

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS SOLUBLES E
INSOLUBLES A PARTIR DE RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO
DE LA NUEZ: PERFIL FENÓLICO Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Ciencias de los Alimentos por:**

Pamela Ruth Toledo Merma

**Directores de Tesis:
Dr. Adriano Costa de Camargo
Dr. Luis Andrés Puente Díaz**

Santiago-CHILE

Julio 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Pamela Ruth Toledo Merma

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias de los Alimentos, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Adriano Costa de Camargo _____

Dr. Luis Andrés Puente Díaz _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Jaime Alejandro Ortiz Viedma _____

Dra. Raquel Bridi _____

Dr. Marcos Alexis Flores García _____

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mis amados padres, Benito Toledo y Emiliana Merma y asimismo a mis queridos hermanos, Olga Toledo e Isaac Toledo, quienes han sido mi mayor motivación diaria para dar lo mejor de mí y son la más grande bendición en todo el sentido de la palabra.

En adición, esta tesis está dedicada a todos aquellos estudiantes y personas con interés de enriquecer sus conocimientos en el área de la ciencia de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, por esta enriquecedora experiencia y a quien debo todo.

A mis directores de tesis, Dr. Adriano Costa de Camargo y Dr. Luis Puente Díaz, agradecida por su valiosa orientación, enseñanza, consejos oportunos y respaldo.

A cada uno de los profesores miembros de la comisión de tesis, por su gran contribución en la mejora de la presente investigación con sus oportunas sugerencias, comentarios y observaciones dadas.

Asimismo, como becaria del gobierno de mi país, la República del Perú, a través del PRONABEC, agradecer por el financiamiento para la presente tesis.

Al Dr. Adriano Costa de Camargo, responsable del proyecto de investigación donde participé como tesista de posgrado, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile a través del concurso U-INICIA (UI-005/20).

A Fernanda Arias, Catalina Ospina, Alina Concepción, Manuela Samary, Carla Cifuentes, integrantes del Laboratorio de Lípidos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), agradecida por su gran apoyo no sólo en la parte experimental de mi tesis, sino también por su compañerismo y palabras de ánimo.

A la Prof. Raquel Bridi, Paula Nuñez y Bairon Jorquera del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por su gran ayuda en la realización de los análisis de caracterización de los extractos fenólicos.

Al Sr. Héctor Flores, quien fue técnico del Laboratorio de Lípidos durante el desarrollo de la tesis, por compartir sus conocimientos y experiencia con considerable paciencia.

A cada una de las personas que de una u otra forma han aportado en el desarrollo de mi tesis con su tiempo, ideas, recomendaciones y palabras de aliento.

Muchas gracias a cada uno de ellos de todo corazón.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Compuestos fenólicos.....	3
2.1.1 Biosíntesis	3
2.1.2 Clasificación	5
2.1.2.1 Por su estructura química	5
2.1.2.2 Por su asociación con la matriz alimentaria	10
2.2 La nuez.....	13
2.2.1 Generalidades	13
2.2.2 Composición química	13
2.2.3 Compuestos fenólicos de la nuez	15
2.2.3.1 Ácidos fenólicos de la nuez.....	15
2.2.3.2 Flavonoides de la nuez	16
2.2.4 Propiedades beneficiosas de la nuez	16
2.2.5 Actividad antioxidante de la nuez	17
2.2.6 Residuos agroindustriales o subproductos de la nuez	17
2.3 Bebidas vegetales	19
2.4 Extracción de compuestos fenólicos	21
2.4.1 Extracción mediante hidrólisis alcalina y ácida	21
2.5 Técnicas analíticas	22

2.5.1	Compuestos fenólicos totales (CFT)	22
2.5.1.1	Capacidad reductora de hierro del plasma (FRAP)	23
2.5.1.2	Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)	24
3.	HIPÓTESIS	26
4.	OBJETIVOS	26
4.1	Objetivo general	26
4.2	Objetivos específicos	26
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1	Materiales	27
5.1.1	Materia prima	27
5.1.2	Solventes y reactivos químicos	27
5.1.3	Materiales de laboratorio	28
5.1.4	Equipos	29
5.2	Métodos	29
5.2.1	Preparación de la muestra	29
5.2.1.1	Obtención de la nuez desgrasada	29
5.2.1.2	Obtención del residuo de bebida vegetal de nuez desgrasado	29
5.2.2	Extracción de los compuestos fenólicos	30
5.2.2.1	Extracción de compuestos fenólicos solubles	31
5.2.2.2	Extracción de compuestos fenólicos insolubles	32
5.2.3	Compuestos fenólicos totales (CFT)	33
5.2.4	Análisis UPLC-MS/MS	34
5.2.5	Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)	35
5.2.6	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)	35
5.2.7	Análisis estadístico	36
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1	Contenido de fenoles totales (CFT)	37
6.2	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos	40
6.3	Poder reductor (FRAP)	45

6.4	Potencial antioxidante (ORAC)	48
7.	CONCLUSIONES	50
8.	BIBLIOGRAFÍA	51
9.	ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la nuez.....	14
Tabla 2. Contenido de fenoles totales (CFT) (mg EAG/100 g p.s.) de las fracciones de fenoles solubles (libre, esterificada, eterificada) e insolubles de la nuez desgrasada y residuo de bebida vegetal de nuez.	37
Tabla 3. Compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) de las fracciones solubles (libre, esterificada y eterificada) e insoluble presentes en el residuo de bebida vegetal de nuez ($\mu\text{g}/100\text{ g}$).	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de los compuestos fenólicos (Mark et al., 2019).	4
Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos por su estructura química (Alara et al., 2021; Shahidi & Hossain, 2023).....	6
Figura 3. Estructura química de ácidos fenólicos (de la Rosa et al., 2019).	7
Figura 4. Estructura química de los tipos de flavonoides	9
Figura 5. Clasificación de los compuestos fenólicos por su asociación con la matriz vegetal (Zhang et al., 2020).	10
Figura 6. Localización de los compuestos fenólicos solubles e insolubles dentro de una célula de la matriz vegetal (Shahidi y Yeo, 2016).....	11
Figura 7. Enlaces éster y éter entre un ácido fenólico y flavonoide de la fracción insoluble unidos a la celulosa que forma parte de la matriz vegetal (Shahidi & Hossain, 2023).	12
Figura 8. Estructura química del ácido gálico (Croitoru et al., 2019).	15
Figura 9. Potencial bioactivo de los principales constituyentes de <i>Juglans regia</i> L. (Gupta et al., 2019).....	17
Figura 10. Diferentes partes del árbol de nuez y su fruto, así como los subproductos generados (Jahanban-Esfahlan et al., 2019).	18
Figura 11. Diagrama de flujo del procesamiento de la bebida vegetal y aceite de nuez y sus subproductos generados.	20
Figura 12. Reacción de ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Muñoz-Bernal et al. 2017).	23
Figura 13. Reacción química y mecanismo de reacción que se produce en el ensayo FRAP (ArOH: antioxidante) (Bibi Sadeer et al., 2020).	24
Figura 14. Mecanismo de reacción que se produce en el ensayo ORAC (Dorta et al., 2015).....	25
Figura 15. Nuez variedad Chandler empleada en el presente estudio.	27

Figura 16. Residuo de (a) nuez desgrasada y (b) de bebida vegetal de nuez desgrasado.....30

Figura 17. Proceso de extracción de compuestos fenólicos A) solubles libres, B) esterificados, C) eterificados e insolubles (Shahidi & Hossain, 2023).33

Figura 18. Estructura química de la isoflavona biochanina A (Sarfraz et al., 2021).43

Figura 19. Poder antioxidante reductor de hierro ($\mu\text{mol ET/g p.s.}$) de las fracciones de fenoles solubles libres (FS), esterificados (FEST), eterificados (FET) e insolubles (FI) de la nuez desgrasada (ND) y residuo de bebida vegetal de nuez (RBVN).46

RESUMEN

“Recuperación de Compuestos Fenólicos Solubles e Insolubles a partir de Residuos del Procesamiento de la Nuez: Perfil Fenólico y Actividad Antioxidante”

Estos últimos años la agroindustria de la nuez, semilla de gran importancia económica para Chile, por ser uno de los principales productores a nivel mundial, ha venido creciendo notablemente debido a la tendencia del consumidor de elegir alimentos saludables de origen vegetal. A consecuencia de ello, se ha venido generando significativas cantidades de desechos o residuos agroindustriales, resultantes del proceso agroindustrial. Su importante contenido en compuestos bioactivos de tipo fenólicos los han convertido en materias primas secundarias valoradas siendo posible la recuperación de sus compuestos con potencial antioxidante promoviendo la economía circular.

Es por ello que, el objetivo del presente estudio fue caracterizar el residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) y nuez desgrasada (ND) respecto a sus compuestos fenólicos con vías a potenciar la aplicación de estos residuos como fuente de compuestos bioactivos con potencial antioxidante. Se realizó la extracción de las fracciones de fenoles solubles (libres, esterificados y eterificados) e insolubles. Fue necesario realizar una hidrólisis alcalina y ácida para poder recuperar las fracciones de fenoles solubles esterificados y eterificados, respectivamente. Asimismo, para la obtención de la fracción insoluble se aplicó una hidrólisis alcalina. Se obtuvieron cuatro extractos por cada muestra (RBVN y ND), haciendo un total de ocho extractos. Los compuestos fenólicos totales (CFT) y la actividad antioxidante de las fracciones de fenoles tanto solubles como insolubles de ambas muestras fueron analizados mediante Folin-Ciocalteu y los métodos FRAP y ORAC, respectivamente. Asimismo, la identificación cualitativa y cuantitativa de los

compuestos fenólicos presentes en el RBVN fue llevada a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS).

A partir de la ND, el mayor contenido estimado de fenoles totales fue encontrado en la fracción libre (384,51 mg EAG/100 g p.s.) mientras que la fracción insoluble de los RBVN fue la que presentó el mayor contenido de fenoles totales (167,95 mg EAG/100 g p.s.). Se mostró una correlación significativa entre CFT y FRAP, donde la fracción libre de la ND presentó el mayor poder reductor (887,56 $\mu\text{mol ET/g}$). Además, el valor ORAC total de la ND (132,20 $\mu\text{mol ET/g}$) fue el doble del RBVN (66,25 $\mu\text{mol ET/g}$), donde las fracciones insolubles de la ND y RBVN representaron el 38,17 y 31,45 % del valor ORAC total respectivamente. Diez compuestos fenólicos entre ácidos fenólicos (6) y flavonoides (4) fueron identificados y cuantificados en el RBVN, de los cuales el ácido gálico fue el más representativo (3768,68 $\mu\text{g}/100 \text{ g p.s.}$). La biochanina A fue identificada por primera vez en el RBVN. Por lo tanto, el RBVN puede ser considerado una fuente potencial para el desarrollo de aditivos alimentarios antioxidantes y/o nutracéuticos.

ABSTRACT

“Recovery of Soluble and Insoluble Phenolic Compounds from Walnut Processing Residues: Phenolic Profile and Antioxidant Activity”

In recent years, the walnut agroindustry, a seed of great economic importance for Chile as one of the main producers worldwide, has been growing significantly due to the consumer trend of choosing healthy foods of vegetable origin. As a result, significant amounts of agro-industrial waste or residues resulting from the agro-industrial process have been generated. Their important content in bioactive compounds of phenolic type have turned them into valued secondary raw materials, being possible the recovery of their compounds with antioxidant potential promoting the circular economy.

Therefore, the aim of the present study was to characterize the walnut plant-based beverage residue (WPBR) and defatted walnut (DW) with respect to their phenolic compounds in order to enhance the application of these residues as a source of bioactive compounds with antioxidant potential. The extraction of the soluble (free, esterified and etherified) and insoluble phenol fractions was carried out. Alkaline and acid hydrolysis was necessary to recover the esterified and etherified soluble phenol fractions, respectively. Likewise, an alkaline hydrolysis was applied to obtain the insoluble fraction. Four extracts were obtained for each sample (DW and WPBR), making a total of eight extracts. Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity of both soluble and insoluble phenol fractions of both samples were analyzed by Folin-Ciocalteu, FRAP and ORAC methods, respectively. Furthermore, qualitative and quantitative identification of the phenolic compounds present in the WPBR was carried out by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

From DW, the highest estimated content of total phenols was found in the free fraction (384,51 mg GAE/100 g p.s.) while the insoluble fraction of WPBR presented the highest content of total phenols (167,95 mg GAE/100 g m.s). A moderate correlation was shown between TPC and FRAP, where the free fraction of DW showed the highest reducing power (887,56 $\mu\text{mol ET/g}$). Furthermore, the total ORAC value of DW (132,20 $\mu\text{mol TE/g}$) was twice that of WPBR (66,25 $\mu\text{mol TE/g}$), where the insoluble fractions of DW and WPBR represented 38,17 and 31,45 % of the total ORAC value, respectively. Ten phenolic compounds including phenolic acids (6) and flavonoids (4) were identified and quantified in the WPBR, of which gallic acid was the most representative (3768,68 $\mu\text{g/100 g p.s.}$). In addition, biochanin A was identified for the first time in the WPBR. Therefore, WPBR could be considered a potential source for the development of antioxidant and/or nutraceutical food additives.

1. INTRODUCCIÓN

La nuez (*Juglans regia* L.), fruto seco comestible de alto valor nutritivo, es compuesta principalmente de ácidos grasos insaturados, proteínas, fibra dietética, minerales, vitaminas del complejo B, además de la vitamina E (tocoferoles) y fitoesteroles (Abdallah et al., 2015; Croitoru et al., 2019; Shahidi et al., 2021; Wang et al., 2022). En adición, la nuez contiene importantes cantidades de compuestos de naturaleza fenólica (Wu et al., 2021). Estos compuestos han mostrado posibles efectos beneficiosos sobre la salud humana contra enfermedades crónicas no transmisibles mediadas por el estrés oxidativo (algunos tipos de cáncer, diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares) y neurodegenerativas por su capacidad antioxidante y antiinflamatorio en estudios *in vitro* e *in vivo* (Carvalho et al., 2010; Guasch-Ferré et al., 2021; Kris-Etherton, 2014; Ni et al., 2021a).

Los compuestos fenólicos se encuentran en diferentes formas dependiendo de su asociación con la matriz alimentaria, se tienen los fenoles solubles tanto libres, esterificados y eterificados, así como los fenoles insolubles (de Camargo et al., 2017; Zhang et al., 2020). No obstante, la mayor parte de los estudios reportados solo consideran el análisis fenólico y la actividad antioxidante de la fracción de fenoles solubles, generalmente evaluados tras la obtención de un extracto crudo, omitiendo la contribución de cada una de las fracciones de fenoles, es decir: los libres, esterificados, eterificados e insolubles (Kafkas et al., 2020; Slatnar et al., 2015). Estos últimos son aquellos fenoles que se encuentran unidos a la pared celular de la matriz mediante enlaces covalentes, los cuales pueden ser liberados mediante hidrólisis alcalina (Shahidi & Yeo, 2016).

El potencial antioxidante de la nuez ha sido evidenciado mediante diferentes métodos analíticos como el DPPH, FRAP, ORAC y ABTS principalmente

(Arranz et al., 2008; Trandafir et al., 2016; Wang et al., 2022), los cuales son métodos prácticos y accesibles de ser realizados (Granato et al., 2018). Asimismo, también los subproductos de la nuez como la cáscara verde externa, cáscara marrón dura, hojas y flores del árbol de nuez y así como su piel han demostrado poseer una alta capacidad antioxidante y poder reductor (Salem et al., 2022; Soto-Maldonado et al., 2022; Zhang et al., 2020).

Sin embargo, en la actualidad, se han venido generando otros subproductos provenientes de la industria de la nuez, considerados como desechos, como por ejemplo las tortas obtenidas del proceso de extracción del aceite y bebidas vegetales a base de nuez. La nuez desgrasada (ND) mostró ser una fuente rica de compuestos fenólicos con potencial antioxidante (García-Mendoza et al., 2021). Sin embargo, no se han reportado estudios previos de la caracterización fenólica y actividad antioxidante a partir de las diferentes fracciones de fenoles solubles (libres, esterificados y eterificados) e insolubles del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) y tampoco del porcentaje de compuestos fenólicos en la materia prima que se estaría desechando al no considerar el residuo de la bebida vegetal de nuez como una fuente de compuestos fenólicos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar los fenoles totales y su actividad antioxidante de cada fracción de fenoles solubles e insolubles tanto de la ND como del RBVN, así como realizar por primera vez la identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos presentes en el RBVN mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son aquellos que en su estructura presentan uno o varios anillos aromáticos unido a uno o más grupos hidroxilo. Son los metabolitos secundarios más abundantes en plantas con más de 8000 estructuras conocidas. Van desde compuestos fenólicos simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos complejos como los taninos. Estos compuestos están involucrados en la defensa de las plantas contra los rayos ultravioleta (UV), patógenos y otros depredadores. Su presencia en todos los órganos de las plantas los convierte en una parte importante de la dieta humana (Alara, Abdurahman, y Ukaegbu,2021).

2.1.1 Biosíntesis

Existen dos rutas propuestas para la biosíntesis de los compuestos fenólicos: la ruta del shikimato o ácido shikímico y la ruta del fenilpropanoide. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina sirven como puntos centrales y son los precursores cruciales para la formación de los diferentes tipos de compuestos fenólicos (de la Rosa et al., 2019; Vuolo et al., 2019). La Figura 1 presenta las rutas de biosíntesis para compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos serían sintetizados en el retículo endoplasmático y luego serían transportados al núcleo de la célula. Su liberación y transporte desde el interior de la célula hasta la pared celular sería a través de un sistema de transferencia vesicular dando lugar a la formación de los fenoles insolubles ligados, unidos a carbohidratos como la celulosa, hemicelulosa, arabinosa, pectina, o proteínas estructurales mediante enlaces covalente. Mientras que los compuestos fenólicos solubles libres podrían ser transportados al interior de las vacuolas. Varios tipos de enzimas como la fenilalanina amoniaco liasa (FAL), la tirosina amoniaco liasa (TAL) y la cinamato-4-hidroxilasa intervienen

principalmente en la biosíntesis de los compuestos fenólicos (Shahidi & Hossain, 2023). A consecuencia de dicha actividad enzimática, se llegarían a formar fenoles que incluyen a los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides (flavanones, flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas) y otro tipos de fenoles (cumarinas, curcuminoides, estilbenos, lignanos, taninos condensados) (Mark et al., 2019).

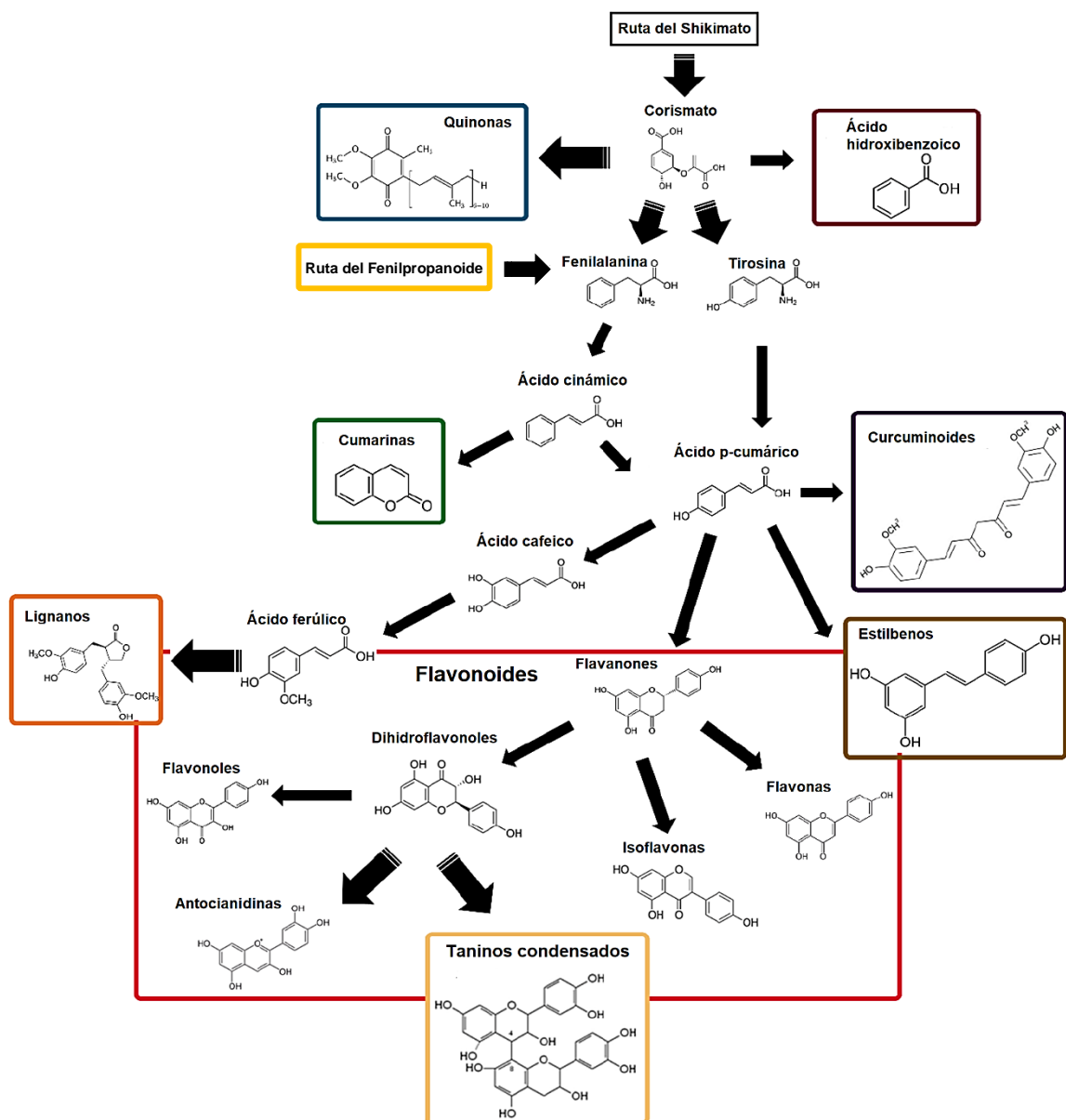


Figura 1. Biosíntesis de los compuestos fenólicos (Mark et al., 2019).

2.1.2 Clasificación

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de diferentes formas. De acuerdo a su estructura química, se han propuesto ciertas formas de clasificación como fenoles simples y complejos, monofenoles o fenoles y polifenoles o también como flavonoides, fenoles asociados y polifenoles (Vuolo et al., 2019). Entre los polifenoles se han categorizado a los taninos (hidrolizables y condensados), lignanos, estilbenos y cumarinas, entre otros. Por otro lado, los compuestos fenólicos también han sido clasificados dependiendo de su asociación con la matriz alimentaria pudiendo ser catalogados como solubles (libres, esterificados y eterificados) e insolubles o también como fenoles libres y conjugados. Los ácidos fenólicos, mayormente los fenoles más abundantes en las matrices vegetales, están presentes en diferentes formas ya sea libre o conjugada. (Shahidi & Hossain, 2023).

2.1.2.1 Por su estructura química

En la Figura 2 se muestra una propuesta de clasificación de los compuestos fenólicos por su estructura química. En el caso de los taninos, poseen un gran número de grupos hidroxilo u otros grupos funcionales, siendo encontrados en la forma de ésteres. Los taninos han sido divididos en taninos hidrolizables y no hidrolizables o condensados. Estos últimos son estructuralmente más complejos y uniformes que los taninos hidrolizables (Vuolo et al., 2019).

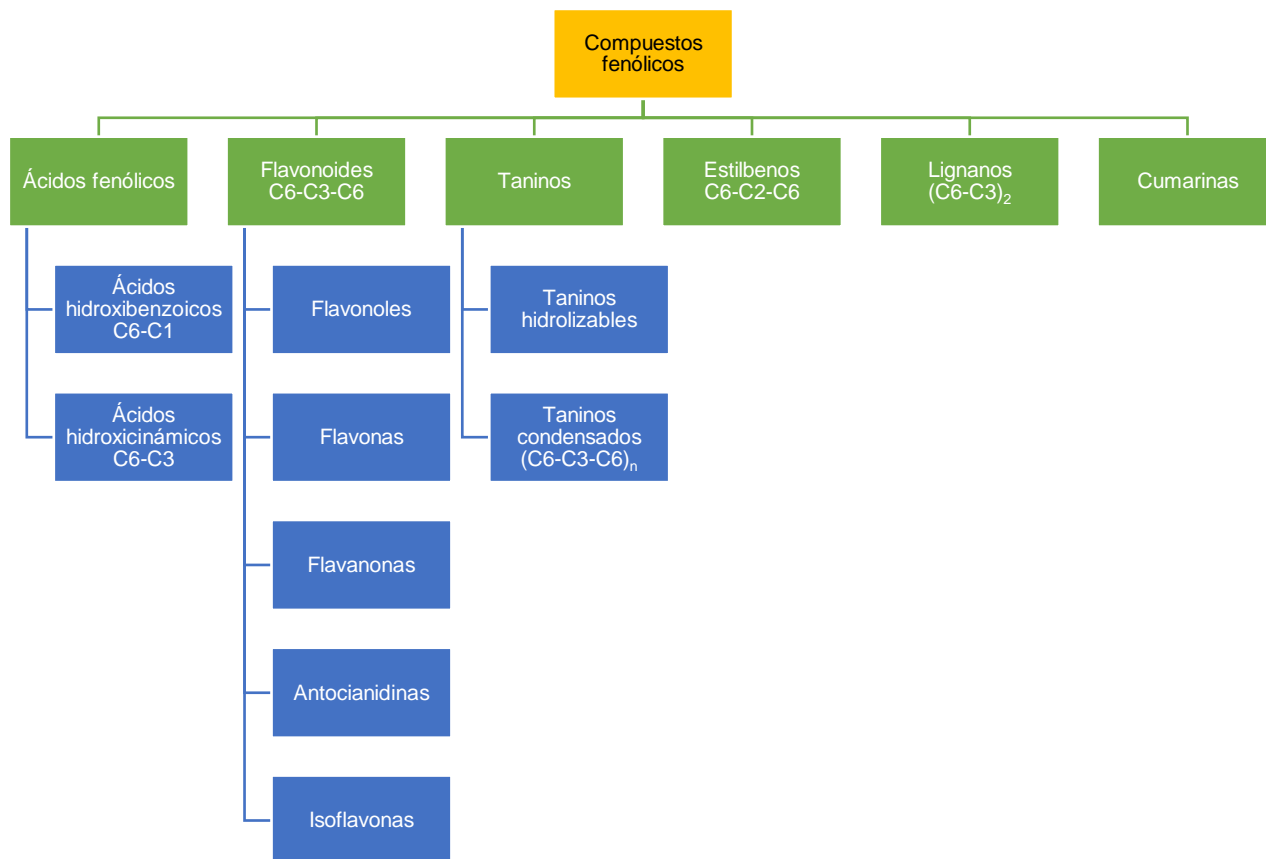


Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos por su estructura química (Alara et al., 2021; Shahidi & Hossain, 2023).

2.1.2.1.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos poseen a lo menos un anillo aromático donde por lo menos un hidrógeno es reemplazado por un grupo hidroxilo (Heleno et al., 2015). Se pueden categorizar en dos grupos: ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. La Figura 3 presenta la estructura química de ácidos fenólicos. Los ácidos hidroxibenzoicos tienen la estructura química C6-C1. Entre los más conocidos se tienen el ácido salicílico, protocatecuico, siríngico y gálico. Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos tienen la estructura C6-C3, con un doble enlace en la

cadena lateral con posibilidad de configurarse de forma *cis* o *trans*. En las matrices alimentarias, mayormente se presentan como monómeros, dímeros o polímeros (Vuolo et al., 2019). Los ácidos hidroxicinámicos más representativos en alimentos se encuentran el ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico (de la Rosa et al., 2019).

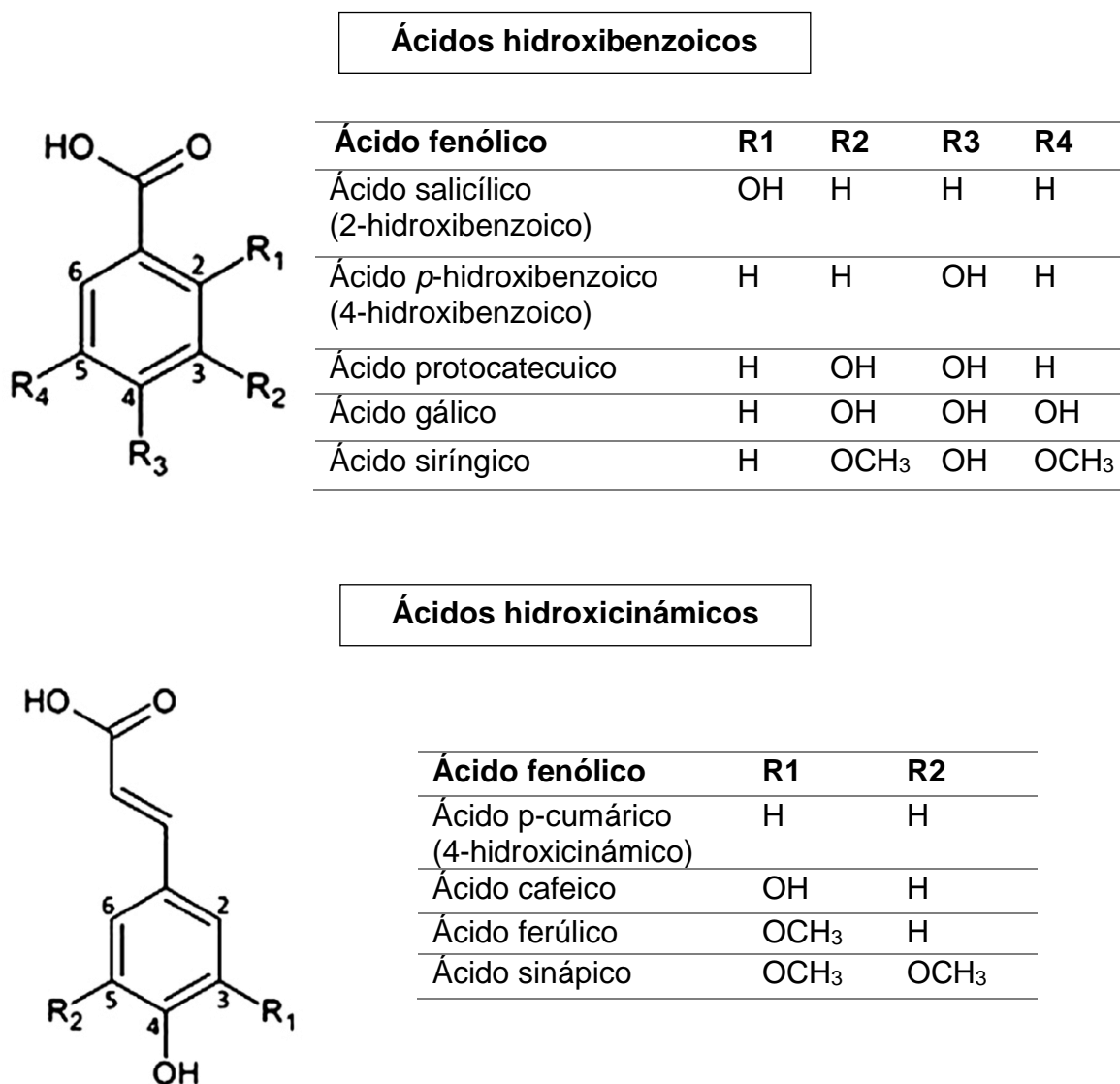


Figura 3. Estructura química de ácidos fenólicos (de la Rosa et al., 2019).

2.1.2.1.2 Flavonoides

Los flavonoides están constituidos por un esqueleto de 15 carbonos (C), dispuestos como C6-C3-C6, con diferentes sustituciones, disposición del esqueleto base y grado de insaturación. En síntesis, los flavonoides representan dos anillos aromáticos A y B, unidos comúnmente por un anillo heterocíclico C (Faggio et al., 2017). Los flavonoides pueden subdividirse en seis grupos o familias, de acuerdo a sus diferencias en el anillo pirano. En la Figura 4 se muestran los diferentes tipos o subgrupos de flavonoides según su estructura química. En cada subgrupo, los compuestos difieren en su patrón de hidroxilación y metilación de los anillos tanto A como B (Vuolo et al., 2019).

Las flavonas son la familia que posee la estructura más básica de entre todos los flavonoides. Las flavonas contienen un grupo cetona en C4, un doble enlace entre el C2 y C3, así como un anillo B unido al C2. En las isoflavonas, los anillos A y C (anillos cromanos) permanecen conectados al anillo B desde la posición C3, en lugar de C2. Las isoflavonas tienen una distribución menor en comparación con otros grupos y se encuentran en muchas especies de la familia Fabaceae (Sarfraz et al., 2021). Además, se ha informado que pueden estar presentes en plantas de las familias Rosaceae, Moraceae, Iridaceae y algunos microorganismos. Se los considera ampliamente como un fitoestrógeno debido a su acción estrogénica. Entre las principales isoflavonas se encuentran la genisteína, la daidzeína y la gliciteína y sus 7-O glicósidos, las cuales se encuentran en la soya, el garbanzo, las lentejas, alubias, el trébol rojo, el maní, entre otras plantas leguminosas (Lone et al., 2020). Sin embargo, en los últimos años se ha reportado también la presencia de la isoflavona biochanina A la cual ha presentado un alto potencial protector contra múltiples enfermedades como el cáncer, diabetes, obesidad y hepáticas (de Camargo et al., 2022).

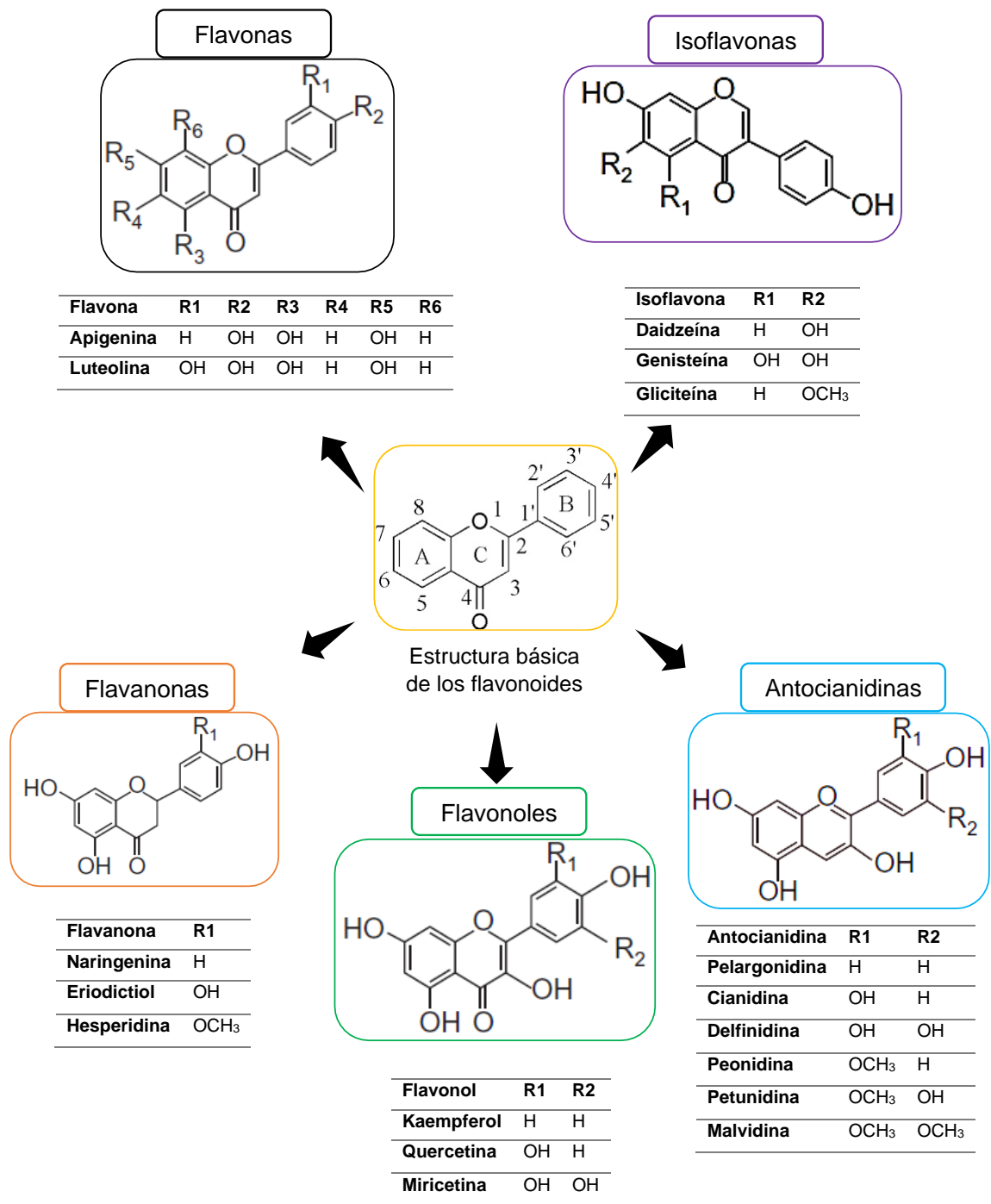


Figura 4. Estructura química de los tipos de flavonoides

Los flavonoles son un subgrupo que estructuralmente son flavonas hidroxiladas en el C3. Entre los principales flavonoles estudiados se encuentran el kaempferol, quercetina y miricetina (de la Rosa et al., 2019). En el caso del subgrupo de flavanonas, el anillo C presenta un grupo pirano saturado, es decir no poseen un doble enlace entre los C2 y C3, pero si muestran el grupo cetónico en C4. Las principales flavanonas son la naringenina, el eriodictiol y la hesperitina. Éstas flavanonas mayormente son encontradas en productos cítricos y hierbas como el orégano. Por otro lado, las antocianidinas, no presentan el grupo cetónico en el C4 y poseen un OH en C3 así como dos dobles enlaces en el anillo C (de la Rosa et al., 2019; Miao et al., 2022; Vuolo et al., 2019).

2.1.2.2 Por su asociación con la matriz alimentaria

Los compuestos fenólicos pueden encontrarse localizados en la matriz vegetal de diferentes formas como se muestra en la Figura 5. Los compuestos fenólicos solubles libres mayormente se ubican en las vacuolas dentro de la célula, no unidos física ni químicamente con otras moléculas, pudiendo ser extraídos haciendo uso de solventes polares u orgánicos (Figura 6).

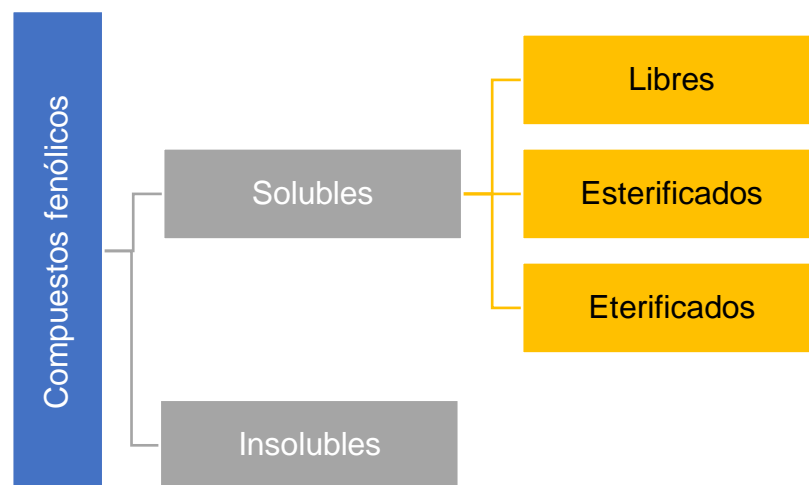


Figura 5. Clasificación de los compuestos fenólicos por su asociación con la matriz vegetal (Zhang et al., 2020).

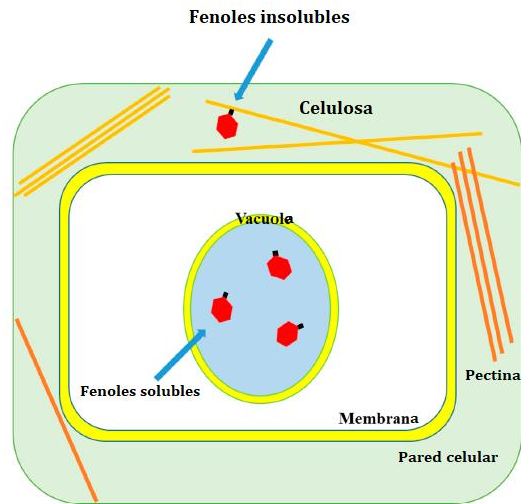


Figura 6. Localización de los compuestos fenólicos solubles e insolubles dentro de una célula de la matriz vegetal (Shahidi y Yeo, 2016).

En el caso de los fenoles solubles esterificados y eterificados están unidos mediante enlaces covalentes, éster u éter a azúcares y macromoléculas de bajo peso molecular. Por ejemplo, los grupos hidroxilo de alguna sustancia de la pared celular puede formar enlaces éster con el grupo carboxilo de los ácidos fenólicos. En adición, los compuestos fenólicos se pueden unir mediante enlaces éter con los grupos hidroxilo de otros componentes presentes. A diferencia de los fenoles solubles, los fenoles insolubles se encuentran unidos a carbohidratos y proteínas que forman parte de la pared celular como la celulosa, hemicelulosa, arabinosa, pectina, lignina y proteínas estructurales mediante enlaces éster, éter y carbono-carbono (C-C). En la Figura 7 se presenta los tipos de enlaces tanto éster y éter que se da entre un compuesto fenólico ya sea un ácido fenólico o flavonoide de la fracción insoluble unido a la celulosa. Además, los fenoles insolubles también podrían estar unidos a la matriz alimentaria mediante enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno (Shahidi & Hossain, 2023).

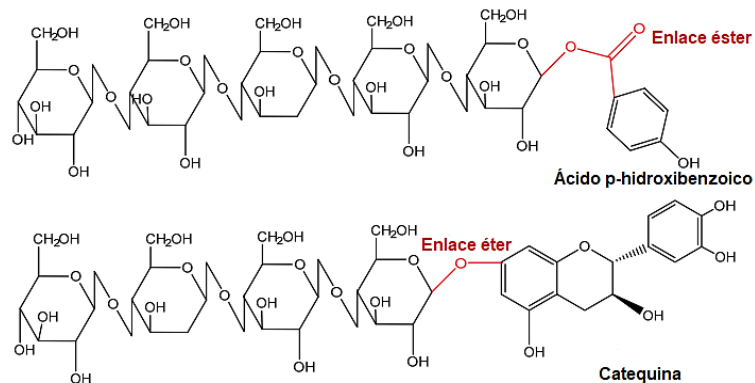


Figura 7. Enlaces éster y éter entre un ácido fenólico y flavonoide de la fracción insoluble unidos a la celulosa que forma parte de la matriz vegetal (Shahidi & Hossain, 2023).

Los fenoles insolubles ligados se encuentran en las plantas en un rango promedio de 20 a 60 % (Shahidi & Hossain, 2023). Las semillas de chíca reportaron tener un 32,27 % de fenoles insolubles con respecto al total de fenoles encontrados (Rahman et al., 2017). Sin embargo, en ciertas matrices se han reportado altos porcentajes de insolubles. De Camargo et al. (2022) obtuvieron un contenido entre 76,47 - 87,75 % de fenoles insolubles en muestras de garbanzo. En adición, se encontró que la fracción de fenoles insolubles fue predominante con un 79 % en muestras de residuos vitivinícolas de la variedad tempranillo (de Camargo et al., 2014).

En cuanto a su localización en los tejidos de la matriz, los fenoles solubles se encuentran generalmente en los tejidos nutricionales (germen, endospermo, radícula, etc.) mientras que los fenoles insolubles se encuentran generalmente en los tejidos protectores (cáscara o piel de la semilla y pericarpio) y una parte de ellos también se localizarían en los tejidos nutricionales, pero en menor proporción (Shahidi & Yeo, 2016; Z. Wang et al., 2020). Sin embargo, no se puede hacer una generalización en este aspecto puesto que en el caso de la piel de maní se encontró un bajo contenido de fenoles insolubles (7,93 %) (de Camargo et al., 2017).

2.2 La nuez

2.2.1 Generalidades

El árbol de la nuez (*Juglans regia* L.) pertenece a la familia Juglandaceae del orden de las Fagales (ITIS, 2011). Este árbol ha sido cultivado en el sureste del continente Europeo y se ha prolongado hasta el Himalaya y el suroeste de China. Esta planta es procedente de Kirguistán (Asia Central), donde el árbol de nuez crece hasta los 1000 - 2000 m de altitud. Este árbol ha sido comercializado por 66 países alrededor del mundo sobre una superficie total de 1 417 640 ha en el año 2021. Su producción a nivel global fue de 3 500 172, 84 t (con cáscara) en el período 2021. China, Estados Unidos y Chile representaron el 31, 19 y 4 % del total de la producción mundial de nueces, respectivamente. La producción de nuez con cáscara en Chile ascendió a 148 000 t en el año 2021. Además, se registraron ventas de exportación por 32 848 toneladas equivalente a USD 237 605 miles de dólares como nuez sin cáscara. Sus principales destinos fueron Alemania, Italia y España (FAO, 2023).

2.2.2 Composición química

El fruto comestible de la nuez, conocido como *kernel* en inglés, es una semilla grande, drupáceo, con mesocarpio carnoso y endocarpio duro, arrugado en dos valvas y el interior dividido incompletamente en dos o cuatro celdas, con un diámetro geométrico promedio del fruto de la nuez con el endocarpio duro que varía entre 3,5 a 4,5 cm (Ercisli et al., 2012). Está compuesto principalmente de ácidos grasos, tocoferoles, fitoesteroles y compuestos fenólicos (Abdallah et al., 2015). La parte comestible es rica en macro y micronutrientes tal como se presenta en la Tabla 1. Entre los macronutrientes se destaca el alto contenido de lípidos y proteínas. El contenido de lípidos puede variar entre 50 a 70 % dependiendo del tipo de cultivar, condiciones climáticas y de suelo. Comparado a otros frutos secos,

la nuez se caracteriza por ser una rica fuente de ácidos grasos esenciales tanto monoinsaturados (AGMI), donde predomina el ácido oleico, como poliinsaturados (AGPIs), teniendo al ácido linoleico y α -linolénico como los principales. Entre los micronutrientes (vitaminas y minerales), presenta un alto contenido de potasio, fósforo, magnesio y calcio, mientras que es baja en sodio. Además, tiene un contenido importante de la vitamina liposoluble E y vitaminas del complejo B (Croitoru et al., 2019).

Tabla 1. Composición nutricional de la nuez

Energía/Constituyentes	Valor nutricional por 100 g
Energía	2738 kJ (654 kcal)
Carbohidratos	13,71
Almidón	0,06
Azúcares	2,61
Fibra dietaria	6,7
Lípidos	65,21
Lípidos saturados	6,126
Lípidos monoinsaturados	8,933
Lípidos poliinsaturados	47,174
Proteínas	15,23
Humedad	4,07
Calcio	98 mg
Hierro	2,91 mg
Magnesio	158 mg
Manganeso	3,414 mg
Fósforo	346 mg
Potasio	441 mg
Sodio	2 mg
Zinc	3,09 mg
Beta-caroteno	12 μ g
Vitamina A	20 UI
Tiamina (B1)	0,314 mg
Riboflavina (B2)	0,15 mg
Niacina (B3)	1,125 mg
Ácido pantoténico (B5)	0,570 mg
Vitamina B6	0,537 mg
Folato (B9)	98 μ g
Vitamina C	1,3 mg
Vitamina E	0,7 mg
Vitamina K	2,7 μ g

μ g= microgramos; mg = miligramos; UI=unidades internacionales (Croitoru et al., 2019).

2.2.3 Compuestos fenólicos de la nuez

Entre muchos frutos secos, un estudio mostró que el contenido de fenoles totales de la nuez es significativamente mayor que el de las almendras, avellanas, anacardos y cacahuets (Rocchetti et al., 2018). Se ha mostrado que la mayoría de los fenoles de la nuez se presentan en forma libre (51,1%-68,1%), seguidos de formas insolubles o ligadas (21,0%-38,0%) y esterificadas (9,7%-18,7%). Asimismo, se ha demostrado que los fenoles solubles (ácidos hidroxicinámicos y flavanoles) pueden ser mejor extraídos con acetona (Wu et al., 2021).

2.2.3.1 Ácidos fenólicos de la nuez

Los ácidos fenólicos se consideran los más representativos en la nuez, alrededor de un 80 % de los fenoles totales (Wu et al., 2021). Entre los ácidos fenólicos encontrados más distintivos en muestras de nuez, se ha reportado la presencia del ácido gálico y otros ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (Croitoru et al., 2019). En la Figura 8, se muestra la estructura química del ácido gálico, que también es denominado como 3,4,5 trihidroxibenzoico. Además se identificó el ácido ferúlico en diez diferentes nueces tanto americanas como francesas (Slatnar et al., 2015). El ácido gálico junto con otros ácidos fenólicos fue encontrado en las fracciones de fenoles solubles libres, esterificadas e insolubles (Wu et al., 2021).

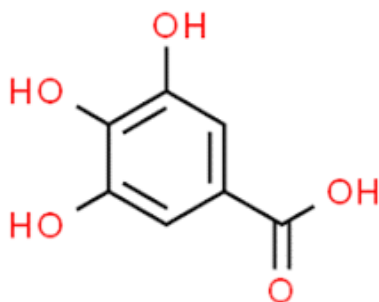


Figura 8. Estructura química del ácido gálico (Croitoru et al., 2019).

2.2.3.2 Flavonoides de la nuez

Los flavonoides se pueden encontrar en un 20 % en la nuez, donde los flavonoides del tipo flavanoles predominan sobre los flavonoles y flavanos en nueces provenientes de origen chino (Wu et al., 2021). Entre los flavonoides identificados en nueces americanas se encontraron los derivados de quercetina (Regueiro et al., 2014).

2.2.4 Propiedades beneficiosas de la nuez

Desde hace un largo tiempo, el árbol de nuez ha sido objeto de arduo estudio por sus propiedades beneficiosas para la salud. La extensa gama de sus características bioactivas se debería primordialmente a la existencia de elementos fitoquímicos como ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, carotenoides, compuestos que contienen nitrógeno junto con otros elementos polifenólicos (Fukuda et al., 2003). Casi todas las partes de esta planta, como la corteza, la almendra, las flores, las hojas, la cáscara, el tabique y el aceite poseen sus propias características bioactivas (Jahanban-Esfahlan et al., 2020). La composición química de los fitonutrientes depende de la ubicación geográfica, las condiciones climáticas y la naturaleza del suelo. Muchos estudios han demostrado que la nuez muestra propiedades antioxidantes, analgésicas, antiulcerosas, antidiabéticas, hepatoprotectoras, antimicrobianas, antiinflamatorias, antihipertensivas, neuroprotectoras, anticancerígenas, cicatrizantes y otras bondades terapéuticas tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (animales y humanos) (Carvalho et al., 2010; Gupta et al., 2019; Ni et al., 2021b; Shah et al., 2015). Las principales propiedades nutraceuticas de los fenoles más predominantes en la nuez se presentan en la Figura 9.

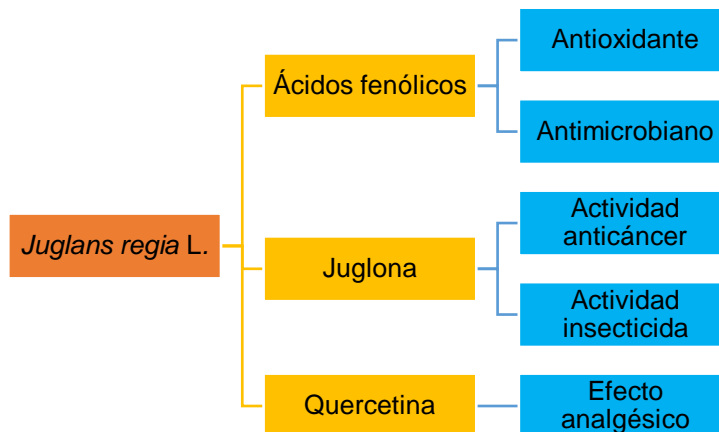


Figura 9. Potencial bioactivo de los principales constituyentes de *Juglans regia* L. (Gupta et al., 2019).

2.2.5 Actividad antioxidante de la nuez

Se han reportado varios estudios sobre el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en la nuez (Garcia-Mendoza et al., 2021; Trandafir et al., 2016; Wang, Ping et al., 2022; Wu et al., 2021). Estos compuestos pueden llegar a prevenir o detener el progreso de varias enfermedades relacionadas al estrés oxidativo, debido principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agentes reductores, quelante de metales, atrapador de radicales libres, inhibidor de oxígeno singlete y donador de hidrógeno (Shah et al., 2015).

2.2.6 Residuos agroindustriales o subproductos de la nuez

Los residuos agroindustriales vegetales comprenden diferentes partes vegetales no comestibles y subproductos industriales como cáscaras, pieles, cascarillas, huesos, paja, tallos, hojas y bagazo, entre otros, así como los productos no aptos para el consumo debido al deterioro y/o apariencia no aceptable (Galanakis, 2012). Su alto contenido en polisacáridos y metabolitos secundarios los ha convertido en materias primas secundarias valiosas y

fácilmente disponibles para la producción de energía, productos químicos o fuentes de ingredientes funcionales y/o nutracéuticos.

La agroindustria de la nuez puede llegar a generar diferentes tipos de subproductos o residuos agroindustriales como se muestra en la Figura 10. El árbol de nuez está compuesto de brotes, ramas, la raíz, el tronco, las hojas y el fruto, de los cuales principalmente de los dos últimos mencionados se han extraído compuestos con propiedades bioactivas en cantidades importantes.

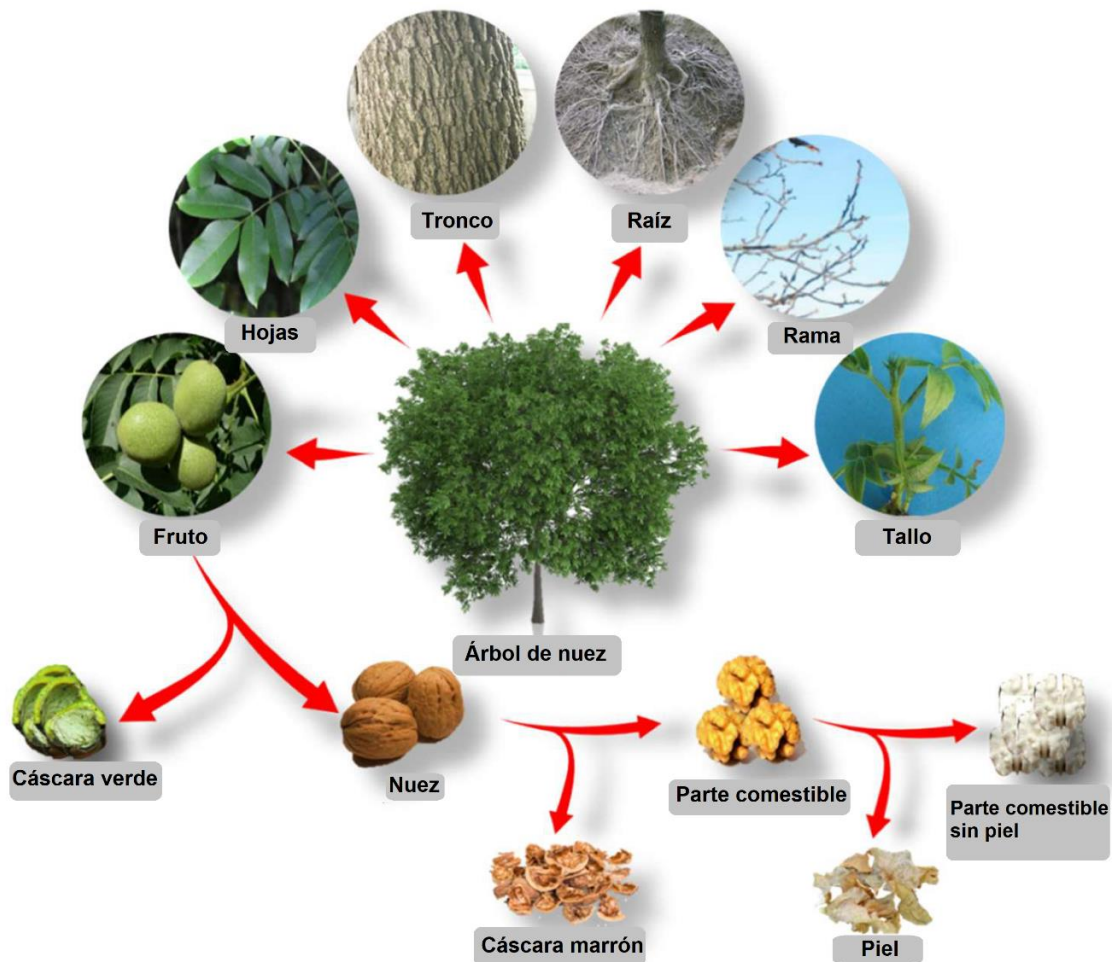


Figura 10. Diferentes partes del árbol de nuez y su fruto, así como los subproductos generados (Jahanban-Esfahlan et al., 2019).

En cuanto al fruto en sí, se considera la parte más importante de la planta por contener la parte comestible. En la agroindustria de la nuez, se pueden llegar a generar subproductos o residuos como la cáscara verde externa, la cáscara interna (*shell* en inglés), la nuez en sí, la piel y la membrana o tejido que separa la nuez en partes (Chamorro et al., 2022). La cáscara interna es considerada un material lignocelulósico de alta dureza. La piel que cubre la parte comestible es una capa protectora marrón, la cual protege de la oxidación y contaminación microbiana. Se ha reportado que la piel presenta mayormente un alto contenido de compuestos fenólicos y una vez retirada (nuez sin piel), se evidenció la disminución de la actividad antioxidante (Arcan & Yemenicioğlu, 2009; Colaric et al., 2005).

2.3 Bebidas vegetales

En el procesamiento de la nuez, se llegan a generar ciertos subproductos, como se muestra en la Figura 11. En el caso del procesamiento de las bebidas vegetales también se generan subproductos que pueden ser revalorados. Las bebidas vegetales son bebidas elaboradas a base de semillas oleaginosas, cereales, legumbres o de frutos secos (nuez, almendra, anacardo, soja), conocidas también como bebidas *plant-based* o sustitutos de la leche. Su consumo se ha incrementado estos últimos años debido a diversas causas entre ellas la tendencia del consumidor a preferir alimentos saludables que no sean de origen animal y que tengan efectos beneficiosos para su salud, así como el aumento de personas intolerantes a la lactosa a nivel mundial. El volumen de las ventas de la bebida vegetal de avena de 2017 a 2018 aumentó en un 71 %, asimismo la bebida vegetal de almendras y de coco en un 10 y 16 % respectivamente (Aydar et al., 2020).

En Chile, desde el 2017, la empresa Vilay inició el procesamiento y comercialización de bebidas vegetales a base de almendras. Entre el año

2018 y 2019 el volumen de producción de las bebidas vegetales creció en más de un 70% en Chile (Sour magazine, 2021). Luego, en el año 2020, la empresa Not Company (NotCo) lanzó al mercado una bebida vegetal llamada “Not Milk” a base de diferentes matrices vegetales como arvejas, achicoria, coco, repollo, piña, entre otras. Estas bebidas se caracterizan por su rico contenido de ácidos grasos insaturados, fibra, compuestos bioactivos como fitoesteroles y compuestos fenólicos los cuales tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y que podrían reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, aterosclerosis y/o diabetes. Sin embargo, uno de los desafíos actuales en la industria de este tipo de bebidas es el manejo y aprovechamiento de los residuos generados conocidos como tortas obtenidas en el proceso de filtración, las cuales son fuentes de compuestos fenólicos solubles e insolubles con alta capacidad antioxidante, además de aceites esenciales (Penha et al., 2021).

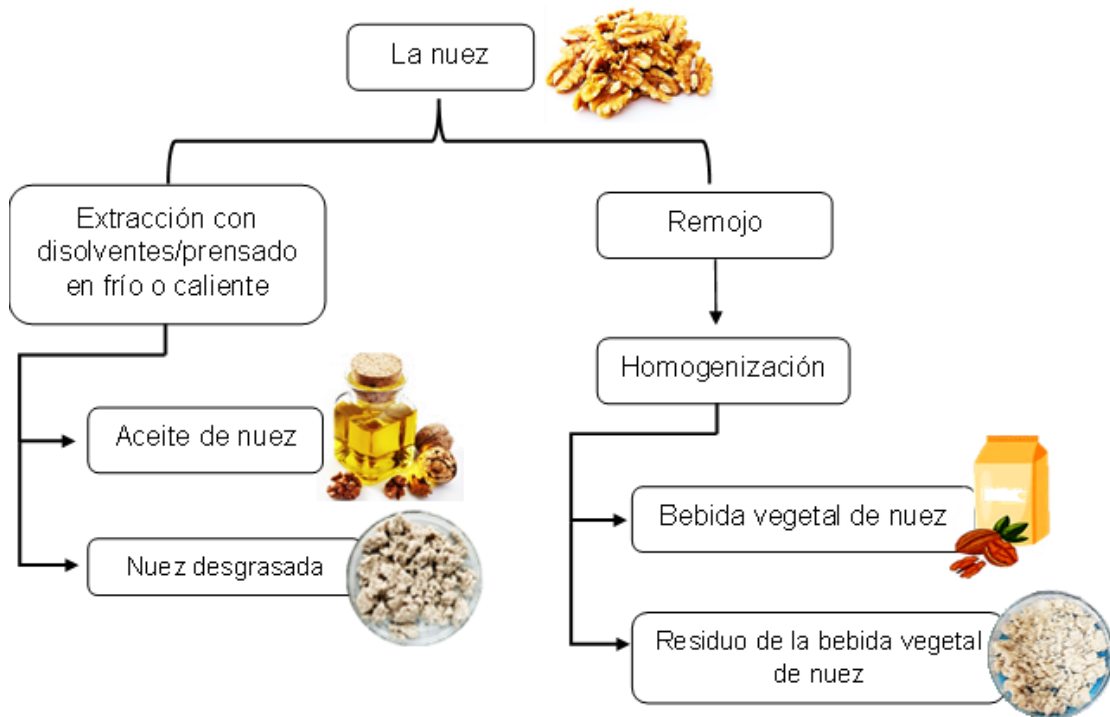


Figura 11. Diagrama de flujo del procesamiento de la bebida vegetal y aceite de nuez y sus subproductos generados.

2.4 Extracción de compuestos fenólicos

El método más común de extracción de compuestos fenólicos es considerado la extracción con solventes que podrían incluir la maceración, decocción, percolación y/o digestión. La extracción por maceración es un procedimiento simple que consiste en remojar muestras trituradas en un solvente adecuado en un sistema cerrado seguido de agitación constante o intermitente a temperatura ambiente (Olejar et al., 2015). Después del período de extracción, se utiliza un proceso de separación para dissociar el sólido del solvente. Este proceso generalmente se logra mediante filtración, sedimentación o centrifugación. Es una técnica simple, aunque tiene como desventaja ser lenta y requerir un importante volumen de solvente (Alara et al., 2021).

Los fitoquímicos se extraen principalmente utilizando disolventes orgánicos y su formulación acuosa. Por ejemplo, la acetona al 50 % ha demostrado ser eficiente en la extracción de polifenoles a partir del tabique de las nueces en comparación con el etanol y mezclas hidroalcohólicas (Rusu et al., 2018). Sin embargo, otro estudio informó que el agua sería el mejor disolvente para la extracción de polifenoles a partir de cáscaras verdes de nuez (Fernández-Agulló et al., 2013). Un estudio reciente encontró que los disolventes acuosos y orgánicos lograron mejores eficiencias de extracción en comparación con los disolventes orgánicos absolutos (de Camargo et al., 2021). Del mismo modo, se reportó que el metanol podría ser un disolvente adecuado para extraer polifenoles a partir de extractos de nueces (Wu et al., 2021).

2.4.1 Extracción mediante hidrólisis alcalina y ácida

Los compuestos fenólicos solubles esterificados y eterificados pueden ser extraídos mediante hidrólisis alcalina y ácida respectivamente. La hidrólisis alcalina consiste en aplicar un álcali siendo mayormente empleado el hidróxido de sodio (NaOH) y el hidróxido de potasio (KOH) diluidos en concentraciones

entre 2 a 4 M. Mediante el tratamiento alcalino, los enlaces éster que unen al compuesto fenólico con algún componente de la matriz vegetal son divididos permitiendo la liberación de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y otros polifenoles. Las condiciones de extracción a tomar en cuenta mediante el uso de álcalis serían mantener protegidos los extractos de la luz o acondicionarlos en un lugar oscuro y ajustar luego el pH a condiciones ácidas (2 a 4) adicionando ácido cítrico o clorhídrico concentrado. El proceso de acidificación es muy relevante puesto que las condiciones ácidas permiten que se evite la formación de las quinonas que se dan usualmente en condiciones básicas donde se desprotonan los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. En adición, una consecuencia que provoca el tratamiento con una base fuerte es la precipitación de las proteínas. Aunque la hidrólisis alcalina se da en largos rangos de tiempo (1 a 4 horas), mediante esta hidrólisis se puede lograr la separación irreversible de los enlaces éster.

En el caso de la obtención de los compuestos fenólicos insolubles, también se da generalmente mediante la hidrólisis alcalina. El proceso de extracción de los compuestos fenólicos mediante el tratamiento con ácidos fuertes se da mediante el empleo de ácidos tales como el ácido clorhídrico o sulfúrico en altas concentraciones (6M), donde se da el rompimiento de enlaces mayormente del tipo éter (Shahidi & Hossain, 2023; Shahidi & Yeo, 2016; Z. Wang et al., 2020).

2.5 Técnicas analíticas

2.5.1 Compuestos fenólicos totales (CFT)

El método de Folin-Coicalteu determina de manera colorimétrica, utilizando un fenol de referencia (ácido gálico), la cantidad de polifenoles totales presentes en las muestras. La técnica se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir una mezcla de ácidos fosfomolibdotúngsticos llamada reactivo de Folin-

Ciocalteu, que en su forma oxidada es de color amarillo, generando un complejo reducido de molibdeno (V) de color azul y que se mide a una longitud de onda de 765 nm. En la Figura 12 se aprecia la reacción química que se da del ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Muñoz-Bernal et al., 2017).

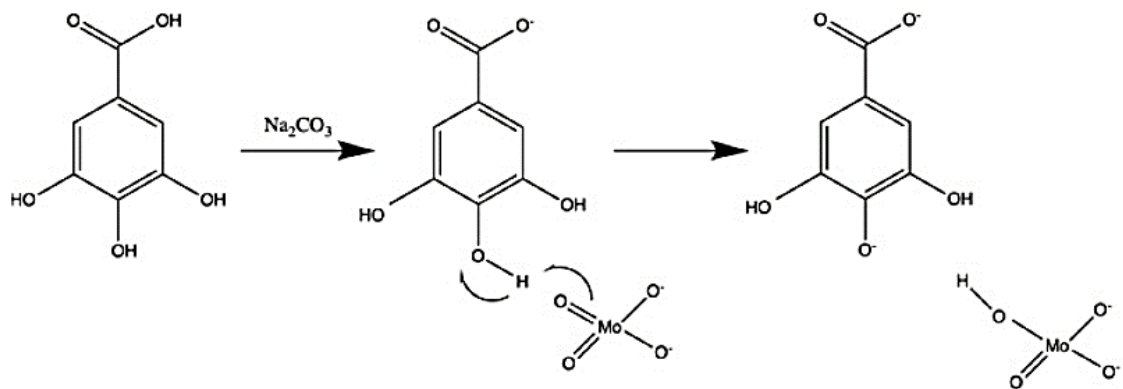
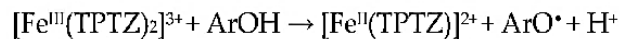


Figura 12. Reacción de ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Muñoz-Bernal et al. 2017).

2.5.1.1 Capacidad reductora de hierro del plasma (FRAP)

Este método consiste en la reducción de iones férricos (Fe III) a ferrosos (Fe II) a un pH bajo de 3,6, resultando un complejo coloreado. El reactivo tripiridiltriazina (TPTZ) férrico es reducido a la forma ferrosa (Fe II) por acción de antioxidantes donde un color azul intenso es formado a una absorbancia máxima de 593 nm (Benzie & Strain, 1996). En la Figura 13 se presenta la reacción química y el mecanismo que se lleva a cabo en el ensayo FRAP.

Reacción química



Mecanismo de reacción

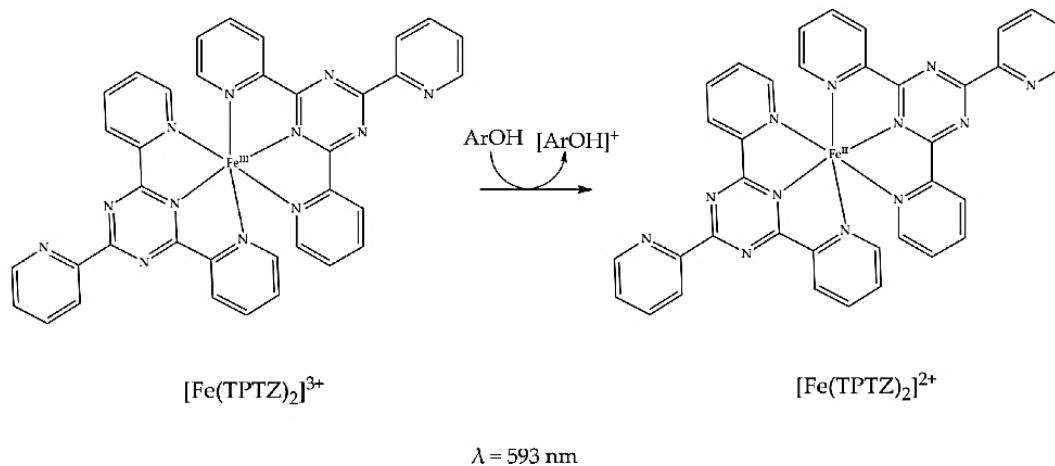


Figura 13. Reacción química y mecanismo de reacción que se produce en el ensayo FRAP (ArOH: antioxidante) (Bibi Sadeer et al., 2020).

2.5.1.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

El método ORAC fue desarrollado por Cao y Prior (1998). Este método evalúa los cambios de fluorescencia de una molécula blanco, fluoresceína (FLH), en presencia de radicales no sólo peroxilo (ROO^\bullet) sino también alcoxilo (RO^\bullet) formados a partir de AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro) (Dorta et al., 2015). Este fenómeno puede ser cuantificado siguiendo el perfil cinético de la molécula blanco en función del tiempo de reacción correlacionando al área bajo la curva de los perfiles obtenidos en presencia y ausencia de una muestra antioxidante (XH) y un antioxidante de referencia, que mayormente es el Trolox, análogo de la vitamina E (Prior, 2015; Shahidi & Zhong, 2015). En la Figura 14 se representa el mecanismo de reacción que se desarrolla durante el ensayo ORAC.

El índice ORAC basado en la fluoresceína está determinado por la reactividad de un antioxidante hacia los radicales alcoxilo y radicales peroxilo, y la contribución relativa de estas dos especies depende de la reactividad de la sonda y el antioxidante. El radical peroxilo es una especie de oxígeno reactivo el cual es el más importante biológicamente presente en el cuerpo humano, siendo el más abundante y responsable por el daño oxidativo. Por lo tanto, el método ORAC, es un método más realista y confiable que otros métodos que emplean radicales sintéticos. Otra ventaja es que el método ORAC usando la fluoresceína, permite medir la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica de una muestra (Dorta et al., 2015; Shahidi & Zhong, 2015).

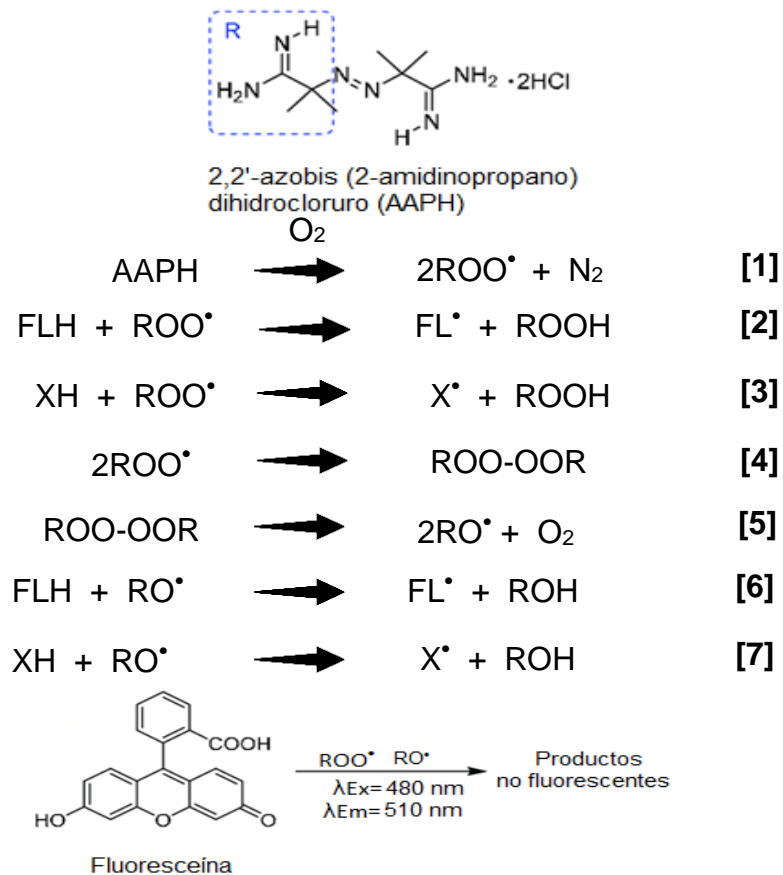


Figura 14. Mecanismo de reacción que se produce en el ensayo ORAC (Dorta et al., 2015).

3. HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos recuperados en la fracción insoluble representan un mayor contenido y potencial antioxidante en comparación a las fracciones de fenoles solubles tanto libres, esterificados y eterificados extraídos a partir de los residuos del procesamiento de la nuez.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los residuos provenientes de la producción de la nuez como fuente de compuestos bioactivos con potencial antioxidante.

4.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar las fracciones que contienen fenólicos solubles (FS) y fenólicos insolubles (FI) de los residuos del procesamiento de la nuez en cuanto a sus contenidos de fenólicos totales y sus perfiles fenólicos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).
- b) Evaluar el poder reductor (FRAP) y el potencial antioxidante (ORAC) de las fracciones que contienen FS y FI.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Materia prima

La nuez en formato mariposa light (variedad Chandler) sin cáscara gruesa marrón fue obtenida de una tienda de productos naturales, cosechada en otoño del 2022 en la comuna del Paine, provincia de Maipo, de la región Metropolitana de Chile. En la Figura 15 se muestra la nuez adquirida para el desarrollo del presente estudio.

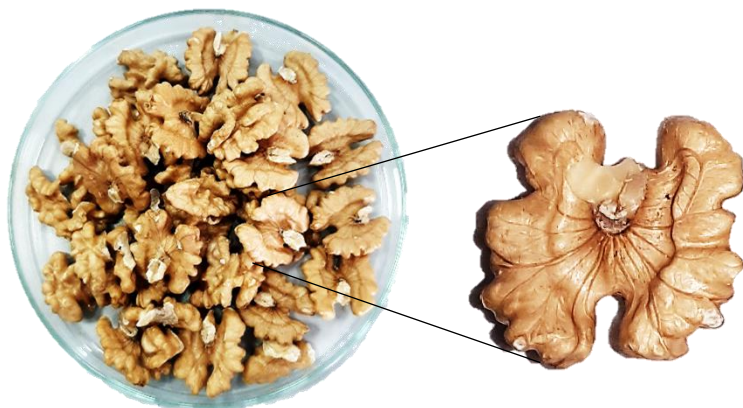


Figura 15. Nuez variedad Chandler empleada en el presente estudio.

5.1.2 Solventes y reactivos químicos

- Hexano, Merck (Darmstadt, Germany).
- Acetona, Merck (Darmstadt, Germany).
- Éter dietílico, Merck (Darmstadt, Germany).
- Acetato de etilo, Merck (Darmstadt, Germany).
- Metanol, Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido clorhídrico, Merck (Darmstadt, Germany).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido acético glacial, Merck (Darmstadt, Germany).
- Hidróxido de sodio (NaOH), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

- Carbonato de sodio (Na_2CO_3), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- 2,4,6-tri(2-piridil)-S-triazine (TPTZ), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Acetato de sodio trihidratado, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Cloruro férrico (FeCl_3), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Fluoresceína 70 Nm (376,27 g/mol), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Solución de buffer acetato 0,3 M, pH 3,6
- Solución buffer fosfato pH 7,4.
- 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (271 g/mol), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- El agua empleada para el análisis HPLC fue purificada en un sistema Milli-Q (Synergy, Millipore, Darmstadt, Germany).

5.1.3 Materiales de laboratorio

- Papel filtro Watman #1
- Embudo Buchner
- Papel aluminio.
- Papel parafilm.
- Film plástico.
- Materiales de vidrio (matraces aforados de 10 - 250 mL, vasos de precipitados de 100 - 1000 mL, probetas de 25 - 500 mL, frascos con tapa de 100 - 1000 mL.)
- Tubos falcon cónicos de 15 - 50 mL.
- Tubos Ependorf 1,5 mL.
- Puntas de plástico de diferente tamaño.
- Micropipetas.
- Viales de vidrio 2 mL.

5.1.4 Equipos

- Licuadora (Model Blender Base, Osterizer, México).
- Equipo homogenizador (MioMat Pro, China).
- Agitador magnético (LMS-1003, LabTech).
- pHmetro (pH6175, JENCO® VisionPlus).
- Centrífuga (Modelo Z206A, HERMLE, Alemania).
- Baño termostático con agitador (Modelo LSB-130S, LabTech, Corea).
- Cabina de extracción
- Rotaevaporador (Modelo RE 100-Pro, MlabScientific) acoplado a una bomba (Vac V-500, BÜCHI, Suiza).
- Espectrofotómetro UV-Vis (N4S, BiosLabChile, China).
- Lector de microplacas Infinite Pro 200 (TECAN, Suiza).
- Espectrómetro de masas triple cuadrupolo 4500 con electrospray (Turbo V) adjunto a un cromatógrafo líquido Eksigent Ekspert Ultra 100 (AB/Sciex, Concord, ON, Canadá).

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de la muestra

5.2.1.1 Obtención de la nuez desgrasada

La fracción lipídica de la nuez fue removida mediante el licuado de la nuez previamente triturada manualmente con solvente hexano (sólido/solvente, 1:5, w/v, 5 min) en una licuadora (Model Blender Base, Osterizer, México) a temperatura ambiente tres veces. Las nueces licuadas con hexano fueron filtradas al vacío a través de un papel filtro Whatman #1 usando un embudo Buchner. Las nueces desgrasadas (Figura 16a) fueron secadas en estufa por 24 h a 40 °C siendo posteriormente molidas y almacenadas a -20 °C.

5.2.1.2 Obtención del residuo de bebida vegetal de nuez desgrasado

Para la obtención del residuo de bebida vegetal de nuez, 100 gramos de nueces con piel fueron sometidas a remojo en agua destilada por un tiempo de 8 horas. Luego, las nueces fueron estrujadas en un equipo homogenizador (MioMat Pro, China) a una temperatura de 42 °C por 12 min. Al residuo sólido obtenido, tipo una torta, se le extrajo la fracción lipídica de la misma forma que a la nuez, haciendo uso del solvente hexano. El residuo de la bebida vegetal de nueces desgrasado (Figura 16b) fue sometido a un proceso de secado en estufa por 24 h a 40 °C y luego molido siendo almacenado a -20 °C para posteriores extracciones.

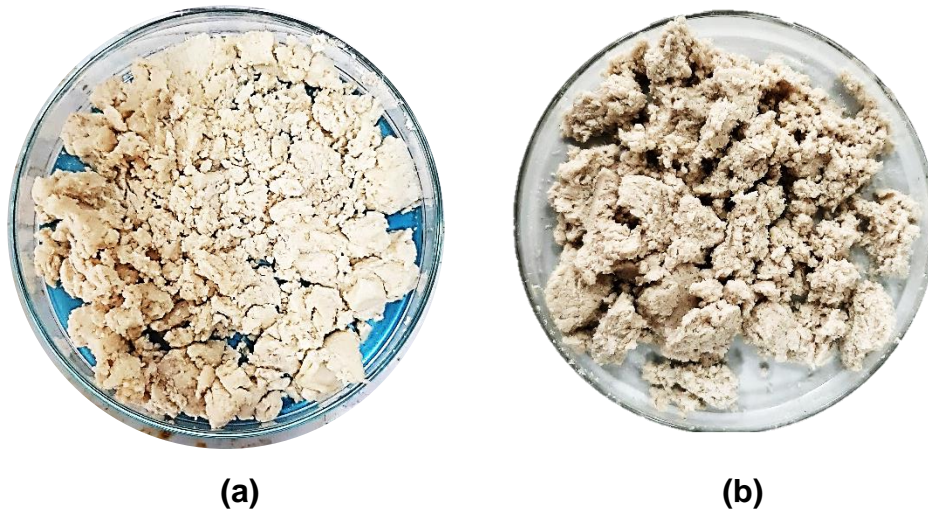


Figura 16. Residuo de (a) nuez desgrasada y (b) de bebida vegetal de nuez desgrasado.

Haciendo un balance de masa desde la recepción de la nuez hasta la obtención de la nuez desgrasada y residuo de la bebida vegetal de nuez desgrasado, se obtuvieron rendimientos de 35 y 17 % respectivamente (Anexo 1 y Anexo 2).

5.2.2 Extracción de los compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos solubles como insolubles tanto a partir de la nuez desgrasada como del residuo de la bebida vegetal de nuez desgrasado se llevaron a cabo según se muestra en la Figura 17. Se realizó una hidrólisis alcalina para la obtención de la fracción de fenoles solubles esterificados e insolubles, mientras que la fracción de fenoles solubles esterificados fue obtenida mediante una hidrólisis ácida.

5.2.2.1 Extracción de compuestos fenólicos solubles

Los fenoles solubles fueron extraídos usando acetona : agua (1:1, v/v) (Rusu et al., 2018). En resumen, 3 g de la muestra fueron extraídos con 30 mL del solvente (1:10, m/v). Estas muestras fueron sometidas a 30 °C x 20 min en un baño con agitación (Modelo LSB-130S, LabTech, Corea). Luego fueron centrifugadas a 4000 g x 5 min (Modelo Z206A, HERMLE, Alemania). Después de la centrifugación, los sobrenadantes fueron recolectados. Este proceso de extracción fue repetido tres veces. Los sobrenadantes colectados fueron empleados para la extracción de la fracción de fenoles solubles libres, esterificados y eterificados, y el residuo sólido fue almacenado para posteriormente extraer la fracción de fenoles insolubles presentes en la nuez y en el residuo de la bebida vegetal de nuez. El solvente orgánico (acetona 50 %) fue removido bajo vacío a 40 °C usando un equipo rotavapor (Modelo RE 100-Pro, MlabScientific) acoplado a una bomba (Vac V-500, BÜCHI, Suiza) obteniendo una fracción acuosa de fenoles solubles, la cual fue empleada para las subsiguientes extracciones.

A. Extracción de fenoles solubles libres

Para la obtención de la fracción de fenoles libres, la fracción acuosa fue ajustada su pH a 2 y luego se realizaron lavados con un mismo volumen de la mezcla de solventes éter dietílico: acetato de etilo (1:1, v/v) cinco veces. Entre cada lavado se agitó y decantó la muestra recuperando la fase acuosa inferior.

La fase orgánica suspendida fue evaporada hasta obtener un extracto seco. Este extracto fue disuelto en 5 mL de metanol y almacenado a temperaturas de congelación para posteriores análisis.

B. Extracción de fenoles solubles esterificados

Para la obtención de la fracción de solubles esterificados, la fase acuosa fue hidrolizada con NaOH 2M por cuatro horas. Luego el pH de la fase acuosa hidrolizada fue ajustado a 2 con HCl 6M y los fenoles liberados fueron extraídos con la mezcla de éter dietílico: acetato de etilo (1:1, v/v). Se evaporó la mezcla de solventes hasta la obtención de un extracto seco, el cual fue suspendido en 5 mL de metanol y sometido a congelación para los análisis posteriores respectivos.

C. Extracción de fenoles solubles eterificados

La fracción de fenoles solubles eterificados fue obtenida haciendo un previo ajuste del pH a 2 con HCl 6M a partir de la fase acuosa que se recolectó de la extracción de la fracción de fenoles esterificados. Esta fase acidificada fue incubada a 95 °C x 45 min en baño termostático con agitación. Luego, los fenoles eterificados fueron extraídos con la mezcla de éter dietílico: acetato de etilo (1:1, v/v). El solvente fue evaporado hasta obtener un extracto seco, el cual fue disuelto en 5 mL de metanol y almacenado a temperaturas de congelación para posteriores análisis.

5.2.2.2 Extracción de compuestos fenólicos insolubles

Para la obtención de la fracción de fenoles insolubles, el residuo sólido obtenido de la extracción de los fenoles solubles fue disuelto en NaOH 2M (20 mL/g de muestra) y agitado por 4 h. La mezcla fue ajustada a un pH de 2 con HCl 6M. Luego, se extrajeron los fenoles insolubles con la mezcla de éter dietílico: acetato de etilo (1:1, v/v) cinco veces, siendo sometido a centrifugación para

facilitar la separación de las fases (orgánica y la acuosa). La mezcla de solventes fue evaporada al vacío hasta obtener un extracto seco, el cual fue también suspendido en un volumen determinado de metanol para posteriores análisis.

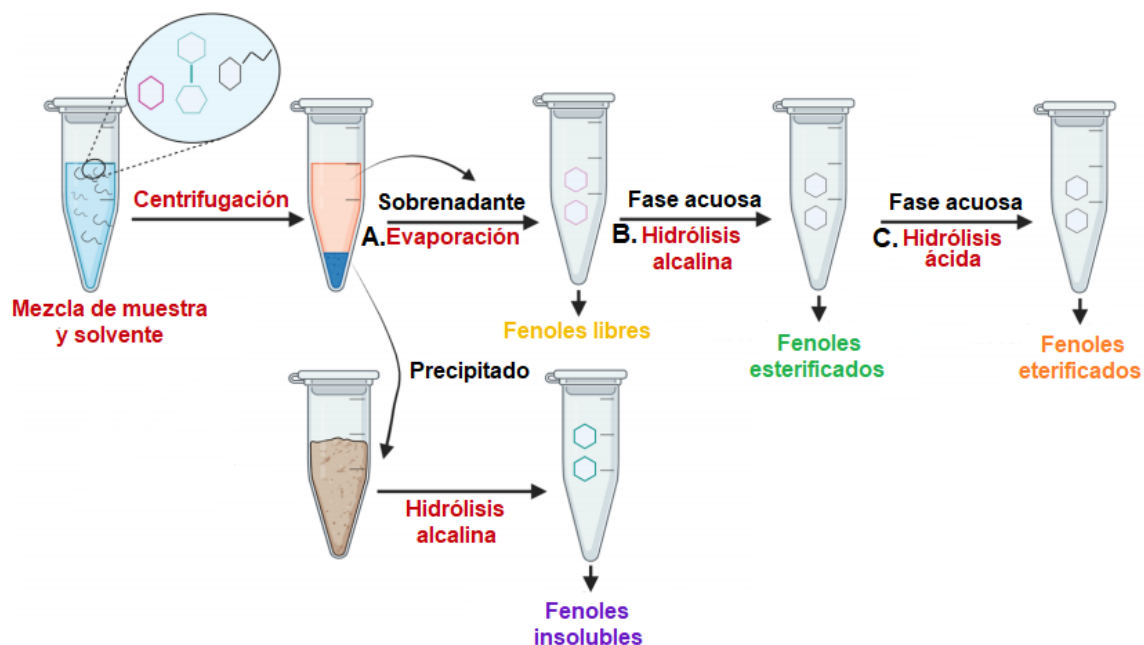


Figura 17. Proceso de extracción de compuestos fenólicos A) solubles libres, B) esterificados, C) eterificados e insolubles (Shahidi & Hossain, 2023).

5.2.3 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Los fenoles totales fueron analizados de acuerdo a la metodología descrita por Swain & Hillis (1959) con ciertas modificaciones. En resumen, 450 μL de agua destilada fue mezclada con 400 μL de carbonato de sodio (20 %, p/v) en un tubo de ensayo. Luego, el extracto diluido en metanol (150 μL) fue adicionado seguido del reactivo del fenol Folin-Ciocalteu (2000 μL). Para la preparación del blanco, se adicionó 150 μL de metanol en lugar del extracto. Dichas preparaciones fueron mantenidas a 37 $^{\circ}\text{C}$ x 30 min. Luego, la absorbancia fue medida a 765 nm en un equipo espectrofotómetro (N4S, BiosLabChile, China) por triplicado para cada muestra. El contenido de compuestos fenólicos totales

fue expresado como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra en peso seco.

5.2.4 Análisis UPLC-MS/MS

El análisis mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) acoplado a espectrometría de masas tándem (MS/MS) fue llevado a cabo siguiendo la metodología descrita por de Camargo et al. (2022) empleando un equipo espectrómetro de masas triple cuadrupolo 4500 provisto con un electrospray (Turbo V) adjunto a un cromatógrafo líquido Eksigent Ekspert Ultra 100 con un sistema de automuestreo (AB/Sciex, Concord, ON, Canadá). El electrospray fue empleado en modo negativo considerando los siguientes parámetros: gas de cortina = 30, gas de colisión = 10, tensión de pulverización iónica = 4500, temperatura = 650, gas fuente de iones 1 = 50, gas fuente de iones 2 = 50, potencial de entrada = 10.

La separación cromatográfica se efectuó considerando una elusión en gradiente con dos fases móviles (A) 0,1 % ácido fórmico y (B) metanol. El gradiente se llevó a cabo de la siguiente manera: 0.1 min, 5 % B; 1-12 min, 5-50 % B; 12-13 min 50-50 % B; 13-14 min, 50-5 % B; y 14-15 min, 5 % B. El volumen de inyección fue de 10 μ L con un caudal de flujo de 0.5 mL/min, y una columna con tapa final (LiChrospher 100 RP-18; 125 mm, 4 mm, 5 μ m; Merck, Darmstadt, Alemania) mantenido a 50 °C. Estándares comerciales fueron empleados para construir las curvas de calibración con fines de cuantificación de los compuestos presentes en las muestras. Los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) así como el r^2 de los gráficos trazados para cada estándar fueron los siguientes: ácido gálico (LDD = 41 ppb, LDC= 124 ppb y un r^2 = 0,9988); ácido *p*-cumárico (LDD= 124 ppb, LDC= 377 ppb y un r^2 = 0,9911); ácido ferúlico (LDD= 110 ppb, LDC= 334 ppb y un r^2 = 0,9944); ácido sinápico

(LDD= 120 ppb, LDC= 364 ppb y un $r^2 = 0,9984$). Todos los análisis fueron realizados en triplicado para los estándares y muestras respectivas.

5.2.5 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

El poder reductor de los extractos fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por Benzie & Strain (1996) con algunas modificaciones reportadas por de Camargo et al. (2022). El reactivo FRAP fue preparado mezclando 50 mL de la solución tampón acetato (pH 3,6), 5 mL de la solución TPTZ diluido en HCl (40 mM) y 5 mL de la solución de cloruro férrico (FeCl_3). Alícuotas de 300 μL de muestra fueron mezcladas con 2700 μL del reactivo FRAP en un tubo de ensayo. Luego, las muestras fueron incubadas en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas a 593 nm en un espectrofotómetro UV-vis (N4S, BiosLabChile, China) por triplicado para cada muestra. La curva de calibración fue construida con el estándar Trolox en concentraciones desde 25 a 200 μM . Los resultados fueron expresados como μmol de equivalentes Trolox por gramo de muestra.

5.2.6 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC fue realizado siguiendo la metodología descrita por de Camargo et al. (2019) con ciertas modificaciones. Alícuotas de 175 μL de tampón fosfato pH 7,4, 30 μL de fluoresceína y 20 μL de la muestra fueron mezclados en una microplaca de 96 pocillos. Las mezclas fueron incubadas por 20 min a 37 °C dentro del equipo lector de microplacas Infinite Pro 200 (TECAN, Suiza). Luego, se le adicionó 25 μL de AAPH a cada pocillo. Las lecturas de fluorescencia fueron realizadas cada 2 minutos durante 140 min con una longitud de onda de excitación y emisión de 480 nm y 510 nm respectivamente. El estándar Trolox fue empleado en concentraciones desde 2,5 μM a 10 μM .

Las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra. Los resultados fueron expresados como μmol de equivalentes Trolox por gramo de muestra.

5.2.7 Análisis estadístico

Los resultados del contenido de fenoles totales (CFT), LC-MS/MS, poder reductor (FRAP) y potencial antioxidante (ORAC) fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($p < 0,05$) mediante el software Statgraphics Centurion XV.I para conocer las diferencias significativas entre las muestras. Además, los resultados obtenidos mediante ORAC fueron evaluados empleando el software GraphPad Prism 8.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Contenido de fenoles totales (CFT)

La nuez contiene distintos compuestos fenólicos, entre ellos principalmente ácidos fenólicos y flavonoides (Regueiro et al., 2014). En este estudio, el contenido de fenoles totales (CFT) de cada una de las fracciones tanto solubles (libre, esterificada y eterificada) como insoluble fue determinado en los extractos a partir de la nuez desgrasada y el residuo de la bebida vegetal de nuez, los cuales se muestran en la Tabla 2. Aunque las fracciones de fenoles solubles tienen una mayor representación (62,79 %), cabe destacar que la estimación de fenoles totales indica que la nuez presentaría una importante cantidad de fenoles insolubles (37,21 %) que mayormente tiende a ser más difícil su extracción de la matriz puesto que se encuentran adheridos fuertemente a la pared celular (Shahidi & Yeo, 2016). La relación de fenoles solubles sobre insolubles (S/I) presentes en la nuez es de 1,69. Además, dentro de las fracciones solubles, los libres representan el 61,02 %, seguido de los solubles esterificados y eterificados con un 22,45 % y 16,53 % respectivamente.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales (CFT) (mg EAG/100 g p.s.) de las fracciones de fenoles solubles (libres, esterificados, eterificados) e insolubles de la nuez desgrasada y residuo de la bebida vegetal de nuez.

Análisis/muestra	Libres	Esterificados	Eterificados	Insolubles
Nuez desgrasada	384,51 ± 9,82 ^{Aa}	141,5 ± 2,18 ^{Ab}	104,15 ± 2,89 ^{Ac}	373,48 ± 4,96 ^{Aa}
Residuo de bebida vegetal de nuez	124,45 ± 3,49 ^{Bb}	78,3 ± 0,88 ^{Bc}	72,55 ± 0,66 ^{Bc}	167,95 ± 3,32 ^{Ba}

Los datos representan los valores de la media ± desviación estándar (n=3). Las medias seguidas por letras en mayúscula diferentes dentro de una parte de la columna muestran diferencias significativas entre ambas muestras (p < 0.05). Las medias seguidas por letras en minúscula diferentes dentro de una fila muestran diferencias significativas entre las fracciones de fenoles (p < 0,05). EAG, equivalentes de ácido gálico; p.s., peso seco de la muestra desgrasada.

Se llevaron a cabo algunos estudios previos los cuales determinaron el contenido de fenoles totales a partir de un extracto crudo, es decir sin considerar el fraccionamiento de los fenoles como se hizo en el presente estudio. Se reportó un CFT de 540,08 mg EAG/100 g p.s. a partir de nueces de la misma variedad Chandler empleadas en el presente estudio, pero de origen americano (Kafkas et al., 2020). En adición, Trandafir et al. (2016) emplearon nueces de 12 diferentes genotipos provenientes de Rumania con resultados de fenoles totales entre 1131 y 2892 mg EAG/100 g p.s.. Asimismo, Labuckas et al. (2008) reportó un CFT de 1630 mg EAG/100 g p.s. a partir de harina de nuez entera haciendo uso de metanol al 60 % y etanol al 70 % como solvente de extracción. Además, otro estudio donde se analizaron nueces provenientes de dos diferentes áreas de crecimiento en Chile (cerca a la cordillera de los Andes y al Océano Pacífico) de diferentes colores de la variedad Chandler reportó contenidos de fenoles totales en el rango de 570 a 1270 mg EAG/100 g p.s (Fuentealba et al., 2017). Añadiendo, Slatnar et al. (2015) analizaron cuatro variedades de nueces provenientes de Francia y USA donde sus resultados estuvieron en el rango de 609,54 a 1092,51 mg EAG/100 g p.s..

Por otro lado, se han llevado a cabo muy pocos estudios donde se realizaron el análisis de fenoles totales a partir de las diferentes fracciones solubles tanto libres, esterificados como esterificados e insolubles. Es importante resaltar que el presente estudio es el primero en evaluar el contenido de fenoles totales de todas las cuatro fracciones de compuestos fenólicos a partir de la nuez desgrasada. Entre los pocos estudios donde analizaron ciertas fracciones, se encuentra el desarrollado por Wu et al. (2021), los cuales analizaron la nuez sin piel de origen chino obteniendo un CFT de las fracciones de fenoles solubles libres y esterificados e insolubles de 1536, 500 y 749 mg EAG/100 g p.s., respectivamente. Asimismo, se llevó a cabo otro estudio donde se empleó la nuez entera y se obtuvieron rangos mayores de CFT libres, esterificados, pero

de similar contenido de insolubles (341-530 mg EAG/ 100 g p.s.) puesto que lo reportado en el presente estudio se encuentra dentro del rango (Wang et al., 2022). Estas diferencias en el CFT podrían depender de diversos factores como variedad y especie de la nuez, su origen, sus atributos de calidad, factores climáticos, ambientales, agronómicos, así también a los métodos de extracción empleados, tipo de solvente aplicado y diferentes condiciones de preparación e integridad de la matriz vegetal (Fuentealba et al., 2017; Kafkas et al., 2020; Slatnar et al., 2015; Vu et al., 2018; Wei et al., 2022).

En cuanto al residuo de la bebida vegetal de nuez, las fracciones de fenoles solubles libres, esterificados, eterificados e insolubles representaron el 28,08, 17,66, 16,37 y 37,89 %, respectivamente. La relación de fenoles solubles sobre insolubles (S/I) presentes en este tipo de residuo fue de 1,64. Además, dentro de las fracciones solubles, los libres representaron el 45,21 %, seguido de los esterificados y eterificados con un 28,44 % y 26,35 % respectivamente. No se han reportado estudios previos del contenido de fenoles totales a partir de los extractos obtenidos de las diferentes fracciones de fenoles solubles e insolubles de residuos de la bebida vegetal de nueces. En este estudio, se muestra que el 44% de los fenoles presentes en la nuez no fueron extraídos durante la producción de la bebida vegetal de nuez y siguieron permaneciendo en el residuo respectivo. Existen muy pocos estudios llevados a cabo donde se analizaron los fenoles totales a partir de residuos de bebidas vegetales, sin embargo, mayormente se han realizado a partir del residuo de bebida vegetal de soya, conocido comúnmente como "okara"(Canaan et al., 2022; Vital et al., 2018).

Canaan et al. (2022), reportaron un CFT de 298 mg EAG/100 g p.s. a partir del extracto crudo del residuo okara. Además, Vital et al. (2018), analizaron mediante el mismo método de Folin-Ciocalteu con ciertas diferencias el residuo

de la bebida vegetal de soya determinando un CFT de 130,50 mg EAG/100 g p.s.. Por lo tanto, tomando en cuenta que el residuo de la bebida vegetal de nuez presenta un contenido de fenoles totales de 443,25 mg EAG/100 g p.s. a partir de las fracciones tanto de fenoles solubles libre, esterificada, eterificada e insoluble, el residuo de la bebida vegetal de nuez se podría considerar también una fuente importante de compuestos fenólicos a fin de ser aprovechado por la industria de la nuez.

6.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

Estudios previos han logrado realizar la caracterización cualitativa y cuantitativa de los principales compuestos fenólicos presentes en la nuez (Regueiro et al., 2014; Wu et al., 2021). Sin embargo, ante la necesidad de valorar los residuos provenientes de la industria de la nuez, en el presente estudio, ciertos compuestos fenólicos de tipo principalmente ácidos fenólicos y flavonoides fueron identificados y cuantificados de los cuatro extractos o fracciones (libres, esterificados, eterificados e insolubles) a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) por primera vez. En la Tabla 3 se muestran los compuestos fenólicos que fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS).

Fueron identificados diez compuestos fenólicos, entre ellos seis ácidos fenólicos y cuatro flavonoides en el residuo de la bebida vegetal de nuez. Considerando la suma de todas las fracciones, los ácidos fenólicos gálico y *p*-cumárico fueron los que se encontraron en mayor cantidad, con un 92,42 y 3,81 % respectivamente, del total de ácidos fenólicos presentes.

Tabla 3. Compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) de las fracciones solubles (libre, esterificada y eterificada) e insoluble presentes en el residuo de la bebida vegetal de nuez ($\mu\text{g}/100\text{ g}$).

Compuesto fenólico	Libre	Esterificada	Eterificada	Insoluble	Total
Ácidos fenólicos					
Ácido gálico	3061,01 \pm 19,71 ^{Aa}	88,87 \pm 3,83 ^{Bb}	88,10 \pm 0,87 ^{Ab}	530,70 \pm 3,89 ^{Bc}	3768,68
Ácido <i>p</i> -cumárico	18,15 \pm 1,97 ^{Ba}	25,43 \pm 0,08 ^{Ca}	tr	111,73 \pm 5,65 ^{Cb}	155,31
Ácido cafeico	54,50 \pm 0,63 ^C	Tr	nd	tr	54,50
Ácido ferúlico	5,70 \pm 0,44 ^{Ba}	7,38 \pm 0,75 ^{Aa}	tr	40,83 \pm 3,14 ^{Ab}	53,90
Ácido dihidroxibenzoico	43,32 \pm 0,95 ^C	Nd	nd	nd	43,32
Ácido sinápico	Tr	Tr	2,11 \pm 0,15 ^B	tr	2,11
Flavonoides					
Biochanin A	259,17 \pm 20,78 ^{Aa}	593,75 \pm 1,50 ^{Bb}	nd	nd	852,92
Quercetina	40,30 \pm 1,37 ^{Ba}	Tr	tr	34,26 \pm 0,64 ^b	74,56
Quercitrina	37.-,49 \pm 1,18 ^{Ba}	12,53 \pm 0,15 ^{Cb}	11,03 \pm 0,69 ^b	tr	61,05
Crisina	Tr	8,67 \pm 0,36 ^A	tr	tr	8,67

tr, trazas; nd, no detectado. Las medias seguidas por letras mayúsculas diferentes dentro de una parte de la columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). Las medias seguidas por letras minúsculas diferentes dentro de una fila muestran diferencias significativas entre las fracciones de fenoles para cada compuesto fenólico cuantificado ($p < 0,05$).

El ácido gálico, ácido orgánico conocido también como 3,4,5-trihidroxibenzoico, es producido mediante un proceso hidrolítico ya sea ácido o alcalino a partir de un tipo de taninos denominado galotaninos. El ácido gálico ha sido evaluado como aditivo alimentario y para formulaciones farmacéuticas por sus potenciales propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, entre otras. Entre las principales aplicaciones que ha sido evaluado el ácido gálico y sus derivados se encuentra como aditivo antioxidante que contrarresta la oxidación lipídica de productos marinos (ostras) y aceites (Lu et al., 2021; Zhao et al., 2021), la oxidación de antocianinas y pérdida de color en jugos (Roidoung et al., 2016), y además ha sido añadido en empaques

alimentarios (Mehmood et al., 2022) con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos patógenos.

Por otro lado, las propiedades beneficiosas para la salud que aporta el ácido gálico han sido evaluadas como su potencial terapéutico contra la obesidad y la diabetes, mejorando la resistencia a la insulina en modelos animales (Behera et al., 2023). Asimismo, se corroboró que a largo plazo, el ácido gálico mejoró el estado de la microbiota fecal, incrementando la abundancia relativa de las bacterias productoras de ácidos grasos de cadenas corta y redujo los triglicéridos séricos (Yang et al., 2022) en perros. Además, el ácido gálico aportó en la mejora de las funciones renales en ratas (Obafemi et al., 2022).

Al comparar con otras matrices vegetales, el contenido de ácido gálico en la fracción insoluble determinado en el presente estudio (530,70 $\mu\text{g}/100\text{ g p.s.}$) fue mayor al reportado en muestras de residuos de membranas carpelares (404 $\mu\text{g}/100\text{ g p.s.}$) y mesocarpio (264 $\mu\text{g}/100\text{ g p.s.}$) de granada (Ambigaipalan et al., 2016) en la misma fracción, así como de la harina de residuos de semillas de mora (345 $\mu\text{g}/100\text{ g p.s.}$) (Ayoub et al., 2016). Sin embargo, el contenido de ácido gálico resultante fue inferior al encontrado en residuos vitivinícolas (18 000 $\mu\text{g}/100\text{ g p.s.}$) extraído mediante hidrólisis alcalina (de Camargo et al., 2016).

Por otro parte, la biochanina A, la forma metilada de la isoflavona genisteína, fue el flavonoide más predominante con un 85,53 %, seguido de la quercetina y quercitrina con un 7,48 y 6,12 % respectivamente. En el presente estudio, es la primera vez que se identifica y cuantifica la biochanina A presente en un producto de nueces. Anteriormente solo fue identificada y cuantificada la isoflavona daidzeína con trazas de genisteína en nueces *Juglans nigra* L. (Mazur & Adlercreutz, 1998; Ososki & Kennelly, 2003).

La biochanina A es un flavonoide del tipo isoflavona O-metilada, que está sustituida por un grupo hidroxilo adicional en la posición 5 y un grupo metoxi en la posición 4', por ello también se le conoce como 5,7-Dihidroxi-4'-metoxiisoflavona (Figura 18) (Sarfranz et al., 2021). Ha sido encontrada principalmente en el trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), el garbanzo (*Cicer arietinum*) y otras especies como la *Cassia fistula* y *Astragalus membranaceus* (Sarfranz et al., 2021). En adición, la piel del maní resultó ser una importante fuente de biochanina A (Rossi et al., 2020). Esta isoflavona es considerada un fitoestrógeno de alto potencial terapéutico avalado por algunos estudios previos, que incluyen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y neurodegenerativas (A. Sarfranz et al., 2020). Además, ha presentado interesantes propiedades de inhibición de la tirosina quinasa así como agente antineoplásico y antidiabético (Felix et al., 2022; Hou et al., 2022; Jaina et al., 2022; L. Wang et al., 2020).

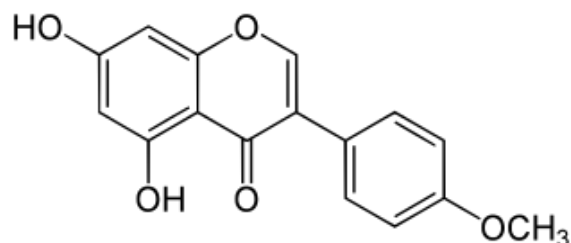


Figura 18. Estructura química de la isoflavona biochanina A (Sarfranz et al., 2021).

En la fracción libre, el ácido gálico fue el compuesto fenólico que se encontró en mayor concentración (3061,01 $\mu\text{g}/100$ g p.s.) seguido del ácido cafeico (54,50 $\mu\text{g}/100$ g p.s.) y dihidroxibenzoico (43,32 $\mu\text{g}/100$ g p.s.). Estos dos últimos ácidos mencionados sólo se encontraron en la fracción libre. Sin embargo, el contenido de flavonoides en la fracción libre sólo representó la décima parte con respecto a los ácidos fenólicos. En la fracción esterificada del RBVN, fueron

identificados tres ácidos fenólicos, de los cuales el ácido *p*-cumárico y ferúlico presentan un mayor contenido en comparación con la fracción libre, indicando posiblemente que una buena parte de estos ácidos estén unidos mediante enlaces tipo éster a la matriz. En esta fracción esterificada se mostró el mayor contenido significativo de biochanina A de entre todas las fracciones, representando casi el 70 % del total encontrado en el RBVN. Esto nos indicaría que este flavonoide está mayormente unido mediante uniones esterificadas a residuos de azúcar, aminas, ácidos orgánicos, lípidos y otros fenoles (de Camargo et al., 2022). Cabe destacar que solo en esta fracción esterificada se reportó la presencia de crisina (8,67 µg/100 g p.s.). En la fracción esterificada, se identificaron dos ácidos fenólicos, reportándose únicamente en esta fracción el ácido sinápico aunque en cantidades mínimas (2,11 µg/100 g p.s.). En esta fracción, el único flavonoide presente fue la quercitrina, representando un 18 % del total de este compuesto presente en el RBVN.

En la fracción de fenoles insolubles, el único compuesto fenólico identificado de tipo flavonoide fue la quercetina en una cantidad importante (46 % del total de este compuesto). Es relevante mencionar que los ácidos fenólicos presentes en la fracción insoluble representan poco más del 95 % en comparación con los flavonoides presentes en dicha fracción. De los tres ácidos identificados en la fracción insoluble, el ácido *p*-cumárico y ferúlico son los que se encontraron en mayor cantidad en comparación con las otras fracciones representando un 71,94 y 75,75 % respectivamente. Lo cual sugiere que la mayor parte de estos ácidos están unidos a la pared celular de la matriz.

Es importante destacar que, al considerar el contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides cuantificados, solo un 14 % se presenta en la fracción insoluble, contrastando con los resultados obtenidos a través de la estimación de los fenoles totales (CFT). Esto podría deberse a las interferencias causadas por la

presencia de otros compuestos con capacidad reductora en el residuo de la bebida vegetal de nuez como el ácido ascórbico (vitamina C), ácido dehidroascórbico (forma oxidada de vitamina C), metales de transición, aminoácidos reductores (triptófano y tirosina) y azúcares reductores. Estos compuestos de naturaleza no fenólica, solubles en el solvente orgánico empleado (metanol), han podido haber reducido el reactivo Folin-Ciocalteu sobreestimando el contenido de fenoles totales, la cual es una limitante de ese método espectrofotométrico. En contraste con dicha técnica de análisis, mediante cromatografía líquida (UPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) se logra no sólo la cuantificación si no también la identificación de los compuestos fenólicos presentes con una alta precisión, resolución, eficiencia y reproducibilidad (Escarpa & González, 2001; Motilva et al., 2013).

A semejanza con otros residuos vegetales como fue el caso de la piel de maní (92,07 %) (de Camargo et al., 2017), la cáscara de la fruta marolo (76,16 %) (Arruda et al., 2018) y harina de residuos de arándano (62,74 %) (Ayoub et al., 2016), los compuestos solubles también fueron mayoritarios (86%) en el residuo de bebida vegetal de nuez. Lo anterior podría hacer la reutilización de este residuo más competitiva puesto que estrategias para liberación de compuestos insolubles, que implicarían etapas y gastos adicionales, no serían tan necesarias. En este estudio, fue la primera vez que se logró caracterizar cualitativa y cuantitativamente el contenido de compuestos fenólicos por cada fracción tanto de fenoles solubles (libres, esterificados y eterificados) como de la fracción de fenoles insolubles a partir del residuo de bebida vegetal de nuez.

6.3 Poder reductor (FRAP)

El poder reductor de los fenoles de la nuez y los residuos de la bebida vegetal de nuez son mostrados en la Figura 19. El mecanismo de operación del ensayo FRAP, mediante transferencia de electrones, puede ser influido por la

presencia, número y configuración de los grupos hidroxilo presentes en los compuestos fenólicos de la matriz. Esto puede ejercer una influencia en las reacciones químicas que se llevan a cabo, las cuales están relacionadas a la capacidad de los fenoles en desactivar o reducir las especies de oxígeno reactivas (ROS) y/o iones metálicos como el ión férrico en el caso del ensayo FRAP (Chen et al., 2020; de Camargo et al., 2014).

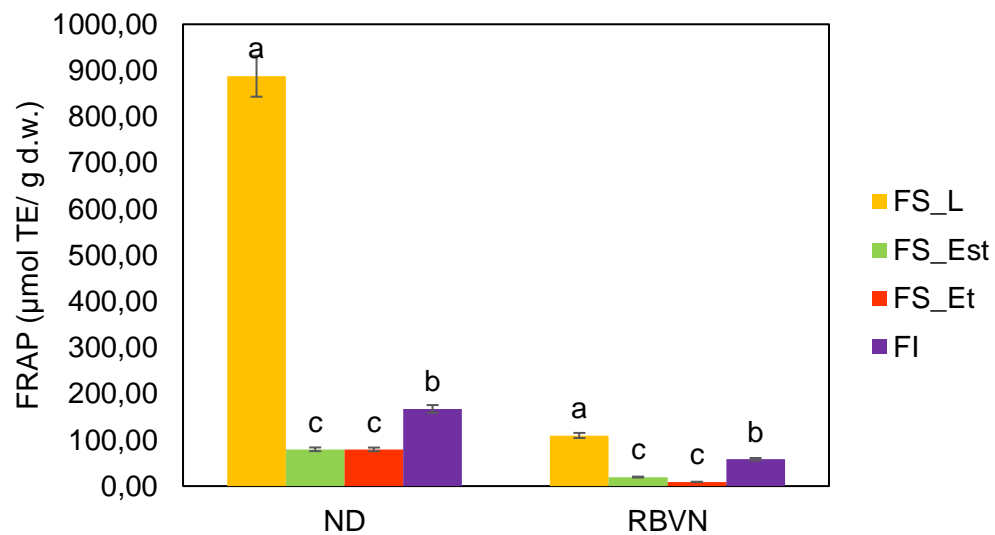


Figura 19. Poder antioxidante reductor de hierro ($\mu\text{mol ET/g p.s.}$) de las fracciones de fenoles solubles libres (FS), esterificados (FEST), eterificados (FET) e insolubles (FI) de la nuez desgrasada (ND) y residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN).

Los resultados obtenidos mediante el método FRAP, considerando los resultados obtenidos de los ocho extractos tanto de la nuez como del residuo de la bebida vegetal de nuez, muestran que existe una correlación significativa entre el poder reductor FRAP y CFT ($r = 0,7516$, $p = 0,0315$), lo cual demuestra el potencial antioxidante de los extractos fenólicos al reducir iones inestables.

La fracción de fenoles solubles libres de la nuez desgrasada fue la que presentó el mayor poder reductor (887,56 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$) de todas las fracciones evaluadas incluyendo las del residuo de bebida vegetal de nuez. Las fracciones de fenoles solubles esterificados y eterificados de la nuez desgrasada presentaron un poder reductor muy similar representando el 7,61 y 7,59 % del total, respectivamente. Cabe destacar que la fracción de fenoles insolubles aportó con el 13,76 % del total del poder reductor presente en la nuez desgrasada. La relación del poder reductor de los fenoles solubles/insolubles (S/I) fue de 6.

En el caso de los residuos de bebida vegetal de nuez, la fracción de fenoles solubles libres fue también la que contribuyó mayormente con el poder reductor de todas las fracciones (55,9 %) incluyendo la fracción insoluble, la cual le siguió con aproximadamente el 30 % del poder reductor total presente en este residuo. La fracción de solubles eterificados fue la que presentó menor poder reductor (8,97 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$), la cual se correlaciona con el menor CFT presente en dicha fracción (72,55 mg EAG/100 g p.s.).

En este estudio, existió una correlación altamente significativa ($r= 0,9942$, $p=0,0058$) entre el ácido gálico y el poder reductor (FRAP), lo cual sugeriría que el ácido gálico sería uno de los principales compuestos fenólicos responsable de otorgar esa capacidad reductora de iones férrico a ferroso a las fracciones de extractos a partir de los residuos de bebida vegetal de nuez.

El poder reductor de los fenoles presentes en la nuez desgrasada fue mucho mayor al del residuo de bebida vegetal de nuez (seis veces más aproximadamente). No obstante, se podría destacar que este residuo también podría ser aprovechado porque presentó un significativo poder antioxidante (196,07 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$). Como referencia, según Arranz et al. (2008), determinaron una capacidad antioxidante de $114,92 \pm 4 \mu\text{mol ET/g p.s.}$ a partir

del extracto crudo de nueces españolas desgrasadas y Christopoulos y Tsantili (2011) analizaron nueces californianas cultivadas en Grecia Central de la misma variedad que el presente estudio (Chandler) donde reportaron un poder reductor de 153,40 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$ a partir del extracto crudo.

6.4 Potencial antioxidante (ORAC)

La medición de ORAC es empleada en presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs), especialmente radicales peroxilo, los cuales se encuentran en sistemas biológicos y también pueden ser generados en alimentos con alto contenido de lípidos durante la oxidación de estos. La capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC) total de la ND (132,21 $\mu\text{mol ET/g}$) fue el doble en comparación con el RBVN (66,25 $\mu\text{mol ET/g}$). Tanto en la ND como en el RBVN, la fracción de fenoles insolubles presentó la mayor capacidad antioxidante (50,47 \pm 1,83 $\mu\text{mol ET/g}$ y 20,84 \pm 0,04 $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente), mientras que las fracciones de fenoles solubles esterificadas mostraron la menor capacidad antioxidante (20,24 \pm 0,35 $\mu\text{mol ET/g}$ y 13,84 \pm 0,10 $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente). Además, hubo diferencias significativas entre las fracciones solubles libres, esterificadas y eterificadas a partir de la ND, lo cual difirió en el caso del RBVN, donde no hubo diferencias significativas entre la fracción soluble libre (15,52 \pm 0,09 $\mu\text{mol ET/g}$) y eterificada (16,05 \pm 0,82 $\mu\text{mol ET/g}$).

En la ND, las fracciones de fenoles solubles (libres, esterificadas, eterificadas) representaron el 61,83 % del valor ORAC total, mientras que en el RBVN las fracciones de fenoles solubles tuvieron un valor ORAC más representativo, de un 68,55 % en comparación con la fracción insoluble. La relación del valor ORAC de fenoles solubles sobre insolubles (S/I) fue 1,62 y 2,18 en la ND y RBVN respectivamente. Todos los valores ORAC obtenidos para las diferentes fracciones fueron significativamente diferentes entre la ND y RBVN, donde se

puede destacar que la fracción libre de la ND representó 2,4 veces el valor ORAC de la misma fracción en comparación con el RBVN.

Hubo una correlación positiva significativa entre los valores CFT y los valores ORAC ($r = 0,9133$, $p = 0,0015$) de todos los extractos evaluados tanto para la ND como el RBVN.

Hasta la fecha no se han desarrollado estudios donde se haya realizado el análisis del potencial antioxidante (ORAC) a partir de las diferentes fracciones de fenoles solubles como insolubles de la nuez u otro fruto seco similar. Sin embargo, se pueden mencionar ciertos estudios donde analizaron ORAC a partir de extractos crudos como puntos de referencia. De acuerdo a Ojeda-Amador et al. (2018), reportaron un rango de valores ORAC entre 455 a 520 $\mu\text{mol ET/g}$ en el subproducto de nuez desgrasada a partir de diferentes variedades. En adición, un estudio previo mostró un valor ORAC de 187,18 $\mu\text{mol ET/g}$ como nuez desgrasada (Arranz et al., 2008). Además, se analizaron otros subproductos a partir de nuez oriunda de Chile, como es el caso de la cáscara verde de la nuez (CV) y la cáscara marrón (CM) donde se reportó que el valor ORAC de la CV (240 $\mu\text{mol TE/g}$) fue mayor al de la CM (175 $\mu\text{mol TE/g}$) (Soto-Maldonado et al., 2022). Estas diferencias en los valores ORAC pueden estar relacionadas a múltiples factores entre ellos las diferencias en las características propias de cada variedad de nuez, las condiciones de la preparación de la matriz, el método y los parámetros de extracción (fraccionamiento, uso de mezcla de solventes), entre otros.

7. CONCLUSIONES

El contenido de fenoles totales de las fracciones solubles fue mayor en comparación con la fracción insoluble tanto en la nuez desgrasada como en el residuo de bebida vegetal de nuez. Mediante el análisis UPLC-MS/MS se evidenció que la fracción de fenoles solubles (libres, esterificados y eterificados) representó el 86 % aproximadamente del total de fenoles presentes en el residuo de bebida vegetal de nuez.

El ácido gálico fue el compuesto fenólico más representativo y el que se encontró en todas las fracciones de fenoles tanto solubles como insolubles en el residuo de la bebida vegetal de nuez. La isoflavona biochanina A fue identificada y cuantificada por primera vez en un producto a partir de la nuez en cantidades importantes principalmente en la fracción esterificada.

Se determinó tanto en la nuez desgrasada como en el residuo de la bebida vegetal de nuez que la suma de los compuestos solubles (libres, esterificados y eterificados) presentaron la mayor contribución para el poder reductor FRAP y potencial antioxidante ORAC en comparación con los fenoles insolubles, por ende estos extractos fenólicos de las fracciones solubles a partir de estos residuos podrían ser aprovechados para su potencial aplicación como suplementos nutraceuticos o aditivos alimentarios con potencial antioxidante.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, I. B., Tlili, N., Martinez-Force, E., Rubio, A. G. P., Perez-Camino, M. C., Albouchi, A., & Boukhchina, S. (2015). Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry*, *173*, 972-978. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.095>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*, 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(34), 6584-6604. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950>
- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis*, *22*(3), 184-188. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.016>
- Arranz, S., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2008). Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): Contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology*, *227*(2), 425-431. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0737-2>
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., & Pastore, G. M. (2018). Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, *245*, 738-749. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.120>
- Aydar, E. F., Tutuncu, S., & Ozcelik, B. (2020). Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability

- studies, and health effects. *Journal of Functional Foods*, 70, 103975. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103975>
- Ayoub, M., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food Chemistry*, 197, 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.107>
- Behera, P. K., Devi, S., & Mittal, N. (2023). Therapeutic potential of gallic acid in obesity: Considerable shift! *Obesity Medicine*, 37, 100473. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2022.100473>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Canaan, J. M. M., Brasil, G. S. P., de Barros, N. R., Mussagy, C. U., Guerra, N. B., & Herculano, R. D. (2022). Soybean processing wastes and their potential in the generation of high value added products. *Food Chemistry*, 373, 131476. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131476>
- Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., & Silva, B. M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 441-447. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.043>
- Chamorro, F., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Taofiq, O., Otero, P., Cao, H., Xiao, J., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022). By-Products of Walnut (*Juglans regia*) as a Source of Bioactive Compounds for the Formulation of Nutraceuticals and Functional Foods. *IECN 2022*, 35. <https://doi.org/10.3390/IECN2022-12396>
- Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., & Kim, C. K. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and

- carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10(1), 2611. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>
- Christopoulos, M. V., & Tsantili, E. (2011). Effects of temperature and packaging atmosphere on total antioxidants and colour of walnut (*Juglans regia* L.) kernels during storage. *Scientia Horticulturae*, 131, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.026>
- Colaric, M., Veberic, R., Solar, A., Hudina, M., & Stampar, F. (2005). Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6390-6396. <https://doi.org/10.1021/jf050721n>
- Croitoru, A., Fikai, D., Craciun, L., Fikai, A., & Andronescu, E. (2019). Evaluation and Exploitation of Bioactive Compounds of Walnut, *Juglans regia*. *Current Pharmaceutical Design*, 25(2), 119-131. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190329150825>
- de Camargo, A. C., Concepción Alvarez, A., Arias-Santé, M. F., Oyarzún, J. E., Andia, M. E., Uribe, S., Núñez Pizarro, P., Bustos, S. M., Schwember, A. R., Shahidi, F., & Bridi, R. (2022). Soluble Free, Esterified and Insoluble-Bound Phenolic Antioxidants from Chickpeas Prevent Cytotoxicity in Human Hepatoma HuH-7 Cells Induced by Peroxyl Radicals. *Antioxidants*, 11(6), 1139. <https://doi.org/10.3390/antiox11061139>
- de Camargo, A. C., de Souza Silva, A. P., Soares, J. C., de Alencar, S. M., Handa, C. L., Cordeiro, K. S., Figueira, M. S., Sampaio, G. R., Torres, E. A. F. S., Shahidi, F., & Schwember, A. R. (2021). Do Flavonoids from Durum Wheat Contribute to Its Bioactive Properties? A Prospective Study. *Molecules*, 26(2), 463. <https://doi.org/10.3390/molecules26020463>
- de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2014). Low Molecular Weight Phenolics of Grape Juice and Winemaking Byproducts: Antioxidant Activities and Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein Cholesterol and DNA Strand Breakage. *Journal*

- of *Agricultural and Food Chemistry*, 62(50), 12159-12171.
<https://doi.org/10.1021/jf504185s>
- de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*, 212, 395-402.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.047>
- de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., & Shahidi, F. (2017). Phenolic Profile of Peanut By-products: Antioxidant Potential and Inhibition of Alpha-Glucosidase and Lipase Activities. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(7), 959-971. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-2996-9>
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic Compounds. En *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253-271). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- Dorta, E., Fuentes-Lemus, E., Aspée, A., Atala, E., Speisky, H., Bridi, R., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2015). The ORAC (oxygen radical absorbance capacity) index does not reflect the capacity of antioxidants to trap peroxy radicals. *RSC Advances*, 5(50), 39899-39902.
<https://doi.org/10.1039/C5RA01645B>
- Ercisli, S., Sayinci, B., Kara, M., Yildiz, C., & Ozturk, I. (2012). Determination of size and shape features of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using image processing. *Scientia Horticulturae*, 133, 47-55.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.014>
- Escarpa, A., & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods.

Analytica Chimica Acta, 427(1), 119-127. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01188-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01188-0)

- Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European Journal of Pharmacology*, 807, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.04.009>
- FAO. (2023). *Crops and livestock products* [Base de Datos]. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Felix, F. B., Vago, J. P., Beltrami, V. A., Araújo, J. M. D., Grespan, R., Teixeira, M. M., & Pinho, V. (2022). Biochanin A as a modulator of the inflammatory response: An updated overview and therapeutic potential. *Pharmacological Research*, 180, 106246. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106246>
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., & Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
- Fuentealba, C., Hernández, I., Saa, S., Toledo, L., Burdiles, P., Chirinos, R., Campos, D., Brown, P., & Pedreschi, R. (2017). Colour and in vitro quality attributes of walnuts from different growing conditions correlate with key precursors of primary and secondary metabolism. *Food Chemistry*, 232, 664-672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.029>
- Fukuda, T., Ito, H., & Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry*, 63(7), 795-801. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00333-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00333-9)
- Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Savoie, R., Etchegoyen, C., Harscoat-Schiavo, C., & Subra-Paternault, P. (2021). Recovery and antioxidant activity of phenolic compounds extracted from walnut press-

- cake using various methods and conditions. *Industrial Crops and Products*, 167, 113546. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113546>
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Miyashita, K., Camp, J. van, Alasalvar, C., Ismail, A. B., Elmore, S., Birch, G. G., Charalampopoulos, D., Astley, S. B., Pegg, R., Zhou, P., & Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471-475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Guasch-Ferré, M., Hernández-Alonso, P., Drouin-Chartier, J.-P., Ruiz-Canela, M., Razquin, C., Toledo, E., Li, J., Dennis, C., Wittenbecher, C., Corella, D., Estruch, R., Fitó, M., Ros, E., Babio, N., Bhupathiraju, S. N., Clish, C. B., Liang, L., Martínez-González, M. A., Hu, F. B., & Salas-Salvadó, J. (2021). Walnut Consumption, Plasma Metabolomics, and Risk of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition*, 151(2), 303-311. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa374>
- Gupta, A., Behl, T., & Panichayupakaranan, P. (2019). A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obesity Medicine*, 16, 100142. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100142>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Hou, Y., Zhao, W., Yu, H., Zhang, F., Zhang, H.-T., & Zhou, Y. (2022). Biochanin A alleviates cognitive impairment and hippocampal mitochondrial damage in ovariectomized APP/PS1 mice. *Phytomedicine*, 100, 154056. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154056>
- ITIS. (2011). *Juglans Regia* L. [Base de Datos]. Integrated Taxonomic Information System - Report.

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503244#null

- Jahanban-Esfahlan, A., Jahanban-Esfahlan, R., Tabibiazar, M., Roufegarinejad, L., & Amarowicz, R. (2020). Recent advances in the use of walnut (*Juglans regia* L.) shell as a valuable plant-based bio-sorbent for the removal of hazardous materials. *RSC Advances*, *10*(12), 7026-7047. <https://doi.org/10.1039/C9RA10084A>
- Jaina, V. K., Eedara, A., Svs, S. P., Jadav, S. S., Chilaka, S., Sistla, R., & Andugulapati, S. B. (2022). Anti-cancer activity of Biochanin A against multiple myeloma by targeting the CD38 and cancer stem-like cells. *Process Biochemistry*, *123*, 11-26. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.029>
- Kafkas, E., Attar, S. H., Gundesli, M. A., Ozcan, A., & Ergun, M. (2020). Phenolic and Fatty Acid Profile, and Protein Content of Different Walnut Cultivars and Genotypes (*Juglans regia* L.) Grown in the USA. *International Journal of Fruit Science*, *20*(sup3), S1711-S1720. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1830014>
- Kris-Etherton, P. M. (2014). Walnuts Decrease Risk of Cardiovascular Disease: A Summary of Efficacy and Biologic Mechanisms. *The Journal of Nutrition*, *144*(4), 547S-554S. <https://doi.org/10.3945/jn.113.182907>
- Lone, R., Shuab, R., & Kamili, A. N. (Eds.). (2020). *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture: Volume 1*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1>
- Lu, T., Shen, Y., Wu, Z.-X., Xie, H.-K., Li, A., Wang, Y.-F., Song, L., Zhou, D.-Y., & Wang, T. (2021). Improving the oxidative stability of flaxseed oil with composite antioxidants comprising gallic acid alkyl ester with appropriate chain length. *LWT*, *138*, 110763. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110763>

- Mark, R., Lyu, X., Lee, J. J. L., Parra-Saldívar, R., & Chen, W. N. (2019). Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. *Journal of Functional Foods*, *57*, 233-254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.008>
- Mazur, W., & Adlercreutz, H. (1998). Naturally occurring oestrogens in food. *Pure and Applied Chemistry*, *70*(9), 1759-1776. <https://doi.org/10.1351/pac199870091759>
- Mehmood, S., Kausar Janjua, N., Tabassum, S., Faizi, S., & Fenniri, H. (2022). Cost effective synthesis approach for green food packaging coating by gallic acid conjugated gold nanoparticles from *Caesalpinia pulcherrima* extract. *Results in Chemistry*, *4*, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100437>
- Miao, L., Zhang, H., Yang, L., Chen, L., Xie, Y., & Xiao, J. (2022). Chapter 4.8—Flavonoids. En S. M. Nabavi & A. S. Silva (Eds.), *Antioxidants Effects in Health* (pp. 353-374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00048-3>
- Motilva, M.-J., Serra, A., & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, *1292*, 66-82. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.012>
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Rosa, L. A. de la, Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., Álvarez-Parrilla, E., Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Rosa, L. A. de la, Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, *20*(2), 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>

- Ni, Z.-J., Zhang, Y.-G., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., Shang, Y.-F., & Wei, Z.-J. (2021a). Exploration of walnut components and their association with health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881439>
- Ni, Z.-J., Zhang, Y.-G., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., Shang, Y.-F., & Wei, Z.-J. (2021b). Exploration of walnut components and their association with health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881439>
- Obafemi, T. O., Anyalechi, D. I., Afolabi, B. A., Ekundayo, B. E., Adewale, O. B., Afolabi, O. B., Anadozie, S. O., Olaoye, O. A., Adu, I. A., & Onasanya, A. (2022). Nephroprotective effects of gallic acid and hesperidin in aluminum chloride-induced toxicity in rats. *Phytomedicine Plus*, 2(4), 100378. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100378>
- Ojeda-Amador, R. M., Salvador, M. D., Gómez-Alonso, S., & Fregapane, G. (2018). Characterization of virgin walnut oils and their residual cakes produced from different varieties. *Food Research International*, 108, 396-404. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.066>
- Olejar, K. J., Fedrizzi, B., & Kilmartin, P. A. (2015). Influence of harvesting technique and maceration process on aroma and phenolic attributes of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, 183, 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.040>
- Ososki, A. L., & Kennelly, E. J. (2003). Phytoestrogens: A review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, 17(8), 845-869. <https://doi.org/10.1002/ptr.1364>
- Penha, C. B., Santos, V. D. P., Speranza, P., & Kurozawa, L. E. (2021). Plant-based beverages: Ecofriendly technologies in the production process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72, 102760. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102760>

- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797-810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Rahman, Md. J., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Phenolic and polyphenolic profiles of chia seeds and their in vitro biological activities. *Journal of Functional Foods*, 35, 622-634. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.044>
- Regueiro, J., Sánchez-González, C., Vallverdú-Queralt, A., Simal-Gándara, J., Lamuela-Raventós, R., & Izquierdo-Pulido, M. (2014). Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 152, 340-348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.158>
- Rocchetti, G., Chiodelli, G., Giuberti, G., & Lucini, L. (2018). Bioaccessibility of phenolic compounds following in vitro large intestine fermentation of nuts for human consumption. *Food Chemistry*, 245, 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.146>
- Roidoung, S., Dolan, K. D., & Siddiq, M. (2016). Gallic acid as a protective antioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice. *Food Chemistry*, 210, 422-427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.133>
- Rossi, Y. E., Bohl, L. P., Vanden Braber, N. L., Ballatore, M. B., Escobar, F. M., Bodoira, R., Maestri, D. M., Porporatto, C., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A. (2020). Polyphenols of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin as bioprotectors of normal cells. Studies of cytotoxicity, cytoprotection and interaction with ROS. *Journal of Functional Foods*, 67, 103862. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103862>
- Rusu, M., Gheldiu, A.-M., Mocan, A., Moldovan, C., Popa, D.-S., Tomuta, I., & Vlase, L. (2018). Process Optimization for Improved Phenolic Compounds Recovery from Walnut (*Juglans regia* L.) Septum:

- Phytochemical Profile and Biological Activities. *Molecules*, 23(11), 2814. <https://doi.org/10.3390/molecules23112814>
- Salem, M. A., Aborehab, N. M., Al-Karmalawy, A. A., Fernie, A. R., Alseekh, S., & Ezzat, S. M. (2022). Potential Valorization of Edible Nuts By-Products: Exploring the Immune-Modulatory and Antioxidants Effects of Selected Nut Shells Extracts in Relation to Their Metabolic Profiles. *Antioxidants*, 11(3), 462. <https://doi.org/10.3390/antiox11030462>
- Sarfraz, A., Javeed, M., Shah, M. A., Hussain, G., Shafiq, N., Sarfraz, I., Riaz, A., Sadiqa, A., Zara, R., Zafar, S., Kanwal, L., Sarker, S. D., & Rasul, A. (2020). Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature. *Science of The Total Environment*, 722, 137907. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137907>
- Sarfraz, I., Rasul, A., Riaz, A., Ucak, I., Zahoor, M. K., Hussain, G., Nawaz, J., Sadiqa, A., & Adem, Ş. (2021). Biochanin A and biochanin B. En *A Centum of Valuable Plant Bioactives* (pp. 563-588). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822923-1.00031-5>
- Shah, T. I., Sharma, E., & Shah, G. A. (2015). Anti-proliferative, Cytotoxicity and Anti-oxidant Activity of Juglans regia Extract. *American Journal of Cancer Prevention*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.12691/ajcp-3-2-4>
- Shahidi, F., & Hossain, A. (2023). Importance of Insoluble-Bound Phenolics to the Antioxidant Potential Is Dictated by Source Material. *Antioxidants*, 12(1), 203. <https://doi.org/10.3390/antiox12010203>
- Shahidi, F., Pinaffi-Langley, A. C. C., Fuentes, J., Speisky, H., & de Camargo, A. C. (2021). Vitamin E as an essential micronutrient for human health: Common, novel, and unexplored dietary sources. *Free Radical Biology and Medicine*, 176, 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.025>
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21(9), 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>

- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., & Solar, A. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). *Food Research International*, 67, 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.016>
- Soto-Maldonado, C., Caballero-Valdés, E., Santis-Bernal, J., Jara-Quezada, J., Fuentes-Viveros, L., & Zúñiga-Hansen, M. E. (2022). Potential of solid wastes from the walnut industry: Extraction conditions to evaluate the antioxidant and bioherbicidal activities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 58, 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.04.005>
- Sour magazine. (2021, 01). *La marca líder en bebidas vegetales made in Chile redobla apuestas con su nueva línea de carne alternativa*. <https://sourmagazine.cl/2021/01/19/la-marca-lider-en-bebidas-vegetales-made-in-chile-redobla-apuestas-con-su-nueva-linea-de-carne-alternativa/>
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Trandafir, I., Cosmulescu, S., Botu, M., & Nour, V. (2016). Antioxidant activity, and phenolic and mineral contents of the walnut kernel (*Juglans regia* L.) as a function of the pellicle color. *Fruits*, 71(3), 177-184. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016006>
- Vital, A. C. P., Croge, C., da Silva, D. F., Araújo, P. J., Gallina, M. Z., & Matumoto-Pintro, P. T. (2018). Okara residue as source of antioxidants against lipid oxidation in milk enriched with omega-3 and bioavailability of bioactive compounds after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1518-1524. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3069-2>

- Vu, D. C., Vo, P. H., Coggeshall, M. V., & Lin, C.-H. (2018). Identification and Characterization of Phenolic Compounds in Black Walnut Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(17), 4503-4511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01181>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds. En *Bioactive Compounds* (pp. 33-50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Wang, L., Li, L., Han, Q., Wang, X., Zhao, D., & Liu, J. (2020). Identification and biological evaluation of natural product Biochanin A. *Bioorganic Chemistry*, 97, 103674. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103674>
- Wang, Ping, Linlin Zhong, Yang, H., Zhu, F., Hou, X., Wu, C., Zhang, R., & Cheng, Y. (2022). Comparative analysis of antioxidant activities between dried and fresh walnut kernels by metabolomic approaches. *LWT*, 155, 112875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112875>
- Wang, Z., Li, S., Ge, S., & Lin, S. (2020). Review of Distribution, Extraction Methods, and Health Benefits of Bound Phenolics in Food Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3330-3343. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06574>
- Wei, F., Li, Y., Sun, D., Chen, Q., Fu, M., Zhao, H., Chen, X., Huang, Y., & Xu, H. (2022). Odor, tastes, nutritional compounds and antioxidant activity of fresh-eating walnut during ripening. *Scientia Horticulturae*, 293, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110744>
- Wu, S., Shen, D., Wang, R., Li, Q., Mo, R., Zheng, Y., Zhou, Y., & Liu, Y. (2021). Phenolic profiles and antioxidant activities of free, esterified and bound phenolic compounds in walnut kernel. *Food Chemistry*, 350, 129217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129217>
- Yang, K., Jian, S., Guo, D., Wen, C., Xin, Z., Zhang, L., Kuang, T., Wen, J., Yin, Y., & Deng, B. (2022). Fecal microbiota and metabolomics revealed the effect of long-term consumption of gallic acid on canine lipid metabolism

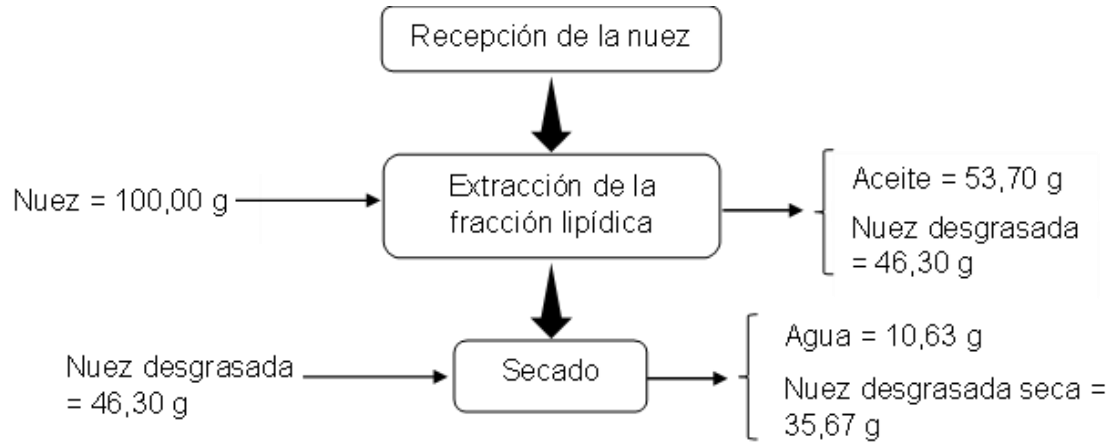
and gut health. *Food Chemistry: X*, 15, 100377.
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100377>

Zhang, Y.-G., Kan, H., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., Shang, Y.-F., & Wei, Z.-J. (2020). Comparison of phenolic compounds extracted from *Diaphragma juglandis fructus*, walnut pellicle, and flowers of *Juglans regia* using methanol, ultrasonic wave, and enzyme assisted-extraction. *Food Chemistry*, 321, 126672.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126672>

Zhao, M.-T., Liu, Z.-Y., Li, A., Zhao, G.-H., Xie, H.-K., Zhou, D.-Y., & Wang, T. (2021). Gallic acid and its alkyl esters emerge as effective antioxidants against lipid oxidation during hot air drying process of *Ostrea talienwhanensis*. *LWT*, 139, 110551.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110551>

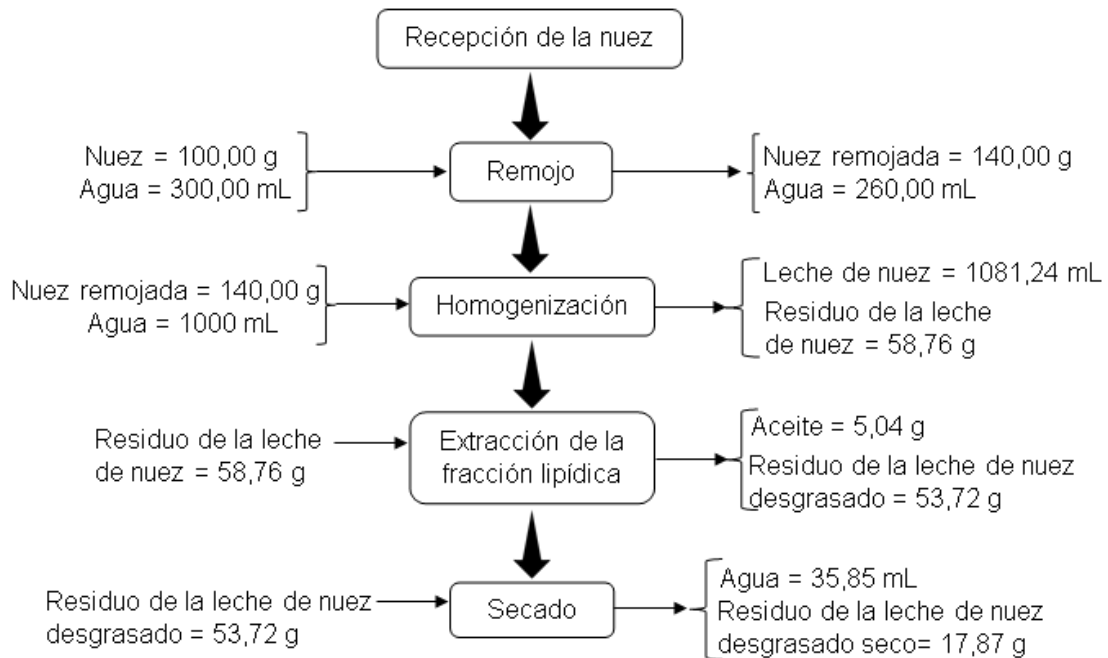
9. ANEXOS

Anexo 1. Balance de masa para la obtención de la nuez desgrasada (ND).



$$\text{Rendimiento nuez desgrasada seca} = (35,67 \text{ g} / 100,00 \text{ g}) * 100 = 35,67 \%$$

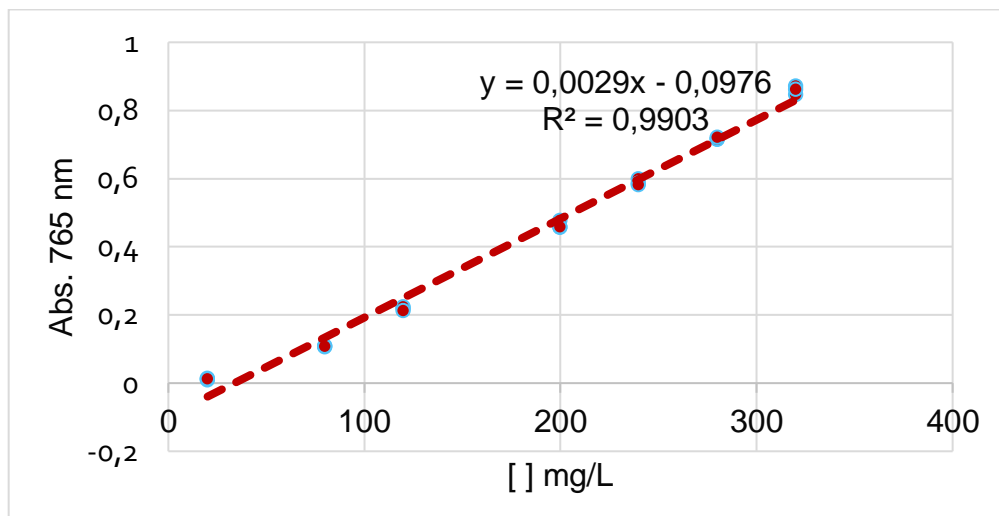
Anexo 2. Balance de masa para la obtención de los residuos de la bebida vegetal de nuez (RBVN).



$$\text{Rendimiento residuo de la bebida vegetal de nuez desgrasado seco} = (17,87 \text{ g} / 100,00 \text{ g}) * 100 = 17,87 \%$$

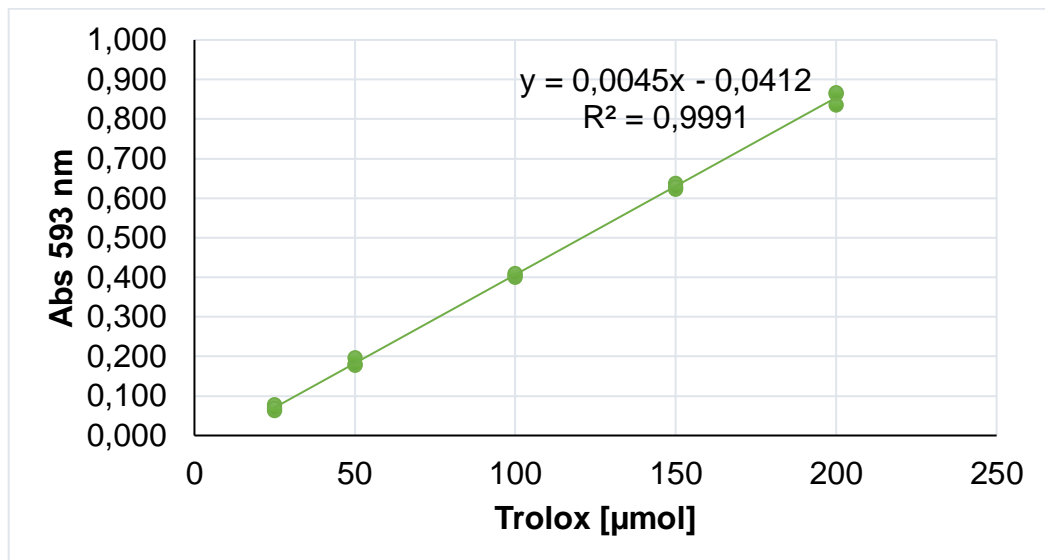
Anexo 3. Curva de calibración obtenida del ensayo del contenido de fenoles totales (CFT).

Concentración del ácido gálico (mg/L)	Absorbancia 765 nm
X	Y
20	0,01
20	0,014
20	0,012
80	0,106
80	0,109
80	0,108
120	0,219
120	0,224
120	0,213
200	0,457
200	0,478
200	0,459
240	0,6
240	0,587
240	0,582
280	0,717
280	0,715
280	0,722
320	0,847
320	0,872
320	0,863



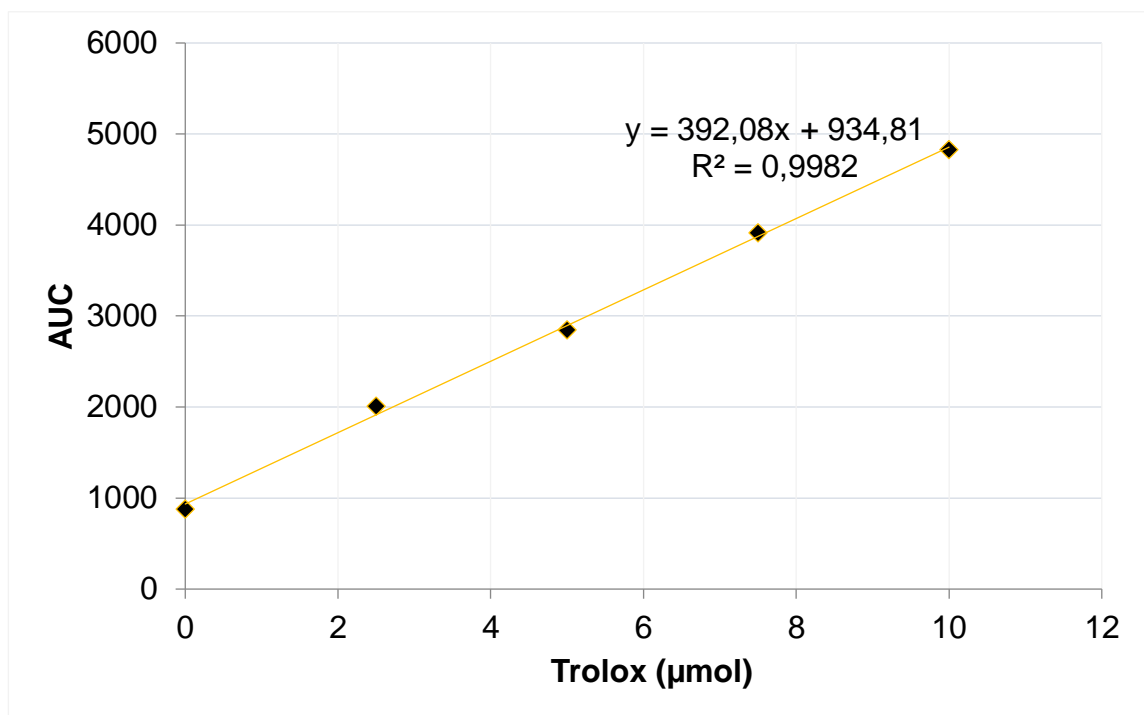
Anexo 4. Curva de calibración obtenida del ensayo del potencial antioxidante reductor de hierro (FRAP).

Concentración de Trolox [μmol]	Absorbancia 593 nm
X	Y
25	0,063
25	0,078
25	0,069
50	0,178
50	0,180
50	0,197
100	0,400
100	0,405
100	0,410
150	0,622
150	0,637
150	0,628
200	0,836
200	0,864
200	0,867



Anexo 5. Curva de calibración obtenida del ensayo de la capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC).

Concentración de Trolox [μmol]	Área bajo la curva promedio (AUC)
X	Y
0	877,348304
2,5	2010,36377
5	2848,18755
7,5	3913,34433
10	4826,89349



Anexo 6. Análisis de varianza del contenido de fenoles totales (CFT) de las fracciones solubles (libres, esterificadas y eterificadas) e insolubles a partir de la nuez desgrasada al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>
Entre grupos	199153	3	66384,5	1978,51	0,0000
Dentro de cada grupo	268,422	8	33,5528		
Total	199422	11			

Anexo 7. Prueba de Tukey del contenido de fenoles totales de las fracciones solubles libres (FL_ND), esterificadas (FEST_ND) y eterificadas (FET_ND) e insolubles (FI_ND) a partir de la nuez desgrasada al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fracciones</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>FET_ND</i>	104,153	X
<i>FEST_ND</i>	141,493	X
<i>FI_ND</i>	373,483	X
<i>FL_ND</i>	384,517	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
<i>FL_ND - FEST_ND</i>	*	243,023	15,1402
<i>FL_ND - FET_ND</i>	*	280,363	15,1402
<i>FL_ND - FI_ND</i>		11,0333	15,1402
<i>FEST_ND - FET_ND</i>	*	37,34	15,1402
<i>FEST_ND - FI_ND</i>	*	-231,99	15,1402
<i>FET_ND - FI_ND</i>	*	-269,33	15,1402

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Anexo 8. Análisis de varianza del contenido de fenoles totales (CFT) de las fracciones solubles (libres, esterificadas y eterificadas) e insolubles a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>
Entre grupos	17915,2	3	5971,72	977,32	0,0000
Dentro de cada grupo	48,8825	8	6,11032		
Total	17964,0	11			

Anexo 9. Prueba de Tukey del contenido de fenoles totales de las fracciones solubles libres (FL_RBVN), esterificadas (FEST_RBVN) y eterificadas (FET_RBVN) e insolubles (FI_RBVN) a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fracciones</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>FET_RBVN</i>	72,5533	X
<i>FEST_RBVN</i>	78,2967	X
<i>FL_RBVN</i>	124,45	X
<i>FI_RBVN</i>	167,95	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
<i>FL_RBVN - FEST_RBVN</i>	*	46,1533	6,46101
<i>FL_RBVN - FET_RBVN</i>	*	51,8967	6,46101
<i>FL_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-43,5	6,46101
<i>FEST_RBVN - FET_RBVN</i>		5,74333	6,46101
<i>FEST_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-89,6533	6,46101
<i>FET_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-95,3967	6,46101

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Anexo 10. Análisis de varianza del poder reductor (FRAP) de las fracciones solubles (libres, esterificadas y eterificadas) e insolubles a partir de la nuez desgrasada (ND) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>
Entre grupos	1,38002E10	3	4,60006E9	1181,63	0,0000
Dentro de cada grupo	3,11439E7	8	3,89299E6		
Total	1,38313E10	11			

Anexo 11. Prueba de Tukey del poder reductor (FRAP) de las fracciones solubles libres (FL_ND), esterificadas (FEST_ND) y eterificadas (FET_ND) e insolubles (FI_ND) a partir de la nuez desgrasada (ND) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fracciones</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>FET_ND</i>	7947,78	X
<i>FEST_ND</i>	7970,0	X
<i>FI_ND</i>	16707,3	X
<i>FL_ND</i>	88755,6	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
<i>FL_ND - FEST_ND</i>	*	80785,6	5157,16
<i>FL_ND - FET_ND</i>	*	80807,8	5157,16
<i>FL_ND - FI_ND</i>	*	72048,2	5157,16
<i>FEST_ND - FET_ND</i>		22,22	5157,16
<i>FEST_ND - FI_ND</i>	*	-8737,32	5157,16
<i>FET_ND - FI_ND</i>	*	-8759,54	5157,16

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Anexo 12. Análisis de varianza del poder reductor (FRAP) de las fracciones solubles (libres, esterificadas y eterificadas) e insolubles a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>
Entre grupos	1,8687E8	3	6,22899E7	266,27	0,0000
Dentro de cada grupo	1,87149E6	8	233937		
Total	1,88741E8	11			

Anexo 13. Prueba de Tukey del poder reductor (FRAP) de las fracciones solubles libres (FL_RBVN), esterificadas (FEST_RBVN) y eterificadas (FET_RBVN) e insolubles (FI_RBVN) a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fracciones</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>FET_RBVN</i>	897,333	X
<i>FEST_RBVN</i>	1951,78	X
<i>FI_RBVN</i>	5793,91	X
<i>FL_RBVN</i>	10964,4	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
<i>FL_RBVN - FEST_RBVN</i>	*	9012,67	1264,21
<i>FL_RBVN - FET_RBVN</i>	*	10067,1	1264,21
<i>FL_RBVN - FI_RBVN</i>	*	5170,53	1264,21
<i>FEST_RBVN - FET_RBVN</i>		1054,45	1264,21
<i>FEST_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-3842,13	1264,21
<i>FET_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-4896,58	1264,21

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Anexo 14. Análisis de varianza del potencial antioxidante (ORAC) de las fracciones solubles (libres, esterificadas y eterificadas) e insolubles a partir de la nuez desgrasada (ND) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>
Entre grupos	1,65341E7	3	5,51137E6	408,12	0,0000
Dentro de cada grupo	108034	8	13504,3		
Total	1,66422E7	11			

Anexo 15. Prueba de Tukey del potencial antioxidante (ORAC) de las fracciones solubles libres (FL_ND), esterificadas (FEST_ND) y eterificadas (FET_ND) e insolubles (FI_ND) a partir de la nuez desgrasada (ND) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fracciones</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>FET_ND</i>	<i>2024,27</i>	<i>X</i>
<i>FEST_ND</i>	<i>2470,13</i>	<i>X</i>
<i>FI_ND</i>	<i>3679,64</i>	<i>X</i>
<i>FL_ND</i>	<i>5046,77</i>	<i>X</i>

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
<i>FL_ND - FEST_ND</i>	<i>*</i>	<i>1655,36</i>	<i>303,741</i>
<i>FL_ND - FET_ND</i>	<i>*</i>	<i>1209,51</i>	<i>303,741</i>
<i>FL_ND - FI_ND</i>	<i>*</i>	<i>-1367,13</i>	<i>303,741</i>
<i>FEST_ND - FET_ND</i>	<i>*</i>	<i>-445,854</i>	<i>303,741</i>
<i>FEST_ND - FI_ND</i>	<i>*</i>	<i>-3022,49</i>	<i>303,741</i>
<i>FET_ND - FI_ND</i>	<i>*</i>	<i>-2576,64</i>	<i>303,741</i>

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Anexo 16. Análisis de varianza del potencial antioxidante (ORAC) de las fracciones solubles (libres, esterificadas y eterificadas) e insolubles a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p</i>
Entre grupos	811203	3	270401	156,41	0,0000
Dentro de cada grupo	13830,3	8	1728,79		
Total	825033	11			

Anexo 17. Prueba de Tukey del potencial antioxidante (ORAC) de las fracciones solubles libres (FL_RBVN), esterificadas (FEST_RBVN) y eterificadas (FET_RBVN) e insolubles (FI_RBVN) a partir del residuo de la bebida vegetal de nuez (RBVN) al 95 % del nivel de confianza.

<i>Fracciones</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>FEST_RBVN</i>	1383,67	X
<i>FL_RBVN</i>	1552,31	X
<i>FET_RBVN</i>	1605,42	X
<i>FI_RBVN</i>	2083,7	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
<i>FL_RBVN - FEST_RBVN</i>	*	168,639	108,678
<i>FL_RBVN - FET_RBVN</i>		-53,1097	108,678
<i>FL_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-531,391	108,678
<i>FEST_RBVN - FET_RBVN</i>	*	-221,749	108,678
<i>FEST_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-700,03	108,678
<i>FET_RBVN - FI_RBVN</i>	*	-478,281	108,678

* denota una diferencia estadísticamente significativa.