UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES PRESENTES EN SEMILLA DE PALTA (*Persea americana* Miller*)* VARIEDAD ZUTANO

TESIS

PRESENTADO POR:

YAJAIRA SUJEY VALDEZ MANCHEGO

Asesor: Dr. NILS LEANDER HUAMAN CASTILLA

Co – Asesor: Mg. NILTON CESAR LEON CALVO

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

MOQUEGUA – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

REGISTRO N°.....13.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis

presentada por la : Bach. YAJAIRA SUJEY VALDEZ MANCHEGO denominada: "EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES PRESENTES EN SEMILLA DE PALTA (*Persea americana* Miller) VARIEDAD ZUTANO", para cumplir con uno de los requisitos para optar el título profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo, así como los conocimientos

demostrados por el sustentante, se declara la tesis como:

APROBADO

Con la nota de : TRECE (13)

Calificativo de : BUENO

En consecuencia, de todos los actuados la Tesista queda APTO para poder recibir el título profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL, de conformidad con lo establecido en el reglamento de grados y títulos de la Universidad Nacional de Moquegua.

Moquegua 11 de diciembre del 2020

Dr. Honorato Ccalli Pacco
PRESIDENTE DE JURADO

Dr. GLINS ESCOBEDO PACHECO
Primer miembro de Jurado

Jhony Mayta Hancco
DNI 01325181
Dr. Jhony Mayta Hancco
Segundo Miembro

DEDICATORIA

A Dios.

Por permitirme tener la fuerza para terminar mi carrera y por haberme dado salud para lograr mis metas y objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi padre Marcial Antonio.

Por todo su apoyo, amor y consejos que me brindó para el desarrollo de éste trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme tener salud y darme la fuerza suficiente para concluir mis metas y objetivos como éste trabajo.

A mi asesor Dr. Nils L. Huamán Castilla por guiarme en este proceso de ejecución de mi tesis; también, por su paciencia, apoyo y asesoramiento en el análisis e interpretación de los resultados, siendo un ejemplo a seguir.

A mi co-asesor Mg. Niltón C. León Calvo quien me brindó su apoyo incondicional en todo el proceso y el tiempo que me tomó para culminar mi tesis de pre-grado.

Al Dr. Elías Escobedo Pacheco por el apoyo y guía en uso de los equipos para la ejecución del presente trabajo y a la vez por sus enseñanzas durante mis años universitarios

RESUMEN

La industria alimentaria genera importantes cantidades de residuos agroindustriales, los cuales no presentan ningún valor económico y son considerados un problema de gestión ambiental. En particular, la industria de la palta produce residuos de semilla, los cuales no son aprovechados pese a ser una fuente natural rica en polifenoles, cuyo procesamiento permitiría no solo generar un valor agregado a este residuo, sino también permitirá mejorar la económica de las empresas y familias relacionadas con este rubro. En ese sentido, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes temperaturas moderadas combinadas con el uso de mezclas agua-etanol en un proceso de extracción convencional (solido-liquido) sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de semilla de palta (*Persea americana*) variedad Zutano. Para tal fin, las muestras de semillas de palta previamente acondicionadas (deshidratadas y molidas) fueron sometidas a un proceso de extracción convencional a temperaturas moderadas (50 y 70 °C) combinado con el uso de mezclas agua-etanol (30:70, 60:40, 90:10) por un periodo de 30 min a 500 RPM. Los extractos obtenidos fueron analizados en su contenido total de polifenoles mediante el método de Folin – Ciocalteu y capacidad antioxidante mediante el método de inhibición del radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).

Los resultados muestran que los incrementos en la concentración de etanol (30, 60 y 90%) y temperatura (50 °C y 70 °C) mejoran la recuperación de polifenoles y favorecen la capacidad de inhibición del radical DPPH.

Probablemente, el uso de etanol mejora las interacciones entre el solvente y los grupos funcionales de los polifenoles, Así como la temperatura permite un incremento de la energía cinética del sistema mejorando la extractabilidad de estos compuestos. Consecuentemente, la mejor condición de extracción (90% - 70 °C) permitió recuperar 9.87 mg EAG/gss, mientras que la capacidad antioxidante definida por el valor IC_{50} fue de 0.22 mL de extracto/mL solución DPPH. Finalmente, los parámetros obtenidos en este estudio son una alternativa a futuro para una extracción sustentable de compuestos bioactivos a partir del uso de descartes agroindustriales como la semilla de palta.

Palabras clave: polifenoles totales, capacidad antioxidante, palta variedad zutano, radical DPPH, Folin Ciocalteu.

ABSTRACT

The food industry generates significant amounts of agroindustrial waste, which has no economic value and is considered an environmental management problem. In particular, the avocado industry produces seed residues, which are not used despite being a natural source rich in polyphenols, the processing of which would not only generate added value to this residue, but will also improve the economics of companies and families related to this item. In this sense, the present research work aimed to evaluate the effect of different moderate temperatures combined with the use of water-ethanol mixtures in a conventional extraction process (solid-liquid) on the polyphenol content and antioxidant capacity of the extracts. Obtained from seed of avocado (*Persea americana*) variety Zutano. To this end, the previously conditioned avocado seed samples (dehydrated and ground) were subjected to a conventional extraction process at moderate temperatures (50 and 70 ° C) combined with the use of water-ethanol mixtures (30:70, 60 : 40, 90:10) for a period of 30 min at 500 RPM. The extracts obtained were analyzed for their total polyphenol content using the Folin-Ciocalteu method and antioxidant capacity using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical inhibition method.

The results show that increases in ethanol concentration (30, 60 and 90%) and temperature (50 ° C and 70 ° C) improve the recovery of polyphenols and favor the inhibition capacity of the radical DPPH. Probably, the use of ethanol improves the interactions between the solvent and the functional groups of the polyphenols, as well as the temperature allows an increase in the kinetic energy of the system, improving the extractability of these compounds. Consequently, the

best extraction condition (90% - 70 ° C) allowed to recover 9.87 mg EAG/gss while the antioxidant capacity defined by the IC_{50} value was 0.22 mL of extract / mL DPPH solution. Finally, the parameters obtained in this study are a future alternative for a sustainable extraction of bioactive compounds from the use of agro-industrial discards such as avocado seed.

Key words: total polyphenols, antioxidant capacity, avocado zutano variety, DPPH radical, Folin Ciocalteu.

ÍNDICE

DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTO iv
RESUMEN v
ABSTRACT vii
ÍNDICE ix
ÍNDICE DE TABLAS xi
ÍNDICE DE FIGURAS xii
ÍNDICE FOTOGRÁFICO xiii
ÍNDICE DE ANEXOS xiv
INTRODUCCIÓN 15
CAPITULO I 17
1.1. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 17
1.1.3. Interrogante general 19
1.1.4. Interrogantes específicas 19
1.2. ANTECEDENTES 20
1.3. OBJETIVOS 22
1.3.1. Objetivo general 22
1.3.2. Objetivos específicos 22
1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA 23
CAPITULO II 25
MARCO TEÓRICO 25
2.1. BASES TEÓRICAS 25
2.1.1. Palta: 25

2.1.2. Producción 26
2.1.3. Semilla 27
2.1.4. Composición química de la semilla de palta 28
2.1.5. Compuestos bioactivos 29
2.2.4. Métodos de Extracción de taninos 44
2.2.5. Métodos de medición de taninos 48
CAPITULO III 55
MÉTODO 55
3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN 55
3.2. MUESTRA 56
3.3. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS 56
3.4. PROCEDIMIENTOS 58
3.4.1. Metodología experimental 58
3.5. ANÁLISIS DE DATOS 63
CAPITULO IV 65
RESULTADOS Y DISCUSIONES 65
4.1. Efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre el contenido de polifenoles 65
4.2. Efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre la capacidad antioxidante 70
CAPITULO V 74
CONCLUSIONES 74
CAPITULO VI 75
RECOMENDACIONES 75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76
ANEXOS 90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de la semilla de palta 28

Tabla 2: Perfil fenólico de piel, pulpa y semilla de palta 36

Tabla 3: Diseño experimental 62

Tabla 4: Comparación de los resultados de curvas de calibración vs otros 65

Tabla 5: Determinación del contenido de polifenoles 67

Tabla 6: Capacidad antioxidante presente en los diferentes extractos 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Partes del fruto de la palta 25

Figura 2: Producción de palta en Moquegua 26

Figura 3: Partes de la semilla de palta 27

Figura 4: Ruta del ácido siquímico 31

Figura 5: Estructura química de los compuestos polifenólicos 32

Figura 6: Monómeros, dímeros y polímeros polifenólicos 33

Figura 7: Clasificación de los polifenoles 34

Figura 8: Polifenoles presentes en la semilla de palta 38

Figura 9: Oxido reducción de la pirocatequina y la hidroquinona 40

Figura 10: Reacción de Folin Ciocalteu para la cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos 49

Figura 11: Estructura del DPPH antes y después de la reacción antioxidante 52

Figura 12: Proceso de obtención de extractos etanólicos 58

Figura 13: Curva estándar de ácido gálico 59

Figura 14: Regresión obtenidas de preparación de la curva de calibración 66

Figura 15: Relación entre contenido de polifenoles e IC50 72

ÍNDICE FOTOGRÁFICO

Fotografía 1: Semilla de palta variedad Zutano 90

Fotografía 2: Semilla de palta molida 90

Fotografía 3: Harina de semilla 91

Fotografía 4: Mezcla de etanol con semilla 91

Fotografía 5: Extracción 92

Fotografía 6: Diluciones para medición de fenoles 92

Fotografía 7: Dilución con reactivo Folin Ciocalteu 93

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Panel Fotográfico 90

Anexo 2: Obtención de la harina de la semilla de palta 93

Anexo 3: Datos de Calibración del método de Folin Ciocalteu 95

Anexo 4: Datos obtenidos para cuantificación de taninos expresado en fenoles totales 97

Anexo 5: Análisis de varianza para polifenoles 98

Anexo 6: Pruebas de comparación 98

Anexo 7: Pruebas de Multiple Rango para polifenoles 99

Anexo 8: Datos obtenidos para determinar la capacidad antioxidante 100

Anexo 9: Análisis de varianza para Capacidad antioxidante 102

Anexo 10: Pruebas de comparación 102

Anexo 11: Datos obtenidos de la extracción de taninos en la semilla 103

INTRODUCCIÓN

Perú produce ~470 mil toneladas de palta por año, cuyo consumo directo o producción de aceite genera importantes cantidades de semilla de palta, un residuo agroindustrial sin valor económico que representa un problema de gestión ambiental (Mendoza et al., 2018). Sin embargo, este residuo presenta importantes concentraciones de polifenoles, los cuales debido a sus propiedades bioactivas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo han despertado el interés de la industria alimentaria y farmacéutica (Dabas et al., 2013)

La semilla de palta presenta diferentes familias específicas de polifenoles tales como ácidos fenólicos, flavanoles y taninos condensados o proantocianinas (Arukwe et al., 2012; Del Refugio et al., 2004; Dwaogu et al., 2008; Takenaga 2008). Por ello, diferentes trabajos de extracción convencional han sido desarrollados mediante el uso de solventes tales como acetona, metanol y hexano con la finalidad de recuperar los polifenoles (Do et al., 2013; Thamizhiniyan et al., 2019). Sin embargo, estos solventes son tóxicos y no amigables con el medio ambiente, lo cual dificulta el uso de los extractos obtenidos en futuras aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. En ese sentido, el uso de mezclas agua-etanol a condiciones atmosféricas ha permitido mejorar la recuperación de polifenoles en otros residuos agroindustriales como es el caso de las semillas de uva en comparación con el uso de metanol y acetona bajo las mismas condiciones (Shi et al., 2003). No obstante, los parámetros adecuados para la recuperación de polifenoles usando mezclas agua-etanol son aún una tarea pendiente por resolver.

Por ello, el presente trabajo propone evaluar el efecto del uso de diferentes mezclas agua-etanol combinado con diferentes temperaturas sobre la recuperación de polifenoles y capacidad antioxidante de los

extractos de semilla de palta variedad Zutano, un tipo de palta que a diferencia de las variedades Hass y Fuerte no es de común comercialización y producción, pero el aprovechamiento de su semilla permitiría no solo la revalorización de este producto sino también futuros proyectos que promuevan su producción. Además, los parámetros obtenidos podrán ser usados en otras variedades de palta y podrán ser escalados a nivel industrial.

CAPITULO I

1.1. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1.1. DESCRIPCIÓN

La producción de palta en la región Moquegua se ha incrementado de 687 TM a 1092 TM entre los años 2017 y 2018 respectivamente, esto representa un incremento del 59% (Jáuregui, 2018). Si bien la palta es un producto de consumo directo, también es una fuente natural para la obtención de aceite, en ambos casos se generan importantes cantidades de semilla de palta, un residuo que representa el 30% del peso fresco de la palta y no presenta ningún valor comercial (Segovia et al., 2018).

A la fecha, diversos trabajos han demostrado que la semilla de palta presenta componentes nutricionales tales como vitaminas y ácidos grasos y compuestos bioactivos como los polifenoles, los cuales pueden ser extraídos y usados para la formulación de alimentos nutraceúticos (Cabrera et al., 2015; Massaro, 2009). Sin embargo, debido a la estructura rígida y compleja de la semilla de palta es necesario primero establecer estrategias de acondicionamiento tales como secado y molido, así como también métodos de extracción que permitan la recuperación de sus compuestos bioactivos (Arranz, 2010). Si bien, a la fecha diversos

métodos de extracción convencional han sido propuestos, el uso de solventes tóxicos (ej. Metanol, acetona y hexano) limitan el uso de los extractos en futuras aplicaciones industriales (Takeuchi et al., 2009). En ese sentido el uso de las mezclas agua-etanol podrían ser la solución frente a este escenario, al ser solventes amigables con el medio ambiente y de grado alimentario. No obstante, los parámetros de temperatura y proporciones agua etanol para la extracción de polifenoles en semilla de palta aún no está definidos.

En particular, la semilla de palta variedad Zutano es una fuente natural de polifenoles aún no explorada a diferencia de otras variedades como la Hass y Fuerte, cuyos trabajos de investigación ya han permitido establecer los polifenoles presentes en su estructura. Por ello, nosotros consideramos que el uso de una fuente natural como la semilla de variedad Zutano no solo permitirá revalorizar este residuo agroindustrial sino también permitirá plantear estrategias para una futura producción a nivel industrial, así como mejorar a futuro los ingresos económicos de las familias y empresas dedicadas a su producción y consumo con la formulación de proyectos productivos que impliquen la recuperación de compuestos bioactivos.

1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En base a todos los párrafos antes mencionados se propone evaluar los parámetros de extracción tales como concentración de solvente (agua-etanol) y temperatura, como factores que afectan la recuperación de polifenoles de la semilla de palta variedad Zutano.

1.1.3. Interrogante general

- ¿Cómo afectan los parámetros del proceso de extracción convencional sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de semilla de palta (*Persea americana* Miller) variedad Zutano?

1.1.4. Interrogantes específicas

- ¿Cuáles son los parámetros adecuados de porcentaje de solvente (etanol) y temperatura que mejoran la extracción de los polifenoles presentes en semilla de palta (*Persea americana* Miller*)* variedad Zutano?

- ¿Cuáles son los parámetros adecuados de porcentaje de solvente (etanol) y temperatura que permiten la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante a partir de semilla de palta (*Persea americana* Miller*)* variedad Zutano?

1.2. ANTECEDENTES

Urraca (2015) determinó la capacidad antioxidante de semilla y cáscara de palta variedad Hass. Entonces, diferentes mezclas metanol:agua (100%, 75%, 0%) fueron usadas a 45° C por 1 hora en un proceso de extracción convencional. Sus resultados mostraron que el uso de altas concentraciones de metanol (100%) en semilla de palta favorece un 35% y 26% la recuperación polifenoles y capacidad antioxidante en comparación con el uso de agua pura bajo las mismas condiciones. Esto les permite interpretar que a diferencia de la molécula de agua que presenta un grupo -OH para interactuar con el grupo -OH del polifenol, el metanol presenta un grupo metilo y un grupo -OH los cuales favorecen las interacciones entre el anillo fenólico y grupo -OH del polifenol respectivamente..

Cabrera (2015) determinó la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de semilla de palta variedad Hass. En resumen, diferentes concentraciones de etanol (10%, 50% y 100%) a 30 °C por un periodo de 24 h fueron evaluadas. Los resultados muestran que existe una relación directamente proporcional entre el contenido de etanol en la solución y la concentración de polifenoles, cuyo maximo valor fue establecido con 100% de etanol (2274.2 mg EAG/gss).

Chávez (2011) determinó las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos de residuos de cáscara y semilla de palta. Diferentes concentraciones de metanol fueron evaluadas por un periodo de 3 días a temperatura ambiente. Obteniendo concentraciones importantes de

polifenoles totales (0.446 mg EAG/g semilla) y capacidad antioxidante (13.914 µM ET/g semilla).

Huamán (2014) evaluó el efecto de diferentes solventes orgánicos tales como acetona (75%), metanol (70%) y agua –combinados con diferentes tiempos de extracción (4, 8 y 12 horas) sobre el rendimiento de polifenoles totales de la harina de semilla de palta. Los resultados muestran que cuanto menor es la polaridad del solvente (agua > acetona > metanol) mayor será la recuperación de polifenoles totales. Adicionalmente, el tiempo prolongado de extracción permitió una mayor recuperación de estos compuestos.

Osorio (2013) evaluó el efecto de dos niveles de pH (6.8 y 4.5) en un proceso de extracción sobre la capacidad antioxidante de semilla de palta criolla. Un diseño de bloques bloques completos al azar (BCA) con medidas repetidas en tiempo con arreglo factorial 2 × 3 correspondiente a acidez (Natural y pH 4.5) y partes de la semilla. Los resultados indican el contenido de polifenoles de 2570 EAG/g a un pH de 6.8 y un tiempo de 2 horas. No se pudo observar efecto antioxidante de las partes de la semilla de palta.

Ali (2012) realizó la extracción de taninos a partir del polvo de vaina de tara, ésta materia prima en su cáscara presenta un alto contenido de taninos. Las vainas fueron deshidratadas a temperatura ambiente y a la intemperie del sol por un periodo de 5 días. Para la extracción de los taninos se utilizó lixiviación 90 % de agua y 10 % de solvente (metanol al 90 %, etanol al 90% y acetona al 85 %), durante 20 minutos a una temperatura de 50 °C. Los resultados indican que el uso de etanol:agua favorecen el contenido de taninos (62.4%). Se estableció que para

obtener mayores rendimientos la concentración debe ser de 40% de etanol y temperatura de 70 °C.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de diferentes temperaturas y concentraciones de etanol en un proceso de extracción convencional sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en los extractos obtenidos a partir de semilla de palta (*Persea americana* Miller*)* variedad Zutano.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las mezclas agua:etanol y moderadas temperaturas de extracción sobre el contenido de taninos presentes en los extractos de la semilla de palta (*Persea americana* Miller) variedad Zutano.

- Evaluar el efecto de las mezclas agua:etanol y moderadas temperaturas de extracción sobre el sobre la capacidad antioxidante de los extractos de la semilla de palta variedad Zutano a diferentes temperaturas y concentraciones de etanol.

1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Los compuestos antioxidantes son sustancias naturales presentes en diferentes matrices vegetales, capaces de prevenir el daño celular ocasionado por el estrés oxidativo (Romero et al., 2003). Los polifenólicos son un grupo particular de compuestos antioxidantes, los cuales se pueden clasificar como flavonoides y no flavonoides (Vázquez et al., 2012; Meng et al., 2012). En particular, la semilla de palta, un residuo agroindustrial no aprovechado por la industria alimentaria presenta importantes concentraciones de polifenoles tales como ácidos fenólicos y flavanoles de alto y bajo peso molecular. Siendo, los de alto peso molecular o taninos (proantocianidinas) los que presentan las propiedades bioactivas más importantes (Robbins, 2003; Araujo et al., 2018). Asimismo, estos compuestos son responsables de la astringencia y sabor amargo (Chávez, 2011). Por ello, diferentes trabajos han sido desarrollados con la finalidad de recuperar estos compuestos y aprovechar sus propiedades bioactivas y tecnológicas.

Por otro lado, a la fecha, los métodos convencionales solido-liquido combinado con el uso de solventes tales como metanol, acetona y hexano han sido propuestos como una alternativa para la obtención de polifenoles de diferentes matrices vegetales (Ivanovic et al., 2014). Sin embargo, debido a la toxicidad de estos solventes su uso posterior en futuras aplicaciones tecnológicas se ve restringida. En ese sentido el uso de solventes amigables con el medio ambiente como las mezclas agua-etanol prometen ser una alternativa de solución frente a este escenario, debido a que el etanol además de ser considerado un solvente de grado alimentario, también tiene la capacidad de reducir la polaridad del solvente y mejorar las interacciones polares y no polares entre los

polifenoles así como también el etanol es considerado un solvente de grado alimentario.

Por otro lado, es importante señalar que diferentes trabajos sobre la recuperación de polifenoles a partir semilla de la palta variedad Hass y Fuerte han sido desarrollados debido a su alto consumo comercial, desplazando a otras variedades de la zona como la variedad Zutano (Plaza et al., 2009). Entonces, considerando la relevancia tecnológica en la determinación de parámetros adecuados de extracción de polifenoles a partir de esta materia prima, también se debe mencionar que el estudio permitirá revalorizar esta variedad de palta en particular promoviendo su producción y aprovechamiento integral a través de métodos sustentables.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. BASES TEÓRICAS

2.1.1. Palta:

La palta (*Persea americana* Miller) es un fruto climatérico, tropical, cuyo contenido particular de ácidos grasos y polifenoles hacen de este fruto un interesante alimento (Devia, 2009). Este fruto es originario de México comúnmente conocido como aguacate. En países de América del sur tales como Perú, Chile y Argentina se le conoce con el nombre de palta (Téliz, 2007). Si bien, existen diversas variedades de palta, son pocas las variedades que se comercializan en los mercados locales y se exportan; entre las más conocidas comercialmente tenemos a las variedades “Fuerte”, “Hass”

La palta variedad Zutano ofrece resistencia al frío hasta 4.5 °C, no debe ser cultivado en suelos salitrosos (García, 2015) puede cultivarse hasta los 2500 m.s.n.m. (Herrera & Narrea, 2011).

En general la palta variedad zutano presenta un fruto ovalado a periforme, de piel delgada, color verde claro, lisa brillante y coriácea, cuyo peso promedio varía de 200 a 400 g, la semilla representa el 35% del peso del fruto (García, 2015). El pericarpio de la palta está formado de tres capas: exocarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpio junto a la cubierta seminal. El endocarpio se compone de

pocas capas de parénquima de células aplanadas tangencialmente que a menudo se adhieren a la testa (Chávez, 2011; Barrientos et al., 2006).

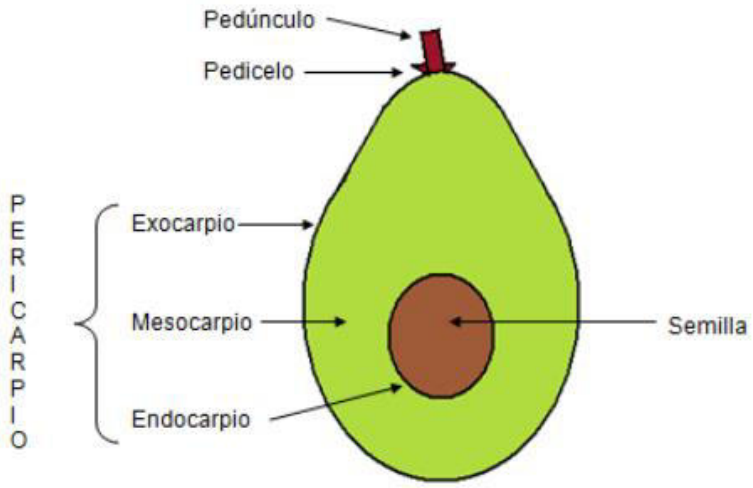


Figura 1. Partes del fruto de la palta
Fuente: Chávez. (2011)

2.1.2. Producción

Debido a la gran demanda internacional y al mayor precio de la palta "Hass", muchos productores han dejado de lado el cultivo de variedades tradicionales como la variedad "Fuerte". Sin embargo, existen otras variedades como la variedad zutano, la misma que es utilizada como polinizador de la variedad Hass y en España es utilizada como cortavientos (García, 2005).

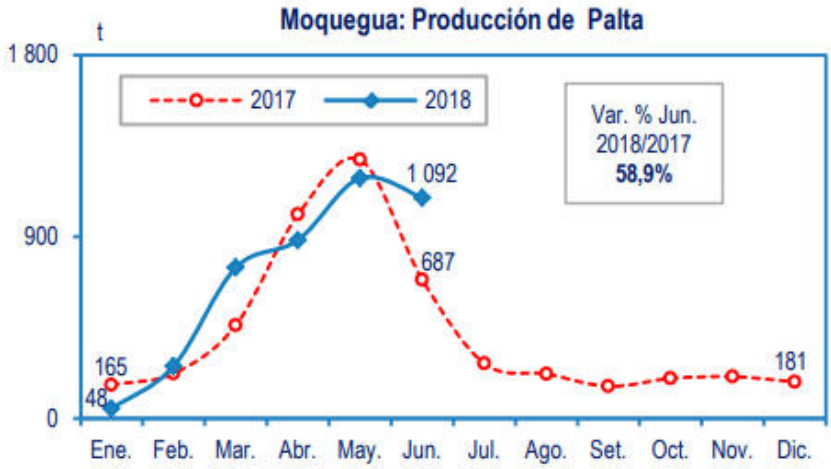


Figura 2: Producción de palta en Moquegua

Fuente: Ministerio de Agricultura y Riego (2018)

Según la Figura 2, la producción de palta en Moquegua alcanzó hasta junio del 2018 una producción de 1092 TM (Jáuregui, 2018). Para fines del 2019 la producción de palta incrementó un 41.4%, cosechando un total de ~1544 TM. (Jáuregui, 2019).

2.1.3. Semilla

La semilla de palta variedad zutano constituye alrededor del 18% del peso seco del fruto (Rengifo, 2014; García, 2015). Presenta una forma alargada, de mediana a grande (1.5 a 5 cm), con pesos que oscilan entre los 100 y 200 gramos, estas semillas son consideradas uniembrómicas. Es decir, (Figura 3) presentan un solo embrión recto, con una corta radícula superior orientada hacia el ombligo, encerrado en dos cotiledones carnosos y aceitosos desprovistos de albumen (García, 2012).

Según León (2000) los cotiledones se forman principalmente de parénquima que contiene importantes cantidades de almidón y taninos. La presencia de taninos puede ser detectada fácilmente por el cambio de color entre amarillo y rojo cuando reacciona con safranina (García et al, 2008).

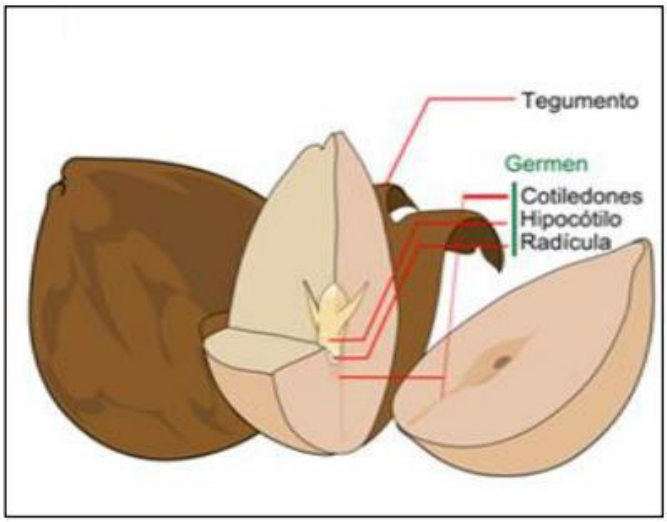


Figura 3: Partes de la semilla de palta.
Fuente: Barrientos et al., (2006)

2.1.4. Composición química de la semilla de palta

El conocimiento de la composición química del cotiledón de la semilla puede permitir la utilización de éstas como materia prima por las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas para el diseño y producción de alimentos nutracéuticos, cosméticos y suplementos nutricionales en bienestar del estado nutricional y la salud de algunos grupos etários de nuestra población (Rengifo, 2014). La tabla 1, presenta algunas características químicas de la semilla de palta.

Tabla 1

Composición química de la semilla de palta

Tamizaje fitoquímico	(mg/100 g de semilla)
Ácidos grasos	Linoleico, oleico, palmítico, esteárico.
Polifenoles	Catequina, isocatequina, (0.11), taninos (1.90)
Alcaloides	0.72
Saponinas	19.21
Esteroles	β-sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol

Fuente: Del Refugio et al., 2004; Dwaogu et al., 2008; Takenaga, 2008.

2.1.5. Compuestos bioactivos

De acuerdo a estudios epidemiológicos realizados, los alimentos de origen vegetal, en especial las frutas y vegetales, pueden ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades tales como cáncer, trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares (Hurtado & Ortiz, 2018). Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como la vitamina C, vitamina E, carotenos, y una mezcla compleja de compuestos polifenólicos (Cabrera et al., 2015).

Los compuestos bioactivos también conocidos como nutracéuticos o fitoquímicos, son componentes que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos. Los efectos beneficiosos de estos compuestos se han atribuido a su poder antioxidante y actividades de captación de radicales que pueden retrasar o inhibir la oxidación del ADN, proteínas y lípidos. Por otro lado, el contenido de compuestos bioactivos en las diferentes frutas va a depender del producto que se evalúe. Por lo general, la vitamina C se distribuye uniformemente en las frutas, los carotenoides se producen principalmente en la superficie de los tejidos, mientras que los compuestos polifenólicos se encuentran preferentemente en la cáscara y las semillas, y en una menor medida, en la pulpa (Hurtado & Ortiz, 2018).

2.1.5.1. Polifenoles:

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de los vegetales usados para su crecimiento y reproducción, actúan como agentes protectores frente a patógenos y condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros (Naczk & Shahidini, 2006).

La biosíntesis de los polifenoles tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Quiñones et al., 2012).

En particular, la ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano), mientras que la ruta

de los poliacetatos proporciona las quinonas y xantonas (Muñoz et al., 2007).

Es importante mencionar que la ruta del ácido siquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de los productos típicamente fotosintéticos, la figura 4 , detalla mejor la síntesis de estos compuestos.

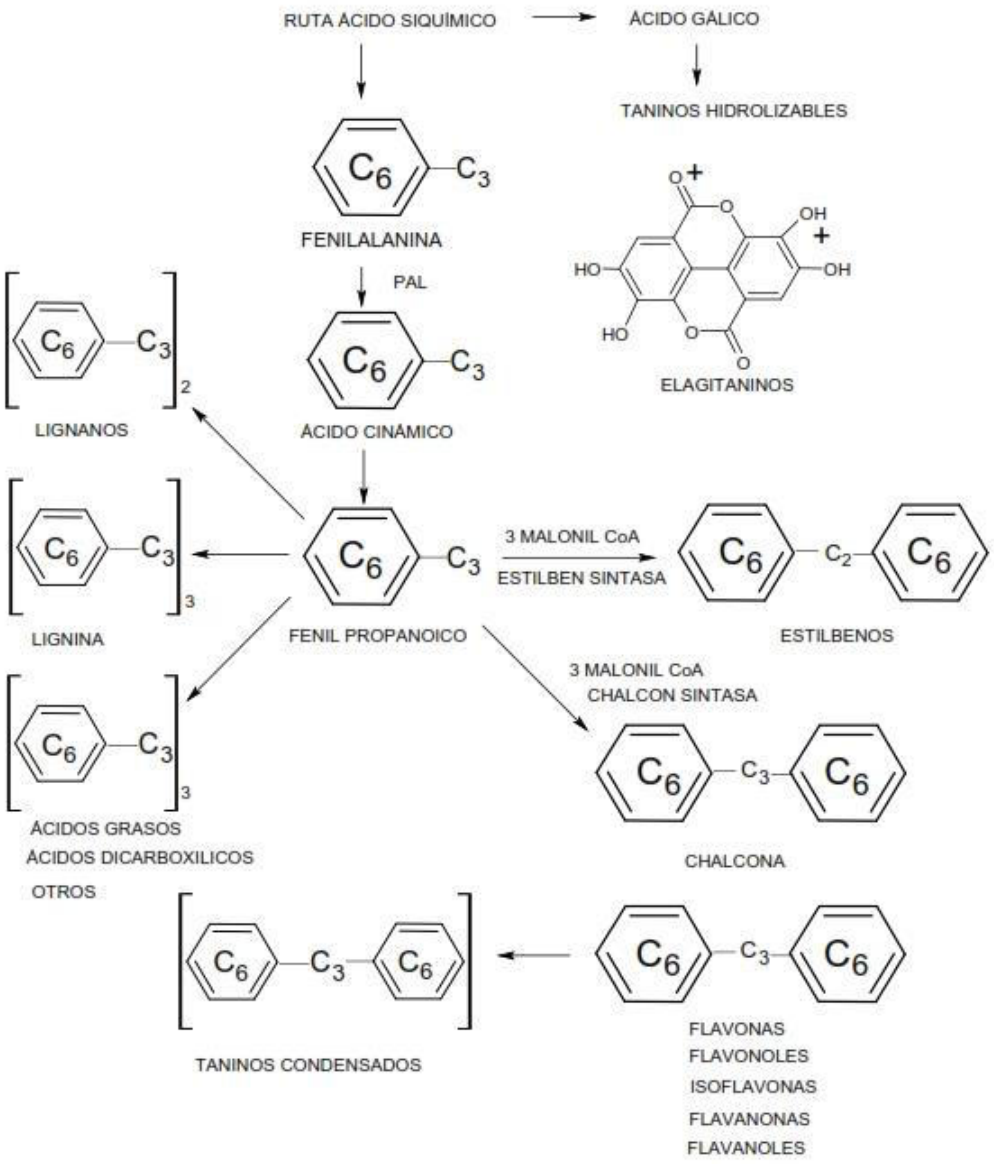


Figura 4: Ruta del ácido shikímico

Fuente: Arranz (2010)

Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en estructura química, pero es requisito principal que deben presentar un anillo fenólico el cual siempre debe estar hidroxilado (Vázquez et al., 2012). Estos compuestos pueden presentar estructuras simples (monómeros) hasta estructuras complejas (polímeros) cuyos pesos moleculares pueden alcanzar los 500 kDa (Figura 5 y 6) (Cheynier, 2005).

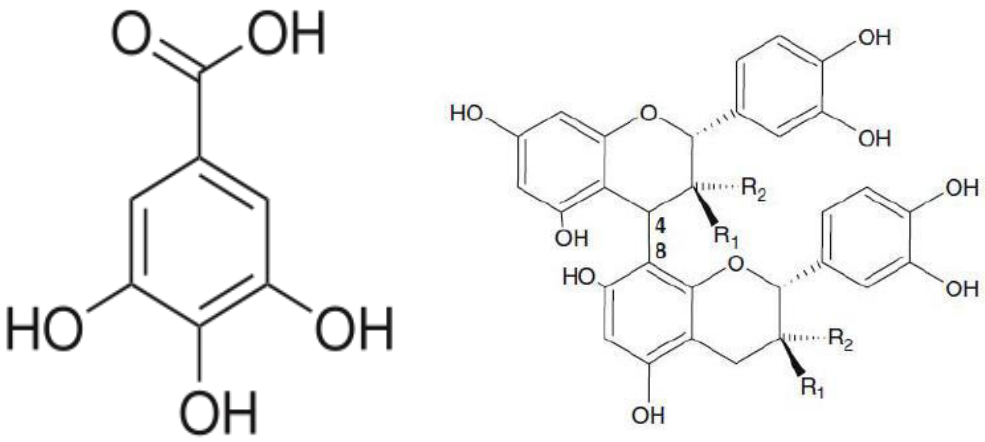


Figura 5: Estructura química de los compuestos polifenólicos
Fuente: Vázquez et al. (2012).

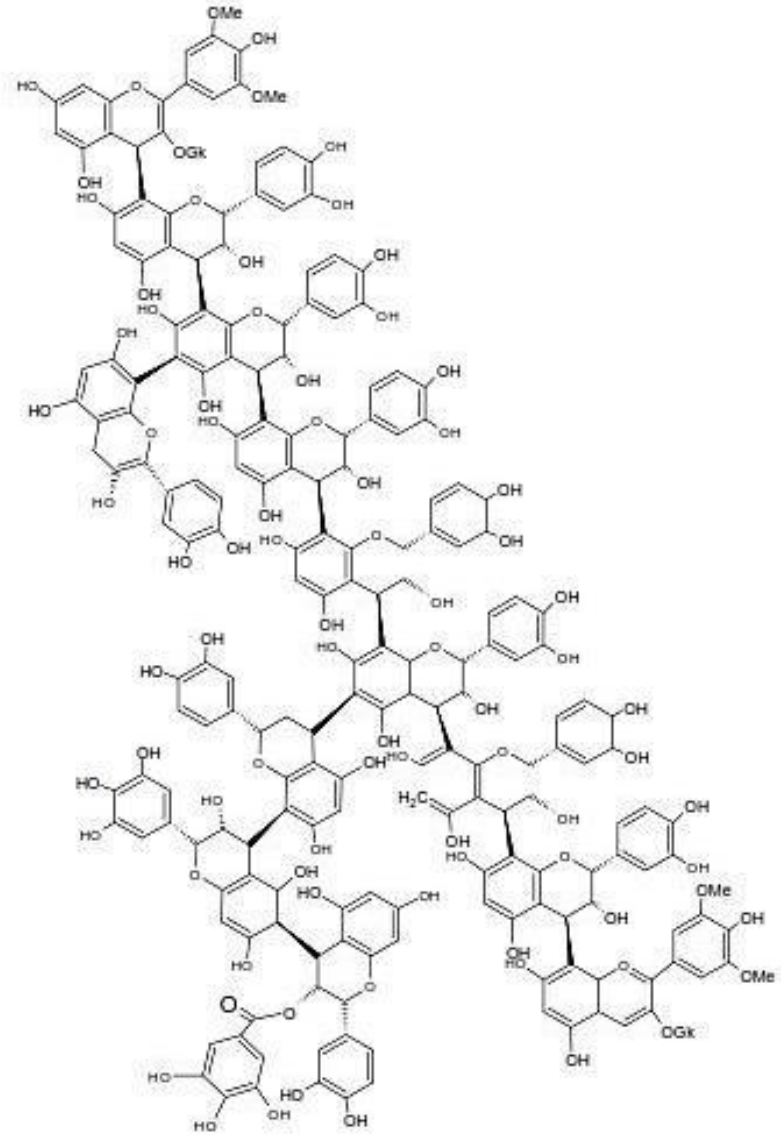


Figura 6: Monómeros, dímeros y polímeros polifenólicos

Fuente: Vázquez et al. (2012)

Los polifenoles pueden clasificarse en dos grandes grupos flavonoides y no flavonoides (Figura 7).

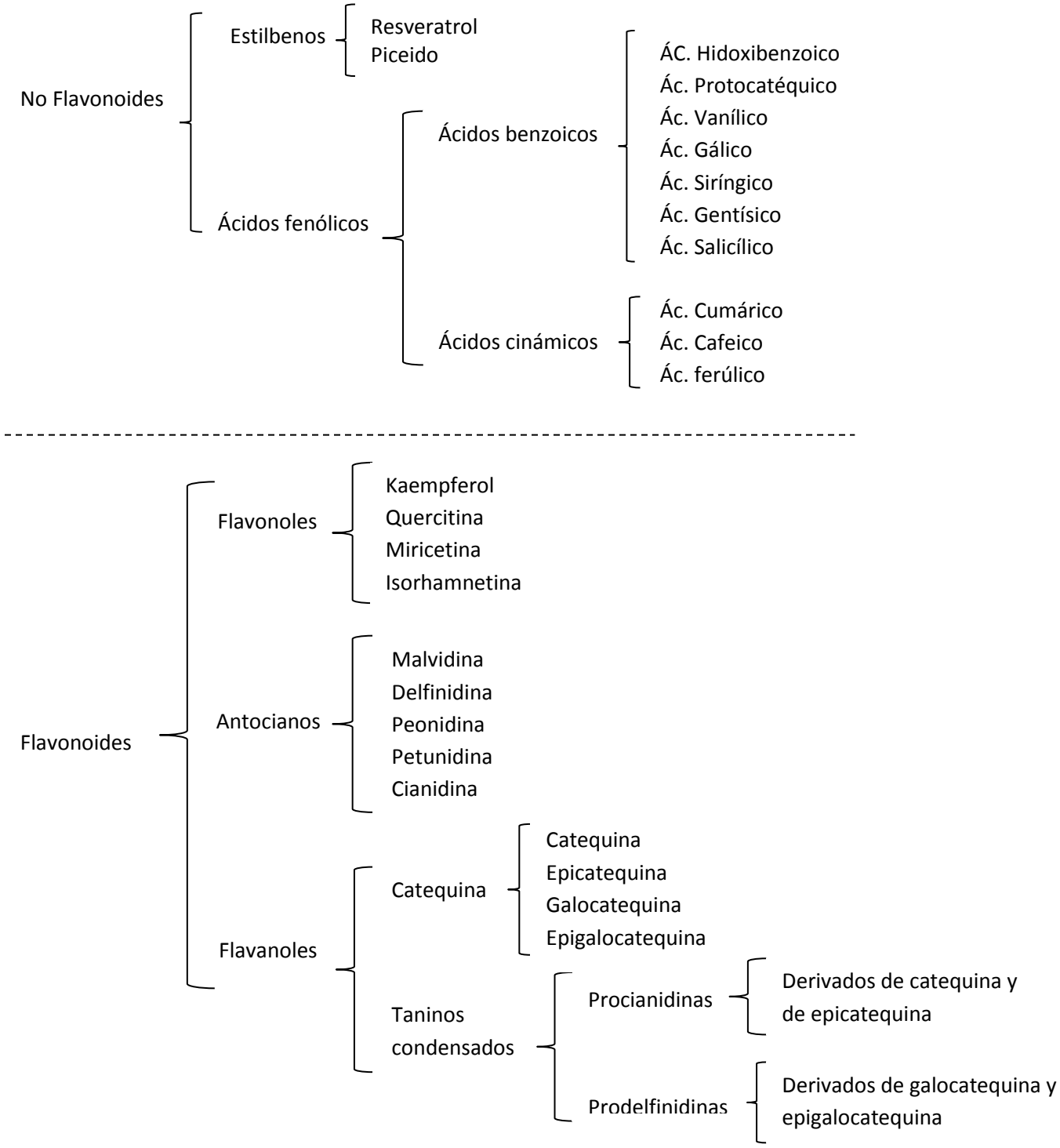


Figura 7: Clasificación de los polifenoles

Fuente: Vázquez et al. (2012)

Los flavonoides tienen un esqueleto químico que consta de tres porciones: dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico oxigenado (C_6 – C_3 - C_6), los cuales conforman el grupo más variado estructuralmente, debido a que su esqueleto base tiene numerosas posibilidades de sustitución por grupos hidroxilo (-OH), metoxilo (-O-CH_3), acilo (-CO), y glucósidos (Vázquez et al. 2012).

Ambos grupos, flavonoides y no flavonoides, se pueden encontrar formando compuestos de muy alto peso molecular (>500 kDa), llamados, en ambos casos, taninos. Sin embargo, cada grupo origina un tipo específico de taninos: los no flavonoides polimerizan para formar taninos hidrolizables, mientras que ciertos flavonoides, al polimerizar, forman taninos condensados (Cheynier, 2005).

Entre los polifenoles presentes en la semilla de palta tenemos a catequinas, isocatequinas, flavonoides, procianidinas (Del Refugio et al., 2004; Dwaogu et al., 2008; Takenaga, 2008). La tabla 2 presenta algunos polifenoles presentes en la piel, pulpa y semilla de palta.

Tabla 2

Perfil fenólico de piel, pulpa y semilla de palta

	Perfil fenólico (mg/100 g de peso seco)				
	Catequinas	Ácido Hidroxibenzoico	Ácido Hidrocianamínico	Flavonoles	Procianidinas
Piel	228.5	1.3	328.1	129.0	4183.5
Pulpa	3.3	34.6	11.3	<límite de detección	73.4
Semilla	237.8	<límite de detección	287.7	1.7	4592.0

Fuente: (Defilippi et al., 2015)

2.1.5.1.1. Taninos

El termino refiere a polifenoles de bajo y alto peso molecular, los cuales reaccionan de forma irreversible con algunas proteínas de la saliva humana (prolina) generando una sensación de astringencia (García, 2012).

Diversos trabajos de investigación han encontrado que los taninos presentes en la semilla de diversos frutos, presentan propiedades bioactivas interesantes debido a su elevada capacidad antioxidante (Defilippi et al., 2015; Isaza, 2007; Reed, 2010). Si bien el término de taninos hace referencia a un grupo específico de compuestos, los taninos son polifenoles de alto peso molecular y representan ~98% del total de polifenoles presentes en la semilla de palta, otro

2% está representado en su mayoría por ácidos fenólicos (Henry et al., 2015; Segovia et al., 2014; Araujo, et al., 2018).

Huamán et al., (2018) indica que los taninos son polifenoles de alto peso molecular, los cuales están galoilados con ácido gálico como unidad terminal, por lo cual el uso de ácido gálico como estándar de referencia es una medida fiable para la cuantificación de estos compuestos. Los taninos son compuestos que no solo poseen un elevado peso molecular, sino además presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confiere la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Redd, 2010). Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente. Por su parte, los taninos condensados o proantocianidinas, provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles (Fine, 2000).

En particular, la semilla de palta representa polifenoles o taninos ricos en monómeros de catequina, que son conocidos como procianidinas (Figura 8) (Araujo et al., 2018).

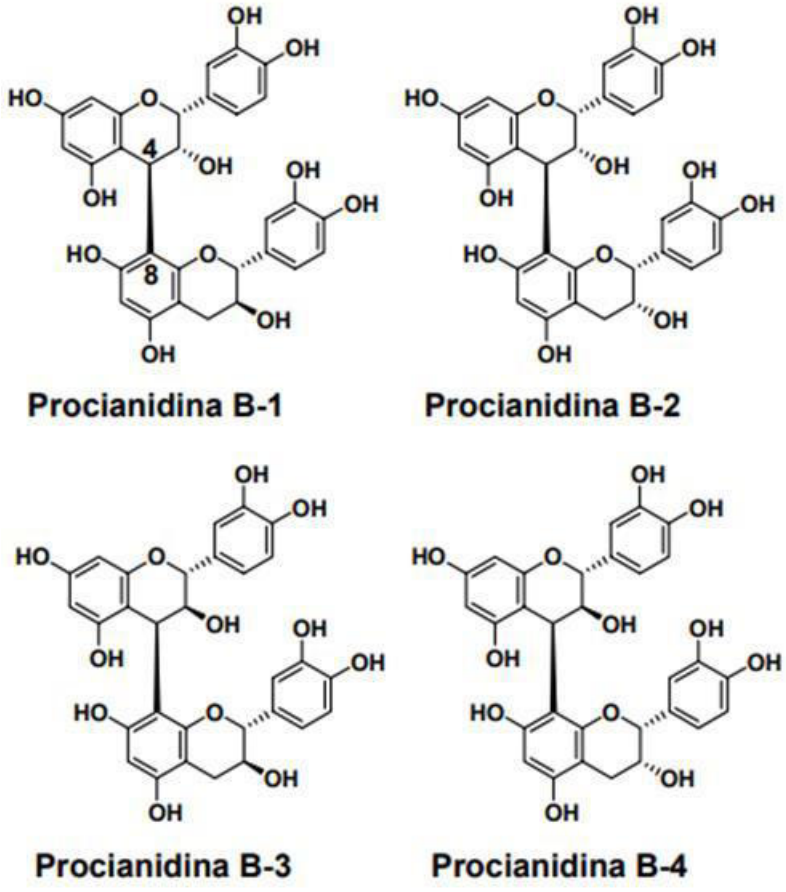


Figura 8: Polifenoles presentes en la semilla de palta

Fuente: Isaza (2007)

A) Propiedades físicas de los polifenoles

Solubilidad: Los polifenoles se disuelven en agua formando disoluciones coloidales, pero su solubilidad varía según el grado de polimerización. Son solubles en alcohol y en C=acetona. Las disoluciones acuosas poseen una estabilidad variable según su estructura, generalmente moderada. Como todos los fenoles, los taninos reaccionan con cloruro férrico. Precipitan de sus disoluciones

acuosas con sales de metales pesados y con gelatina. Los taninos hidrolizables y los condensados se pueden diferenciar con base en su comportamiento en medio ácido y en caliente (García, 2012).

Estabilidad térmica: Se debe prestar atención a su estabilidad térmica en altas temperaturas. En el caso de antocianinas, al ser sometidas a altas temperaturas (>50 °C) aceleran su proceso de degradación (Dai et al., 2009). Para compuestos termosensibles es preferible el uso de bajas temperaturas (Takeuchi et al., 2009).

Peso molecular: Los polifenoles presentan un peso molecular entre 500 y 3000 – 5000. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenil-pirano (C_6-C_3-C_6), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico (Quiñones, 2012). Las procianidinas se clasifican según su peso molecular expresado por el grado de polimerización (GP), dando origen a oligómeros (dos a cinco unidades, GP de 2-5) o polímeros (más de cinco unidades, GP > 5) (Serra et al., 2010).

2.1.5.2. Actividad antioxidante de los polifenoles y taninos

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena (Londoño, 2012).

Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes (Defilippi et al., 2015). La propiedad más importante de los polifenoles es la capacidad de oxidarse para dar quinonas (Figura 9) y la formación de un equilibrio oxido reducción (redox) (Huamán, 2014).

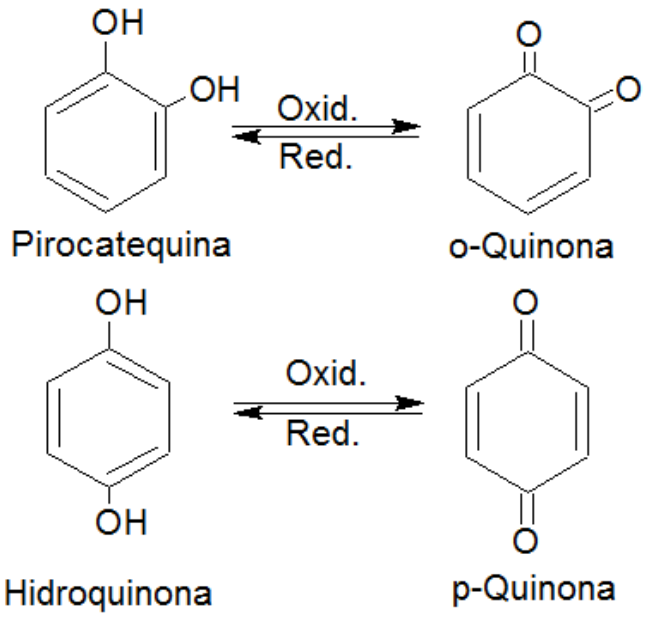


Figura 9: Oxido reducción de la pirocatequina y la hidroquinona
Fuente: Huamán (2014)

Efectos biológicos positivos de taninos condensados e hidrolizables

Ambos tipos de taninos, al ser compuestos polifenólicos, han sido tema de múltiples revisiones científicas, destacando su propiedad antioxidante in vitro e in vivo. Sin embargo, los taninos

hidrolizables, aunque se encuentran distribuidos ampliamente en plantas y son un parámetro muy importante de calidad de frutos, han recibido menos atención en lo que se refiere a su impacto a la salud. Esto posiblemente es debido a las dificultades en su identificación, aislamiento, purificación y cuantificación (Monagas et al., 2010). Debido a esto, es más fácil encontrar referencias que señalan mayor actividad biológica para los taninos condensados (Beecher, 2003).

a) **Taninos hidrolizables:** El más estudiado es pentagaloil glucosa (PGG), al que se le reconoce cierta actividad anti cancerígena, antidiabética y antioxidante en modelos experimentales in vitro. La actividad anti cancerígena in vivo de la PGG se ha probado para cáncer de próstata y pulmón. En ambos padecimientos, el suministro de PGG en dosis de 4 a 25 mg/kg de rata inhibe factores de crecimiento tumoral y vascular. No solo impide el crecimiento de tumores, sino también disminuye su tamaño, impidiendo procesos de angiogénesis (crecimiento vascular muy común en metástasis, y la supresión de la expresión de oncoproteínas. En cuanto a su actividad como antioxidante, en una concentración de 100 µg/mL, la PGG fue capaz de neutralizar in vitro especies altamente reactivas, como el superóxido y radical hidroxilo, así como disminuir la peroxidación de lípidos de membranas celulares (Zhang et al., 2009). Cabe mencionar que a concentraciones mayores, de 200-400 µg/mL, no se observa el mismo efecto. En este contexto, se observa una importante acción biológica del tanino hidrolizable PGG que puede representar una actividad alta a muy bajas concentraciones. Es importante considerar, además,

que los efectos fueron observados in vitro, por lo que, aunque estos estudios proporcionan una buena idea de su mecanismo de acción, muchas veces no reflejan del todo su actividad biológica

b) **Taninos condensados:** Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, además de que se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacterial o bacteriostático, anticarcinogénica, inhibidora de la peroxidación lipídica, y de la agregación plaquetaria relacionada a la formación de trombos en sistema circulatorio (Fine, 2000). In vivo se ha observado el efecto bacteriostático del jugo de arándano, atribuido a los taninos condensados presentes. El jugo de arándano no solo mantiene saludable el tracto urinario por la acidificación del medio, sino además las proantocianidinas presentes en el jugo exhiben actividad antibacterial, impidiendo la adhesión de Escherichia coli a superficies celulares del tracto urinario (Prior et al., 2005).

Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico): es un ácido fenólico natural con alta solubilidad en el agua, bajo costo, permite su empleo como estándar en la curva de comparación del ensayo de polifenoles totales (PFT), expresado como g de Equivalente de Ácido gálico (EAG) por unidad de peso o de volumen de la muestra analizada, generalmente por 100 g de peso fresco o 100 mL.

2.2.4. Métodos de Extracción de taninos

La extracción es un paso importante en la recuperación de los compuestos fenólicos. Sin embargo, actualmente no existe un método o un protocolo de extracción estándar, es este sentido el desarrollo de dichos métodos de extracción pueden proporcionar valiosa información para la caracterización de muestras (Dueñas, 2017).

Existen diferentes métodos para la extracción de bioactivos a partir de matrices vegetales, los métodos de extracción realizadas a presión atmosférica, con o sin agitación y temperatura utilizadas de manera general son considerados como método clásicos o convencionales (Corrales et al., 2009).

2.2.4.1. Extracción convencional (sólido-líquido)

El proceso de extracción de muestras sólidas con solventes (orgánicos) capaces de disolver la muestra, generalmente es conocido como extracción sólido-líquido, en el que se recuperan compuestos solubles mediante difusión desde una matriz sólida hacia una matriz líquida; siendo éste un método muy utilizado en la recuperación de compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales (Ballard, 2008).

Sin embargo, consumen mucho tiempo y requieren cantidades relativamente grandes de solventes (Fontana et al., 2013; Corrales et al., 2009). Así mismo, debido a las etapas prolongadas de extracción utilizadas por estas técnicas, como por ejemplo empleo

de altas temperaturas se produce una pérdida de compuestos fenólicos debido a la ionización, hidrólisis y oxidación durante el procedimiento de extracción (Dueñas, 2017).

Además, factores como el solvente de extracción y la relación muestra/solvente son relevantes para lograr buenas recuperaciones, especialmente teniendo en cuenta la naturaleza polar de dichos compuestos. También, el tiempo de extracción es determinante para obtener un mayor rendimiento, teniendo en cuenta que a mayores periodos de extracción pueden producir oxidaciones (Arranz, 2010).

Se plantea a las conocidas *tecnologías verdes* como una alternativa a los métodos tradicionales de extracción, ya que reducen el uso de disolventes, disminuyendo el impacto ambiental, y aceleran los procesos de extracción haciéndolos más eficientes (Ivanovic *et al*., 2014). Entre estas tecnologías se encuentran las extracciones asistidas por ultrasonido o microondas, o las que utilizan fluidos supercríticos.

A) Tiempo de Extracción

Huamán (2014), menciona que el tiempo de extracción o difusión está en función inversa a los factores de la temperatura y agitación, pero generalmente se da en el tiempo suficiente, como para lograr un buen contacto del sólido con el solvente.

Se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto a 24 horas, teniendo en cuenta que largos periodos de extracción

pueden producir oxidaciones que se minimizan añadiendo agentes reductores (Arranz, 2010).

B) Temperatura de extracción

La variación de la temperatura es directa en función a la velocidad de extracción, esto se debe a que el coeficiente de difusión aumente con el incremento de temperatura y ésta permite aumentar en la velocidad de extracción. El calor facilita el pase de agua a través de las membranas semipermeables de la estructura de los polifenoles totales (Arraz, 2010).

La extracción a temperaturas elevadas (>50 °C) afecta la estabilidad de los compuestos fenólicos, debido a la degradación enzimática, química y a las pérdidas causadas por la volatilización y la descomposición térmica (Gonzáles et al., 2010).

C) Tamaño de partícula

El proceso de la extracción se considera a las partículas de la matriz todas esféricas del mismo tamaño y el material extraíble uniformemente distribuido, los compuestos que se van a extraer se mueven a través de la matriz mediante un proceso similar a la difusión, la cual está definida mediante un modelo matemático de “hot-ball” de Bartle la cual indica la relación entre la masa de un compuesto que permanece en la matriz y la masa inicial a un tiempo. Indicando que una extracción más

efectiva se da con menores diámetros de partícula obteniendo mayores coeficientes de difusión (Señorans, 2012).

Paladino (2011), determinó en las extracciones utilizando solventes acuosos-orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (agua, metanol, acetona, etanol) se obtienen extractos con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos. Así mismo, de acuerdo a Fontana et al. (2013), la eficiencia del fenómeno de transporte de masa ocurrido durante el proceso de extracción convencional puede optimizarse mediante cambios en las gradientes de concentración, coeficientes de difusión, tipo de solvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción. Los compuestos fenólicos presentan naturaleza polar, debido a ello, estos son fácilmente solubilizados en medios próticos polares como pueden ser las soluciones hidroalcohólicas.

Diversas investigaciones realizadas sobre la recuperación de compuestos fenólicos en residuos agroindustriales determinaron que la manera más común de extraer estos compuestos es la utilización de soluciones generalmente hidroalcohólicas, aplicando elevadas temperaturas para poder liberar la mayor parte de los compuestos no extraíbles. Se cree que estos compuestos permanecen en el residuo asociados a componentes de la fibra dietética (polisacáridos) o bien formando complejos con proteínas o unidos entre sí formando compuestos de alto peso molecular. La utilización de soluciones hidroalcohólicas, por un lado, permite la liberación de los polifenoles unidos a la matriz vegetal y, por otro lado, permite la despolimerización de compuestos de alto peso molecular a compuestos de estructuras más sencillas, que puedan

ser cuantificados en base a patrones conocidos, aunque es posible también que se produzca la degradación de ciertas estructuras de compuestos fenólicos. La mezcla etanol-agua es el solvente comúnmente empleado para la extracción de compuestos bioactivos, siendo el etanol un solvente inocuo (aceptado por la FDA como solvente de grado alimenticio) y de fácil manipulación (Venanzi, 2014).

En los últimos años se han desarrollo métodos no convencionales, que fueron propuestos con éxito para la extracción de compuestos fenólicos. Estas técnicas se centran principalmente en acortar el tiempo de extracción, reducir el consumo de solventes orgánicos mientras se mantiene o incluso mejora la recuperación de estos compuestos de interés (Fontana et al., 2013).

2.2.5. Métodos de medición de taninos

A. Método de Reactivo de Folin Ciocalteu

Este método fue propuesto por Folin en 1962 y modificado por Singleton et al., 1965. Se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del polianión molibdotungstofosfórico para generar un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm.

Una de las modificaciones al método propuesto por Singleton implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en

equivalentes de ácido gálico (EAG). Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecúico y ácido ferúlico, lo cual imposibilita la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura (Londoño, 2012).

Todos los métodos hasta ahora publicados que emplean dicho reactivo, miden la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V) presente en el complejo molibdotungstato que caracteriza el reactivo de Folin Ciocalteu (Figura 10). Como resultado de tal reducción, el reactivo, de color amarillo, adquiere un intenso color azul, el cual es cuantificado espectrofotométricamente a 765 nm. Para calcular el contenido total de fenoles se utiliza una curva de calibrado con la elección de un determinado compuesto fenólico como estándar. Los resultados son expresados en términos de equivalentes molares del compuesto fenólico (mg EAG/g ms), idealmente éste debiera ser abundante en la muestra analizada (García, 2005).

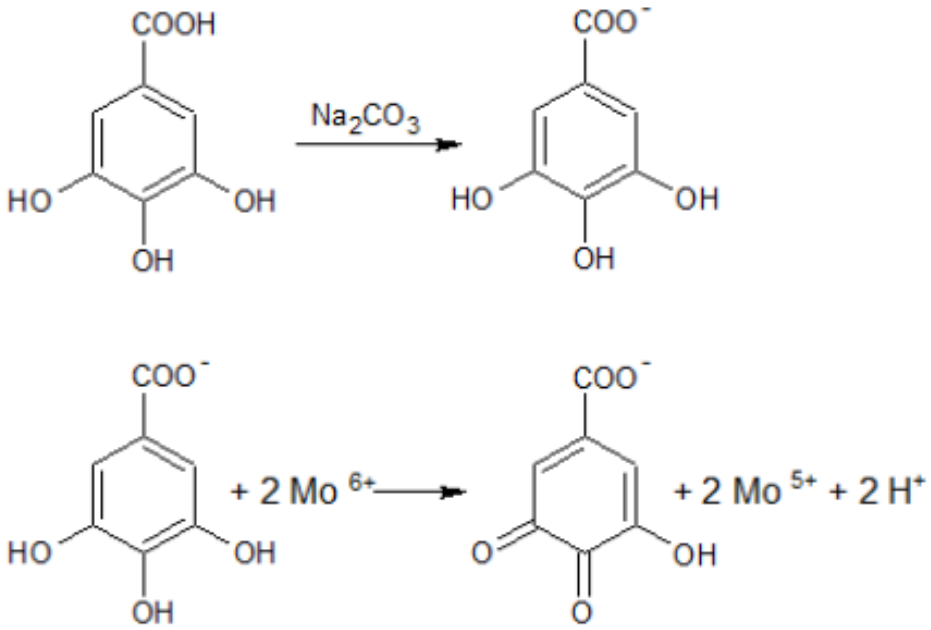


Figura 10: Reacción de Folin-Ciocalteu para la cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos

Fuente: De Oliveira et al., (2014)

A) Evaluación de la Capacidad antioxidante:

Orjuela (2015) indica que la capacidad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. La mayoría de los ensayos para determinar la capacidad antioxidante puede ser dividida en dos categorías:

- Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (TAH).

$$ROO- + AH \rightarrow ROOH + A-$$
$$A- + ROO \rightarrow ROOA$$

- Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (TE).

$$Oxidante + e- proveniente\ del\ antioxidante \rightarrow Oxidante\ reducido + Antioxidante\ oxidado$$

Para determinar los efectos antioxidantes de las fracciones de las especies obtenidas a partir del extracto etanólico se usan diferentes métodos dentro de los que se destacan dos métodos espectrofotométricos los cuales son, DPPH y ABTS+.

B.1. Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este ensayo propuesto originalmente por Brand – Williams et al., (1995) es una manera rápida y práctica de evaluar la actividad antiradical de los antioxidantes, sin embargo la toma de datos e interpretación de los mismos se deben hacer con precaución, la interacción de un potencial antioxidante con DPPH depende de su formación estructural, ciertos componentes reaccionan muy rápidamente con el DPPH, reduciendo el número de moléculas de DPPH correspondiente al número de grupos hidroxilos disponibles. La medición de la capacidad antioxidante por DPPH es el método más frecuente usado in vitro, aunque existen otros métodos, es el más sencillo, rápido y económico puesto que no requiere muchos pasos ni reactivos y puede ser usado para análisis en alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales (Alam et al., 2013).

El ensayo de DPPH es un método confiable para determinar la capacidad antioxidante de sustratos de origen biológico (Chen et al., 2013). La mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 minutos en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requeridos para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Mishra et al., 2012)

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula, por esto la molécula no se dimeriza. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece como se observa en la Figura 11. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tovar del Rio, 2013). Los resultados se expresan como EC_{50}, es decir, la concentración necesaria para estabilizar un 50% del DPPH.

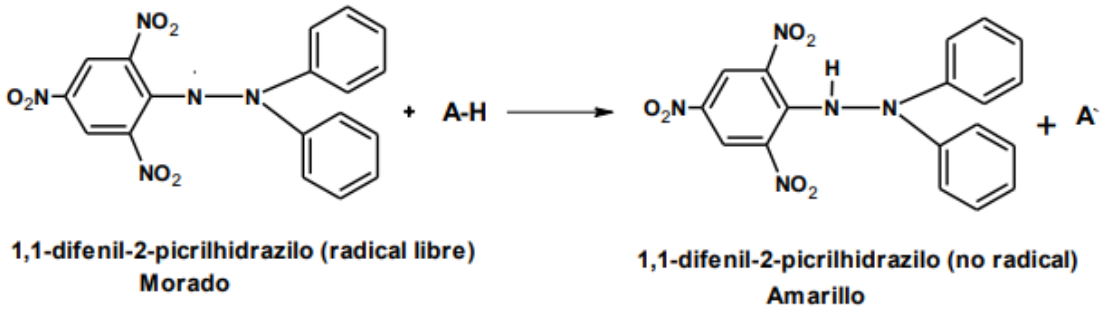


Figura 11: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Fuente: Alam et al., (2012)

Según Doroteo (2013) se calcula el porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%\text{Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Ac}}{\text{Ab}}\right) \text{x}100 \qquad \text{..... Ec. (1)}$$

Donde:

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

Ab= Absorbancia del control a 517 nm

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

$$\%\,\text{inhibición} = \text{mC} + \text{n} \qquad \text{..... Ec. (2)}$$

Donde el % de inhibición a la concentración C de muestra, y m y n son los coeficientes determinados en la regresión lineal.

Con la ecuación anterior, se determina el factor IC50, cantidad de antioxidante necesario para disminuir en un 50% la cantidad inicial del radical DPPH; reemplazando el % de decoloración por 50%:

$$IC_{50} = \frac{50-n}{m} \qquad \text{…… Ec. (3)}$$

La actividad antiradical se define como la cantidad de antioxidante necesario para reducir la concentración inicial de DPPH (IC50, concentración efectiva media) en un 50%, se obtiene de la recta obtenida al graficar el porcentaje de actividad antioxidante versus la concentración de la muestra (mg/mL).

Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyos espectro de absorción se solapa con la del radical; adicionalmente el DPPH es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales piróxilo no lo hacen así con DPPH, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que lo rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad (Londoño, 2012).

CAPITULO III

MÉTODO

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones de los laboratorios de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua, entre los periodos de marzo del 2017 a agosto del 2018, cuyo procedimiento experimental y análisis detallamos a continuación

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Tipo de Investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, el cual tiene por finalidad evaluar el efecto de dos factores estudio en un proceso de extracción convencional tales como temperaturas (50 °C y 70 °C) y concentración de etanol (30%, 60% y 90%, p/p) sobre las variables respuesta contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante a partir de la semilla de palta variedad Zutano.

Nivel de Investigación

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

3.2. MUESTRA

Tres kilogramos de semilla de palta variedad Zutano fueron adquiridos de los productores del Fundo Hass, Moquegua. Estas muestras corresponden a la campaña agrícola 2017. Después, las muestras fueron envasadas en bolsas de polietileno de alta densidad para su transporte y almacenamiento a -15 ± 3°C hasta su posterior análisis. Las muestras adquiridas fueron secadas a temperatura ambiente ~23° C bajo sombra por un periodo de 5 días, luego fueron almacenadas en bolsas de polipropileno con sellado hermético bajo refrigeración (6–10 °C) para su posterior acondicionamiento, extracción y análisis.

3.3. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1. Materiales de vidrio

- 02 varillas de vidrio de 30 cm
- 03 vaso precipitado de vidrio 250 mL
- 02 vaso precipitado de vidrio 100 mL
- 04 vaso precipitado de vidrio 50 mL
- 03 vaso precipitado de vidrio 25 mL
- 02 vaso precipitado de vidrio 10 mL
- 01 gradilla para tubos de 50 mL
- 12 fiolas de 10 mL
- 04 frascos de vidrio boca ancha con tapa rosca 1 L
- 01 pera de goma
- 01 pipeta graduada de vidrio 1 mL
- 01 pipeta graduada de vidrio 5 mL

3.3.2. Insumos y Reactivos

- Alcohol etílico grado analítico (>99.8%)
- Agua destilada
- Reactivo Folin – Ciocalteu (1 N)
- Carbonato de sodio al 10 %
- Estándar de ácido gálico
- Reactivo DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)
- Metanol 99.99%

3.3.3. Equipos:

- Centrífuga de mesa digital marca Centurion, modelo C 2004
- Agitador magnético marca Dragonlab, modelo M5-PB
- Termómetro digital marca BOECO, rango de medición de -10 a 150 °C
- Balanza analítica marca Radwag modelo WTC 2000, capacidad de 2000 g/0.01 g.
- Refrigerador marca Indurama
- Espectrofotómetro UV/VIS marca PerkinElmer, modelo Lambda 650

3.3.4. Otros materiales

- Molino de granos casero
- 01 piceta de 500 mL
- Jeringas descartables
- Papel filtro Whatman N° 40
- Papel aluminio
- 16 tubos de centrífuga 50 mL

3.4. PROCEDIMIENTOS

3.4.1. Metodología experimental

El presente trabajo de investigación plantea el uso de diferentes concentraciones de etanol para obtener extractos ricos en taninos a partir de semilla de palta. Luego, los extractos fueron analizados en función de su capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales, cuyos procedimientos se detallan a continuación.

a) Acondicionamiento

Las muestras almacenadas fueron molidas y/o reducidas en tamaño mediante un molino de martillo (Landers, modelo Corona, Perú) hasta un diámetro promedio de 2mm. Este valor fue establecido mediante el uso de un tamiz N° 24. Después las muestras molidas fueron envasadas en bolsas de polietileno de alta densidad y almacenadas (-15 ± 3°C) hasta su posterior análisis.

b) Extracción convencional (solido-liquido)

El proceso de extracción se realizó según la metodología propuesta por Ali (2012) con algunas modificaciones. Cinco (05) g de muestra previamente acondicionada de semilla de palta fueron mezcladas con 100 mL de diferentes proporciones de etanol (30%, 60% y 90%) a temperaturas de 50 y 70 °C por un periodo de 4 h bajo agitación constante (~500 RPM) (Figura 12). Luego, los extractos obtenidos fueron filtrados usando papel filtro Whatman N° 40. Finalmente, Los extractos filtrados fueron envasados en viales de color ámbar y almacenados bajo congelación (4 °C) para su posterior análisis.

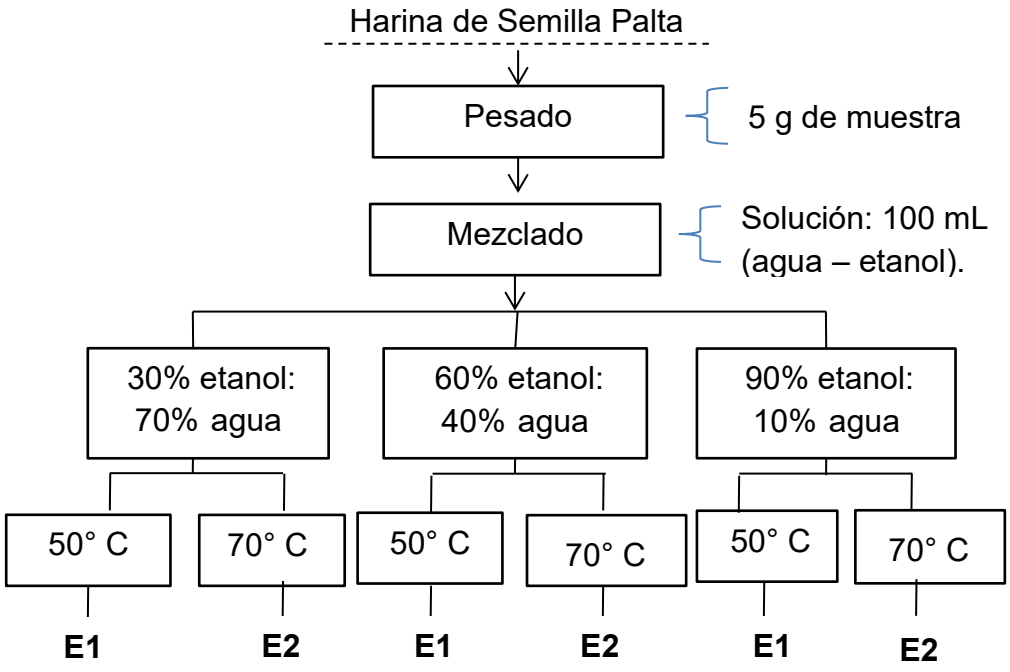


Figura 12: Proceso de obtención de extractos etanólicos

Donde E: representa los extractos etanólicos obtenidos

c) Determinación del contenido de polifenoles totales.

El contenido total de polifenoles presentes en los extractos etanólicos obtenidos a partir de la semilla de palta fueron determinados mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965). Un volumen de 3.75 mL de agua destilada, 0.5 mL de muestra de extracto y 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) se mezclaron con 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (10% p/v). Luego, las muestras fueron protegidas de la luz por un tiempo de 1 hora a temperatura ambiente. Después, la absorbancia de las muestras se determinó a

765 nm en un espectrómetro UV-visible. Paralelamente, bajo el mismo procedimiento descrito una muestra denominada blanco fue realizada, la misma que contiene 0.5 mL de agua destilada en reemplazo de los 0.5 mL de muestra de extracto. Entonces bajo las mismas condiciones se procedió con la lectura de su absorbancia.

Previamente, una curva estándar fue realizada usando acido gálico como polifenol mayoritario presente en los extractos etanólicos. Entonces, cinco (05) diferentes concentraciones de ácido gálico fueron preparadas entre 0 mg/L y 0.02 mg/L (Anexo3). Luego, bajo los mismos criterios establecidos por el ensayo de Folin-Ciocalteu se procedió a determinar las absorbancias de cada una de las concentraciones de ácido gálico. Los resultados permitieron construir una curva estándar (absorbancia versus concentración) y generar la ecuación de una recta (Figura 13).

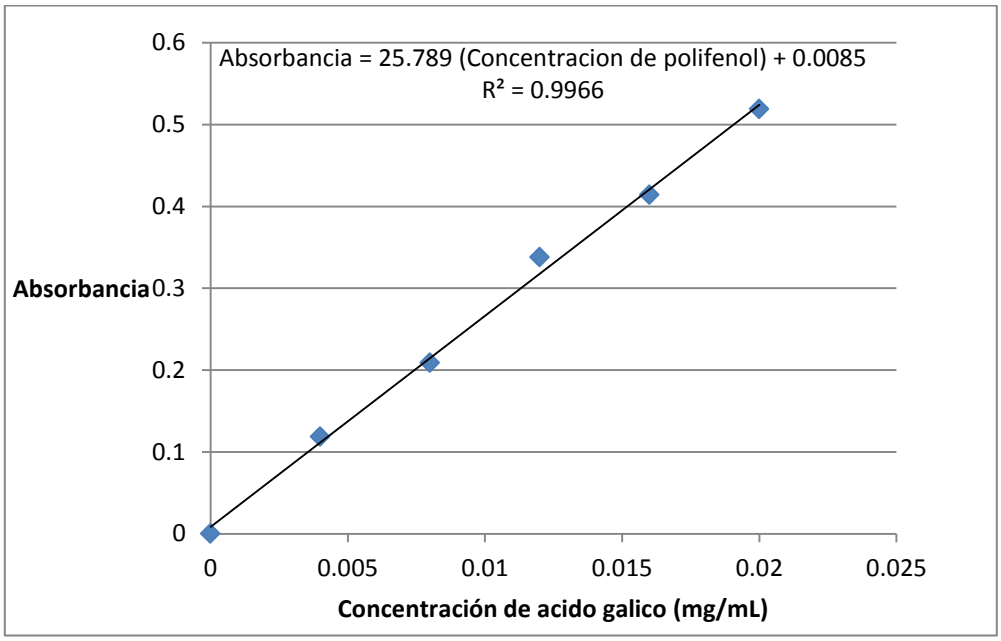


Figura 13: Curva estándar de ácido gálico

La ecuación de la recta permitió determinar el contenido total de polifenoles presentes en los extractos etanólicos de semilla de palta. Finalmente, los resultados fueron expresados como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por gramo de solido seco.

d) Análisis de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos etanólicos fue determinada según la metodología propuesta por Brand-Williams et al. (1995). En resumen, 1 L de una solución metanólica de DPPH (19.72 mg en 500 mL), fue preparada, protegida de la luz y almacenada bajo refrigeración. Previo a los análisis la absorbancia de la solución fue evaluada a 517nm, cuyos valores no deben pasar el umbral de absorbancia de 0.5, para que sea considerada una solución fresca.

Tres diferentes diluciones de los extractos polifenólicos fueron preparadas utilizando metanol como medio de dilución (1:10, 0.5:10 y 0.1:10). Luego 0.1 mL de cada dilución de fue agregada a un tubo de ensayo (en triplicado) junto con 3,9 mL de la solución metanólica de DPPH. Los tubos fueron agitados y se dejó reaccionar por un periodo de 30 min bajo la oscuridad a temperatura ambiente. Paralelamente fueron preparados un tubo que contiene solo una alícuota de 3,9 mL de metanol (blanco de la dilución) y otro 3,9 mL que contiene solo la solución metanólica de DPPH (control negativo). Finalmente, se midió la absorbancia a todas las muestras preparadas en un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 517 nm.

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

$$\%Inhibición = \left(1 - \frac{Ac}{Ab}\right) x100 \qquad \text{..... Ec. (4)}$$

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:

$$\%\, inhibición = mC + n \qquad \text{..... Ec. (5)}$$

Donde: el % de inhibición a la concentración “C” de muestra, y “m” y “n” son los coeficientes determinados en la regresión lineal.

Con la ecuación anterior, se determinó el factor IC_{50}, cantidad de antioxidante necesario para reducir en un 50% la actividad del radical DPPH:

$$IC_{50} = \frac{50-n}{m} \qquad \text{..... Ec. (6)}$$

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

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

Diseño experimental

Para evaluar el efecto de los factores en estudio en el proceso de extracción convencional tales como temperaturas (50°C y 70°C) y concentración de etanol (30%, 60% y 90%, p/p) sobre las variables respuesta contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante a partir de la semilla de palta variedad Zutano. Un arreglo factorial completo 2 x 3 con 3 repeticiones de cada análisis fue desarrollado (Tabla 3). En total 18 observaciones fueron analizadas mediante el programa Statgraphics Plus, Windows 4.0 (Statpoint Technologies, Inc., Virginia, E.E.U.U) que permitió determinar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación Tukey con un nivel de significancia al 5% (p-valor < 0.05)

Tabla 3

Diseño Experimental

Concentración De solvente (%)	Temperatura (°C)	Variables de Respuesta (Polifenoles totales y Capacidad Antioxidante)		
		R1	R2	R3
30	50	Y_{11}	Y_{12}	Y_{13}
	70	Y_{21}	Y_{22}	Y_{23}
60	50	Y_{31}	Y_{32}	Y_{33}
	70	Y_{41}	Y_{42}	Y_{43}
90	50	Y_{51}	Y_{52}	Y_{53}
	70	Y_{61}	Y_{62}	Y_{63}

- Modelo estadístico:

$Y_{ij} = u + \alpha_i + \beta_i + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$ …… Ec. (7)

Donde:

- Y_{ij} : es el valor observado en la i-ésima temperatura y j-ésima concentración de etanol
- μ: es el efecto de la media general
- α_i: es el efecto del i-ésima temperatura
- β_j: es el efecto del j-ésima concentración de etanol
- $(\alpha\beta)_{ij}$: es el efecto de la interacción de la i-ésima temperatura y j-ésima concentración de etanol
- e_{ij} : es el efecto del error experimental

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre el contenido de polifenoles

Los extractos polifenólicos presentan una amplia gama de polifenoles desde monómeros de bajo peso molecular hasta polímeros de alto peso molecular (Segovia, 2018). En ese sentido, determinar el contenido de cada polifenol en particular es una tarea muy compleja que demandaría muchos análisis de cromatografía liquida. Frente a este escenario, se han establecido métodos de cuantificación que permiten determinar de forma rápida el contenido de polifenoles totales como el método de Folin Ciocalteu, el cual fue propuesto por Singleton y Rossi (1965).

El método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Sin embargo, para poder medir el contenido de polifenoles totales presente en los extractos es necesario previamente construir una curva estándar usando ácido gálico como polifenol equivalente. Esto permite establecer una ecuación lineal que finalmente determinará el contenido de polifenoles totales presentes en los extractos obtenidos, los mismos que serán expresados como en mg de ácido gálico equivale/100 gr o mL de muestra.

La Tabla 4, muestra los resultados de absorbancia del presente trabajo cuyas concentraciones varían de 4 a 20 mg/L con absorbancias entre 0.11 y 0.52. Si bien las concentraciones de ácido gálico (polifenol equivalente)

usadas en este trabajo de investigación distan de otras concentraciones usadas en otros trabajos de investigación (Tabla 4), cuyas diferencias probablemente se deban a la pureza del polifenol equivalente al momento de preparar la curva estándar. Sin embargo, la ley de Lambert – Beer establece que los valores de absorbancia no deben superar el valor de 0.85 debido a la linealidad de la curva obtenida. En ese sentido podemos observar que nuestros parámetros están dentro del rango establecido.

Tabla 4

Comparación de los resultados de curvas de calibración versus otros autores

Tesis		Paladino (2007)		Dueñas (2017)	
mg/L	**Absorbancia**	**mg/L**	**Absorbancia**	**mg/L**	**Absorbancia**
0	0	0	0	0	0
4	0.1186	50	0.097	20.2	0.086
8	0.2089	10	0.2016	60.2	0.369
12	0.3378	150	0.2801	100.2	0.887
16	0.4141	250	0.4216	140.2	1.239
20	0.519	500	0.7878		

Otro aspecto importante de la construcción de la curva estándar es poder establecer una ecuación lineal que permita determinar el contenido de polifenoles presentes en los extractos polifenólicos obtenidos. Esta ecuación lineal debe ser validada mediante el ajuste del R^2 cuyo valor debe ser superior a 0.9 (Figura 14).

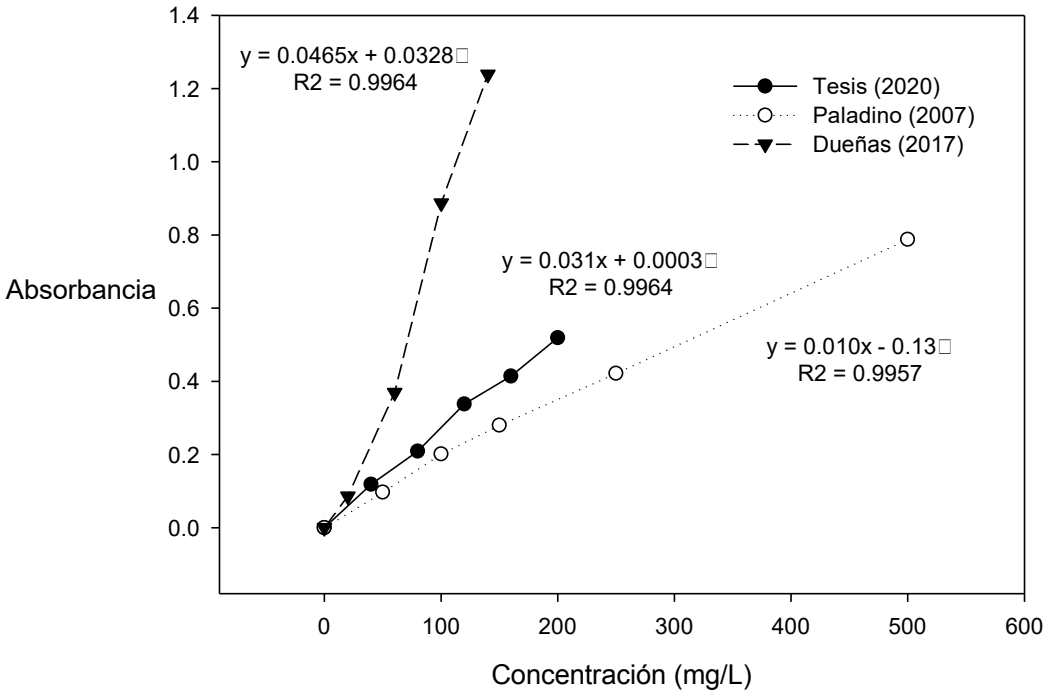


Figura 14: Regresiones obtenidas de la preparación de la curva de calibración

Los resultados del efecto de la temperatura (50°C y 70°C) y concentración de etanol (30, 60 y 90%) sobre el contenido de polifenoles se muestran en la Tabla 5. Un incremento en la temperatura de extracción de 50 a 70°C incrementa la recuperación de polifenoles totales expresados como mg de equivalente de ácido gálico por gramo de solido seco (EAG/gss) en un 23%, 36% y 31% para con las concentraciones de etanol de 30%, 60% y 90%, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5

Determinación del contenido de polifenoles

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Polifenoles (mg EAG/g)	Incremento (%)
30	50	$2.91^{a} \pm 0.27$	
	70	$3.58^{b} \pm 0.28$	23
60	50	$6.63^{c} \pm 0.85$	
	70	$9.04^{d} \pm 0.53$	36
90	50	$7.52^{e} \pm 0.42$	
	70	$9.87^{f} \pm 0.06$	31

El análisis de varianza ANOVA muestra que los factores estudio independientes (temperatura y concentración de etanol) así como sus interacciones presentan diferencias estadísticas significativas (p-valor <0.05) sobre la variable respuesta, consecuentemente se puede establecer que existe influencia de estos factores estudio sobre el contenido de polifenoles (Anexo 5). La prueba de comparación Tukey permitió establecer cuales medias son significativamente diferentes de otras, demostrando que existen 3 grupos homogéneos diferentes tales como A, B y C para la concentración de etanol de 30, 60 y 90%, respectivamente. Asimismo, este análisis de comparación también permitió definir que existen 2 grupos homogéneos diferentes A y B para la temperatura de extracción de 50 y 70°C respectivamente (Anexo 6).

El efecto positivo del uso de etanol sobre el contenido de polifenoles reportados en este trabajo (Tabla 4), también ha sido reportado por otros trabajos de investigación. Por ejemplo, Gómez et al. (2014), mencionan que

un incremento en la concentración de etanol de 40 a 80% mejora en un 16% y 32% la recuperación de taninos (polifenoles) usando temperaturas de 40 y 80 °C a partir de semillas de palta respectivamente. Al respecto, Do et al. (2014) mencionan que independiente de la temperatura, el uso de mezclas agua-etanol ha demostrado ser más eficiente en la recuperación de polifenoles en comparación con el uso de agua pura bajo las mismas condiciones, debido a una mayor afinidad del polifenol por el etanol.

Si bien el uso de agua pura como solvente de extracción permite tener un solvente de extracción polar (Ɛ=80) con una mayor afinidad por compuestos polares, la adición de etanol (Ɛ=24) permitiría reducir la polaridad del solvente favoreciendo la afinidad por compuestos medianamente polares como los polifenoles (Wei-Na and Jun-Hong, 2014; Waszkowiak and Gliszczynska-Swiglo, 2016). Esta reducción de polaridad en el solvente de extracción favorece las interacciones entre el polifenol y el solvente, debido a que el etanol presenta en su estructura química grupos hidroxilo (fracción polar) y un grupo etilo (fracción no polar), los cuales pueden establecer interacciones tipo puentes de hidrogeno y dipolo-dipolo inducido con los grupos hidroxilo y anillo fenólico de los polifenoles respectivamente (Galanakis et al., 2013).

De forma similar, los incrementos de temperatura durante el proceso también favorecieron la recuperación de polifenoles (Tabla 5). Al respecto, diversos autores mencionan que los incrementos de temperatura mejoran la difusión de las moléculas de solvente dentro de la matriz vegetal debido a un incremento en la energía cinética del solvente; esto permite que el solvente rompa la estructura de las células vegetales liberando los polifenoles a la solución (Gonzales et al., 2010; Escribano-Bailon and Santos-Buelga, 2003).

La mejor condición de extracción fue establecida con 70 °C y 90% de etanol a 500 rpm por un periodo de 4 h, cuyo valor promedio fue de 9.87 mg EAG/gss (Tabla 5). Los resultados obtenidos son relativamente menores en comparación con otros valores reportados por otros autores. Por ejemplo, Gómez et al. (2014), reportaron que el uso de etanol al 80% a 80 °C en un proceso de extracción convencional (2500 rpm, 100 min) permitió una recuperación de ~46 mg EAG/gss de taninos a partir de semilla de palta liofilizada variedad Hass. Estas diferencias encontradas en la recuperación de polifenoles probablemente se deban al tipo de conservación de la muestra previo al proceso de extracción, así como la particularidad de la variedad de la semilla de palta y las condiciones de proceso.

4.2. Efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre la capacidad antioxidante

El mecanismo de acción de los polifenoles sobre la actividad del radical DPPH, está relacionada con la capacidad de estos compuestos para reducir al radical, debido a que actúan como donadores de átomos de hidrógeno (Houhoula et al., 2003; Muñoz et al., 2007; Osorio, 2013). Entonces, la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos evaluada por el método de DPPH puede ser expresada como el factor IC_{50} (mL extracto/mL solución DPPH), que representa la cantidad de extracto necesario en mL para inhibir en un 50% la actividad de la solución DPPH (Brand-Williams et al., 1995)

Los resultados del efecto de la temperatura (50 °C y 70 °C) y concentración de etanol (30, 60 y 90%) sobre la capacidad antioxidante se muestran en la Tabla 6. Un incremento en la temperatura de extracción de 50 a 70 °C

reduce la cantidad de extracto necesario para inhibir la actividad del radical DPPH en un 8%, 6% y 47% para con las concentraciones de etanol de 30%, 60% y 90%, respectivamente (Tabla 6).

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que solo la concentración de etanol presenta diferencias estadísticas significativas (p-valor <0.05) sobre la variable respuesta, mientras que la temperatura y las interacciones (Etanol-Temperatura) no presentan diferencias estadísticas significativas (p-valor >0.05) (Anexo 9). La prueba de comparación Tukey realizada solo para establecer cuales medias en la concentración de etanol son significativamente diferentes de otras, demostraron que existen 2 grupos homogéneos diferentes A y B para los promedios obtenidos con 90% de etanol y con 30 y 60% de etanol respectivamente (Anexo10).

Tabla 6

Capacidad antioxidante presente en los diferentes extractos etanólicos

Etanol (%)	Temperatura (°C)	IC_{50}	Reducción (%)
30	50	1.81 ± 0.31	
	70	1.66 ± 0.10	8
60	50	1.31 ± 0.11	
	70	1.23 ± 0.44	6
90	50	0.42 ± 0.15	
	70	0.22 ± 0.09	47

IC_{50} = Concentración equivalente al 50% de Inhibición, ± Desviación estándar (n=3)

Según nuestros resultados, un incremento de temperatura de 50 a 70 °C usando etanol al 90% presenta no solo los promedios más bajos de IC_{50}, sino también permite una mayor reducción o inhibición de la actividad del radical DPPH en ~47%, en comparación con las otras condiciones de 60 y 70% de etanol (Tabla 6). Al respecto, Zhu et al. (2011) mencionan que un menor valor de IC_{50} indica una mayor capacidad antioxidante del extracto, el cual se ve favorecido por un incremento en la temperatura y concentración de etanol. Similar con nuestro comportamiento, Gómez et al., (2014) reportaron que un incremento de temperatura de 40 a 80 °C usando etanol al 80% favorece en un 50% la capacidad antioxidante en los extractos de semilla de palta, consecuentemente, un menor volumen de los extractos obtenidos con 80% de etanol serán necesarios para una mayor inhibición de los radicales libres.

Este efecto marcado del etanol sobre la capacidad antioxidante, probablemente se deba a su habilidad para reducir la polaridad del solvente y poder recuperar los compuestos antioxidantes como los polifenoles, no solo aquellos de bajo peso molecular (monómeros), sino también aquellos polifenoles de alto peso molecular como los taninos (Jiménez et al., 2005) (Galanakis et al., 2013). Por ello, diferentes estudios mencionan que cuanto mayor es el contenido de polifenoles en el extracto mayor será la capacidad antioxidante (Paladino, 2011; Arranz, 2010). En ese sentido, la Figura 15, muestra la relación que existe entre el contenido de polifenoles y el valor IC_{50}. Por tanto, cuanto mayor es el contenido de polifenoles menor es el valor IC_{50}, o dicho de otra manera cuanto mayor es el contenido de polifenoles, menos extracto será necesario para inhibir la actividad del radical DPPH en un 50%.

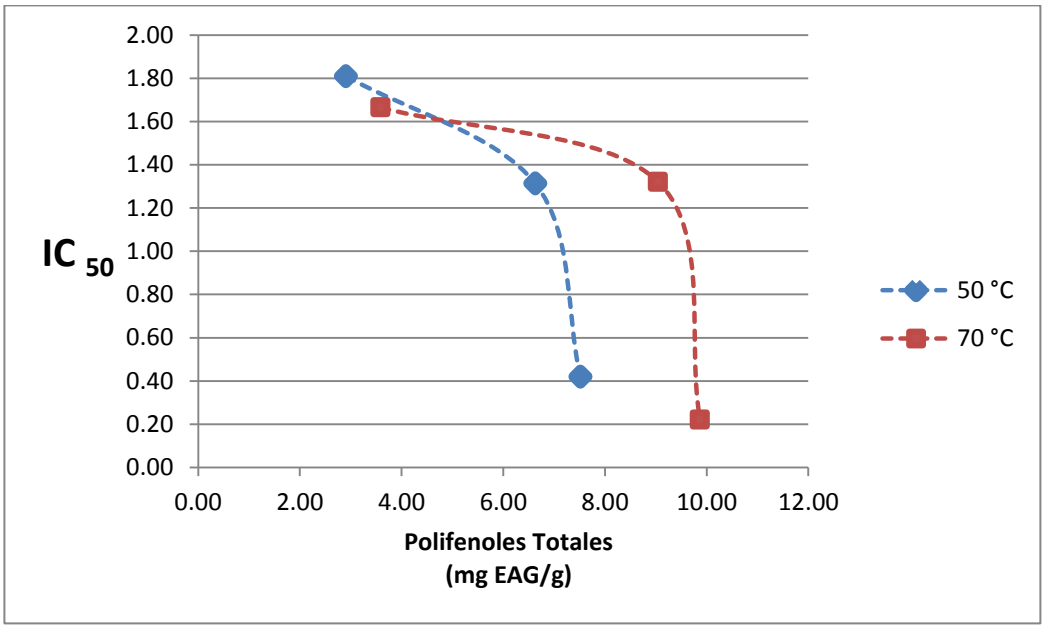


Figura 15: Relación entre contenido de polifenoles e IC_{50}

Finalmente, si bien algunos trabajos recomiendan el uso de mezclas acuosas tales como metanol, acetona y acetato de etilo para la recuperación de polifenoles de alto peso molecular, estos solventes no son de grado alimentario. Por ello, el uso de etanol, un solvente de grado alimentario es una alternativa atractiva para la recuperación de estos compuestos (Do et al., 2014a).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- La medición de la curva estándar del ácido gálico con concentraciones de 4 a 20 mg/L se obtiene absorbancias entre 0.11 a 0.52, presentando ciertas diferencias con respecto a otros autores, probablemente debido a la pureza del polifenol al ser preparado.

- Los incrementos en la concentración de etanol (30, 60 y 90%) y temperatura (50 °C y 70 °C) mejoran la recuperación de polifenoles entre un 23 y 36%, demostrando que el uso de mezclas agua etanol mejora la solubilidad de compuestos no polares como los polifenoles, consecuentemente, la mejor condición de extracción fue establecida con 90% de etanol a 70 °C, cuyo valor promedio fue de 9.87 mg EAG/gss.

- De manera similar al comportamiento reportado en la extracción de polifenoles totales, Los incrementos en la concentración de etanol (30, 60 y 90%) y temperatura (50 °C y 70 °C) favorecen la capacidad antioxidante en los extractos obtenidos. Esto permite una mayor inhibición del radical DPPH, el cual se ve representado por una disminución entre 6 y 47% del valor IC_{50}.

- Si bien se demostró que existe una relación directa entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, el uso del valor IC_{50} también nos permite evaluar en qué medida el extracto obtenido permite reducir la actividad de este radical libre.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

- Es importante realizar estudios con otros tipos de solventes (acetona, metanol y agua) a diferentes concentraciones como al 100% de solvente, temperaturas y tiempos de obtención de extractos fenólicos de la semilla de palta de la variedad Zutano para caracterizar más amplia los componentes, tipos de polifenoles y su asociación con otros elementos.

- Es recomendable para la cuantificación de fenoles totales utilizar otros métodos y realizar comparaciones para recabar mayor información.

- Para la capacidad antioxidante se recomienda realizar una comparación con el método espectrofotométrico del ABTS+ y otros más, con el fin de aportar información relevante al sector agroindustrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, M., Bristi, Nusrat, J., y Rafiquezzaman, M. (2012). Revisión de métodos in vivo e in vitro de la evaluación de la actividad antioxidante. Revista farmacéutica Journal. N° 21. Vol. 2. 143-152 p.

Ali, D. (2012). Extracción de taninos (ácido gálico) a partir del polvo de vaina de tara (Caesalpinia spinosa). Tesis (Ingeniero Agroindustrial). Puno, Perú. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ciencias Agrarias. 23 p.

Arranz, M. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis para optar el grado de doctor en Farmacia y Bromatología, Universidad Complutense de Madrid. España – Madrid.

Arranz, S., Silván, J. M., & Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition and Food Research*. https://doi.org/10.1002/mnfr.200900580

Arukwe, V., Amadi, B. A., Dun, M., Agomuo, E. N., Adindu, E. A., Odika, P. C., Lele, K. C., Egejuru, L. and Anukike, J. (2012). Composición química de la hoja, semilla y pulpa de Persea Americana. 11(?): 346-349. Nigeria.

Ballard, T. (2008). Optimización de antioxidantes de la extracción de compuestos fenólicos de piel de maní. Tesis (Ingeniería de Sistemas Biológicos). Facultad de Virginia, Instituto Politécnico y Universidad Estatal. 25-37 p.

Barea, M. (2015). Caracterización, capacidad antioxidante y perfil fenólico de frutas subtropicales producidas y comercializadas en la costa de Granada-Málaga. Tesis (Doctoral en Nutrición y Tecnología de los Alimentos). Universidad de Granada.

Barrientos, A., García, E. y Avitia, G. (2006). *Anatomía del fruto de aguacate ¿drupa o baya?* Revista Chapingo serie horticultura. N° 2.

Beecher, G. (2003). Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, ocurrence and intake. Journal of Nutrition 133:3248s-3254s.

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

Bressani, R., Rodas, B. y Silvia de Ruiz, A (2009). La composición química, capacidad antioxidativa y valor nutritivo de la semilla de variedades de Aguacate. Proyecto FODECYT No. 02-2006. 23 p. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala

Cabrera, J., Dilas, L. D. y Minchán, L. I. (2015). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de la

semilla de Persea americana Miller Var. Hass “Palta”. *Revista Perspectiva*. N° 16(18). 209-219 p.

Chavez, P. (2011). Evaluación antioxidante y antimicrobiana en extractos de residuos de aguacate. Tesis (Maestro en Ciencias en Recursos Naturales). Obregón, Sonora. Instituto Tecnológico de Sonora. 34 p.

Cheynier, V. (2005). Los polifenoles son más complejos de los que a menudo se enseña. Revista Americana de Clínica de Nutrición. N°81. 223-229 p.

Chen, Z., Bertin, R., y Froldi, G. (2013). Estimación de EC 50 de la actividad antioxidante en el ensayo DPPH utilizando varios programas estadísticos. Química de los alimentos. N° 138 (1). 414-420 p.

Corrales, M., García, A., Butz, P., Tauscher, B. (2009). Extracción de antocianinas de pieles de uva asistidas por alta presión hidrostática. Revista de Ingeniería de Alimentos. N° 90 (4). 415 p.

Dabas, D., Shegog, R., Ziegler, G., Lambert, J. (2013). Avocado (Persea americana) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. Current Pharmaceutical Design. Vol. 19. N° 34. 6133-6140 p.

De Oliveira, S., Alves, G., Rodrigues, C., Alves, T., Silva, E. (2014). Evaluación de ensayos antirradicales utilizados para determinar la capacidad antioxidante de compuestos puros y extractos de plantas. Revista Química Nova . N° 37. Vol. 3. 499 p.

Defilippi, B., Ferreyra, R y Rivera, S. (2015). Optimización de la calidad de la palta “Hass”. Herramientas para emprender nuevos desafíos. Boletín Instituto Nacional de Ingeniería Agraria. N° 307. Chile.

Del Refugio M, Jerz G, Villanueva S, López-Dellamary F, Waibel R, Winterhalter P. (2004). Two glucosylated abscicic acid derivates from avocado seeds (Persea americana Mill. Lauraceae cv. Hass). Phytochem 2004; 65(7):955–962.

Devia, J. (2009). Innovación para el desarrollo de productos. Grupo de Investigación, desarrollo y diseño de procesos y productos. N° 122. 13 p. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.

Do, Q., Angkawijaya, A., Tran-Nguyen, P., Huynh, L., Soetaredjo, F., Ismadji, S., Ju, Y. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. *Jurnal of Food and Drug Analysis.* 22(3). 296-302. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001

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

Doroteo, V., Díaz, C., Terry, C., Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú. Vol. 79. N° 1. Lima, Perú.

Dueñas, J. (2017). Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido. Tesis (Magíster en Química). Pontificia Universidad Católica del Perú. Ica, Perú. 27- 33 p.

Dwaogu, L., Alisi, C., Ojiako, O. (2008). Studies on the nutritional and phytochemical properties of Persea Americana seed. Bio-Research. 6 (1): 320-322

Fine, A. (2000). Complejos de proantocianidinas oligoméricas: historia, estructura y aplicaciones Fito farmacéuticas. Revista de Medicina Alternativa. 55:144-151.

Fontana, A., Antoniolli, A., Bottini, R. (2013). El orujo de uva como fuente sostenible de compuestos bioactivos: extracción, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de fenólicos. Revista de Agricultura y Química Alimentaria. N° 61(38). 8987-9003 p.

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

García A. (2005). Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Murcia. España.

García, E. (2012). Extracción y caracterización fisicoquímica de la fracción colorante de la semilla de aguacate (*Persea americana* Miller) a nivel laboratorio. Universidad se San Carlos Guatemala. Guatemala.

García, E., Fernández, I., Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por l método de Folin Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia. 5 p.

García, J., Ramos, M., y Mora-Galindo, J. (2008). Estructura de la semilla de aguacate y cuantificación de la grasa extraída por diferentes técnicas. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. México.

Gómez, F., Peiró, S., Gallego, M., Mohd, N., Almajano, M. (2014). Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Us as Antioxidant in Food. Open Access antioxidants. N° 3. 439-454 p.

González, R., Gloria, M. y González, M. (2010). Antioxidant activity in banana pee extracts. Revista de *Química de los Alimentos*. Vol. 119(3):1030-1039.

Herrera, M y Narrea, M. (2011). Manejo integrado de palto. 5 p. Moquegua

Huamán, M. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos con solventes orgánicos, agua y el tiempo de extracción en el rendimiento de polifenoles totales de la harina de semilla de palta (*Persea americana*). Tesis para obtener el título de ingeniero en industrias alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo.

Huaman, N., Mariotti, M., Perez, J. (2018). Polifenoles de uva Carmenere. Revista de Química Orgánica. Chile. N° 14. 176-186 p.

Isaza J. (2007). Taninos o polifenoles. Scientia et technica año XIII. Universidad Tecnológica del Perú. ISSN 0122-1701. N° 33.

Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S., Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extracr from blacberry cultivar “Čačanska Bestrna”. Industrial Crops and Products. Vol. 53. 274-281 p.

Jáuregui, E. (2018). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú: Panorama Económico Departamental. Informe Técnico N° 8 – Agosto 2018. Perú.

Jiménez, M., Lazo, E. (2005). Determinación de taninos en epicarpio de *Persea americana* G. (AGUACATE), Corteza de *Psidium guajava* L. (GUAYABO) y Semillas de *Vitis vinífera* DC. (VID). Para optar el título en Licenciatura en química y farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador.

Jurado, B., Aparcana, I. M. y Villareal, L. S. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (Physalis peruviana L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la sociedad Química del Perú*. 82 (3): 272-279. Lima.

Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad antioxidante. Programa de Ingeniería de Alimentos. Corporación Universitaria Lasallista.

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

Massaro, C. (2009). Características generales de las paltas. Boletín de los consumidores. N° 129. Chile.

Mendoza, M., Castillo, L., Moreno, S., Pacheco, M., Tapia, L. (2018). Elaboración del aceite de palta. Trabajo de Investigación para optener el Grado Académico de Bachiller. Universidad San Ignacio de Loyola. Lima.

Meng, J., Fang, Y., Zhang, A y Gao, J. (2012). Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Wine Produced from Spine Grape (Vitis davidii foex) and Cherokee Rose (Rosa laevigata michx.). Journal of food science. Vol. 71(1).

Mishra, K., Ojha, H. y Chaudhury, N. (2012). Estimación de las propiedades antirradicales de los antioxidantes mediante el ensayo DPPH: una

revisión crítica y resultados. Química de los alimentos. 130 (4), 1036-1043.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez, C., Andres, C., Bartolomé, B (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. Food Functio 3:233-253

Montañés, F. (2009). Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la purificación de carbohidratos prebióticos. Tesis (Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos). Universidad Autónoma de Madrid.

Moreno, J. (2013). Extracción de compuestos antioxidantes del gel de Aloe Vera. Optimización del proceso mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta. Universidad de las Islas Baleares. España.

Muñoz, A. A., Fernández, A., Ramos, F. y Ortiz, C. A. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Revista Sociedad Química del Perú.* 73(1): 30-40. Perú.

Muñoz, M. A. y Gutierrez, D. M. (2007). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol Nicotiana Glauca. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Queretano. 3p.

Muñoz I. y Soto V. (2005). Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de vitis vinífera en aortas de rata sometida

a estrés oxidativo. Tesis para optar el título de Licenciado en Kinesiología. Universidad de Chile, Facultad de Medicina. Chile.

Naczk, M. and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruit and vegetales: ocurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed*. Anal. 41(¿): 1523-1542.

Naczk, M. y Shahidi, F. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press. Londres. Pp. 1-16.

Orjuela, A. (2015). Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de Chromolaena perglabra (b. l. robinson) R.M. King & h. Robinson. BOGOTÁ D. C.

Osorio, G. (2013). Evaluación del defecto de dos niveles de pH en la capacidad antioxidante de la semilla de aguacate criollo (Persea americana Mill.). Tesis (Ingeniero en Agroindustria Alimentaria). Zamorano, Honduras. Carrera de Agroindustria Alimentaria.

Osorio, T., Meireles, A. (2013). Aplicaciones recientes de extracción de fluidos a presión: Extracción de curcuminoides con líquidos presurizados. Revista de alimentos y Salud Pública. N° 3 (6). 289-303 p.

Paladino, S. (2011). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinífera* L.). Tesis para obtener el grado académico de Magister en Alimentos. Rioja, San Martín.

Prior, R.L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal Agriculture Food Chemistry. 53: 4290-4302.

Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Departamento de Farmacología. Universidad Complutense. Madrid – España.

Reed, J. (2010). Toxicología nutricional de taninos y polifenoles relacionados en leguminosas forrajeras. Revista de Ciencia Animal. 73: 1516-1528 p.

Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. Vol. 51. 2866-2887.

Romero, M., Doval, M., Sturla, A. y Judis, A. (2003). Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada.

Santos, M. (2015). Cultivo de aguacate (*Persea americana* Miller), fruta de extraordinarias propiedades alimenticias, curativas e industriales (Primera parte). Boletín Mensual – Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. N° 40.

Segovia, F., Hidalgo, G., Villasante, J., Ramis, X., Almajano, M. (2018). Avocado Seed: A Comparative Study of Antioxidant Content and

Capacity in Protecting Oil Models from Oxidation. Journal Molecules. 10.3390/molecules23102421

Señorans, J. (2012). *Nuevas técnicas de preparación de muestras*. Área de tecnología de alimentos – Universidad Autónoma de Madrid.

Serra, A., Macia, A., Romero, M., Valls, J., Blade, C., Lluı´s, A., Motilva, M. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in vitro and in vivo models. British Journal of Nutrition. N° 103. 944–952 p.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, C., Bryan, M., Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. Food, Agriculture & Environment. Vol. 1(2). 42-47 p.

Singleton, V. and Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungtic acid reagents. *Am J. Enol Vitc*. 16(?):144-158)

Takenaga F, Matsuyama K, Abe S, Torii Y, Itoh S. (2008). Lipid and fatty acid composition of mesocarp and seed of avocado fruits harvested at northern range in Japan. J Oleo Sci 2008; 57(11):591–597.

Takeuchi, T., Pererira, C., Braga, M., Maróstica, M., Leal, P., Meireles, A. (2009). Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assited, and ultrasound assited) from condimentary plants. In Meireles, M. ed. 2009. Extracting bioactive compounds for food products. CRC Press, Florida. 138 – 211 p.

Teliz, D. (2007). El aguacate y su manejo integrado. México: Mundi – prensa.

Thamizhiniyan, V., Young-Woong, C., Young-Kyoon, K. (2019). Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of *Pinus densiflora* Bark Extact. BioMed Research International. https://doi.org/10.1155/2019/3520675

Tovar del Rio, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. PEREIRA.

Tremocoldi, M., Rosalen, P., Franchin, M., Massarioli, A., Denny, C., Daiuto, E., Rizzato, J., Melo, P., De Alencar, S. (2018). Exploratio of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. Plos One. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192577 Universidad de Sao Paulo. Sao Paulo, Brazil.

Urraca, C., Soto, C. y Zúñiga, M. (2015). Propiedades antioxidantes de residuos (semilla y cáscara) de la agroindustria de palta (Persea americana Mill, Avocado) en Chile. GORE VALPARAISO-CONICYT Programa Regional R12C1001. Valparaíso, Chile. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall, A., De La Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. Artículo arbitrado en alimentos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.

Vásquez, L. (2008). Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.

Venanzi, L. (2014). Estudio de métodos de extracción de compuestos fenólicos de orujo provenientes de vinificación de uva cv Malbec. Tesis (Licenciatura en Bomatología). Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina. 22 p.

Wang, W., Bostic, T., Gu, L. (2010). Capacidad antioxidante, procianidinas y pigmentos en paltas de diferentes cepas y cultivares. Revista de Agricultura y Química de los Alimentos. N° 122. 1193-1198 p.

Waszkowiak, K,; Gliszczynska-Swiglo, A. (2016). Binary etanol-water solventes affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. Eur Food Res Technol. N° 242. 777-786 p.

Wei-Na, L., Jun-Hong, W. (2014). Effective permittivity of alcohol + wáter mixtures as influenced by concentration. Jornal of Chemical and Pharmaceutical Research. N° 6 (7). 1432-1434 p.

Zhang, Jinhui, L., Sung-Hoong, K., Ann, H., Junxuan, L. (2009). Anti-cancer, anti-diabetic, and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. Pharmaceutical Research. N° 26. 1-27 p.

Zhu, K., Lian, C., Guo, X., Zhou, H. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. Food Chem. N° 126. 1122-1126 p.

ANEXOS

Anexo 1: Panel fotográfico

Fotografía 1

Semilla de variedad Zutano



Fotografía 2

Semilla de palta molida



Fotografía 3

Harina de semilla



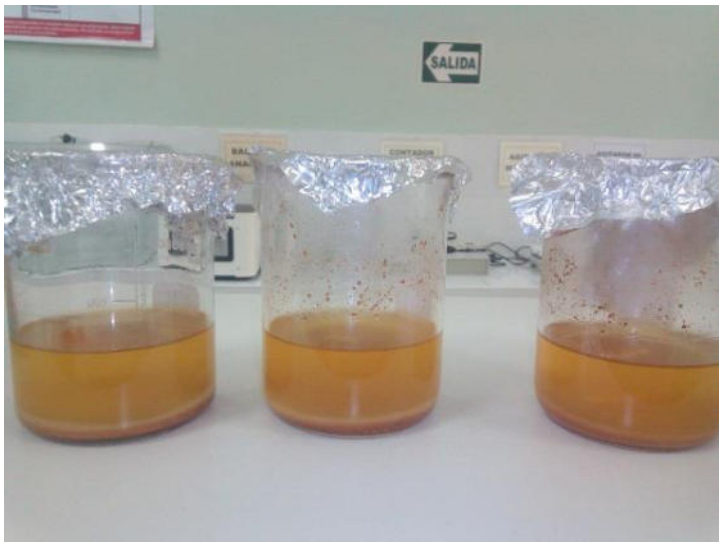
Fotografía 4

Mezcla de etanol con semilla



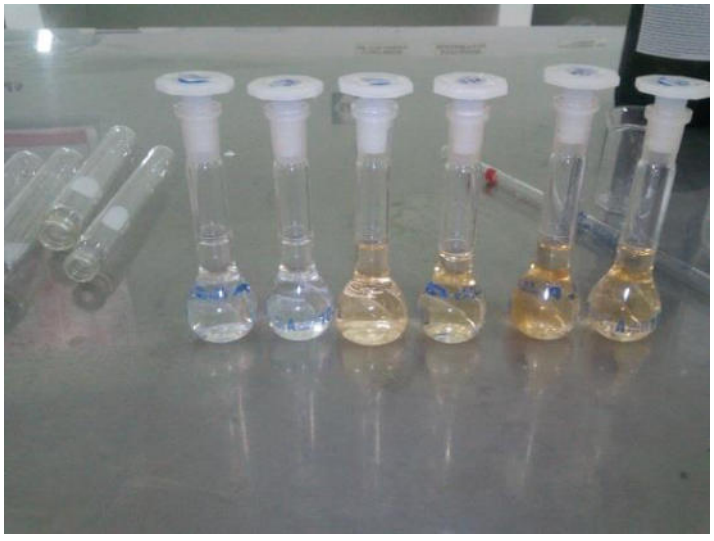
Fotografía 5

Extracción



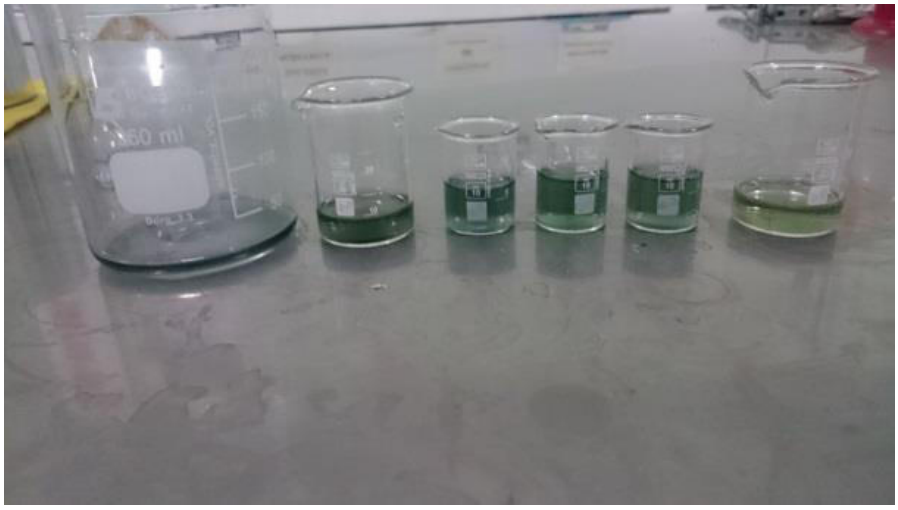
Fotografía 6

Diluciones para medición de polifenoles



Fotografía 7

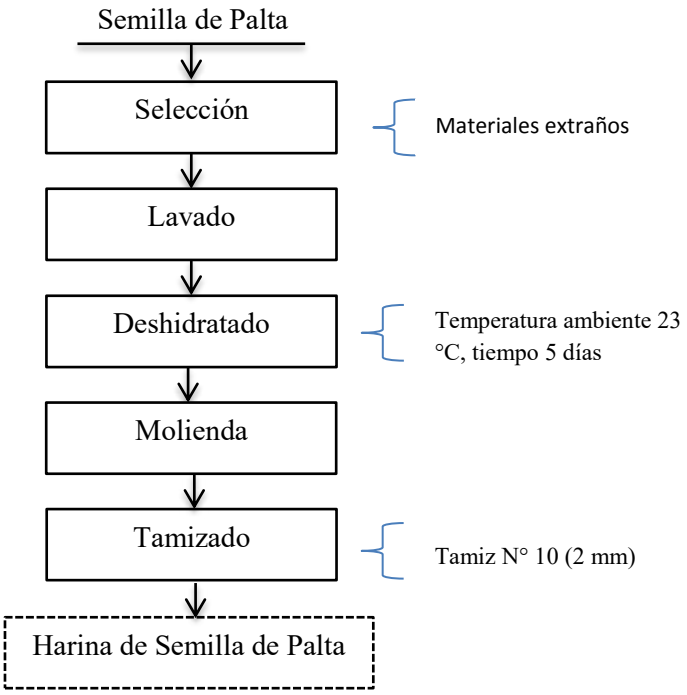
Dilución con reactivo Folin Ciocalteu



Anexo 2

Obtención de la harina de semilla de palta

Para obtener la harina de semilla de palta, la muestra se sometió a limpieza, se quitó los restos de pulpa y se enjuagó con agua potable, se deshidrató a temperatura ambiente de 23 °C, la cual se molió y obtuvo así partículas más pequeñas, tal como se muestra en la figura.



- **Selección:** Se separó las semillas del fruto entero y de los materiales extraños y defectuosos.
- **Lavado:** Con abundante agua limpia se quitó los restos de pulpa impregnados en la semilla.
- **Deshidratado:** Se tendió sobre taburetes cubiertos con yute, sobre este se extendió una cama con el fruto. El deshidratado se realizó a temperatura ambiente de 23 °C, por un periodo de 5 días.
- **Molienda:** Las semillas se rayaron con el objetivo de disminuir su tamaño, dejándolo secar por 3 días. Luego, se utilizó un molino de granos reduciendo el tamaño a polvo, se recolectó en bolsas transparentes de polipropileno de alta densidad de 1 kg.
- **Tamizado:** Se realizó el tamizaje utilizando una malla Nº 10 (2 mm).

- **Harina de semilla de palta:** El almacenado se realizó en bolsas de polipropileno de 50 g en un ambiente seco, temperatura ambiente 23 °C y alejada de la luz solar.

Anexo 3

Datos de Calibración del método de Folin Ciocalteu

Patrón: Ácido gálico

Se calibró el método de determinación de taninos por medio del reactivo de Folin Ciocalteu, empleando ácido gálico como patrón. En la tabla se presentan los valores de absorbancia medida a una longitud de onda de 765 nm correspondientes a las distintas concentraciones de ácido gálico.

Tabla de calibración del Método de *Folin Ciocalteu*

	X	Y
N°	Concentración mg/ml	Absorbancia
1	0	0
2	0.004	0.1186
3	0.008	0.2089
4	0.012	0.3378
5	0.016	0.4141
6	0.020	0.5190

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal simple, con el objeto de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincula las dos variables. Según Paladino (2011) indica que el análisis de regresión permite obtener un modelo que relacione una variable dependiente “y” (longitud de onda a 765 nm) con una variable independiente “x” (concentración de ácido gálico mg/l). El coeficiente de determinación simple R^2 indica cuál es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”. El resultado analítico afirma que el ajuste del modelo matemático es cercano a 1, ya que el valor de R^2 es 0.9966 con respecto a la variable “y”, es decir que existe el 99.66% de variabilidad pudiendo concluir que el análisis estadístico de regresión lineal simple aplicado es adecuado para describir la relación que existe entre las variables.

Anexo 4

Datos obtenidos para cuantificación de taninos expresados en mg equivalente de ácido gálico

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Absorbancia (765 nm)	Taninos (mg EAG/g)	Taninos corregidos	Taninos (mg/ml)	Desviación estándar
30	50	0.2349	0.0088	0.1463	2.9263	0.2655
	50	0.2122	0.0079	0.1316	2.6329	
	50	0.2532	0.0095	0.1581	3.1628	
	70	0.3066	0.0116	0.1927	3.8531	0.2842
	70	0.2881	0.0108	0.1807	3.6139	
	70	0.2628	0.0099	0.1643	3.2869	
60	50	0.4549	0.0173	0.2885	5.7699	0.8476
	50	0.5860	0.0224	0.3732	7.4644	
	50	0.5235	0.0200	0.3328	6.6566	
	70	0.7555	0.0290	0.4828	9.6553	0.5344
	70	0.6899	0.0264	0.4404	8.8074	
	70	0.6791	0.0260	0.4334	8.6678	
90	50	0.6222	0.0238	0.3966	7.9323	0.4215
	50	0.5911	0.0226	0.3765	7.5303	
	50	0.5570	0.0213	0.3545	7.0896	
	70	0.7674	0.0294	0.4905	9.8091	0.0642
	70	0.7773	0.0298	0.4969	9.9371	
	70	0.7717	0.0296	0.4932	9.8647	

Anexo 5

Análisis de Varianza para polifenoles totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	103.028	2	51.5141	232.02	0.0000
B:Temperaura	14.8331	1	14.8331	66.81	0.0000
INTERACCIONES					
AB	2.92141	2	1.46071	6.58	0.0118
RESIDUOS	2.66427	12	0.222022		
TOTAL (CORREGIDO)	123.447	17			

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

Anexo 6

Pruebas de comparación

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Etanol	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	6	3.246	0.192715	X
60	6	7.83689	0.192715	X
70	6	8.69384	0.192715	X

Continuación de Pruebas de comparación

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
30 - 60	*	-4.59089	0.7291
30 - 70	*	-5.44784	0.7291
60 - 70	*	-0.856955	0.7291

* indica una diferencia significativa.

Anexo 7

Pruebas de Múltiple Rangos para Polifenoles totales por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
50	9	5.68503	0.157351	X
70	9	7.49947	0.157351	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
50 - 70	*	-1.81444	0.484849

* indica una diferencia significativa.

Anexo 8

Datos obtenidos para determinar la capacidad antioxidante

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Taninos (mg/ml)	Disoluciones	Concentraciones	Absorbancia de la muestra (517 nm)	Absorbancia Control Negativo (517 nm)	Porcentaje de Inhibición (%I)	Factor IC50	SD
30	50	2.93	0.1	0.29	0.6623	1.1089	40.2741	1.7011	0.1028
			0.4	1.17	0.1905	1.1089	82.8208		
	50	2.63	0.1	0.26	0.6473	0.9109	28.9384	1.8223	
			0.4	1.05	0.1866	0.9109	79.5148		
	50	3.16	0.1	0.32	0.7595	1.1089	31.5087	1.9056	
			0.4	1.27	0.4119	1.1089	62.8551		
	70	3.85	0.1	0.39	0.6887	1.1089	37.8934	1.3372	
			0.4	1.54	0.1402	1.1089	87.3568		
	70	3.61	0.1	0.36	0.7149	1.1089	35.5307	1.6938	0.3142
			0.4	1.45	0.1376	1.1089	87.5913		
	70	3.29	0.1	0.33	0.7385	1.1089	33.4025	1.9636	
			0.4	1.31	0.1459	1.1089	86.8428		
60	50	5.77	0.1	0.58	0.6963	0.9109	23.5591	1.4343	
			0.4	2.31	0.2100	0.9109	76.9459		
	50	7.46	0.1	0.75	0.5168	0.8684	40.4883	1.2965	0.1140
			0.4	2.99	0.1805	0.8684	79.2146		
	50	6.66	0.1	0.67	0.7094	1.1089	36.0267	1.2081	

			0.4	2.66	0.1390	1.1089	87.4651		
	70	9.66	0.1	0.97	0.3555	0.7374	51.7901	0.7739	
			0.4	3.86	0.1560	0.7374	78.8446		
	70	8.81	0.1	0.88	0.5987	0.9109	34.2738	1.9286	0.4447
			0.4	3.52	0.2375	0.9109	73.9269		
	70	8.67	0.1	0.87	0.4796	0.8684	44.7720	1.2607	
			0.4	3.47	0.1799	0.8684	79.2837		
	50	7.93	0.1	0.79	0.5934	1.1089	46.4875	0.3703	
			0.4	3.17	0.1531	1.1089	86.1935		
	50	7.53	0.1	0.75	0.6217	0.9109	31.7488	0.5855	0.1482
			0.4	3.01	0.2141	0.9109	76.4958		
	50	7.09	0.1	0.71	0.4305	0.8684	50.4261	0.3014	
90			0.4	2.84	0.1937	0.8684	77.6946		
	70	9.81	0.1	0.98	0.4197	0.8684	51.6697	0.3144	
			0.4	3.92	0.1835	0.8684	78.8692		
	70	9.94	0.1	0.99	0.4234	0.9109	53.5185	0.2114	0.0886
			0.4	3.97	0.1917	0.9109	78.9549		
	70	9.86	0.1	0.99	0.4137	0.9109	54.5834	0.1380	
			0.4	3.95	0.1978	0.9109	78.2852		

Anexo 9

Análisis de Varianza para capacidad antioxidante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	6.26237	2	3.13118	53.70	0.0000
B:Temperatura	0.00895122	1	0.00895122	0.15	0.7021
INTERACCIONES					
AB	0.0909796	2	0.0454898	0.78	0.4803
RESIDUOS	0.699705	12	0.0583088		
TOTAL (CORREGIDO)	7.062	17			

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

Anexo 10

Pruebas de comparación

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Etanol	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
90	6	0.320167	0.0985806	X
30	6	1.27257	0.0985806	X
60	6	1.73727	0.0985806	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
90 - 60	*	-0.9524	0.37296
90 - 30	*	-1.4171	0.37296
60 - 30		-0.4647	0.37296

* indica una diferencia significativa.

Anexo 11

Datos obtenidos de la extracción de taninos en la semilla de palta

Etanol (%)	Temperatura (%C)	Volumen (ml)
30	50	85
	50	84
	50	86
	70	78
	70	80
	70	80
60	50	78
	50	74
	50	76
	70	68
	70	67
	70	69
90	50	63
	50	65
	50	63
	70	58
	70	60
	70	57