134
AC	111760.	1	111760.	54.98	0.0000
BC	38196.2	2	19098.1	9.40	0.0035
ABC	19234.8	2	9617.42	4.73	0.0305
RESIDUOS	24392.0	12	2032.67		
TOTAL (CORREGIDO)	802594.	23			

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

Pruebas de comparación por Solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Solvente	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Glicerol	12	421.629	13.015	X
Etanol	12	481.989	13.015	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Etanol - Glicerol	*	60.3603	40.1032

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Concentración de solvente
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
0	8	297.166	15.94	X
15	8	407.755	15.94	X
30	8	650.505	15.94	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
0 - 15	*	-110.589	60.3058
0 - 30	*	-353.339	60.3058
15 - 30	*	-242.75	60.3058

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de comparación por Temperatura
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
50	12	411.583	13.015	X
70	12	492.035	13.015	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
50 - 70	*	-80.4516	40.1032

* indica una diferencia significativa.

PANEL DE FOTOGRAFÍAS

Fig N° 01: Recolección de hojas de olivo.



Fig N° 02: Transporte de las hojas de olivo.



Fig N° 03: Secado a temperatura ambiente de las hojas de olivo



Fig N° 04: Molienda de las hojas de olivo.



Fig N° 05: Hojas de olivo en polvo.



Fig N° 06: Extracción de Polifenoles por el método ELP.



Fig N° 07: Purificación del extracto de polifenoles.



Fig N° 08: Análisis de las muestras.



"UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

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	: Karla Syndel Díaz Huamaní
DNI/Carnet de Extranjería/Pasaporte N°	: 72489471
Correo electrónico	: karla03011988@gmail.com
Teléfono/Celular	: 949086858

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 : "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO".
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 : 72489471
NOMBRES Y APELLIDOS : Karla Syndel Díaz Huamaní

"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 : 72489471
NOMBRES Y APELLIDOS : Karla Syndel Díaz Huamaní
FECHA : 21 de Diciembre del 2023

01

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

Yo, Karla Syndel Díaz Huamaní, bachiller de la Escuela Profesional de: Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua, identificado(a) con DNI Nº 72489471, autor(a) del Trabajo de Investigación / Tesis / Trabajo de suficiencia profesional, denominado: "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO".

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, 21 de diciembre del 2023



Karla Syndel Díaz Huamaní
DNI: 72489471

Huella digital

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	: Yolanda Cristina Palomino Villegas
DNI/Carnet de Extranjería/Pasaporte N°	: 41858804
Correo electrónico	: yolacristi@hotmail.com
Teléfono/Celular	: 926549144

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 : "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO".
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 : 41858804
NOMBRES Y APELLIDOS : Yolanda Cristina Palomino Villegas

"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 : 41858804
NOMBRES Y APELLIDOS : Yolanda Cristina Palomino Villegas
FECHA : 11 de Diciembre 2023



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

Yo, Yolanda Cristina Palomino Villegas, bachiller de la Escuela Profesional de: Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua, identificado(a) con DNI Nº 41858804, autor(a) del Trabajo de Investigación / Tesis / Trabajo de suficiencia profesional, denominado: "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO".

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, 11 de diciembre del 2023



Yolanda Cristina Palomino Villegas
DNI: 41858804

Huella digital

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
magister

Tesis Karla & Yolanda

9% Textos sospechosos

9% Similitudes
0% similitudes entre comillas

< 1% Idioma no reconocido
0% Textos potencialmente generados por la IA

Nombre del documento: Tesis Karla & Yolanda.docx
ID del documento: 0faf4de491d09c948f6150b50b7d602b1bdaa3c0
Tamaño del documento original: 1,36 MB

Depositante: NILS LEANDER HUAMAN CASTILLA
Fecha de depósito: 6/12/2023
Tipo de carga: interface
fecha de fin de análisis: 6/12/2023

Número de palabras: 15.768
Número de caracteres: 104.938

Ubicación de las similitudes en el documento:



Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	**repositorio.unam.edu.pe** https://repositorio.unam.edu.pe/server/api/core/bitstreams/ac3613f5-bd94-4e1a-9a78-b9bca96a35... **4 fuentes similares**	7%		Palabras idénticas: **7%** (1081 palabras)
2	**repositorio.unam.edu.pe** https://repositorio.unam.edu.pe/bitstreams/57a2bbad-8e5c-4162-8aff-fe4fe99b5753/download **2 fuentes similares**	3%		Palabras idénticas: **3%** (515 palabras)
3	**repositorio.unam.edu.pe** | Evaluación de la capacidad antioxidante de los polifen... http://repositorio.unam.edu.pe/bitstream/UNAM/229/1/D095_72891001_T.pdf	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (169 palabras)
4	**repositorio.unam.edu.pe** | Repositorio - Universidad Nacional de Moquegua :: Inicio https://repositorio.unam.edu.pe/home	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (51 palabras)
5	**es.scribd.com** | LOS PARADIGMAS DEL DERECHO PENAL EL PROGRESO DE LA CIENC... https://es.scribd.com/document/648883670/LOS-PARADIGMAS-DEL-DERECHO-PENAL-EL-PROGRES... **5 fuentes similares**	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (46 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	**Documento de otro usuario** #ddcba2 El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (20 palabras)
2	**hdl.handle.net** | Taller de cuentos infantiles para la práctica de valores en los niño... https://hdl.handle.net/20.500.12692/53404	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (19 palabras)
3	**hdl.handle.net** | Recopilacion de casos quirurgicos de retina en el primer ano de t... https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000151861	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (14 palabras)
4	**repositorio.unam.edu.pe** | Evaluación del uso de etanol y glicerol como solventes ... https://repositorio.unam.edu.pe/items/7c431297-bd72-48c1-abd9-1ba2d038668c#:~:text=Por ell... e...	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (11 palabras)
5	**www.clubensayos.com** | Almacenes Robotizados e inteligencia Artificial - Tesis - Jo... https://www.clubensayos.com/Tecnología/Almacenes-Robotizados-e-inteligencia-Artificial/5522708....	< 1%		Palabras idénticas: **< 1%** (13 palabras)

DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES
"AÑO DEL BICENTENARIO, DE LA CONSOLIDACIÓN DE NUESTRA INDEPENDENCIA, Y DE LA CONMEMORACIÓN DE LAS HEROICAS BATALLAS DE JUNÍN Y AYACUCHO"

RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA Nº 273-2024-UNAM/CO

Moquegua, 22 de abril de 2024

LA COMISIÓN ORGANIZADORA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

VISTOS:

El Acuerdo de Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora de fecha 17 de abril de 2024; PROVEÍDO N° 9030-2024 de fecha 17 de abril de 2024 emitido por la Presidencia de la Comisión Organizadora; INFORME N° 273-2024-UNAM-CO-P/SG de fecha 17 de abril de 2024 emitido por la Secretaría General; CARTAS Nº 022 y 027-2024-GYT/UNAM-PCAS emitidos por el Especialista de Grados y Títulos; Sobre el otorgamiento del Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial y demás documentos que escoltan el expediente administrativo, y;

CONSIDERANDO:

Que, la Constitución Política del Perú en su artículo 18º prevé que cada Universidad es autónoma en su régimen normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, y el artículo 8º de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, establece que la referida autonomía inherente a las Universidades, se ejerce de conformidad con la Constitución y las Leyes de la República e implica las organizaciones de su sistema académico, económico y administrativo, así como la administración de sus bienes y rentas, elaborar su presupuesto y aplicar sus fondos con la responsabilidad que impone la Ley;

Que, de conformidad con la Ley N° 28520 de fecha 23/05/2005, se creó la Universidad Nacional de Moquegua, cuyo artículo 1º dispone: "créase la Universidad Nacional de Moquegua como persona jurídica de derecho público interno, con sede en la ciudad de Moquegua, Provincia de Mariscal Nieto, Departamento de Moquegua";

Que, el artículo 29° de la Ley Universitaria, Ley N° 30220, establece que, aprobada la ley de creación de una universidad pública, el Ministerio de Educación (MINEDU), constituye una Comisión Organizadora integrada por tres (3) académicos de reconocido prestigio, que cumplan los mismos requisitos para ser Rector (…). Esta Comisión tiene a su cargo la aprobación del estatuto, reglamentos y documentos de gestión académica y administrativa de la universidad, formulados en los instrumentos de planeamiento, así como su conducción y dirección hasta que se constituyan los órganos de gobierno que, de acuerdo a la presente Ley, le correspondan";

Que, mediante Resolución Viceministerial Nº 011-2024-MINEDU de fecha 31/01/2024, se reconformó la Comisión Organizadora de la Universidad Nacional de Moquegua, integrada por los académicos: Dr. Jorge Lázaro Franco Medina, como Presidente; Dr. Edwin Molina Porcel, como Vicepresidente Académico y Dr. Avid Roman Gonzalez, como Vicepresidente de Investigación;

Que, el artículo 58° de la Ley Universitaria, Ley Nº 30220, concordado con el artículo 14º del Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución de Comisión Organizadora Nº 578-2021-UNAM, establecen que el **Consejo Universitario es el máximo órgano de gestión, dirección y ejecución académica y administrativa de la universidad.** En el caso de la Universidad Nacional de Moquegua, dada su condición y naturaleza, corresponde ejercer dicha atribución a la Comisión Organizadora quien hace las veces de Consejo Universitario, disposición relacionada con la Resolución Viceministerial N° 244-2021-MINEDU y sus modificatorias;

Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe

Que, el artículo 44° de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, señala que las universidades otorgan los grados académicos de Bachiller, Maestro, Doctor y los Títulos Profesionales que correspondan, a nombre de la Nación (...);

Que, el numeral 45.2 del artículo 45° de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, precisa **los requisitos mínimos para la obtención del título profesional, como son: el grado de Bachiller y la aprobación de una tesis** o trabajo de suficiencia profesional. Asimismo, establece que el título profesional solo se puede obtener en la universidad en la cual se haya obtenido el grado de bachiller;

Que, mediante Resolución de Comisión Organizadora Nº 1153-2021-UNAM, se aprobó el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, el mismo que fue modificado a través de las Resoluciones de Comisión Organizadora N° 410; 453 y 890-2022 y N° 880-2023-UNAM el cual establece los requisitos y norma los procedimientos para la obtención de los grados académicos y títulos profesionales conferidos por esta Casa Superior de Estudios;

Que, mediante las Cartas N° 022 y 027-2024-GYT/UNAM-PCAS, el Especialista del Área de Grados y Títulos, remite a Secretaria General, la relación de cinco (5) bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, quienes se encuentran aptos para la expedición del Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, al haber cumplido satisfactoriamente con los requisitos legales y reglamentarios[1], exigidos en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, conforme lo señala la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial,, razón por la cual la Secretaría General incluye el expediente como punto de agenda para ser tratado en Sesión de Comisión Organizadora de fecha 17 de abril de 2024;

Que, se ha establecido como atribución de la Comision Organizadora de la UNAM, la facultad de conferir los grados académicos y los títulos profesionales (...), por lo que en mérito al pedido del Secretario General y debatido el caso en Sesión Ordinaria de fecha 17 de abril de 2024, se acordó por unanimidad **conferir a nombre de la Nación el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, por la**

---

[1] Artículo 122°. - Requisitos para la obtención del Título Profesional
Para obtener el Título Profesional el interesado deberá presentar ante su Escuela Profesional un expediente con la siguiente documentación:

a. Solicitud dirigida al Director de la Escuela Profesional o quien haga sus veces, indicando la fecha y numero de comprobante de pago.
b. Dos (2) fotografías de frente, tamaño pasaporte a color con fondo blanco (con traje formal); para garantizar la seguridad ciudadana.
c. Dos ejemplares de la Tesis, del Trabajo de Suficiencia Profesional o Informe del Examen Profesional en físico, uno para la Biblioteca y otro para la Escuela Profesional, y un CD con la versión digital.
d. Formulario de autorización del graduado para la publicación de la Tesis, Trabajo de Suficiencia Profesional o Informe de Examen Profesional en el repositorio.
e. Declaración Jurada de originalidad de la Tesis, Trabajo de Suficiencia Profesional o Informe de Examen Profesional.

La Escuela Profesional es responsable de completar el expediente del bachiller en un plazo máximo de 3 días hábiles y derivar a la Oficina de Secretaría General, adjuntando los siguientes documentos:

a. Copia del acta de sustentación indicando la modalidad de obtención del título profesional.
b. Constancia de "no adeudo" de Bienes a la Universidad, bienes a los Laboratorios Básicos y de Especialidad, material bibliográfico; dichos documentos deberán ser refrendados por los responsables a cargo.

Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe

DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES
"AÑO DEL BICENTENARIO, DE LA CONSOLIDACIÓN DE NUESTRA INDEPENDENCIA, Y DE LA CONMEMORACIÓN DE LAS HEROICAS BATALLAS DE JUNÍN Y AYACUCHO"

modalidad de la Sustentación de Tesis, a cinco (5) Bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua;

Estando en uso de las facultades y atribuciones conferidas en el artículo 18° de la Constitución Política del Perú; la Ley N° 30220, Ley Universitaria; el Documento Normativo denominado: "Disposiciones para la Constitución y Funcionamiento de las Comisiones Organizadoras de las Universidades Públicas en proceso de Constitución", aprobado mediante la Resolución Viceministerial N° 244-2021-MINEDU y sus modificatorias, y en la Resolución Viceministerial Nº 011-2024-MINEDU, así como en el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua y demás normas concordantes;

SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO: CONFERIR, a nombre de la Nación el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL,** por la modalidad de la Sustentación de Tesis, a los Bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Moquegua, que se consigna en el listado siguiente:

1. **FROILAN ROQUE CACERES**

   TESIS : "TIPIFICACIÓN FLORAL DE MIELES DE *Apis Mellifera* EN EL VALLE INTERANDINO DEL TICSANI, REGIÓN DE MOQUEGUA"

2. **LIDIA YESENIA MALDONADO MAMANI**

   TESIS : "EFECTO DEL ESTADO DE MADUREZ SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMA DE OLOR (*Citrus Limetta*)"

3. **KARLA SYNDEL DIAZ HUAMANI**

   TESIS : "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO".

4. **YOLANDA CRISTINA PALOMINO VILLEGAS**

   TESIS : "ESTUDIO DE UN PROCESO INTEGRADO SOSTENIBLE PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOJAS DE OLIVO".

5. **FRANK JORGE HERVAS NINA**

   TESIS : "ESTUDIO DEL USO DE LÍQUIDOS PRESURIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES PRESENTES EN ALGA MARINAS ROJAS".

ARTÍCULO SEGUNDO: AUTORIZAR, a la Secretaría General de la Universidad Nacional de Moquegua, expedir y registrar los Diplomas correspondientes para su otorgamiento.

ARTÍCULO TERCERO: ENCARGAR al Área de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, para que realice las acciones pertinentes conducentes, relacionadas con la inscripción de los grados y títulos en el Registro de Grados y Títulos de la Superintendencia Nacional de Educación Superior Universitaria - SUNEDU.

Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe

///... **Resolución de Comision Organizadora Nº 273-2024-UNAM/CO**

ARTÍCULO CUARTO: NOTIFICAR, la presente Resolución a todas las instancias y dependencias administrativas y académicas de la Universidad Nacional de Moquegua, para su conocimiento, cumplimiento y demás fines pertinentes.

ARTÍCULO QUINTO: ENCARGAR, a la Oficina de Tecnología de la Información, la publicación de la presente Resolución en el portal de transparencia de la Universidad Nacional de Moquegua.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE, CUMPLASE Y ARCHÍVESE.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA · PRESIDENTE

DR. JORGE LAZARO FRANCO MEDINA
Presidente de la Comisión Organizadora
Universidad Nacional de Moquegua

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA · SECRETARIA GENERAL

ABOG. KEVIN YUVER CHIHUAN QUISPE
Secretario General
Universidad Nacional de Moquegua

Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe