

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**"EFECTO DE EXTRACTOS DE PALTO  
SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LINOLEATO DE METILO"**

Tesis presentada para optar al Título de Ingeniero en Alimentos y  
Grado de Magíster en Alimentos, mención en Gestión, Calidad e Inocuidad de  
Alimentos

**Por**

**CECILIA BELÉN JARA MORALES**

**Director de Tesis**

Dra. Paula Andrea Jiménez Patiño

**Codirectores de Tesis**

Dra. Paz Robert Canales

Dr. Miguel Ángel Rincón Cervera

Santiago, 2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**"EFECTO DE EXTRACTOS DE PALTO  
SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LINOLEATO DE METILO"**

Tesis presentada para optar al Título de Ingeniero en Alimentos y  
Grado de Magíster en Alimentos, mención en Gestión, Calidad e Inocuidad de  
Alimentos

**Por**

CECILIA BELÉN JARA MORALES

**Director de Tesis**

Dra. Paula Andrea Jiménez Patiño

**Codirectores de Tesis**

Dra. Paz Robert Canales

Dr. Miguel Ángel Rincón Cervera

**Esta Tesis forma parte del proyecto Fondecyt N°11130373**

Santiago, 2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**Informe de Aprobación**  
**Tesis de Magíster**

EFFECTO DE EXTRACTOS DE PALTO  
SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LINOLEATO DE METILO

**Por**

CECILIA BELÉN JARA MORALES

Tesis aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Título de Ingeniero en Alimentos y Grado de Magíster en Alimentos, mención en Gestión, Calidad e Inocuidad de Alimentos

**Director y Codirectores de Tesis**

Dra. Paula Andrea Jiménez Patiño

\_\_\_\_\_

Dra. Paz Robert Canales

\_\_\_\_\_

Dr. Miguel Ángel Rincón Cervera

\_\_\_\_\_

**Comisión informante**

Dr. Jaime Ortiz (P)

\_\_\_\_\_

Dr. Julio de la Fuente

\_\_\_\_\_

Dr. Rodrigo Valenzuela

\_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

A mi Familia, por su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por su apoyo y por todos los esfuerzos realizados durante esta etapa.

A mis hermanos por su apoyo incondicional.

A Alejandro por su nobleza, amor y apoyo incondicional.

A mi directora Dra. Paula Jiménez Patiño, codirectores Dra. Paz Robert Canales y Dr. Miguel Ángel Rincón Cervera, por su apoyo incondicional, capacidad crítica, disposición, preocupación y dedicación para la finalización de esta tesis.

A los profesores de la comisión informante de tesis, Dr. Jaime Ortiz, Dr. Julio de la Fuente y Dr. Rodrigo Valenzuela por su interés, comentarios, ayuda y apoyo en esta tesis.

Al laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina, en especial a María José y Señora Elia Vásquez por su amistad, colaboración y apoyo.

# ÍNDICE DE MATERIAS

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Oxidación lipídica. ....</b>	<b>2</b>
1.1.1. <i>Termooxidación. ....</i>	3
<b>1.2. Productos de la oxidación. ....</b>	<b>4</b>
1.2.1. <i>Compuestos primarios de oxidación. ....</i>	4
1.2.2. <i>Compuestos secundarios de oxidación. ....</i>	4
<b>1.3. Métodos de evaluación de la oxidación lipídica. ....</b>	<b>6</b>
1.3.1. <i>Compuestos polares (CP). ....</i>	7
<b>1.4. Inhibición de la oxidación lipídica. ....</b>	<b>7</b>
1.4.1. <i>Antioxidantes. ....</i>	7
1.4.1.1. <i>Antioxidantes sintéticos. ....</i>	8
1.4.1.2. <i>Antioxidantes Naturales. ....</i>	9
<b>1.5. Fuentes de antioxidantes naturales. ....</b>	<b>12</b>
1.5.1. <i>Extractos vegetales. ....</i>	12
1.5.2. <i>Extractos de palto. ....</i>	13
1.5.2.1. <i>Características botánicas del palto y su fruto. ....</i>	13
1.5.2.2. <i>Subproductos del palto (Persea americana Mill.) y fruto. ....</i>	14
1.5.2.3. <i>Compuestos bioactivos en cáscara y hojas de palto. ....</i>	14

<b>1.6. Efecto de polifenoles sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas. ...</b>	<b>19</b>
1.6.1. <i>Efecto de polifenoles libres sobre la estabilidad de linoleato de metilo. ....</i>	19
1.6.2. <i>Efecto de extractos de polifenoles sobre la estabilidad oxidativa de lípidos. ...</i>	20
<b>1.7. Determinación de polifenoles en matrices lipídicas. ....</b>	<b>24</b>
<b>1.8. Hipótesis. ....</b>	<b>25</b>
<b>1.9. Objetivos. ....</b>	<b>25</b>
1.9.1. <i>Objetivo General. ....</i>	25
1.9.2. <i>Objetivos específicos. ....</i>	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Materiales. ....</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Métodos. ....</b>	<b>28</b>
2.2.1. <i>Preparación de los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólicos y acuosos). ....</i>	28
2.2.2. <i>Caracterización de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de hojas y cáscaras de palto. ....</i>	29
2.2.3. <i>Estabilidad oxidativa de linoleato de metilo (LM) durante el almacenamiento con la adición de los extractos de palto. ....</i>	32
2.2.4. <i>Extracción de polifenoles desde los sistemas linoleato de metilo con la adición de los extractos de cáscaras y hojas de palto almacenados a 80 °C. ....</i>	33
2.2.5. <i>Identificación de principales polifenoles. ....</i>	35
2.2.6. <i>Análisis estadístico. ....</i>	35

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. Caracterización de los extractos de cáscaras y hojas de palto (acuoso e hidroalcohólico)</b> .....	<b>37</b>
3.1.1. <i>Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) de los extractos de cáscaras y hojas de palto.</i> ....	38
3.1.2. <i>Determinación de la actividad antioxidante (AA) de los extractos de cáscaras y hojas de palto.</i> .....	41
3.1.3. <i>Identificación de los principales compuestos fenólicos en extractos de cáscaras y hojas de palto.</i> .....	44
<b>3.2. Efecto de los extractos de cáscaras y hojas de palto (en polvo) en la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo en condiciones aceleradas de oxidación.</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3. Evolución de polifenoles en los sistemas de LM con extractos de cáscaras y hojas de palto almacenados a 80 °C.</b> .....	<b>52</b>
3.3.1. <i>Selección de la metodología para la extracción de polifenoles.</i> ....	53
3.3.1.1. <i>Extracción Líquido-Líquido (ELL) de polifenoles.</i> .....	53
3.3.1.2. <i>Extracción en Fase Sólida (EFS) de polifenoles.</i> ....	55
<b>3.4. Aplicación de la metodología EFS en sistemas de LM con la adición de los extractos de palto, almacenados a 80 °C.</b> .....	<b>59</b>
<b>3.5. Constantes de velocidad de degradación de los compuestos fenólicos en los sistemas de LM con la adición de extractos de palto almacenados a 80 °C.</b> .....	<b>63</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>84</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los polifenoles considerando número de carbonos de su estructura. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Polifenoles identificados en cáscaras y hojas de palto. ....	16
<b>Tabla 3.</b> Efectos de extractos de polifenoles desde diferentes fuentes sobre la actividad antioxidante de matrices lipídica.....	22
<b>Tabla 4.</b> Contenido de polifenoles totales de extractos de cáscaras y hojas de palto, antes y después del secado por atomización. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Actividad antioxidante (FRAP y DPPH) de extractos de cáscaras y hojas de palto, antes y después del secado por atomización. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Evolución del contenido de compuestos polares (%) a 80 °C, en los sistemas linoleato de metilo control y en los sistemas de linoleato de metilo con la adición de extractos de palto en polvo.....	49
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de ácido clorogénico y procianidina dímero en linoleato de metilo con los extractos de palto (hojas y cáscaras) a 80 °C aplicando ELL. ....	54
<b>Tabla 8.</b> Estimación de la recuperación de ácido clorogénico y procianidina dímero tras la aplicación de EFS con cartuchos C18 y diol. ....	58
<b>Tabla 9.</b> Evolución de ácido clorogénico y procianidina dímero en los sistemas linoleato de metilo con los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados 80 °C, utilizando EFS-diol y UHPLC-MS. ....	62
<b>Tabla 10.</b> Constantes de velocidad de degradación de primer orden para ácido clorogénico y procianidina dímero, en los sistemas linoleato de metilo con la adición de los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados a 80 °C. ....	64
<b>Tabla 11.</b> Determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH para los extractos de hojas y cáscaras palto. ....	87
<b>Tabla 12.</b> Perfil de principales polifenoles de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de hoja y cáscara de palto en polvo en modo de ionización positivo e ionización negativo.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ecuaciones que describen el deterioro oxidativo de las materias grasas.....	3
<b>Figura 2.</b> Formación de compuestos secundarios de oxidación a partir de la degradación de hidroperóxidos. ....	5
<b>Figura 3.</b> Formación de compuestos secundarios de oxidación con funciones hidroxil y cetona.....	6
<b>Figura 4.</b> Ecuaciones que describen la acción antioxidante in vitro de los polifenoles. ....	11
<b>Figura 5.</b> Estructuras de procianidinas diméricas B1(A), B2(B), B5(C) y B7(D), procianidinas triméricas C1(E), tetraméricas A2(F) y pentaméricas A3 (G). ....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura de ácido clorogénico. ....	19
<b>Figura 7.</b> Formación de Capsul®.....	23
<b>Figura 8.</b> Imágenes de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de hojas y cáscaras de palto.....	37
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas de los principales polifenoles identificados por HPLC-MS en extractos acuosos de cáscaras y hojas de palto, secados por atomización. ....	46
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas de los principales polifenoles identificados por HPLC-MS, en extractos hidroalcohólicos de cáscaras y hojas de palto, secados por atomización.....	47
<b>Figura 11.</b> Evolución de compuestos polares para los sistemas de LM y LM con la adición de EHC, EHH, EAH, EAC o BHA, almacenados a 80°C.....	50
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas de las señales (m/z) identificadas por UHPLC para ácido clorogénico y (C) procianidina dímero, detectadas en linoleato de metilo. ....	57
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas representativos para ácido clorogénico (A) y procianidina (B), utilizando EFS-diol y UHPLC-MS en el sistema LM+EHC.....	60
<b>Figura 14.</b> Esquema representativo de los resultados obtenidos. ....	66

<b>Figura 15.</b> Curva de calibración de ácido cafeico para la determinación de CPT de polifenoles en los extractos de hojas y cáscaras de palto .....	84
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración utilizada para la determinación de la capacidad antioxidante de polifenoles en los extractos de hojas y cáscaras de palto .....	86
<b>Figura 17.</b> Degradación de AC y PD en los sistemas LM con los extractos hidroalcohólicos de palto hasta las 216 horas de almacenamiento. ....	89
<b>Figura 18.</b> Degradación AC y PD en los sistemas LM con los extractos acuosos de palto hasta las 216 horas de almacenamiento.....	90
<b>Figura 19.</b> Comportamiento de AC y PD en los sistemas LM con los extractos hidroalcohólicos de palto hasta las 216 horas de almacenamiento. ....	91
<b>Figura 20.</b> Comportamiento de AC y PD en los sistemas LM con los extractos acuosos de palto hasta las 216 horas de almacenamiento.....	92

## ABREVIATURAS

EAH: Extracto acuoso de hojas

EAC: Extracto acuoso de cáscaras

EHH: Extracto hidroalcohólico de hojas

EHC: Extracto hidroalcohólico de cáscaras

CP: Compuestos polares

BHA: Butilhidroxianisol

AA: Actividad antioxidante

CPT: Contenido de polifenoles totales

AC: Ácido clorogénico

PD: Procianidina dímero

ELL: Extracción líquido-líquido

EFS: Extracción en fase sólida

EFS-C18: Extracción en fase sólida con cartuchos de fase estacionaria C18

EFS-Diol: Extracción en fase sólida con cartuchos de fase estacionaria Diol

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas

UHPLC-MS: Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas

## RESUMEN

Las materias grasas, en general los aceites que contienen ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a sufrir deterioro oxidativo cuando se someten a procesos térmicos, alterando las propiedades organolépticas y nutricionales de los aceites. Para retardar el deterioro oxidativo se ha recurrido a la utilización de antioxidantes sintéticos, sin embargo, estos han sido cuestionados por sus posibles efectos adversos en la salud a altas concentraciones. En este contexto, investigaciones en la utilización de extractos vegetales como fuente de antioxidantes, se están llevando a cabo.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la adición de extractos hidroalcohólicos y acuosos de hojas y cáscaras de palto en polvo, sobre la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo sometido a 80 °C, en comparación con la adición de un antioxidante sintético (BHA). Los extractos de cáscaras y hojas de palto (variedad Hass) se prepararon utilizando como solvente agua (EAC, EAH) o etanol/agua (EHC, EHH), posteriormente se secaron a 140 °C, usando Capsul® como carrier. Los extractos de palto (EAC, EAH, EHC y EHH) antes y después del secado, se caracterizaron de acuerdo al contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) y capacidad antioxidante (FRAP y DPPH), mientras que la identificación de los principales polifenoles (HPLC-detector UV y espectrómetro de masas) se realizó en los extractos en polvo. Los resultados obtenidos mostraron, un aumento en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en los cuatro extractos después del secado por atomización, siendo mayor para el EHC. Los principales polifenoles identificados en los extractos en polvo fueron ácido clorogénico, procianidina dímero y epicatequina.

La estabilidad térmica-oxidativa de muestras de linoleato de metilo (LM) con la adición de extractos de cáscaras y hojas de palto en polvo (EAC, EAH, EHC y EHH) (equivalente a 400 ppm de polifenoles) se sometieron a un almacenamiento a 80 °C por 240 horas. Los resultados mostraron que los extractos de palto no tuvieron un efecto significativo ( $p \leq 0,05$ ) en disminuir la formación de compuestos polares en LM, sólo el BHA mejoró la estabilidad termo-oxidativa de LM.

La extracción de los polifenoles ácido clorogénico (AC) y procianidina dímero (PD) desde los sistemas de LM con los extractos de cáscaras y hojas de palto en polvo, después del almacenamiento a 80 °C, se realizó por extracción en fase sólida (cartuchos diol). Los resultados mostraron que los extractos de hojas (hidroalcohólico y acuoso) presentaron mayores concentraciones de AC, mientras que los extractos de cáscaras (hidroalcohólico y acuoso) presentaron mayores concentraciones de PD. No se observó un efecto del tipo de extracto (solvente de extracción y tipo de material vegetal (hoja o cáscara)) sobre la constante de velocidad de degradación de AC y PD en LM con extractos de palto almacenados a 80 °C hasta 216 horas.

## ABSTRACT

### "Effect of avocado extracts on oxidative stability of methyl linoleate"

In general oils that contain polyunsaturated fatty acids are susceptible to oxidative deterioration under thermal processes. Plant extracts can be considered as a source of natural antioxidants for inhibition of lipid oxidation. The aim of this work was to study the effect of avocado extracts (leaves and peels) on the oxidative stability of methyl linoleate at 80 °C.

The avocado extracts of leaves and peels (var. Hass) were elaborated using water (PAE and LAE, respectively) or ethanol:water (50:50 v/v) (PHE and LHE, respectively) as extracting solvents. The aqueous and hydroalcoholic extracts were dried by spray-drying at 140 °C using Capsul® as carrier. The extracts (PAE, LAE, PHE and LHE) before and after spray-drying were characterized according to total content of polyphenols (Folin-Ciocalteu) and antioxidant activity (FRAP and DPPH) while the identification of the main polyphenols (HPLC-UV detector and mass spectrometer) was performed on powder extracts. The results showed an increase of total polyphenol content and antioxidant capacity in the four extracts after spray-drying, being the highest PHE. The main polyphenols identified in powder extracts were: chlorogenic acid, procyanidin dimer and epicatechin. The thermal-oxidative stability of methyl linoleate (ML) samples with the addition of avocado extracts powder (LAE, PAE, LHE y PHE) (400 ppm polyphenols) were stored at 80 °C until 240 h. The results showed that the avocado extracts did not have a significant effect ( $p \leq 0.05$ ) in decreasing the formation of polar compounds in ML, only BHA improved the thermo-oxidative stability of ML.

The extraction of chlorogenic acid (CA) and procyanidin dimer (PD) from ML with avocado extracts during storage at 80 °C, were performed by solid phase

extraction (cartridges Diol). The avocado leaves extracts (hydroalcoholic and aqueous) had a higher CA content whereas the avocado peels extracts (hydroalcoholic and aqueous) had a higher PD content. The extract type (extracting solvent and plant material (leaf or peel)) did not have influence on the degradation rate constants of CA and PD in ML with avocado extracts at 80 °C until 216 hours.

## INTRODUCCIÓN

La oxidación lipídica es un factor muy importante para la industria alimentaria, debido a que afecta la calidad sensorial y nutricional de los alimentos, además de la salud de los consumidores (Shahidi y Zhong, 2010; Yanishlieva y Marinova, 2001). Los productos de oxidación son responsables de olores y sabores rancios (Choe y Min, 2007; Frankel, 2005), siendo una de las principales causas de deterioro de los alimentos y la segunda causa de deterioro después de la acción de microorganismos (Yanishlieva y Marinova, 2001).

Una de las alternativas para prevenir o retardar la oxidación de lípidos son los antioxidantes, que pueden ser de origen natural o artificial. Los antioxidantes naturales son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden obtener mediante extractos vegetales a partir de distintas partes de las plantas, tales como hojas, cortezas, semillas, frutas, flores, entre otros (Brewer, 2011). Así, los subproductos de palto (hojas y cáscaras) podrían ser considerados como una fuente para la obtención de extractos con propiedades antioxidantes (Wang *et al.*, 2010; Terasawa *et al.*, 2006) y que potencialmente podrían mejorar la vida útil de sistemas lipídicos y ser utilizados en la industria alimentaria.

## 1.1. Oxidación lipídica.

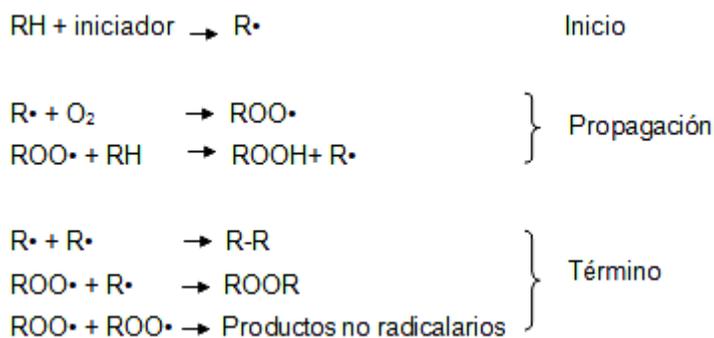
Los lípidos son susceptibles a oxidación por factores tales como luz, temperatura, enzimas, metales, metaloproteínas, oxígeno y clorofila (Choe y Min 2009; Yanishlieva y Marinova, 2001), dando lugar a procesos de auto-oxidación, foto-oxidación u oxidación enzimática (Shahidi y Zhong, 2010). La auto-oxidación ocurre con más frecuencia y consiste en la oxidación de ácidos grasos insaturados en presencia de oxígeno atmosférico cuyo mecanismo de deterioro se describe como un proceso mediado por radicales libres en tres etapas: inicio, propagación y término (Ver figura 1) (Yanishlieva y Marinova, 2001).

En la **iniciación**, la luz y los metales actúan como iniciadores, estos sustraen uno de los átomos de hidrógeno del carbono adyacente al doble enlace de un ácido graso insaturado (RH), formándose un radical alquil ( $R\bullet$ ) (Yanishlieva y Marinova, 2001; Belitz, 1997).

En la **propagación**, el radical alquil ( $R\bullet$ ) formado en el inicio, reacciona con el oxígeno atmosférico originando un radical peroxil ( $ROO\bullet$ ); este último reacciona con otras moléculas de ácidos grasos insaturados, sustrayendo un átomo de hidrógeno en la posición alílica o bis alílica para formar el hidroperóxido ( $ROOH$ ) y un nuevo radical alquil ( $R\bullet$ ), que propaga la reacción. Los hidroperóxidos constituyen los productos primarios de la oxidación (Yanishlieva y Marinova, 2001; Belitz, 1997).

Al **término**, los radicales libres provenientes de la descomposición de los hidroperóxidos se asocian para formar una serie de compuestos no radicalarios estables, como aldehídos, cetonas, alcanos, alcoholes, los cuales son

responsables de aromas y sabores indeseables y de cambios en el color (Yanishlieva y Marinova, 2001; Cheftel, 1992).



**Figura 1.** Ecuaciones que describen el deterioro oxidativo de las materias grasas.

### 1.1.1. Termooxidación.

Cuando una materia grasa se somete a alta temperatura, además del deterioro oxidativo se produce un deterioro térmico (Dobarganes *et al.*, 1988). El mecanismo químico de la termooxidación es básicamente el mismo que el de la auto-oxidación (Marmesat *et al.*, 2010), con la formación de hidroperóxidos (productos de oxidación primaria inestables) que son a su vez, degradados rápidamente en productos de oxidación secundarios volátiles o no volátiles (Choe y Min, 2007). Los hidroperóxidos están prácticamente ausentes sobre 150 °C lo que indica que la velocidad de su descomposición es mayor a la de su formación. El deterioro térmico a su vez, se caracteriza por la formación de dímeros, producto del cambio de la estructura 1,4-pentadieno del ácido graso a posiciones conjugadas, las cuales mediante cicloadición 1,4 originan los aductos de Diels-Alder. Estos aductos se pueden producir entre dos moléculas de diferentes triglicéridos, dentro de una molécula del triglicérido o por unión de dos ácidos grasos (Warner, 2004). El dímero puede derivar en polímeros; también pueden formarse isómeros *trans*, posicionales y monómeros cíclicos.

Así, los polímeros formados producto de la oxidación tienen alto peso molecular (692 a 1600 Daltons) (Choe y Min, 2006; Moreira *et al.*, 1999). En aceites vegetales, la polimerización se produce más fácilmente en aquellos aceites con alto contenido de ácidos grasos linoleico y linolénico (Choe y Min, 2006).

## **1.2. Productos de la oxidación.**

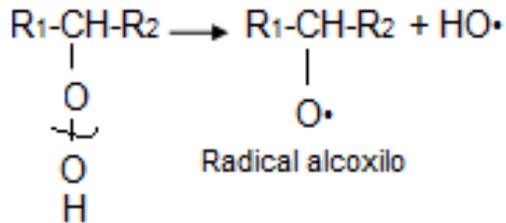
### *1.2.1. Compuestos primarios de oxidación.*

Los hidroperóxidos son los compuestos primarios de oxidación y se forman por reacciones de propagación. Son compuestos inestables a altas temperaturas, que se descomponen fácilmente en radicales, principalmente hidroxil y alcoxil y a partir de estos, se pueden formar aldehídos, cetonas, ácidos, éster, alcoholes e hidrocarburos de cadena corta (Choe y Min, 2006). En condiciones de temperaturas bajas y moderadas constituyen una fracción muy importante de los productos de oxidación.

### *1.2.2. Compuestos secundarios de oxidación.*

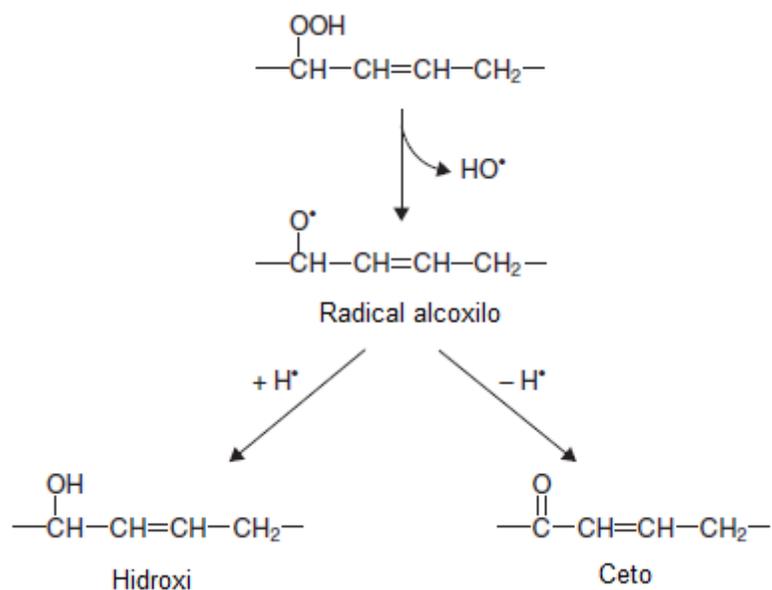
Los compuestos secundarios se forman a partir de los hidroperóxidos a través de distintos tipos de reacciones. Cada uno de los hidroperóxidos origina una serie de productos de degradación iniciales, que le son característicos y que dependen de la posición del grupo hidroperóxido en la molécula originaria. Cabe señalar que los hidroperóxidos comienzan a descomponerse tan pronto como se forman. En los primeros estadios de la auto-oxidación, la velocidad de formación supera a la de descomposición, pero en etapas posteriores ocurre lo contrario. La primera etapa de la descomposición de un hidroperóxido es la escisión del enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, lo que da origen a un radical alcoxi y otro hidroxil, como se muestra en la Figura 2. La segunda

etapa de la descomposición de los hidroperóxidos es la ruptura de enlaces carbono-carbono a uno u otro lado del grupo alcoxilo (ruptura homolítica) (Frankel, 2005).



**Figura 2.** Formación de compuestos secundarios de oxidación a partir de la degradación de hidroperóxidos.

En estados avanzados de oxidación de linoleato de metilo, los principales compuestos secundarios son monómeros oxidados, dímeros y polímeros alterados. Estos compuestos alterados corresponden a los compuestos polares. Los monómeros oxidados se forman por la ruptura homolítica del grupo hidroperóxido, formando radicales hidroxilo y alcoxilo. El radical alcoxilo puede participar en diferentes reacciones que conducen a la formación de compuestos con función epoxi, hidroxilo y ceto, entre otras y que constituyen, junto a los hidroperóxidos, el grupo mayoritario originado por degradación oxidativa a temperatura ambiente o moderada (Frankel, 2005). La formación de compuestos secundarios con funciones hidroxilo y ceto se muestran en la Figura 3.



**Figura 3.** Formación de compuestos secundarios de oxidación con funciones hidroxi y ceto.

### 1.3. Métodos de evaluación de la oxidación lipídica.

Se han desarrollado una variedad de metodologías para evaluar el nivel de oxidación de los aceites, sin embargo, no existe un único método que permita evaluar todos los estados de oxidación, por lo que se recomienda el uso de métodos combinados o el uso de la metodología adecuada al estado de oxidación que se quiere evaluar (Frankel, 2005). Cada método proporciona diferente información sobre el estado oxidativo (Shahidi y Zong, 2005), por ejemplo, para la determinación de productos volátiles se puede utilizar cromatografía de gases (CG) y para la determinación de compuestos primarios se puede utilizar el índice de peróxidos. Mientras que para el estudio de la evolución de compuestos secundarios de oxidación, se puede utilizar el valor de anisidina, dienos, trienos o la determinación de compuestos polares (IUPAC, 2000).

### 1.3.1. *Compuestos polares (CP).*

Los compuestos polares en materias grasas son todos aquellos compuestos oxidados no volátiles que presentan una polaridad mayor a la de los triglicéridos, acumulándose desde el inicio de la oxidación y que permanecen en la materia grasa. La formación de compuestos polares, representa el método más adecuado para la evaluación de la oxidación lipídica sometida a condiciones aceleradas de almacenamiento (Dobarganes *et al.*, 1988). Los compuestos polares en linoleato de metilo se determinan por extracción en fase sólida, en columna abierta, donde se puede separar la primera fracción correspondiente a linoleato de metilo no alterado y luego obtener la segunda fracción correspondiente a monómeros oxidados, dímeros y polímeros alterados de linoleato de metilo correspondientes a compuestos polares totales (IUPAC, 2000). De acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos para los aceites, se permite hasta un 25% como máximo sobre la cantidad total de componentes en un aceite de fritura (RSA, 1996).

## 1.4. **Inhibición de la oxidación lipídica.**

### 1.4.1. *Antioxidantes.*

Para inhibir la oxidación lipídica, la industria alimentaria utiliza generalmente antioxidantes. Estas son moléculas orgánicas, de origen natural o sintético, capaces de retardar el deterioro oxidativo del alimento (Oroian y Escriche, 2015; Yanishlieva y Marinova, 2001), mediante la prolongación del período de inducción o retardo de la propagación. Se ha descrito que los antioxidantes aumentan la vida útil de un alimento rico en grasas entre un 15 y un 200% (Maestro-Durán y Borja-Padilla, 1993). Los antioxidantes pueden atrapar radicales libres, inactivar el oxígeno singlete, inactivar sensibilizadores o atrapar

metales (Oroian y Escriche, 2015; Shahidi y Ambigaipalan 2015; Choe y Min, 2009).

Los antioxidantes pueden clasificarse en primarios o secundarios; los primarios atrapan radicales libres retrasando la propagación, por ello se denominan quebradores de cadena, destruyéndose durante el período de inducción, e incluyen a la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), polifenoles, BHT, entre otros. Los secundarios actúan mediante unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicalarias, absorción de la radiación ultravioleta o desactivación del oxígeno singlete. Algunos antioxidantes secundarios son ácido cítrico y ácido ascórbico, entre otros (Shahidi y Ambigaipalan 2015; Brewer, 2011; Yanishlieva, 2004).

#### *1.4.1.1. Antioxidantes sintéticos.*

Algunos de los antioxidantes sintéticos son los más utilizados por la industria alimentaria, corresponden a compuestos fenólicos como el hidroxibutilanisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y galato de Propilo (PG). Sin embargo, su uso es actualmente cuestionado debido a sus posibles efectos adversos a la salud (Dolatabadi y Kashanian, 2010). Se han reportado una relación entre el uso de BHA y BHT y el desarrollo de cáncer (Shahidi y Ambigaipalan 2015; Valenzuela y Nieto, 1996).

Entre las ventajas de los antioxidantes sintéticos se encuentran: bajo costo, mecanismo de acción conocido y alta disponibilidad, sin embargo, en general son volátiles y se descomponen con facilidad a temperaturas por sobre 100 °C (Marmesant *et al.*, 2010). A pesar de ese inconveniente, en este estudio se utilizó BHA como control, debido a su uso como antioxidante sintético en los alimentos.

#### 1.4.1.2. Antioxidantes Naturales.

Se encuentran presente prácticamente en todos los vegetales, microorganismos, hongos e incluso en tejidos animales, donde tienen múltiples efectos biológicos debido a su actividad antioxidante (Brewer, 2011; Barclay y Vinqvist, 2003; Halliwell, 1995). La mayoría corresponde a compuestos fenólicos, entre los cuales, los principales grupos son los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) y polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos).

##### 1.4.1.2.1. Polifenoles.

Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Oroian y Escriche, 2015) y se han relacionado con varios efectos biológicos, proporcionando protección frente a algunas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares, se reconocen también como antiinflamatorios y reguladores del balance de la microbiota intestinal (Shahidi y Ambigaipalan 2015; Pandey y Rizvi, 2009; Pace-Asciak *et al.*, 1995).

Los polifenoles se sintetizan en los vegetales por las rutas de biosíntesis del ácido siquímico y/o del acetato. Más de 8.000 compuestos fenólicos se han identificado en varias especies de plantas (Bravo, 1998). Estos se pueden clasificar en función del número de anillos que contenga el fenol, y de los grupos funcionales asociados a estos anillos. De acuerdo a su estructura pueden dividirse en diferentes clases (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los polifenoles considerando número de carbonos de su estructura.

<b>Estructura</b>	<b>Polifenoles</b>
C6	Fenoles simples y benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Ácidos fenilacéticos y acetofenonas
C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos, derivados fenilpropanoides, cumarinas y cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolizables
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas

Fuente: Balasundram *et al.*, 2006.

Los compuestos fenólicos (ArOH) presentan propiedades antioxidantes en sistemas biológicos que se atribuyen a su capacidad para atrapar radicales libres y quelar metales. En este sentido, se describen dos mecanismos para inactivar radicales libres ( $R^\bullet$ ): (1) donación de un átomo de hidrógeno a través de la ruptura homolítica del enlace O-H (Ec. 1) y (2) transferencia de electrones (Ec. 2) (Brewer, 2011; Leopoldini *et al.*, 2011). La representación aparece en la Figura 4.



**Figura 4.** Ecuaciones que describen la acción antioxidante *in vitro* de los polifenoles.

Las estructuras aromáticas, radical fenoxil ( $\text{ArO}^\bullet$ ) ó el radical catión fenoxil ( $\text{ArOH}^{+\bullet}$ ), son estructuras que permiten la deslocalización del electrón (estabilización por resonancia), disminuyendo su reactividad (Brewer, 2011; Leopoldini *et al.*, 2011; Shahidi y Wanasundara, 1992).

Existe una estrecha relación entre la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y su estructura química (Rice-Evans *et al.*, 1996). Esta ha sido bien estudiada en matrices hidrofílicas, no así en matrices hidrofóbicas como los aceites.

El consumo de materias grasas oxidadas, está relacionado con la prevalencia de ciertas enfermedades, principalmente cáncer, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. Los ácidos grasos actúan como moduladores de diversas funciones celulares, pudiendo alterar el organismo humano. El adicionar antioxidantes a matrices lipídicas no sólo mejora la estabilidad de un alimento sino que además, estos compuestos bioactivos son capaces de inhibir la oxidación lipídica en tejidos biológicos disminuyendo el riesgo de desarrollar estas enfermedades (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2015).

## **1.5. Fuentes de antioxidantes naturales.**

### *1.5.1. Extractos vegetales.*

Uno de los procedimientos más utilizados para la obtención de antioxidantes naturales es a través de la preparación de extractos a partir de plantas (hojas, semillas, frutas, flores, corteza, ramas, entre otros), utilizando disolventes de distinta polaridad (medio de extracción) de acuerdo a la estructura química de los compuestos de interés (Jiménez *et al*, 2011; Naczk y Shahidi, 2006). Los extractos vegetales contienen una mezcla de compuestos bioactivos, algunos con propiedades antioxidantes. El efecto observado al adicionarlos a una matriz corresponde al conjunto de todos ellos, pero no permite identificar las propiedades antioxidantes individuales de cada constituyente.

En relación con la actividad antioxidante de los extractos, se ha descrito que ésta depende tanto de la estructura de los polifenoles como de la presencia de componentes menores, de manera que los polifenoles pueden presentar un comportamiento diferente cuando están puros (Benavente-García *et al.*, 2000). En este estudio se utilizaron hojas y cáscaras de palto como materia prima para la elaboración de extractos con agua y etanol como disolventes de extracción ya que ambos están permitidos para aplicaciones en alimentos (RSA, 1996). Por otra parte, la incorporación de los extractos a matrices lipídicas fue facilitada por el uso de secado por atomización como tratamiento previo. Disolventes tales como metanol, acetona, acetato de etilo, agua y sus mezclas se han utilizado para la extracción de polifenoles de la cáscara (Wang *et al.*, 2010) u hojas de palto (Ojewole y Amabeoku, 2006).

### 1.5.2. Extractos de palto.

#### 1.5.2.1. Características botánicas del palto y su fruto.

El palto (*Persea americana Mill.*), es una especie frutal perteneciente a la familia de las *Lauráceas*. Es un árbol de hoja perenne, nativo del área de América central que puede alcanzar 12 metros de altura y 14 metros de diámetro de copa, también es conocido como avocado y aguacate, en los países Centroamericanos. En Chile, la condición climática mediterránea templada, la calidad y disponibilidad de agua y suelos, posibilidad de cultivo en altas pendientes y baja incidencia de plagas, entre otros, ha permitido su creciente desarrollo (ODEPA, 2015).

La superficie cultivada con paltos se distribuye mayoritariamente en las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana, que concentran más del 90% de la superficie nacional plantada. Durante el año 2014, la superficie plantada de paltos a nivel nacional fue de 31.727 hectáreas, siendo el segundo mayor exportador de palta después de México, produciendo 160.657 Toneladas en el año 2007 (Yahia, 2011) y aunque una gran parte de su cosecha se exporta, cerca de 30% de la producción se comercializa en el mercado interno. Las variedades de palta más importantes en Chile corresponden a Fuerte, Negra de La Cruz, Bacon y Hass, siendo esta última la única que se produce durante todo el año (ODEPA, 2015).

El fruto es conocido en Chile como palta, este puede ser redondo, en forma de pera u oblongo, mientras que la piel o cáscara puede variar en textura y color. La piel puede ser flexible a dura, suave a rugosa y de color verde amarillo, rojo púrpura, morado o negro. La pulpa es de color amarillo verdoso a amarillo brillante cuando está maduro y mantecoso en consistencia, variedades inferiores pueden ser fibrosas. El carozo representa un 10 a 25 % del peso de la

fruta (Yahia, 2011). La palta es rica en ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), fibra dietética, vitaminas B y E entre otros nutrientes (Wang *et al.*, 2010).

#### *1.5.2.2. Subproductos del palto (*Persea americana* Mill.) y fruto.*

Debido a la producción industrial del palto y de la pulpa del fruto, se obtienen distintos subproductos tales como las hojas del palto generadas por la poda y las cáscaras del fruto. La poda se realiza con el fin de maximizar la luz al interior del follaje y así mantener altas producciones del fruto en la zona baja de la planta, facilitando las operaciones de manejo, en especial la cosecha. El palto se poda en otoño con intensidad suave y una poda severa en primavera (Yahia, 2011).

#### *1.5.2.3. Compuestos bioactivos en cáscara y hojas de palto.*

Son escasos los estudios que se han centrado en la composición fitoquímica del palto, específicamente que relacionen el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y determinación de compuestos bioactivos (Wang *et al.*, 2010). Los extractos de palto presentan una cantidad importante de polifenoles y entre ellos, procianidinas (Chávez *et al.*, 2011; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011 a, b; Wang *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2007; Teresawa *et al.*, 2006; De Almeida *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1987; Brune *et al.*, 1982), pero su aplicación en sistemas lipídicos alimentarios no ha sido investigada.

Se ha informado que cáscaras y hojas de palto contienen compuestos bioactivos, como los polifenoles (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011 a, b; Ding *et al.*, 2007; Teresawa *et al.*, 2006; De Almeida *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1987; Brune y van Lelyveld, 1982). Sin embargo, hay pocos estudios que han

cuantificado e identificado los polifenoles presentes en cáscaras y hojas de palto (Tabla 2). En la cáscara de palto se han identificado: procianidinas (Kosinska *et al.*, 2012; Chávez *et al.*, 2011; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2010), antocianidinas (Cox. *et al.*, 2004; Prahba *et al.*, 1980), ácidos cinámico, hidroxibenzoico (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b) y clorogénico (Prahba, 1980), quercetina 3,4'-diglucósido, quercetina 3-O-rutinósido, quercetina 3-O arabinosil-glucósido, quercetina 3-O-galactósido (Kosinska *et al.*, 2012) y epicatequinas (Kosinska *et al.*, 2012; Chávez *et al.*, 2011; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b; Ding *et al.*, 2007; Teresawa *et al.*, 2006; Prahba, 1980).

Los polifenoles identificados en hojas corresponden a ácidos cafeico, clorogénico, cumárico, ferúlico, gálico, hidroxibenzoico, protocatéquico, resorcílico, sinápico, siríngico y vaníllico (Ding *et al.*, 2007; De Almeida *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1987; Brune y van Lelyveld, 1982) y algunos flavonoides como la apigenina, isoramnetina, caempferol 3-O-arabinopiranosido, caempferol 3-O- $\beta$ -glucopiranosido, caempferol 3-O-ramnopiranosido, luteolina, luteolina 7-O-glucósido, rutina, quercetina, la quercetina 3-O-arapyranoside, quercetina 3-O- $\beta$ -glucopiranosido, glucósido de quercetina 3-O- $\beta$ -D y epicatequina (Owolabi *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2007; De Almeida *et al.*, 1998).

Para la identificación del perfil de compuestos fenólicos en extractos de palto se han descrito una variedad de métodos, tales como cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), resonancia magnética nuclear (RMN), entre otros. En este proyecto se utilizó la metodología de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS) para determinar el perfil de polifenoles presentes en extractos de cáscaras y hojas de palto.

**Tabla 2.** Polifenoles identificados en cáscaras (Cásc.) y hojas de palto.

---

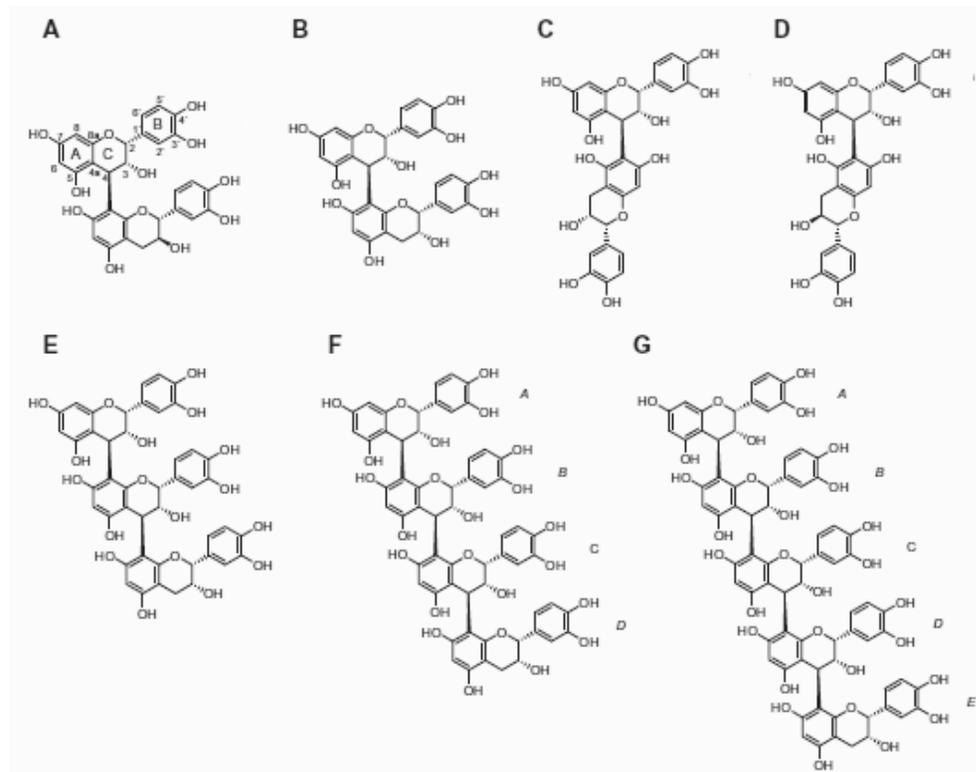
Antocianina-3-O-glucósido	Cásc.	Cox <i>et al.</i> , 2004
Antocianina-3-O-galactósido	Cásc.	Prahba <i>et al.</i> , 1980 ; Cox <i>et al.</i> , 2004
Apigenina	Hojas	Ding <i>et al.</i> , 2007; Owolabi <i>et al.</i> , 2010
Ácido cafeico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987; Bune y van Lelyveld, 1982
Ácido cinámico	Cásc. Cásc.	Rodriguez-Carpena <i>et al.</i> , 2011b
Ácido clorogénico	Cásc. Cásc.	Kosinska <i>et al.</i> , 2012; De Almeida <i>et al.</i> , 1998; Prahba , 1980
Ácido cumárico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987
Epicatequina	Cásc. hojas	Chávez <i>et al.</i> , 2011; Rodriguez-Carpena <i>et al.</i> , 2011b; Ding <i>et al.</i> , 2007; Teresawa <i>et al.</i> , 2006; Prahba, 1980
Ácido ferúlico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987; Bune y van Lelyveld, 1982
Ácido gálico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido hidroxibenzoico	Cásc. hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987; Bune y van Lelyveld, 1982 Rodriguez-Carpena <i>et al.</i> , 2011b
Isoramnetina	Hojas	Owolabi <i>et al.</i> , 2010
Caempferol 3-O- arabinopiranosido	Hojas	De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Caempferol 3-O- $\beta$ - glucopiranosido	Hojas	Ding <i>et al.</i> , 2007
Caempferol 3-O-ramnopiranosido	Hojas	Ding <i>et al.</i> , 2007; De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Luteolina	Hojas	Owolabi <i>et al.</i> , 2010; Ding <i>et al.</i> , 2007
Luteolina 7-O- glucósido	Hojas	Ding <i>et al.</i> , 2007
Ácido pirocatéquico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido protocatéquico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987; Bune and van Lelyveld, 1982
Procianidinas	Cásc.	Kosinska <i>et al.</i> , 2012; Chávez <i>et al.</i> , 2011; Rodriguez-Carpena <i>et al.</i> , 2011b; Wang <i>et al.</i> , 2010;
Ácido Resorcílico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987
Rutina	Hojas	Owolabi <i>et al.</i> , 2010
Ácido sinápico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido siríngico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987
Quercetina	Hojas	Owolabi <i>et al.</i> , 2010; De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Quercetina 3-O-arabinósido	Hojas	Ding <i>et al.</i> , 2007; De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Quercetin 3-O- $\beta$ -glucopiranosido	Hojas	De Almeida <i>et al.</i> , 1998.
Quercetina 3-O- $\beta$ -D-glucósido	Hojas	Ding <i>et al.</i> , 2007.
Quercetina (3,4'-diglucósido, 3- O-rutinósido, 3- O-arabinosil- glucósido, 3- O-galactósido)	Cásc.	Kosinska <i>et al.</i> ,2012
Ácido vaníllico	Hojas	Torres <i>et al.</i> , 1987

---

Algunos de los polifenoles de mayor interés son las procianidinas y ácido clorogénico por su actividad antioxidante y sus potenciales efectos beneficiosos en la salud. Con respecto a la procianidinas, estas son una subclase de flavonoides, se encuentran en la mayoría de las plantas y en una amplia gama de alimentos, tales como el vino tinto, cacao, té, frutas y palta (semilla y cáscara) entre otros (Esatbeyoglu *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2003).

Las procianidinas son compuestos fenólicos formados por unión de monómeros (+) - catequina y (-) - epicatequina a través de enlaces C4-C8 y/o enlaces C4-C6 (tipo B), encontrándose mayoritariamente las de tipo diméricas que se caracterizan por presentar dos subtipos A y B, siendo las tipo A más rígidas en conformación que las de tipo B, debido a la presencia de enlaces C-C y C-O entre monómeros. Se clasifican según su peso molecular expresado por el grado de polimerización (GP), dando origen a oligómeros (dos a cinco unidades, GP de 2-5) o polímeros (más de cinco unidades, GP > 5) (Serra *et al.*, 2010). La figura 5 muestra las estructuras de procianidinas de acuerdo a su grado de polimerización.

Entre los efectos biológicos descritos para procianidinas dímero se encuentran: aumento del efecto antioxidante de las células (Puiggro's *et al.*, 2009), efectos antiinflamatorios (Serra *et al.*, 2010) y la actividad antidiabética (Chen *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2012). Sin embargo, su efecto como antioxidante ha sido poco investigado en los alimentos.



**Figura 5.** Estructuras de procianidinas diméricas B1(A), B2(B), B5(C) y B7(D), procianidinas triméricas C1(E), tetraméricas A2(F) y pentaméricas A3 (G).

El ácido clorogénico, es un éster derivado del ácido cinámico, se encuentra presente en una gran variedad de frutas y vegetales (jugo de naranja, romero, entre otros), con una alta actividad antioxidante. Algunos efectos biológicos conocidos asociados a su actividad son antibacterial, antiviral, anticarcinogénico, antiinflamatorio y vasodilatador (Lima *et al.*, 2014; Mudnic *et al.*, 2010). En la figura 6 se presenta la estructura del ácido clorogénico.

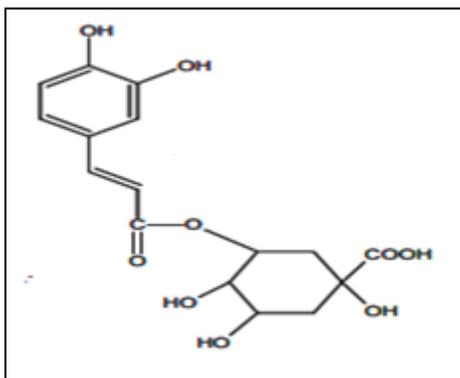


Figura 6. Estructura de ácido clorogénico.

## 1.6. Efecto de polifenoles sobre la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas.

### 1.6.1. Efecto de polifenoles libres sobre la estabilidad de linoleato de metilo.

Se escogió linoleato de metilo (LM) como matriz modelo de aceites insaturados porque no contiene antioxidantes añadidos, ni antioxidantes naturales. Su estructura está formada por 18 átomos de carbonos, un grupo éster terminal y presenta dos dobles enlaces. Es un modelo que se utiliza habitualmente para profundizar en los mecanismos de oxidación de materias grasas, estudiar actividad antioxidante de compuestos bioactivos y medir otras variables que influyen en la estabilidad oxidativa (Márquez-Ruiz y Dobarganes, 2006).

Se ha observado que el uso de polifenoles impide o retarda la formación de hidroperóxidos en esta matriz, de acuerdo al siguiente orden: miricetina > quercetina > alfa-tocoferol > (+)-catequina > caempferol = rutina (Pekkarinen *et al.*, 1999). En estudios similares se evaluó el efecto antioxidante de quercetina, (-)-epicatequina, y (+)-catequina, determinando que la primera fue más eficiente en inhibir la oxidación, seguido por las catequinas (Pedrielli y Skibsted, 2002).

También se ha estudiado el efecto de ácido gálico, galato de propilo, galato, miricetina, catecol, rutina, ácido cafeico, observándose una mayor actividad antioxidante por catequina, epicatequina y quercetina (Roginsky y Pliss, 2010). Además se ha comprobado que tocoferoles y c-orizanol presentes en salvado de arroz inhiben la oxidación del linoleato de metilo (Yamanaka *et al.*, 2010).

#### *1.6.2. Efecto de extractos de polifenoles sobre la estabilidad oxidativa de lípidos.*

De acuerdo a antecedentes de la literatura, en modelos de lípidos, tal como el linoleato de metilo (LM) a temperaturas bajas (menores a 60 °C), la actividad antioxidante de los flavonoides depende del número y posición de los grupos hidroxilo en el anillo B (principalmente orto y para), presencia de un doble enlace en la posición 2,3 y la glicosilación de la molécula (Pedrielli y Skibsted, 2002; Pekkarinen *et al.*, 1999). Por otro lado, fracciones polimerizadas de proantocianidinas fueron más eficaces contra la oxidación de lípidos a 40 °C en muestras de aceite de pescado a granel, mientras que las proantocianidinas con un grado de polimerización intermedia mostraron actividad más alta en emulsiones O/W de aceite de pescado. La eficacia de la actividad antioxidante dependió altamente de la ubicación física de los sitios sensibles a la oxidación en los antioxidantes (Iglesias *et al.*, 2010). Por lo tanto, algunos factores como: la estructura química de los polifenoles, variaciones de la temperatura a la que están sometidos, condiciones experimentales, forma de preparación de los extractos, tipo de solvente utilizado, concentración de polifenoles en el extracto y la presencia e interacción de componentes menores presentes en los extractos naturales, pueden afectar su actividad antioxidante.

En la tabla 3, se muestra el efecto de los extractos de polifenoles desde diferentes fuentes sobre la actividad antioxidante de matrices lipídicas a temperaturas inferiores y superiores a 60 °C.

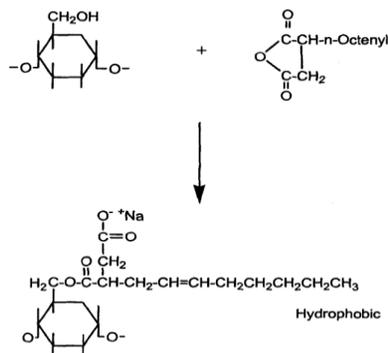
Existen pocos estudios que han evaluado el efecto de extractos de palto en la estabilidad oxidativa de los lípidos en alimentos. Teresawa *et al.* (2006) informó que el extracto de palto del epicarpio inhibe la oxidación de ácido linoleico a 40 °C y que además se mantuvo estable a 180 °C durante 60 min, sugiriendo que los productos de degradación de compuestos fenólicos también muestran captación de radicales (Murakami *et al.*, 2004). Del mismo modo, Rodríguez-Carpena, *et al.*, (2011a, b) informó que los lípidos de la carne de porcino en hamburguesas fueron protegidos por la adición de extractos de cáscara o semilla de palto.

De acuerdo con estos antecedentes, la cáscara y las hojas de palto podrían ser obtenidas fácilmente como subproductos agroalimentarios y a bajo costo, siendo atractivas fuentes de antioxidantes naturales. El enriquecimiento de los alimentos con estos compuestos fenólicos podría contribuir a inhibir la oxidación de la fracción lipídica de dichos alimentos, minimizando el daño oxidativo y los riesgos de padecer ciertas enfermedades crónicas

**Tabla 3.** Efectos de extractos de polifenoles desde diferentes fuentes sobre la actividad antioxidante de matrices lipídica

Temperatura	Planta	Concentración	Solvente	Condiciones	Efectos	Referencia
Menor a 60 °C	Ajo	250, 500 ppm 1000 ppm	Metanol	Aceite de girasol 50 °C	Antioxidante	Iqbal y Bhanger, 2007.
	<i>Irinian Mentha pulegium</i>	600, 800 y 1000 ppm	Agua, metanol	Aceite de girasol 60 °C x 7 días	Antioxidante agua>metanol	Kamkan <i>et al.</i> , 2010
	Té verde y negro	0.25%	Extracto comercial	aceite marino purificado 60 °C x 140h	Alta inhibición de aldehídos (>95%)	Zhu <i>et al.</i> , 2009
Mayor a 60 °C	Torta de Sésamo	200 ppm	Metanol	Aceite de girasol y soja, sin antioxidante 70 °C x 72h	Antioxidante	Mohdaly <i>et al.</i> , 2011
	Romero	1000 ppm	Extracto comercial	Aceite de soja (refinado y purificado, sin antioxidante) Tiempo de inducción 100°C	Antioxidante	Ramalho y Neuza, 2008
	Hojas de Olivo	630 ppm	Extracto hidroalcohólico de hojas de olivo comercial	Aceite de girasol, canola y soja (refinado) sin antioxidante tiempo de inducción 110°C	Antioxidante Prooxidante	Jiménez <i>et al.</i> , 2011
	Pulpa uva <i>Thompson</i> . Romero	0.3-0.5%	Extracto hidroalcohólico comercial	Aceite de soja refinado sin extractos de antioxidantes Tiempo de Inducción 110°C	Antioxidante Romero>pulpa de uva	Gámez-Meza <i>et al.</i> , 2009
	Hojas Inca muña	600 ppm	Fracción de acetato de etilo	Aceite de soja (no refinado) tiempo de inducción 140 °C	Antioxidante	Chirinos <i>et al.</i> , 2011

Extractos de polifenoles en polvo han sido menos estudiados. El secado por atomización es una de las tecnologías industriales más utilizadas para convertir líquidos en polvos. El principio de secado por pulverización o por atomización consiste en la dispersión del compuesto de interés en un polímero carrier. La dispersión es atomizada sobre una corriente de aire caliente, lo que permite una rápida transferencia de calor y de masa (agua) en las gotas, obteniendo un polvo (Lim *et al.*, 2011). En este estudio, se utilizaron extractos de palto (cáscaras y hojas) en polvo, los que presentan ventajas como: menores costos de almacenamiento, mayor concentración, estabilidad microbiológica de los compuestos bioactivos, respecto a las formas líquidas convencionales (Oliveira *et al.*, 2006). Además, en el proceso de secado se utiliza como carrier Capsul®, un almidón modificado que contiene en su estructura un componente lipofílico (Marchal *et al.*, 1999), lo que podría mejorar la solubilidad de los extractos sobre sistemas lipídicos. En la figura 7 se muestra la estructura del carrier Capsul®.



**Figura 7.** Formación de Capsul®.

### **1.7. Determinación de polifenoles en matrices lipídicas.**

La extracción de polifenoles desde matrices lipídicas es un paso crucial para el desarrollo de un método analítico lo suficientemente sensible para determinar estas sustancias a bajas concentraciones. En la literatura se describen varios métodos de extracción, pero los más comunes son la extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, y la extracción con fluidos supercríticos (Lamuela-Raventós, 2014). Sin embargo, no existen reportes sobre métodos de extracción específicos para polifenoles de palto desde hojas y cáscaras y que sean adicionados a matrices lipídicas sometidas a calentamiento, por lo que en esta investigación se ensayaron dos metodologías enfocadas principalmente a la obtención de estos compuestos: extracción líquido- líquido (ELL) y extracción en fase sólida (EFS), utilizando en esta última dos tipos de cartuchos (C18 y diol). En la ELL, la composición de compuestos fenólicos varía según el tipo de solvente utilizado, mientras que la EFS es más específica para la extracción de polifenoles.

En general en la EFS, el uso de C18 como fase estacionaria no altera la composición fenólica, aunque la extracción podría ser incompleta si las condiciones no están optimizadas (Mateos *et al.*, 2001). Por otra parte, el uso de diol como fase estacionaria es un método analítico simple y preciso para la determinación de compuestos fenólicos, lignanos, flavonas y ácido cinámico en los aceites de oliva (Alarcón *et al.*, 2012; García-Villalba *et al.*, 2010; Mateos *et al.*, 2001). Existen además investigaciones sobre extracción con fase estacionaria C18 y diol en vino tinto (Jeffery, 2008), zanahoria, tomate, brócoli, cebolla, pimienta verde y roja (Silva *et al.*, 2012).

## **1.8. Hipótesis.**

La adición de extractos hidroalcohólicos y acuosos, de cáscaras y hojas de palto en polvo, mejora la estabilidad oxidativa del linoleato de metilo (LM) sometido a 80 °C, en comparación al sistema lipídico sin la adición de extracto.

## **1.9. Objetivos.**

### **1.9.1. Objetivo General.**

Estudiar la adición de extractos hidroalcohólicos y acuosos de cáscaras y hojas de palto en polvo, sobre la estabilidad oxidativa y degradación de polifenoles en un sistema lipídico (linoleato de metilo) a 80 °C.

### **1.9.2. Objetivos específicos.**

**Objetivo 1:** Elaborar y caracterizar los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscaras y hojas de palto, secados por atomización, de acuerdo al contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante e identificación de los principales polifenoles.

**Objetivo 2:** Estudiar la estabilidad oxidativa a través de la formación de compuestos polares en linoleato de metilo a 80 °C, después de la adición de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscaras y hojas de palto en polvo y compararlo con la adición de un antioxidante sintético (BHA).

**Objetivo 3:** Estudiar y comparar métodos de extracción para polifenoles desde linoleato de metilo adicionado con los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscaras y hojas de palto en polvo almacenados a 80 °C.

**Objetivo 4:** Implementar un método por UHPLC-MS, para identificar y cuantificar los principales polifenoles extraídos desde linoleato de metilo adicionado con los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscaras y hojas de palto en polvo almacenados a 80 °C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

- Cáscaras y hojas de palto (*P. americana Mill.*) cv. Hass.

Las hojas de palto fueron recolectadas desde árboles de más de 10 años de edad, ubicados en la localidad de Casablanca (33° 19' latitud sur y 71° 25' longitud oeste), Región de Valparaíso, Chile. El muestreo de hojas, se realizó en forma aleatoria en cada uno de los 25 árboles, recolectándose un total de 10 Kg de hojas. Las cáscaras se obtuvieron desde paltas producidas en la localidad de Quillota (32° 53' latitud sur y 71° 16' longitud oeste), Región de Valparaíso, Chile. Para el muestreo de las cáscaras se recolectaron paltas, en forma aleatoria en cada uno de los 10 árboles, obteniendo un total de 15 Kg de cáscaras.

- Agente carrier: Capsul® (almidón de maíz ceroso modificado hidrofóticamente) se adquirió en National Starch, SA (Chile).
- Modelo lipídico: linoleato de metilo ( $\geq 99\%$  de pureza) se adquirió en Sigma-Aldrich (Chile).
- Antioxidante Sintético: butilhidroxianisol (BHA) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Chile). Se adicionó a LM con un límite legal de 0,02% para propósitos comparativos.
- Estándares de polifenoles: procianidina dímero tipo B ( $\geq 90\%$  de pureza) y ácido clorogénico ( $\geq 95\%$  de pureza), se adquirieron en Sigma-Aldrich (Chile).

## **2.2. Métodos.**

### **2.2.1. Preparación de los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólicos y acuosos).**

Las hojas y cáscaras de palto, en forma independiente se escaldaron en agua a 90 °C por 3 min y se secaron a temperatura ambiente (25 °C) en oscuridad por 24 h. Posteriormente, las hojas o cáscaras secas (400 g) se molieron en un procesador de alimentos (Moulinex, España) y se tamizaron para obtener un tamaño de partícula menor a 1 mm. Las hojas o cáscaras se maceraron en 2 L de etanol/agua (50:50 v/v) (extracto hidroalcohólico) o agua (extracto acuoso) con agitación constante durante las primeras 6 h y luego por otras 66 h sin agitación, a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente los extractos se filtraron y congelaron a -20 °C.

Los extractos de palto elaborados fueron:

- Acuoso de hojas de palto (EAH)
- Hidroalcohólico de hojas de palto(EHH)
- Acuoso de cáscaras de palta (EAC)
- Hidroalcohólico de cáscaras de palta (EHC)

#### *2.2.1.1. Secado por atomización*

Los extractos (EAH, EHH, EAC y EHC) se secaron en un secador Spray-Dryer Büchi B-290 a 140 °C, utilizando Capsul® como carrier en una proporción de 5% en relación a 100 mL de extracto.

## **2.2.2. Caracterización de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de hojas y cáscaras de palto.**

### *2.2.2.1. Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT).*

El contenido de polifenoles se determinó por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y Rossi (1965). La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Unicam UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK) a 725 nm (correspondiente al máximo de absorción del ácido cafeico). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido cafeico por gramo de extracto (hojas o cáscaras) en base seca (mg Eac/g), utilizando una curva de calibración de ácido cafeico (Anexo 1).

### *2.2.2.2. Determinación de la actividad antioxidante (AA).*

La actividad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de palto se determinó a través de dos metodologías.

- *Poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP).*

Se determinó el potencial de reducción de los antioxidantes según el método descrito por Benzie y Strain (1996) como medida del poder antioxidante. Este método se basa en el poder que tiene el antioxidante para reducir el ión férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ión ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Este último ( $\text{Fe}^{+2}$ ) forma un complejo ferroso azulado con 2,4,6-tripiridil-5-triazina ( $\text{Fe}^{+2}/\text{TPTZ}$ ) (Ecuación 1).



El complejo incoloro ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) es reducido por compuestos fenólicos con potenciales redox menores a 0,7 V (potencial redox del  $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ).

La lectura se realizó a 593 nm, utilizando un espectrofotómetro (Unicam UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK). Los resultados se expresaron como mmoles de  $\text{Fe}^{+2}$  por gramo de extracto (hojas o cáscaras) en base seca ( $\text{mmol Fe}^{+2}/\text{g}$ ), utilizando una curva de calibración (Anexo 2).

- *Reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo hidratado).*

Se realizó por el método de decoloración de DPPH, este se fundamenta en el cambio de color del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo hidratado (DPPH) que varía desde un color violeta intenso a amarillo pálido, dependiendo de la concentración del antioxidante (Ecuación 2).



Se preparó una solución metanólica del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) de 20 mg/L. Se pesó 0,005 g de DPPH y se aforó en un matraz de 250 mL con metanol. Luego de 30 min se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro (Unicam UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK) (Brand-Williams et al., 1995). Se prepararon además soluciones metanólicas del compuesto a ensayar a distintas concentraciones y se aforaron con metanol hasta un volumen de 10 mL. Se mezcló y después de 30 min se leyó en un espectrofotómetro Unicam UV/Vis ATI UNICAM a 517 nm (Anexo 3).

Los valores de DPPH, se expresaron como  $\text{EC}_{50}$ , (concentración capaz de decolorar a DPPH en un 50 %) que indica la concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50 % el porcentaje de decoloración del radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995), este puede expresarse en diferentes equivalencias de acuerdo al tipo de antioxidante que se haya utilizado. El

porcentaje de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Decoloración} = 100 - \left( \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \right) \times 100$$

### *2.2.2.3. Identificación de principales polifenoles.*

Los principales compuestos fenólicos en los extractos de palto, se identificaron por cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS, de acuerdo al método descrito por Gu et al. (2003).

Los compuestos fenólicos se identificaron utilizando un sistema LC-MS. El equipo consistió en un cromatógrafo HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc CA-USA), acoplado a un espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica (ESI-IT Esquire 4000, Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del sistema HPLC se utilizó el programa ChemStation para LC 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) y para el control del espectrómetro se utilizó el programa Esquire Control 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la separación se utilizó una columna C18 Spherisorb ODS-2 (250 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm, Waters, USA). A la salida de la columna se conectó un split que dividió el flujo hacia el detector UV y al espectrómetro de masas. La detección se realizó a 280 nm. La fase móvil fue agua con ácido fórmico (34% v/v) y acetonitrilo, a un flujo de 1 mL/min.

El proceso de ionización (nebulización) de la muestra fue mediante electrospray y se realizó utilizando nitrógeno a una temperatura de 365 °C, presión de 50 psi y flujo de gas de 10 L/min. El análisis de los cromatogramas y de los espectros de masas se realizó por medio del programa Data Analysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

### **2.2.3. Estabilidad oxidativa de linoleato de metilo (LM) durante el almacenamiento con la adición de los extractos de palto.**

#### *2.2.3.1. Sistemas estudiados.*

Los extractos en polvo se adicionaron a linoleato de metilo en concentraciones de polifenoles equivalentes a 400 mg de ácido cafeico/kg aceite (400 ppm). La elección de la concentración fue de acuerdo a estudios preliminares de estabilidad oxidativa (determinados por Rancimat) donde se estudiaron concentraciones de 400 y 700 ppm y no se observaron diferencias significativas en los tiempos de inducción entre ellas.

Sistemas de linoleato de metilo (LM):

- LM control (sin la adición de extractos de hojas o cáscaras de palto): LM
- LM con extracto acuoso de hojas de palto en polvo: LM+EAH
- LM con extracto hidroalcohólico de hojas de palto en polvo: LM+EHH
- LM con extracto acuoso de cáscaras de palto en polvo: LM+EAC
- LM con extracto hidroalcohólico de cáscaras de palto en polvo: LM+EHC
- LM con 200 ppm de antioxidante sintético: LM+BHA

Los sistemas con y sin la adición de extractos de cáscaras y hojas de palto (acuoso e hidroalcohólico) en polvo o BHA, se colocaron en tubos de vidrio y se calentaron en una placa calefactora a  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  en oscuridad, con control de temperatura y agitación de 175 rpm. Se retiraron alícuotas de cada tubo cada 24 horas para determinar la formación de compuestos polares (CP) y polifenoles en el aceite. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 2.2.3.2. Determinación de compuestos polares (CP).

Esta determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Dobarganes et al. (1988) y al método oficial IUPAC (2000). Las muestras de los sistemas de LM ( $0,50 \pm 0,01$  g) se colocan en columnas de sílice activada a  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 h, luego se ajustó la humedad a un 5% (m/m) con agua destilada. La primera fracción correspondió al linoleato de metilo no alterado, la que eluyó con una mezcla de éter de petróleo: éter etílico (90:10 %v/v) (60 mL). La segunda fracción correspondió a los monómeros oxidados, dímeros y polímeros de LM alterados o compuestos polares totales la que se eluyó con éter etílico (50 mL).

$$\text{Fracción LM no alterado (\%)} = \frac{\text{Peso fracción LM no alterado (g)}}{\text{Peso muestra (g)}} \times 100$$

#### 2.2.4. Extracción de polifenoles desde los sistemas linoleato de metilo con la adición de los extractos de cáscaras y hojas de palto almacenados a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para la identificación de los polifenoles en los sistemas de LM con los extractos de palto, se realizó previamente una extracción de polifenoles utilizando en forma independiente dos metodologías. La extracción líquido- líquido (ELL) y la extracción en fase sólida (EFS).

##### 2.2.4.1. Extracción Líquido-Líquido (ELL).

Para la extracción de polifenoles de los sistemas de LM con los extractos de cáscaras y hojas de palto, se pesaron en un tubo de vidrio  $1,00 \pm 0,01$  g de LM de cada sistema y se le agregaron 5 mL de hexano. Luego se realizó una extracción con 3 mL de una solución etanol-agua (60:40 v/v) y se agitó por 2 min. Se transfirió la capa etanol-agua a un tubo de vidrio, se re-extrajo con 3 mL

de la mezcla etanol-agua (60:40 v/v). La extracción se realizó dos veces más, agitando por 3 min cada vez. Posteriormente se juntaron las extracciones y se llevaron a un rotavapor bajo vacío a 40 °C, hasta sequedad. El residuo se re-disolvió en dos porciones de 0,1 mL de etanol, se filtró usando filtros (0,45 µm, Milipore) y se almacenaron en viales a -20 °C.

#### 2.2.4.2. Extracción en Fase Sólida (EFS).

La extracción de polifenoles, se realizó de acuerdo a las metodologías descritas por Mateos *et al.*, (2001) y Alarcón *et al.*, (2012), con algunas modificaciones. Se evaluaron dos tipos de columnas de extracción: C18 y diol.

Para la extracción de polifenoles en cada sistema de LM con los extractos de cáscaras u hojas de palto, se empleó  $1,00 \pm 0,01$  g de los sistemas de LM, luego se utilizaron columnas de diol (3 mL, 500 mg, Waters) y C18 (3 mL, 500 mg, Clean-Up, UCT), estas se insertaron en un equipo de extracción bajo vacío (Manifold UCT), utilizando una bomba de vacío (Rocker 400, 1/6 hp, 220 V, 60 hz) y se acondicionaron previamente con 5 mL de metanol y luego con 5 mL de hexano. Cada columna acondicionada se cargó con los sistemas de LM y se realizó un lavado con 8 mL de hexano para remover la fracción no polar. Posteriormente, la fracción polar conteniendo los polifenoles se eluyeron con 16 mL de una mezcla metanol:agua (70:30 v/v). La fracción polar de cada muestra se recogió en matraces de vidrio de fondo cónico de 50 mL y se concentró a 35 °C en rotavapor (Buchi) bajo vacío durante 20-30 min. Seguidamente, se extrajo de cada matraz 1 mL de la solución, que fue filtrado a través de un filtro 0,45 µm (Milipore) y almacenado en oscuridad en viales a -20 °C.

### **2.2.5. Identificación de principales polifenoles.**

Se identificaron los principales polifenoles de los sistemas de LM adicionado con los extractos de cáscaras y hojas de palto mediante un equipo UHPLC (Thermo Fisher Scientific Focused 3000, Alemania) acoplado a espectrometría de masas (MS) (Thermo Fisher Scientific modelo Exactive) con columna C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,9  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, Alemania). Se utilizó como fase móvil agua con 1 % de ácido fórmico (eluyente A, 90%) y acetonitrilo (eluyente B, 10%) en régimen isocrático con un flujo de 0,2 mL/min. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L.

El análisis de espectrometría de masas se realizó en modo de ionización negativo. Los parámetros de MS fueron sheath gas: 35 unidades, gas auxiliar: 10 unidades, con rango de medida de 150 a 600 m/z (masa/carga), spray voltage de 3500 V y temperatura del capilar 320 °C.

### **2.2.6. Análisis estadístico.**

La determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos, se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar. De esta misma forma se expresaron también los resultados para la determinación de compuestos polares y polifenoles en los sistemas de LM.

Para evaluar las diferencias estadísticas entre los parámetros analizados en los extractos de palto (polifenoles totales, DPPH y FRAP) y en los sistemas de LM (compuestos polares y constante de velocidad de degradación de polifenoles), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, mediante el software Statgraphics Plus versión 7.0, con un nivel de significancia de un 95%. Cuando

los resultados mostraron diferencias significativas se aplicó el test de rangos múltiples de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Caracterización de los extractos de cáscaras y hojas de palto (acuoso e hidroalcohólico).

Para la elaboración de los extractos de cáscaras y hojas de palto, se utilizaron dos tipos de solvente, una mezcla etanol-agua (50:50v/v) (extracto hidroalcohólico) y agua (extracto acuoso), posteriormente se sometieron a un secado por atomización a 140 °C, utilizando Capsul® como carrier, dando origen así a un total de cuatro extractos en polvo (EHH, EHC, EAH, EAC). La figura 8 muestra las imágenes de los extractos de palto en polvo.



**Figura 8.** Extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscaras y hojas de palto en polvo.

La caracterización de extractos de cáscaras y hojas de palto (acuoso e hidroalcohólico) se realizó antes y después del secado por atomización, de acuerdo al contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante. La determinación de los principales polifenoles se realizó en los extractos después del secado.

### 3.1.1. Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) de los extractos de cáscaras y hojas de palto.

La tabla 4 presenta el CPT de los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso), antes y después del secado por atomización. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido cafeico (Eac) por gramo de extracto en base seca de hoja o cáscara (mg de Eac/ g extracto en base seca de hoja o cáscara).

**Tabla 4.** Contenido de polifenoles totales de extractos de cáscaras y hojas de palto, antes y después del secado por atomización.

Extracto	Contenido de Polifenoles	
	(mg Eac/g extracto en base seca de hoja o cáscara)	
	Antes del secado por atomización	Después del secado por atomización
EHC	77,6 ± 5,1 <sup>b</sup>	166,2 ± 4,6 <sup>d</sup>
EAC	53,7 ± 4,1 <sup>a</sup>	89,2 ± 0,7 <sup>b</sup>
EHH	51,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	134,0 ± 1,1 <sup>c</sup>
EAH	47,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	67,8 ± 2,5 <sup>a</sup>

Valores correspondientes al promedio y desviación estándar (n=3). Superíndices diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre tipos de extractos, según análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de rangos múltiples de Tukey. Los valores fueron expresados en base seca (b.s.), humedad final para cáscara y hojas de 8% y para polvos obtenidos por secado por atomización de 4%. Eac: equivalentes a ácido cafeico; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscaras; EAC: extracto acuoso de cáscaras; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas; EAH: extracto acuoso de hojas.

Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el CPT, de acuerdo a la aplicación del proceso de secado, al tipo de subproducto de palto (hoja o cáscara) y solvente utilizado para la extracción.

Los extractos en polvo tuvieron un mayor contenido de polifenoles en comparación a los extractos líquidos (antes del secado). El EHC, fue el extracto con el mayor contenido de polifenoles totales antes (77,6 mg Eac/ g extracto de cáscara) y después (166,2 mg Eac/ g extracto de cáscara) del secado por atomización. El CPT se determinó por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu, proporcional al número de grupos hidroxilos asociados a la estructura de polifenoles.

El aumento en el CPT en los extractos en polvo, se debería a la alta temperatura utilizada durante el proceso de secado (140 °C). Los polifenoles condensados y/o conjugados se hidrolizan a altas temperaturas dando origen a monómeros tales como epicatequinas y catequinas, aumentando el número de grupos hidroxilos que reaccionaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Lim *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2006; Harbourne, 2008).

En relación al tipo de subproducto de palto (hoja o cáscara), al observar la tabla 4, el CPT varió en un rango entre 47,6 a 77,6 mg Eac/g extracto hoja o cáscara en base seca, para los extractos antes del secado por atomización, mientras que para los extractos después del secado, se obtuvo un rango entre 67,8 a 166,2 mg Eac/g extracto de hoja o cáscara en base seca. Se ha reportado que los subproductos de palto tiene una gran cantidad de polifenoles extraíbles, que pueden ser cuantificados a través de este análisis y que además tienen la capacidad de prevenir la oxidación en diferentes matrices alimentarias (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Logaraj *et al.*, 2008; Soong

y Barlow, 2004). Además se ha encontrado que los extractos de cáscaras tienen una gran cantidad de compuestos fenólicos asociado a una mayor capacidad antioxidante, contribuyendo con el 38% de la actividad antioxidante del palto (Wang *et al.*, 2010).

Sin embargo, la comparación en el contenido total de polifenoles en palto no es simple, puesto que los resultados varían de acuerdo a la especie, variedad, localidad geográfica, estacionalidad, época de poda, época de recolección de las hojas, estados de madurez del fruto y de la conservación de los subproductos, metodología de obtención de los extractos y tipo de solvente utilizado (Aladedunye, 2014; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Corral-Aguayo *et al.*, 2008). Además de la variabilidad en la expresión de los resultados en ambos subproductos, como el tipo de polifenol utilizado para expresar los resultados y base de expresión (fresca o seca). Wang *et al.* (2010) reportaron CPT entre 19,2 a 51,6 mg EAG/g extracto en cáscaras frescas de ocho variedades de palto en tres localidades distintas. Rodríguez-Carpena *et al.*, (2011) reportó un CPT de 8.997 mg EAG/100 g bs en cáscaras de palto, de una sola variedad. Con respecto a las hojas de palto se reportó un CPT en un rango entre 1.750 y 1.930 mg EAG/100 g de materia seca en hojas jóvenes y maduras de una sola la variedad (Torres *et al.*, 1987).

Con respecto al tipo de solvente utilizado, el CPT fue significativamente mayor para la mezcla etanol-agua (50/50 v/v) respecto al agua, estos resultados podrían atribuirse a la polaridad del disolvente utilizado (constante dieléctrica) (Naczki y Shahidi., 2006) y a la afinidad de los compuestos fenólicos presentes en los extractos. Se ha encontrado que el uso de diferentes proporciones de etanol en agua en extractos de salvia, permiten separar mejor la fracción fenólica, debido a la afinidad de los polifenoles con el solvente orgánico etanol (Durling *et al.*, 2007). La influencia del solvente en la extracción de compuestos

bioactivos es muy importante, puesto que a partir del tipo y mezcla de solventes utilizados se aumenta considerablemente la recuperación de compuestos fenólicos (Oroian y Escriche, 2015). Se debe considerar, que la optimización de un procedimiento de extracción de compuestos bioactivos en extractos vegetales es compleja, debido a que estos contienen una mezcla de diferentes clases de compuestos fenólicos, por lo que la extracción de polifenoles dependerá de la afinidad y solubilidad de éstos en el solvente de extracción como también de la temperatura utilizada y método de extracción (Ignat *et al.*, 2011; Naczk y Shahidi, 2006).

### *3.1.2. Determinación de la actividad antioxidante (AA) de los extractos de cáscaras y hojas de palto.*

La actividad antioxidante de los extractos de palto se determinó por los métodos espectrofotométricos FRAP y DPPH. Los valores de DPPH, se expresaron como EC<sub>50</sub> (concentración del extracto capaz de decolorar la concentración inicial de DPPH en un 50%).

La tabla 5 presenta los valores obtenidos para FRAP y DPPH (EC<sub>50</sub>) de los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso), antes y después del secado por atomización.

**Tabla 5.** Actividad antioxidante (FRAP y DPPH) de extractos de cáscaras y hojas de palto, antes y después del secado por atomización.

Extracto	FRAP (mmol Fe <sup>+2</sup> / g extracto en base seca )		DPPH (EC <sub>50</sub> ) (mg extracto en base seca/ mL solución)	
	Antes del secado por atomización	Después del secado por atomización	Antes del secado por atomización	Después del secado por atomización
EHC	0,57 ± 0,005 <sup>d</sup>	1,33 ± 0,022 <sup>c</sup>	0,048 ± 0,0002 <sup>a</sup>	0,043 ± 0,0005 <sup>a</sup>
EAC	0,17 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,013 <sup>b</sup>	0,061 ± 0,0004 <sup>c</sup>	0,052 ± 0,0056 <sup>b</sup>
EHH	0,22 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,096 <sup>b</sup>	0,055 ± 0,0004 <sup>b</sup>	0,063 ± 0,0004 <sup>c</sup>
EAH	0,25 ± 0,002 <sup>c</sup>	0,45 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,106 ± 0,0007 <sup>d</sup>	0,075 ± 0,0002 <sup>d</sup>

Valores correspondientes al promedio y desviación estándar (n=3). Superíndices diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p≤0,05) según análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de rangos múltiples de Tukey. Eac: equivalente a ácido cafeico; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscaras; EAC: extracto acuoso de cáscaras; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas; EAH: extracto acuoso de hojas.

Los resultados de la tabla 5 muestran diferencias significativas (p≤0,05) en AA, de acuerdo al tipo de subproducto de palto (hojas o cáscara) y al método de medición utilizado (FRAP y DPPH).

Los resultados de FRAP en la tabla 5, indicaron diferencias significativas entre los extractos antes y después del secado. El poder antioxidante-reductor del ión férrico entre los extractos antes del secado varió de 0,17 a 0,57 mmol Fe<sup>+2</sup>/g de extracto, mientras que para los extractos en polvo varió de 0,45 a 1,33 mmol Fe<sup>+2</sup>/ g de extracto. En relación a los resultados por DPPH, también se indicaron diferencias significativas entre extractos, mostrando para los extractos antes del secado una variación de 0,048 a 0,106 mg/mL (EC<sub>50</sub>) y para los extractos después del secado una variación de 0,043 a 0,075 mg/mL (EC<sub>50</sub>).

La mayor actividad antioxidante según análisis FRAP fue para los extractos hidroalcohólicos; EHC en polvo (1,33 mmol Fe<sup>+2</sup>/ g de extracto) y EHH en polvo (0,83 mmol Fe<sup>+2</sup>/ g de extracto). Mientras que por análisis DPPH la mayor

actividad antioxidante, la presentaron los extractos de cáscara de palto; extracto hidroalcohólico EHC en polvo (0,043 mg/mL) y extracto acuoso EAC en polvo (0,052 mg/mL). Las dos metodologías se basan en la transferencia de un electrón, pero miden la AA en diferentes solventes, lo que puede explicar las diferencias entre FRAP y DPPH. El análisis DPPH se basa en la reacción entre el antioxidante y los radicales DPPH• en solución, reduciendo un número de moléculas DPPH• equivalentes al número de grupos hidroxilos que tengan disponibles los antioxidantes. Este radical DPPH• se considera un modelo de radical lipofílico estable, que al ser disuelto en solvente orgánico ofrece mayor afinidad para antioxidantes hidrofóbicos que para los antioxidantes hidrofílicos. En contraste con el análisis FRAP en que este mide mayormente el poder reductor o capacidad reductora de los antioxidantes que son más hidrofílicos (Nawirska-Olszanska y Biesiada, 2013; Çelik *et al.*, 2010). En este contexto, generalmente se sugiere seleccionar más de un método para la determinación de AA (Conde *et al.*, 2013; Nawirska-Olszanska y Biesiada, 2013).

Se debe tener en cuenta, que en ambos métodos, los resultados de FRAP y DPPH indicaron al EHC como aquel extracto con la mayor AA (antes y después del secado por atomización) y que además presenta el mayor CPT. Esto sugeriría que los extractos de cáscara dado a una mayor AA serían más eficaces en inhibir la oxidación lipídica. Se han observado resultados similares en otros estudios que demuestran que las cáscaras de palto de diferentes variedades tienen un mayor contenido de polifenoles y una mayor actividad antioxidante (Kosinska *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). En la literatura, los valores de AA para extractos de hojas son escasos. Oboh *et al.* (2013) reportaron valores de 29,52 mg Equivalente ácido ascórbico/g hoja fresca, utilizando como solvente de extracción HCl/metanol (1:1 v/v).

En relación al proceso de secado por atomización, se observó un aumento significativo en la AA de todos los extractos después del secado, excepto para EHH evaluado por DPPH. El aumento de la AA de los extractos en polvo, se puede explicar por el aumento en el CPT, específicamente por los grupos hidroxilos capaces de donar electrones frente al reactivo de FRAP y DPPH, mostrando que la actividad antioxidante depende del contenido de polifenoles y de las características estructurales de los polifenoles (Balasundram *et al.*, 2006).

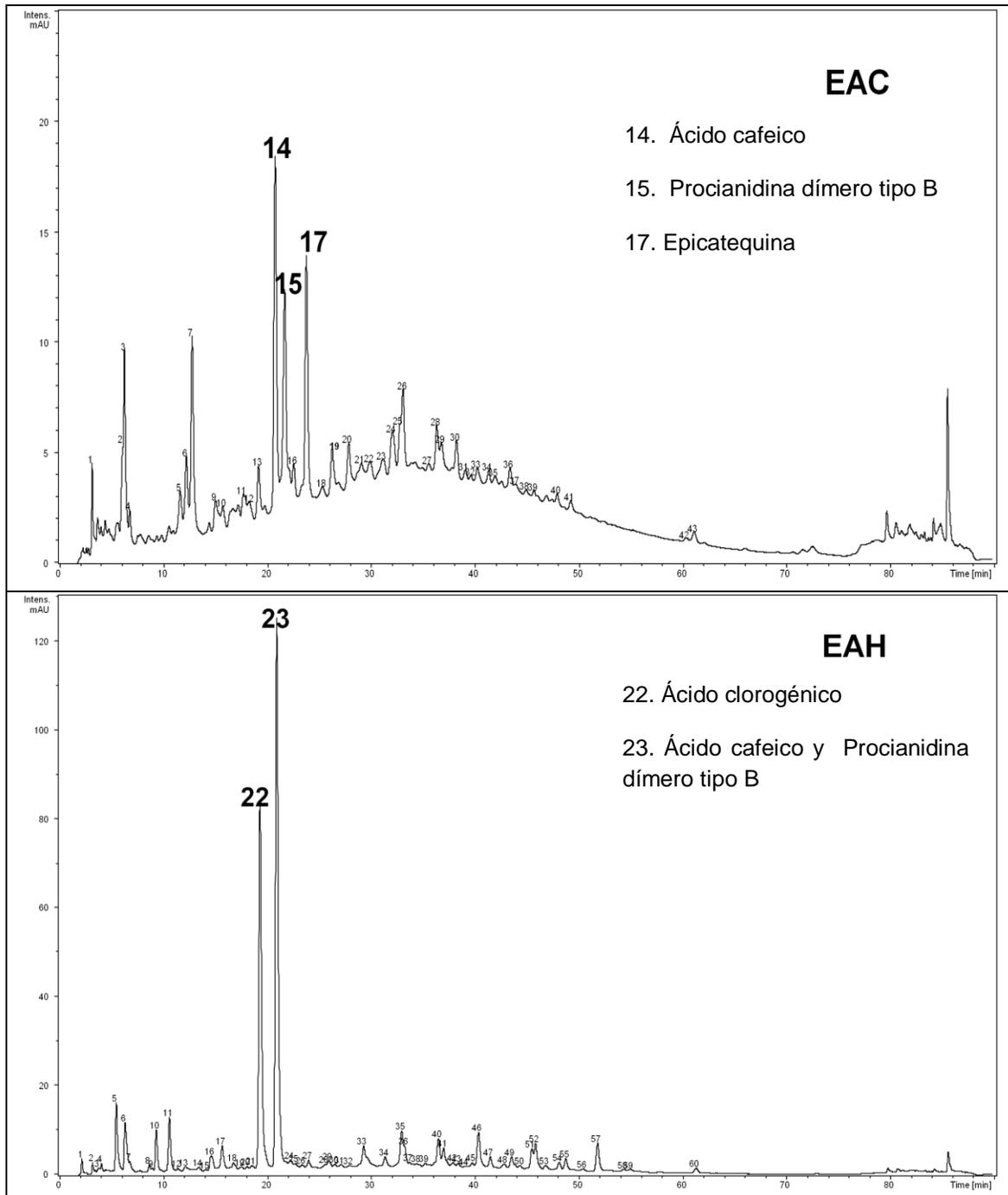
### *3.1.3. Identificación de los principales compuestos fenólicos en extractos de cáscaras y hojas de palto.*

Para la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo, se realizó la identificación de los principales peaks en los cuatros extractos en polvo obtenidos (EHC, EHH, EAC y EAH). Para cada uno de los peaks cromatográficos observados, se obtuvieron sus espectros de masas y las señales masa/carga ( $m/z$ ) de sus iones, en modo de ionización positivo y negativo (Anexo 4).

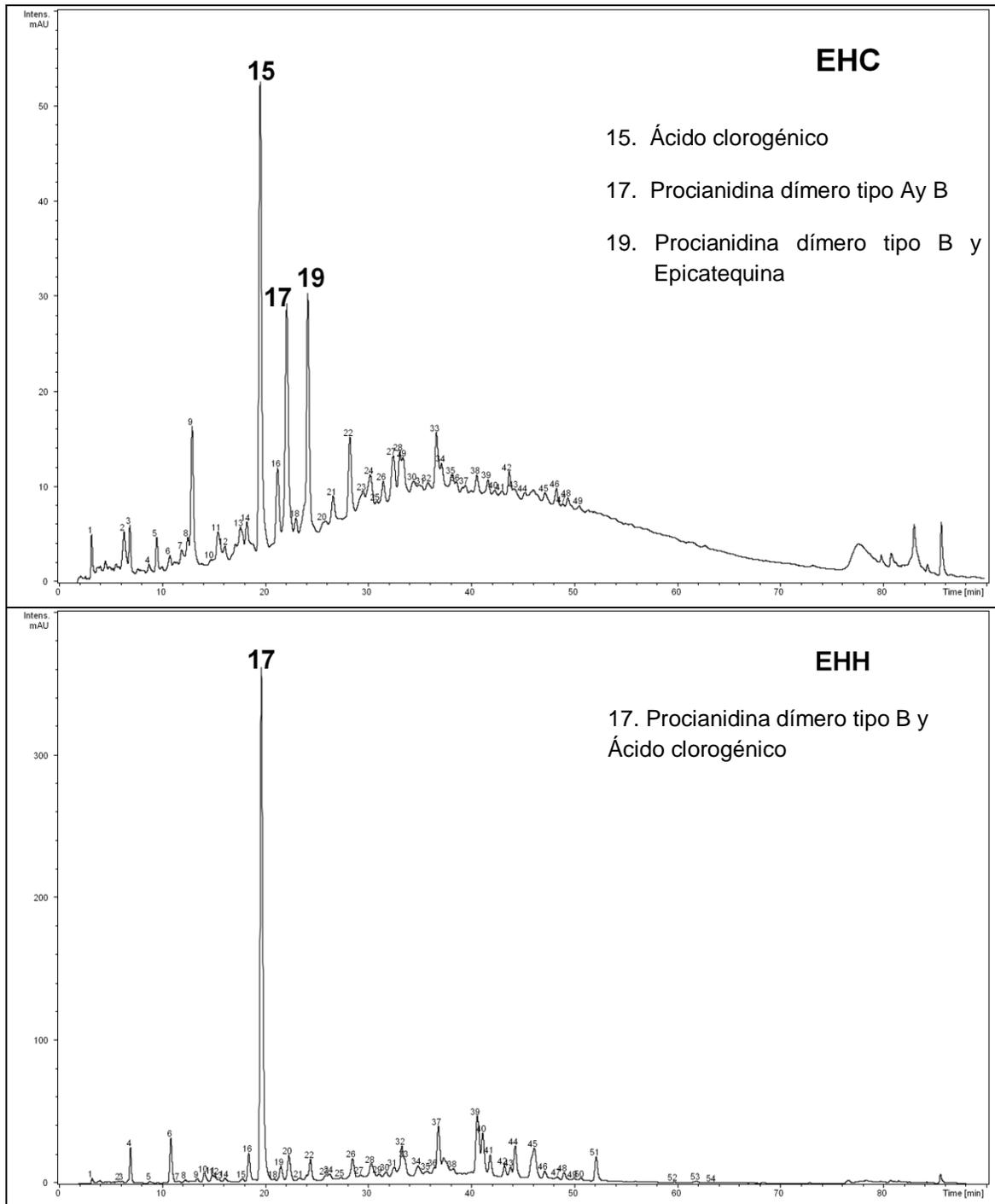
La figura 9 y figura 10, muestran los cromatograma HPLC-MS de los extractos de hoja y cáscaras de palto (hidroalcohólico y acuosos) en polvo. Cabe señalar, que algunos peaks presentan más de un compuesto, esto se debe a que en matrices complejas como los extractos vegetales, existe la posibilidad de una co-elución simultánea de compuestos distintos por las mínimas diferencias en los tiempos de retención.

Los principales compuestos fenólicos identificados en hojas de palto, correspondieron a ácido clorogénico ( $t_R$  18,8 a 19,7 min), procianidina dimérica tipo A y B ( $t_R$  21,1 a 22,4 min) y epicatequina ( $t_R$  17,7 a 24,4 min) (figura 9 y 10).

Resultados similares se obtuvieron en la identificación de compuestos fenólicos en cáscaras de palta, los cuales fueron principalmente procianidinas incluyendo tipo A y B. Este resultado coincide con la mayor actividad antioxidante en el EHC (Tabla 5), la cual se puede atribuir a la presencia de procianidinas (Wang *et al.*, 2010), principal componente del EHC y al mayor contenido de polifenoles. Chávez *et al.* (2011) y Teresawa *et al.* (2006), reportaron que los extractos de cáscara de palta poseen un alto contenido de catequina y epicatequina, siendo los precursores necesarios para formar específicamente procianidinas, compuestos que aumentan la AA de estos extractos.



**Figura 9.** Cromatogramas de los principales polifenoles identificados por HPLC-MS, en extractos acuosos de cáscaras y hojas de palto, secados por atomización.



**Figura 10.** Cromatogramas de los principales polifenoles identificados por HPLC-MS, en extractos hidroalcohólicos de cáscaras y hojas de palto, en polvo, secados por atomización.

### **3.2. Efecto de los extractos de cáscaras y hojas de palto (en polvo) en la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo en condiciones aceleradas de oxidación.**

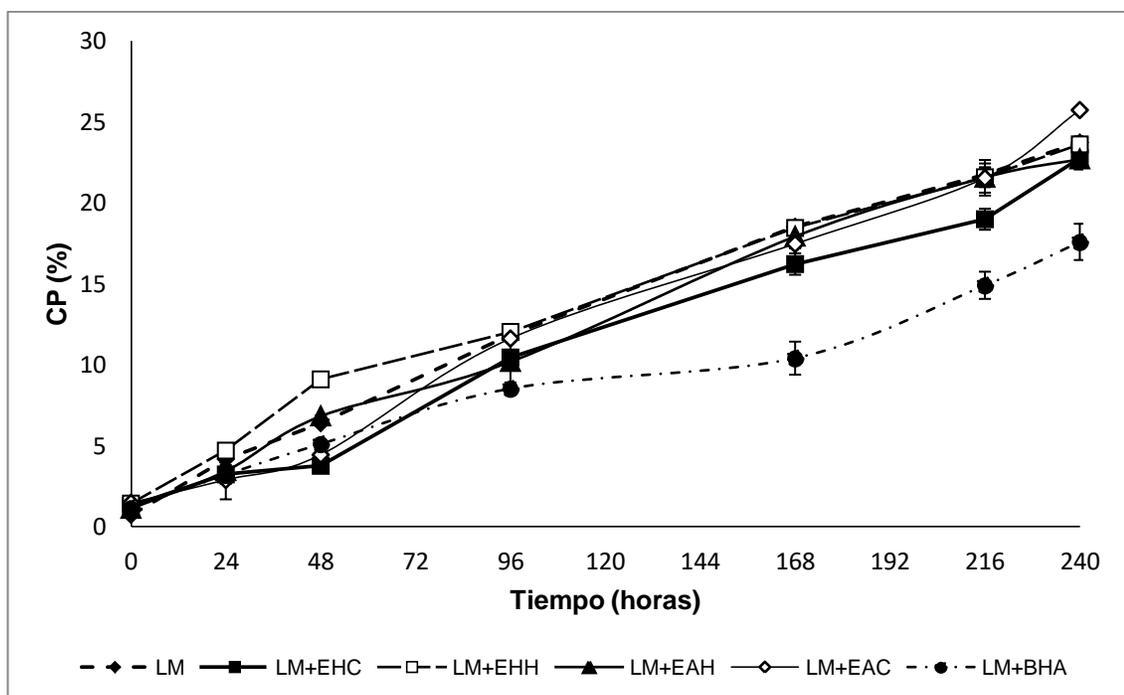
Los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo, se adicionaron a linoleato de metilo (equivalente a 400 ppm de polifenoles) para estudiar el efecto de éstos en la estabilidad oxidativa de linoleato de metilo, a través de la formación de compuestos polares (CP) durante el almacenamiento en placa calefactora a 80 °C. Para efectos comparativos, además se adicionó un antioxidante sintético BHA (200 ppm).

Se consideró un total de seis sistemas LM; LM+EHC; LM+EHH; LM+EAH; LM+EAC y LM+BHA. Los resultados de la evolución de compuestos polares en linoleato de metilo, con y sin la adición de los extractos de palto en polvo, se presentan en la Tabla 6 y figura 11.

**Tabla 6.** Evolución del contenido de compuestos polares (%) a 80 °C, en los sistemas linoleato de metilo control y en los sistemas de linoleato de metilo con la adición de extractos de palto (equivalente a 400 ppm de polifenoles) en polvo.

Muestra/Tiempo (horas)	CP (%)						
	0	24	48	96	168	216	240
LM	0,74 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,60 <sup>a</sup>	6,40 ± 0,04 <sup>a</sup>	11,85 ± 0,17 <sup>a</sup>	18,54 ± 0,12 <sup>a</sup>	21,75 ± 0,44 <sup>a</sup>	23,74 ± 0,38 <sup>a</sup>
LM+EHC	1,30 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,24 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,35 <sup>b</sup>	10,46 ± 2,00 <sup>a</sup>	16,23 ± 0,66 <sup>a</sup>	19,00 ± 0,65 <sup>b</sup>	22,77 ± 0,13 <sup>a</sup>
LM+EHH	1,30 ± 0,15 <sup>b</sup>	4,71 ± 0,12 <sup>a</sup>	9,11 ± 0,23 <sup>d</sup>	12,04 ± 0,16 <sup>a</sup>	18,46 ± 0,18 <sup>a</sup>	21,59 ± 0,61 <sup>a</sup>	23,62 ± 0,42 <sup>a</sup>
LM+EAH	1,30 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,44 ± 0,26 <sup>a</sup>	6,82 ± 0,05 <sup>a</sup>	10,18 ± 0,44 <sup>a</sup>	17,92 ± 0,66 <sup>a</sup>	21,56 ± 1,10 <sup>a</sup>	22,69 ± 0,62 <sup>a</sup>
LM+EAC	1,30 ± 0,10 <sup>b</sup>	2,90 ± 1,20 <sup>a</sup>	4,45 ± 0,27 <sup>bc</sup>	11,63 ± 0,69 <sup>a</sup>	17,47 ± 0,27 <sup>a</sup>	21,54 ± 0,90 <sup>a</sup>	25,74 ± 0,18 <sup>b</sup>
LM+BHA	1,20 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,22 ± 0,15 <sup>a</sup>	5,12 ± 0,21 <sup>c</sup>	8,54 ± 0,38 <sup>a</sup>	10,42 ± 1,02 <sup>b</sup>	14,92 ± 0,84 <sup>c</sup>	17,60 ± 1,12 <sup>c</sup>

Valores correspondientes al Promedio y Desviación estándar (n=3). Superíndices diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido de CP con respecto al tipo de extracto según análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de rangos múltiples de Tukey. CP: compuestos polares (%); LM: linoleato de metilo; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscaras; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas; EAH: extracto acuoso de hojas; EAC: extracto acuoso de cáscaras; BHA: hidroxibutilanisol.



**Figura 11.** Evolución de compuestos polares para los sistemas de LM y LM con la adición de EHC, EHH, EAH, EAC o BHA, almacenados a 80 °C.

Al observar la tabla 6 y figura 11, los resultados indicaron un aumento en la formación de compuestos polares (CP) a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento en todos los sistemas estudiados. Sólo el sistema LM+EAC, a las 240 horas (10 días) superó el valor máximo permitido de CP, de 25% por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (RSA, 1996).

La adición de los extractos de cáscaras y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo a linoleato de metilo (LM), no mostraron un efecto estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) en disminuir la formación de compuestos polares, cuando estos se compararon con la evolución de CP en LM (control). Por lo tanto la adición de los diferentes extractos de hojas o cáscaras de palto (hidroalcohólico y acuoso) no tienen un efecto protector significativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre la oxidación de LM en estas condiciones experimentales. Sin embargo, se

observó a las 48 horas (dos días) de almacenamiento, diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los extractos, en la formación de compuestos polares, indicando al EHC como aquel extracto con mayor efecto protector frente a la oxidación de linoleato de metilo, obteniendo una menor formación de CP (3,77%) respecto a lo observado en LM control (6,40%). El efecto protector del EHC, se puede atribuir al mayor contenido de polifenoles (CPT) y a la mayor actividad antioxidante (AA) determinada por FRAP y DPPH. Esto coincide además, con lo expresado por Brewer (2011), indicando que la AA está estrechamente relacionada con el contenido y tipo de polifenoles. Según lo reportado por Barrera-Arellano *et al.*, (2002), en un estudio de oxidación incluso a 180 °C, la formación de compuestos polares en una matriz lipídica resultó ser más influenciada por el contenido y tipo de antioxidante natural adicionado, más que por el grado de insaturación de la matriz modelo.

El LM es un modelo de aceites, como el aceite de girasol, donde el ácido linoleico es el principal ácido graso (99,8%). Se han encontrado resultados similares en ensayos realizados a 80 °C y a 180 °C hasta las 192 horas y 48 horas de almacenamiento respectivamente en aceite de girasol, adicionando el mismo tipo de extracto de palto (EHC), a la misma concentración de polifenoles (400 ppm) (Jiménez *et al.*, datos no publicados).

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el efecto de la adición de los extractos de palto (hidroalcohólico y acuoso) y la adición de BHA con respecto a la formación de CP en linoleato de metilo. El sistema LM+BHA presentó una menor formación de CP, mostrando el BHA una mayor AA a partir de las 96 horas de almacenamiento. Esto se atribuye a que la AA varía de acuerdo al tipo, estructura química y tamaño de las moléculas antioxidantes, concentración óptima y distribución de los antioxidantes en la interfase aire-aceite, mecanismo antioxidante, solubilidad, matriz lipídica,

temperatura e interacciones con otros componentes presente en los extractos vegetales que podrían contribuir a la auto-oxidación de LM (Aladedunye, 2014; Brewer, 2011; Balasundram *et al.*, 2006).

De acuerdo a la literatura, se puede considerar como opción viable, el uso de mezclas de antioxidantes con acción sinergista, que regeneran el radical antioxidante aumentando su eficacia. Esto se ha demostrado en diversos estudios, que presentan un aumento significativo en la estabilidad oxidativa de aceites, como por ejemplo el sinergismo entre tocoferol y ácido ascórbico en aceites marinos (Han *et al.*, 1991), o mezclas de antioxidantes sintéticos a muy baja proporción con antioxidantes provenientes de extractos naturales que logran potenciar la actividad antioxidante de ambos, como se ha comprobado en extractos de romero y BHT a una relación de 75:25 (p:p) en aceite de soja, generando un mayor efecto protector juntos respecto a su forma individual. Además, se podría recomendar la mezcla de extractos de palto con otros extractos naturales como el extracto de trigo (*Triticum aestivum*) que ha demostrado tener actividad antioxidante en aceite, a temperaturas entre 60°C y 100°C (Balasundram *et al.*, 2006).

### **3.3. Evolución de polifenoles en los sistemas de LM con extractos de cáscaras y hojas de palto almacenados a 80 °C.**

Una vez que los sistemas de LM con los extractos de palto (LM+EHC; LM+EHH; LM+EAC y LM+EAH) se sometieron a un almacenamiento a 80 °C, se realizó la extracción de polifenoles.

### *3.3.1. Selección de la metodología para la extracción de polifenoles.*

Las metodologías de extracción de polifenoles utilizadas fueron la extracción líquido-líquido (ELL) y extracción en fase sólida (EFS), ambas se aplicaron de forma independiente en los sistemas de LM con los extractos de hojas y cáscaras de palto. Posteriormente se seleccionó el procedimiento con una mayor recuperación y selectividad para la extracción de polifenoles en los sistemas ensayados.

En ambos casos, se realizó una curva de calibración con dos estándares de polifenoles empleando cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS). Los estándares utilizados fueron ácido clorogénico (AC) y procianidina dímero (PD). La elección de los estándares se debe a que estos compuestos fueron los más representativos en la caracterización de los extractos de palto (hidroalcohólicos y acuosos) en polvo.

#### *3.3.1.1. Extracción líquido-líquido (ELL) de polifenoles.*

En la tabla 7, se muestra la cuantificación de AC y PD para la ELL en los sistemas de linoleato de metilo (LM) con la adición de los extractos de palto hasta las 96 horas de almacenamiento a 80 °C.

**Tabla 7.** Cuantificación de ácido clorogénico y procianidina dímero en linoleato de metilo con los extractos de palto (hojas y cáscaras) a 80 °C aplicando ELL.

Sistema	Tiempo de almacenamiento (horas)	Ácido clorogénico (ppm)	Procianidina dímero (ppm)
LM+EHC	0	11,61 ± 0,13	50,50 ± 0,07
	24	ND	1,15 ± 0,02
	48	ND	1,52 ± 0,01
	96	ND	0,87 ± 0,06
LM+EHH	0	26,52 ± 0,04	6,68 ± 0,01
	24	2,65 ± 0,07	ND
	48	7,03 ± 0,03	1,09 ± 0,01
	96	ND	ND
LM+EAC	0	ND	4,5 ± 0,07
	24	ND	2,49 ± 0,01
	48	ND	2,02 ± 0,01
	96	ND	2,79 ± 0,15
LM+EAH	0	14,07 ± 0,04	3,76 ± 0,01
	24	2,42 ± 0,02	0,43 ± 0,01
	48	3,46 ± 0,06	0,63 ± 0,05
	96	2,96 ± 0,06	0,29 ± 0,01

Valores correspondientes al promedio y desviación estándar (n=2). LM: linoleato de metilo; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscaras; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas; EAC: extracto acuoso de cáscaras; EAH: extracto acuoso de hojas. ND: no detectado.

En la tabla 7, se puede observar que el método de ELL fue más eficaz en la extracción de PD que de AC para todos los sistemas con excepción del sistema LM+EAH. El rango de cuantificación para PD estuvo entre 0,29 ppm y 50,50 ppm mientras que para AC estuvo entre 2,42 ppm y 26,52 ppm.

Sin embargo, se observó una baja eficiencia en la extracción de ambos compuestos fenólicos al emplear la extracción ELL, además la presencia de AC

y PD no fue detectada de forma proporcional al tiempo de calentamiento, es decir, a mayor tiempo de calentamiento, se esperaba una menor cantidad de analito. Esto indicó, que el método ELL no es adecuado para extraer compuestos fenólicos a partir de la matriz lipídica ensayada en este trabajo. Este resultado se debería a la baja selectividad del propio método para la extracción de los compuestos fenólicos. La reducida eficiencia del proceso (ELL) puede ser explicada en base a lo reportado por Mateos et al., (2001), que señala que la separación del aceite, involucra una limpieza reiterada del extracto que contiene los compuestos fenólicos, afectando la extracción y recuperación de la fracción fenólica por los múltiples lavados realizados (Alarcón et al., 2012; Mateos et al., 2010).

Debido a los pobres resultados de la ELL, se ensayó el método de extracción en fase sólida (EFS), ya que se esperaba de este método una mayor selectividad y recuperación para los dos compuestos fenólicos que fueron identificados en los sistemas de LM con los extractos de palto, almacenados a 80 °C. En la literatura se ha descrito que este método es más eficiente que la ELL en el análisis de compuestos fenólicos, además de la posibilidad de elección entre una gran variedad de cartuchos con diferentes fases estacionarias en función de la naturaleza de los analitos que se pretenden extraer (Alarcón et al., 2012).

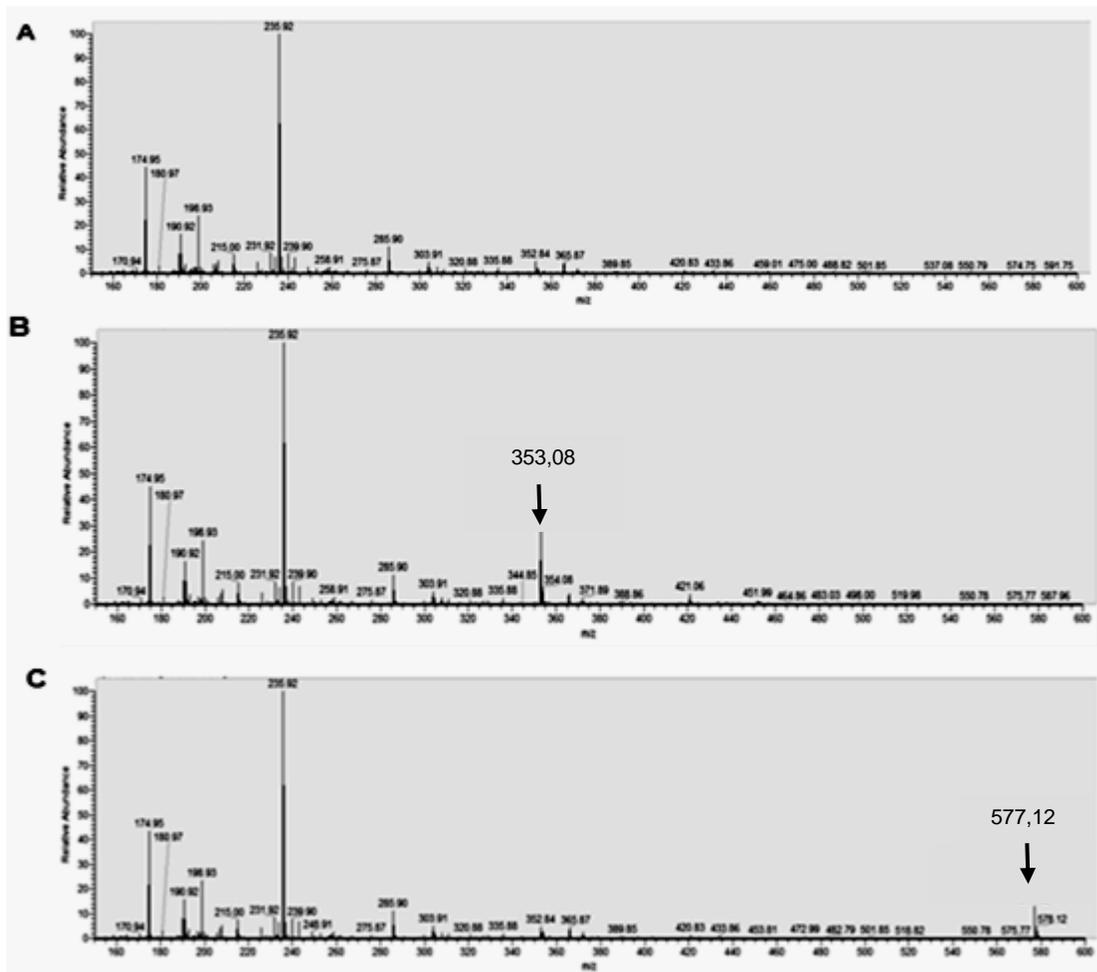
#### *3.3.1.2. Extracción en Fase Sólida (EFS) de polifenoles.*

En el método EFS, se determinó la reproducibilidad y recuperación de dos estándares AC y PD. Esta estimación permite asegurar que las recuperaciones obtenidas de los estándares fenólicos sean posteriormente reproducibles en los sistemas reales. Se realizaron ensayos de recuperación en distintos días y se

expresó la reproducibilidad como la desviación estándar de las diferentes determinaciones.

En primer lugar, se realizó una curva de calibración para cada estándar en el rango entre 0,2 y 2 ppm, correlacionando el área bajo la curva de la señal correspondiente al analito con las concentraciones del estándar. En ambos casos el coeficiente de correlación fue de 0,999. Se utilizaron blancos de linoleato de metilo, que se fortificaron con los estándares de AC y PD a dos concentraciones diferentes (0,5 y 2 ppm). La selección de las concentraciones se estableció cercana al límite de cuantificación del equipo (0,5 ppm) para esos compuestos y la otra concentración 4 veces mayor (2 ppm). La fiabilidad del método se estudió a través de la recuperación (%) obtenida en cada blanco fortificado.

La identificación de AC y PD se llevó a cabo por UHPLC-MS a través del reconocimiento de los tiempos de retención característicos de los dos estándares y la señal de masa/carga ( $m/z$ ) de sus iones en modo de ionización negativo. En la figura 12, se observan las señales correspondientes a la fase móvil del sistema cromatográfico en ausencia de estándares (Figura 12 A), la señal del AC a 353,08 ( $m/z$ ) (Figura 12 B) y señal de la PD a 577,12 ( $m/z$ ) (Figura 12 C), obtenidas por UHPLC-MS.



**Figura 12.** Cromatogramas de las señales (m/z) identificadas por UHPLC-MS. (A) señales correspondientes a la fase móvil del sistema cromatográfico en ausencia de estándares. (B) aparición de la señal correspondiente al ácido clorogénico y (C) aparición de la señal correspondiente a procianidina dímero, detectadas en linoleato de metilo.

Finalmente, los blancos fortificados se procesaron por EFS en dos tipos de cartuchos, los cuales se diferencian en la composición de la fase estacionaria (C18 o diol). La tabla 8 muestra la fiabilidad del método mediante la recuperación obtenida para AC y PD a las dos concentraciones ensayadas, utilizando los dos tipos de cartuchos.

**Tabla 8.** Estimación de la recuperación de ácido clorogénico y procianidina dímero tras la aplicación de EFS con cartuchos C18 y diol.

Cartucho	Analito	Nivel de fortificación 0,5 ppm		Nivel de fortificación 2 ppm	
		R (%)	Reproducibilidad (DE)	R (%)	Reproducibilidad (DE)
EFS-C18	Ácido clorogénico	-	-	38,0	27,7
	Procianidina dímero	-	-	36,0	29,4
EFS-diol	Ácido clorogénico	90,3	0,2	74,1	0,6
	Procianidina dímero	79,6	1,4	86,1	4,2

R: Recuperación; DE: Desviación estándar.

La recuperación de los compuestos fenólicos a las dos concentraciones definidas utilizando cartuchos C18, mostró que a 0,5 ppm no se detectó ninguno de los dos analitos estudiados, mientras que a 2 ppm se obtuvieron recuperaciones de 38,0 % (AC) y 36,0 % (PD).

Por otra parte, se muestran las recuperaciones de los compuestos fenólicos a las dos concentraciones definidas, utilizando cartuchos diol, indicando que a 0,5 ppm las recuperaciones fueron 90,3 % (AC) y 79,6 % (PD), mientras que a 2 ppm se obtuvieron recuperaciones de 74,1 % (AC) y 86,1 % (PD). Por lo tanto, el uso de cartucho diol fue más eficiente al ofrecer mayores recuperaciones para los dos analitos en ambos niveles de concentración.

De acuerdo con los resultados para las recuperaciones de AC y PD, se estableció el empleo de la fase estacionaria diol para la extracción de compuestos fenólicos de los sistemas de LM con extractos de palto almacenados a 80 °C, ya que como se observó en la tabla 8, no sólo se obtuvieron recuperaciones sobre el 70 % para ambos estándares (AC y PD), sino que además se indicó que la reproducibilidad de los valores de recuperación (precisión entre días) fue menor a 4,2 % al usar cartuchos diol, esto da cuenta de una baja dispersión de los datos en el tiempo, determinando

una mayor precisión y estabilidad al usar la fase estacionaria diol en comparación con la fase C18.

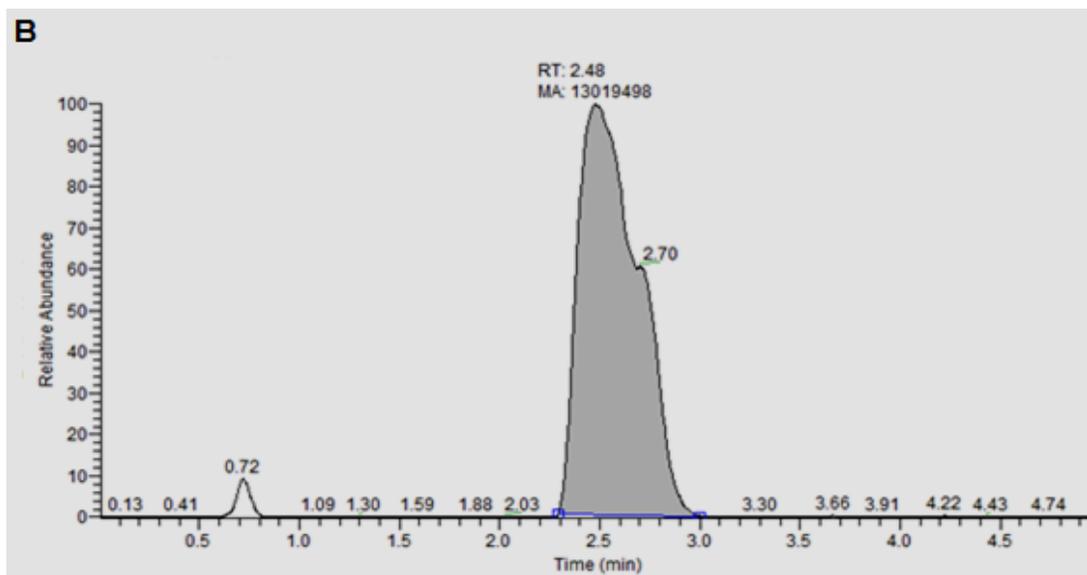
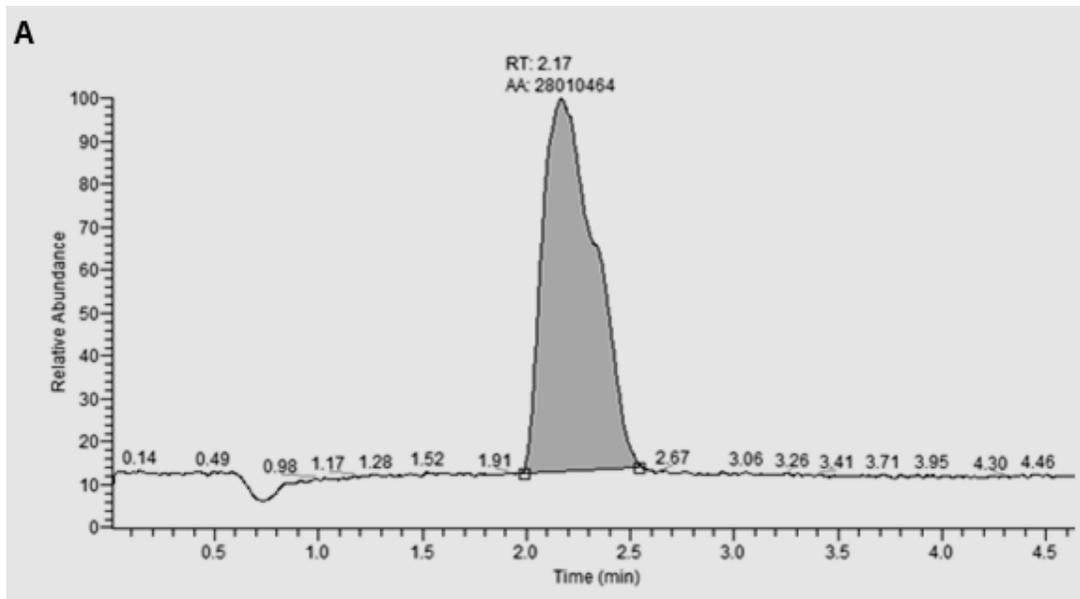
Las diferencias observadas en las recuperaciones de compuestos fenólicos entre los cartuchos utilizados, se puede atribuir a la mayor interacción existente entre los polifenoles presentes en los extractos y la fase estacionaria. La presencia de grupos hidroxilo en los cartuchos diol, aumentan la afinidad entre la fase estacionaria diol y los polifenoles debido a la formación de puentes de hidrógeno. Con respecto a los cartuchos C18, se ha reportado que las recuperaciones obtenidas son reducidas, debido a una extracción incompleta de los compuestos fenólicos (Mateos et al., 2001).

La importancia de la selección del cartucho, radica en comprobar que el procedimiento EFS-diol, es fiable para el cálculo de las concentraciones de polifenoles en muestras reales, al suponer un comportamiento análogo a los blancos fortificados.

#### **3.4. Aplicación de la metodología EFS en sistemas de LM con la adición de los extractos de palto, almacenados a 80 °C.**

Se seleccionaron los cartuchos de fase estacionaria diol para la extracción de compuestos fenólicos en los sistemas de LM con los extractos de palto almacenados a 80 °C. El método EFS-Diol se aplicó en los cuatro sistemas LM+EHC; LM+EHH; LM+EAC y LM+EAH hasta las 216 horas (9 días) de almacenamiento a 80 °C. Las concentraciones obtenidas de AC y PD en cada uno de los sistemas, se cuantificaron por UHPLC-MS bajo las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para los blancos fortificados.

En la figura 13 (A y B) se presentan los cromatogramas para AC y PD, respectivamente, identificados por UHPLC-MS en el sistema LM+EHC. El AC eluyó a 2,17 min (figura 13 A), mientras que la PD eluyó a los 2,48 min (figura 13 B).



**Figura 13.** Cromatogramas representativos para ácido clorogénico (A) y procianidina (B), utilizando EFS-diol y UHPLC-MS en el sistema LM+EHC.

Finalmente, cabe destacar que el uso de la EFS-diol para la extracción de los compuestos fenólicos en los sistemas analizados, acompañado del uso de la técnica UHPLC-MS con fines de identificación y cuantificación, resultó ser una herramienta muy útil para la detección de AC y PD en sistemas de LM con la adición de extractos de palto. Esto coincide con lo reportado por Sun, (2008) indicando que la técnica UHPLC-MS es altamente selectiva y precisa para la determinación de compuestos bioactivos, además de tener una alta sensibilidad y reproducibilidad (Lamuela-Raventós, 2014; Luykx y Van Ruth 2008). La cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas, proporciona una herramienta fundamental en el análisis e identificación de compuestos fenólicos, debido a que este instrumento separa moléculas ionizadas de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ), lo que la hace selectiva para la identificación y cuantificación (Watson, 2014).

La tabla 9 muestra el contenido de AC y PD, en todos los sistemas de LM con los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados a 80 °C, utilizando EFS-diol y UHPLC-MS.

**Tabla 9.** Evolución de ácido clorogénico y procianidina dímero en los sistemas linoleato de metilo con los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados 80 °C, utilizando EFS-diol y UHPLC-MS.

Sistema	Tiempo de almacenamiento (horas)	Ácido clorogénico (ppm)	Procianidina dímero (ppm)
LM+EHC	0	28,98 ± 0,02	37,96 ± 0,01
	24	25,56 ± 0,06	35,92 ± 0,11
	48	22,70 ± 0,28	31,41 ± 0,27
	96	21,64 ± 0,06	13,84 ± 0,18
	168	17,88 ± 0,18	3,71 ± 0,08
	216	14,73 ± 0,33	2,32 ± 0,07
LM+EHH	0	132,60 ± 0,14	10,73 ± 0,10
	24	129,30 ± 0,23	8,68 ± 0,02
	48	113,79 ± 0,15	6,79 ± 0,01
	96	98,89 ± 0,16	2,33 ± 0,24
	168	97,53 ± 0,08	1,28 ± 0,01
	216	72,26 ± 0,06	1,20 ± 0,04
LM+EAC	0	12,67 ± 0,04	29,87 ± 0,01
	24	12,07 ± 0,03	25,57 ± 0,11
	48	11,08 ± 0,02	15,61 ± 0,06
	96	9,80 ± 0,29	7,12 ± 0,06
	168	8,22 ± 0,09	4,92 ± 0,08
	216	6,39 ± 0,01	1,96 ± 0,06
LM+EAH	0	136,00 ± 0,85	5,20 ± 0,07
	24	110,64 ± 0,33	4,81 ± 0,17
	48	108,28 ± 0,40	3,56 ± 0,06
	96	99,93 ± 0,10	2,78 ± 0,27
	168	89,76 ± 0,13	0,94 ± 0,03
	216	71,44 ± 0,64	0,91 ± 0,01

Valores correspondientes al promedio y desviación estándar (n=2). LM: linoleato de metilo; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscara de palto; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas de palto; EAC: extracto acuoso de cáscara de palto; EAH: extracto acuoso de hojas de palto.

Los resultados muestran una disminución en la concentración de los compuestos fenólicos (AC y PD) a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento en todos los sistemas estudiados (Anexo 5 y 6).

Los extractos de hojas (hidroalcohólico y acuoso) presentaron mayor contenido de AC, mientras que los extractos de cáscaras (hidroalcohólico y acuoso) contienen mayor contenido de PD. Este resultado coincide con lo reportado por Wang *et al.* (2010), en la identificación de procianidinas dímero y trímero de tipo A y B en extractos de cáscaras de palto y a la mayor AA encontrada en el EHC. La AA medida por FRAP y DPPH, no necesariamente representa la AA de los extractos en LM almacenados a 80 °C.

Si bien se obtuvieron recuperaciones mayores al 70% en ambos compuestos fenólicos AC y PD por EFS-diol, cualquier método de extracción es un procedimiento condicionado en que múltiples factores afectan la concentración de los analitos en el extracto final, principalmente temperatura, velocidad de flujo de la fase móvil a través de la fase estacionaria, interacciones fisicoquímicas entre los componentes fenólicos y las fases móvil y estacionaria, tamaño de partícula, peso molecular, grado de polimerización de los compuestos e interacción de los analitos con otros componentes de la matriz (Ignat *et al.*, 2011; Hayouni *et al.*, 2007).

### **3.5. Constantes de velocidad de degradación de los compuestos fenólicos en los sistemas de LM con la adición de extractos de palto almacenados a 80 °C.**

La degradación de AC y PD se ajustó a una cinética de primer orden, donde los valores para la constante de degradación en cada sistema se calculó a partir de la pendiente de un gráfico de  $\ln$  (% retención de AC ó PD) frente al tiempo.

En la tabla 10 se presentan las constantes de velocidad de degradación de primer orden de AC y PD, en los sistemas de LM con la adición de los extractos de palto (cáscaras y hojas) almacenados a 80 °C. Las constantes de velocidad fueron calculadas como la pendiente de un gráfico del logaritmo natural del porcentaje de retención de los compuestos fenólicos en función del tiempo (horas) (Anexos 7 y 8).

**Tabla 10.** Constantes de velocidad de degradación de primer orden para ácido clorogénico y procianidina dímero, en los sistemas linoleato de metilo con la adición de los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados a 80 °C.

Sistemas	$k_{obs}$ ( $h^{-1}$ )			
	Ácido clorogénico	$R^2$	Procianidina dímero	$R^2$
LM+EHC	$0,0027 \pm 0,0001^a$	0,9897	$0,0119 \pm 0,0001^a$	0,9783
LM+EHH	$0,0028 \pm 0,0000^a$	0,9891	$0,0122 \pm 0,0001^a$	0,9993
LM+EAC	$0,0026 \pm 0,0002^a$	0,9919	$0,0121 \pm 0,0001^a$	0,9842
LM+EAH	$0,0028 \pm 0,0001^a$	0,9390	$0,0077 \pm 0,0001^b$	0,9886

Valores correspondientes al promedio y desviación estándar ( $n=2$ ). Superíndices diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) según análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de rangos múltiples de Tukey. LM: linoleato de metilo; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscara de palto; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas de palto; EAC: extracto acuoso de cáscara de palto; EAH: extracto acuoso de hojas de palto.

Los resultados mostraron que las constantes de velocidad de degradación de AC fueron menores a las de PD. Además, no se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los sistemas de LM con los extractos de hojas y cáscaras de palto (hidroalcohólico y acuoso) para las constantes de degradación de AC. El mismo comportamiento se observó para PD, excepto para el sistema LM+EAH, donde la degradación de PD fue significativamente menor respecto a los otros sistemas de LM.

La degradación de AC y PD en los sistemas de LM con los extractos de palto almacenados a 80 °C, pudo ser afectada por la presencia de otros

componentes presentes en los extractos de palto con acción prooxidantes, que pudieron contribuir a una degradación más rápida de PD que de AC. Se ha encontrado que las procianidinas son más sensibles a la degradación debido a su inestabilidad producida por la temperatura o por estar constantemente bajo reordenamiento molecular al reaccionar con otros compuestos presentes en los extractos formando de manera reversible o irreversible algunos complejos (epimerización) (Gu *et al.*, 2003; Rohr, 1999).

En la literatura, no se reportan valores de constantes de degradación para AC y PD provenientes de extractos naturales de palto, sin embargo se ha determinado según análisis cinéticos en aceite de girasol, que el ácido clorogénico y sus radicales reaccionan más fácilmente con los hidroperóxidos en las reacciones secundarias de oxidación, interviniendo principalmente en la descomposición de hidroperóxidos, explicando así su mayor estabilidad (Marinova *et al.*, 2009).

La metodología de análisis permitió obtener datos preliminares, para la identificación y cuantificación de AC y PD desde de extractos de hojas y cáscaras de palto adicionados a LM y almacenados a 80 °C hasta 216 horas (9 días).

En la figura 14, se presenta un esquema representativo de los resultados obtenidos en este estudio.

	<b>CPT</b>	<b>AA</b>	<b>PF</b>
Caracterización	Extractos en polvo  EHC > EHH > EAC > EAH	Extractos en polvo  EHC > EHH > EAC > EAH (FRAP) EHC > EAC > EAH > EHH (DPPH)	Extractos en polvo  Ácido clorogénico Procianidina dímero y trímero Epicatequina Ácido cafeico
<b>Efecto de la adición de extractos de hojas y cáscaras de palto (400 ppm de Polifenoles) a LM a 80 °C</b>			
Estabilidad de LM (%CP)	No hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre extractos (hidroalcohólico y acuoso) de hojas y cáscaras de palto en polvo, en disminuir la formación de CP de LM en estas condiciones experimentales. Sólo la adición de BHA mostró un efecto significativo en inhibir la oxidación de LM a 80 °C.		
<b>Extracción de Polifenoles (AC y PD) desde los sistemas de LM con los extractos de hojas y cáscaras de palto en polvo a 80 °C</b>			
ELL	Este método tuvo baja eficiencia para extraer AC Y PD desde los sistemas de LM con los extractos de palto.		
EFS	Con la EFS-diol se obtuvieron recuperaciones sobre el 70% para AC y PD. Se identificó la presencia de AC y PD en los sistemas de LM con los extractos de palto hasta las 216 h de almacenamiento a 80 °C.		
<b>Constantes de velocidad degradación de primer orden para de AC y PD en los sistemas de LM con los extractos de palto a 80 °C.</b>			
Las constantes de velocidad de degradación de AC y PD no mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los sistemas de LM con los extractos de palto.			

**Figura 14.** Esquema representativo de los resultados obtenidos.

A pesar de que no se encontró un efecto antioxidante de los extractos de hojas y cáscara de palto en LM a 80 °C; estos extractos podrían presentar un efecto antioxidante en matrices lipídicas reales (aceites vegetales), debido a la presencia de otros componentes presentes en aceites, que actuarían por un mecanismo antioxidante y/o como agentes regeneradores de polifenoles.

## CONCLUSIONES

- Los extractos hidroalcohólicos de hojas (EHH) y cáscaras de palto (EHC) presentaron una mayor AA y un mayor CPT en comparación a los extractos acuosos de hojas (EAH) y cáscara (EAC). Los extractos sometidos a secado por atomización presentaron mayor CPT, siendo el EHC en polvo el que presentó el mayor CPT y AA ( $p \leq 0,05$ ). El ácido clorogénico (AC), epicatequina y procianidina dímero tipo A y B (PD) fueron los principales polifenoles identificados en los extractos en polvo.
- La adición de extractos de hojas y cáscaras de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo a LM (equivalente a 400 ppm de polifenoles), no tuvieron un efecto antioxidante sobre los sistemas almacenados a 80 °C. Aunque, la adición del antioxidante sintético BHA disminuyó significativamente la formación de compuestos polares ( $p < 0,05$ ) en comparación al LM (control), mejorando su estabilidad oxidativa hasta las 240 horas de almacenamiento.
- Se determinó que la extracción en fase sólida (EFS) con cartuchos de diol, fue más selectiva para la extracción de AC y PD, respecto a los cartuchos de C18, encontrándose recuperaciones mayores al 70% para ambos compuestos fenólicos. Por otro lado, la metodología de UHPLC-MS, permitió identificar la presencia tanto de AC como de PD en los sistemas de LM con los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados a 80 °C por 216 horas.
- Las constantes de degradación de AC y PD no mostraron diferencias significativas entre los sistemas de LM con los extractos de palto (hojas y cáscaras) almacenados a 80 °C, siendo las constantes de degradación

independientes del tipo de extracto (tipo de solvente de extracción y del tipo de material vegetal (hoja o cáscara de palto)).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Aladedunye F. (2014). Review article natural antioxidants as stabilizers of frying oils. (2014). *European Journal Lipid Science. Technology*, 116: 688–706.
- Alarcón M., Romero R., Garrido A., Martínez J. (2012). Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 134: 2465–2472.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191–203.
- Barclay L., Vinqvist M.R. (2003). Phenols as antioxidants. In Z. Rappoport (eds). *The chemistry of phenols*. Nueva York, USA. pp: 839-908
- Barrera-Arellano D., Ruiz-Méndez V., Márquez Ruiz. (2002). Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1923–1928.
- Belitz H. (1997). Lípidos. In H.D. Belitz, W. In Grosh (eds). *Química de Alimentos*. Acribia, Zaragoza, España. pp: 175-267
- Benavente-García J., Castillo J., Lorente A, Ortuno A., Del Rio J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68: 457–462.
- Benzie I., Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.

- Brand-Williams W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Bravo L. Polyphenols (1998). Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*, 56: 317–333.
- Brewer M.S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 221–247.
- Brune W., van Lelyveld L.J. (1982). Biochemical comparison of leaves of five avocado (*Persea americana Mill.*). Cultivars and its possible association with susceptibility to phytophthora cinnamomi rootrot. *Phytopathology*, 104: 243-254.
- Çelik S., Özyürek M., Güçlü K., Apak R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81: 1300-1309.
- Conde E., Moure A., Domínguez H., Parajó J. (2013). Extraction of natural antioxidants from plant foods. *Woodhead Publishing Series in Food science, Technology and Nutrition*, 18: 506–594.
- Corral-Aguayo R., Yahia E., Carrillo A., González G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10498–10504.
- Cox K., McGhie T., White A., Woolf A. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of Hass avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31: 287-294.

- Chávez F., Aranda M., García A., Pastene E. (2011). Antioxidant polyphenols extracted from Avocado epicarp (*Persea americana* var. Hass) inhibit *Helicobacter pylori* urease. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 10: 265-280.
- Cheftel, J.C. (1992). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Cheftel (ed). Acribia. Zaragoza, España. pp 265-269.
- Chen L., Sun P., Wang T., Chen K., Jia Q., Wang H., Li Y. (2012). Diverse mechanisms of antidiabetic: Effects of the different procyanidin oligomer types of two different cinnamon species on db/db mice. Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 60: 9144–9150.
- Chirinos R., Huamán M., Betalleluz I., Pedreschi R., Campos D. (2011). Characterization of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. Food chemistry, 128: 711–716.
- Choe E., Min D. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. Comprehensive Reviews in Foods Science and Food Safety, 5: 169-186.
- Choe E., Min D. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. Journal of Food Science, 72: 77–86.
- Choe E., Min D. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8: 345-358.
- Cox K., McGhie T., White A., Woolf A. (2004). Skin colour and pigment changes during ripening of Hass avocado fruit. Postharvest Biology and Technology, 31: 287-294.

- De Almeida A., Miranda M., Simoni I., Wigg M., Lagrota M. (1998). Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (*Lauraceae*) leaf infusion. *Research*, 12: 562–567.
- Ding H., Chin Y., Kinghorn A., D’Ambrosi S. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*, 17: 386-394.
- Dobarganes M., Perez M., Márquez-Ruiz G. (1988). High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 90: 308-311.
- Dobarganes, M., Márquez-Ruiz, G. (2007). Formation and analysis of oxidized monomeric, dimeric and higher oligomeric triglycerides. In AOCS (eds), *Deep Frying: Chemistry Nutrition and Practical Applications*, Champaign, USA. pp: 87-110.
- Dobarganes M., Márquez-Ruiz G. (2015). Possible adverse effects of frying with vegetable oils. *British Journal of Nutrition*, 113: 49–57.
- Dolatabadi J., Kashanian S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43: 1223–1230.
- Durling N., Catchpole O., Grey J., Webby R., Mitchell K., Foo L. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 4: 1417–1424.
- Esatbeyoglu T., Wray V., Winterhalter P. (2015). Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric and pentameric procyanidins from unroasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) using countercurrent chromatography. *Food Chemistry*, 179: 278–289.
- Frankel E N. (2005). *Lipid oxidation*. Bridgwater, England. The Oily Press. Lipid oxidation – the other dimensions. *Inform*, 5: 423–436.

- Gámez-Meza N., Noriega J., Leyva L., Ortega J., Bringas L., García H., Medina L. (2009). Antioxidant activity comparison of *Thompson* grape pomace extract, rosemary and tocopherols in soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33: 110–120.
- García-Villalba R., Carrasco P., Oliveras C. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS Method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 416–429.
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research*, 40: 1107–1112.
- Gu L., Kelm M., Hammerstone J., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior R. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7513-7521.
- Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49: 1341-1348.
- Han D., Yi O-S., Shin H. (1991). Solubilization of vitamin C in fish oil and synergistic effect with vitamin E in retarding oxidation. *Journal American Oil Chemistry Society*, 68: 740–743.
- Harbourne N., Jacquier J., Morgan D., Lyng J. (2008). Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry*, 111: 204-208.
- Hayouni E., Adedraba M., Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian*

*Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry, 105: 1126–1134.

- Iglesias J., Pazos M., Lois S., Medina I. (2010). Contribution of galloylation and polymerization to the antioxidant activity of polyphenols in fish lipid systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 7423-7431.
- Ignat I., Volf I., Popa V. (2011). Critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry, 126: 1821–1835.
- Iqbal S., Bhangar M. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. Food Chemistry, 100: 246-254.
- IUPAC. (2000). The determination of polar compounds, polymerised and oxidised triacylglycerols and diacylglycerols in oils and fats. Pure and Applied Chemistry, 72: 1563-1575.
- Jeffery D., (2008). Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid-phase extraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 2571–2580.
- Jiménez P., Masson L., Barriga A., Chávez J., Robert P. (2011). Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. European Journal of Lipid Science and Technology, 113: 497-505.
- Jiménez N., Bohuon P., Lima J., Dornier M., Vaillant F., Perez, A.M. (2010). Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100-180 °C). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 2314-2322.
- Kamkan A., Javan A., Asadi F., Kamalinejad M. (2010). The antioxidative effect of *Iranian Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. Food and Chemical Toxicology, 48: 1796–1800.

- Kim S., Jeong S., Park W., Nam K., Ahn D., Lee S. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*, 97: 472-479.
- Kosinska A., Karamác M., Estrella I., Hernández T., Bartolomé B., Dykes G. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana Mill.* and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18: 820-897.
- Lamuela-Raventós R., Jáuregui O., Martínez M. (2014). Improved characterization of polyphenols using liquid chromatography. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*, 14: 261-292.
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125: 288–306.
- Lim K., Ma M., Dolan K. (2011). Effects of spray drying on antioxidant capacity and anthocyanidin content of blueberry by-products. *Journal of Food Science*, 76:156-164.
- Lima M., Silani I., Toaldo I., Corrêa L., Biasoto A., Pereira G. (2014). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the northeast region of Brazil. *Food Chemistry*, 161: 94–103.
- Logaraj T., Bhattacharya S., Udaya Sankar K., Venkateswaran G. (2008). Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. *Food Chemistry*, 106: 937–943.
- Luykx D., Van R. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107: 897-911.

- Maestro-Durán R., Borja-Padilla R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, 44: 101-106.
- Marchal L., Beeftink H., Tramper J. (1999). Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends Food Science Technology*, 6: 397-406.
- Marinova E., Toneva A., Yanishlieva N., (2009). Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chemistry*, 114: 1498–1502.
- Marmesat S., Morales A., Velasco J., Dobarganes M. (2010). Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas y Aceites*, 61:333-340.
- Márquez-Ruiz G., Dobarganes M. (2006). HPSEC in lipid analysis. In: AOCS (eds). *Lipid analysis and lipidomics: new techniques and application*. Champaign, USA. pp 205-238.
- Mateos R., Espartero J., Trujillo M., Cert A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2185–2192.
- Mohdaly A., Smetanska I., Ramadanc M., Sarhanb M., Mahmoudb A. (2011). Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, 34: 952– 959.
- Moreira R., Castell M., Barrufet M. (1999). Frying oil characteristics. In: Deep-fat frying (ed). *Fundamentals and applications*. A Chapman & Hall Food Science Book. Gaithersburg, Aspen. pp 33–74.
- Mudnic I., Modun D., Rastija V., Vukovic J., Brizic I., Katalinic V.(2010). Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry* 119: 1205–1210.

- Murakami M., Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T. (2004). Effects of thermal treatment on radical scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Science*, 69: 7-10.
- Naczki M., Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetable: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Nawirska-Olszańska A., Biesiada A. (2013). Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chemistry*, 139: 155–161.
- Oboh G., Adelusi T., Akinyemi, A. (2013). Inhibitory effect of phenolic extract from leaf of avocado pear (*Persea americana*) on Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation in rats pancreas in vitro. *Futa Journal of Research in Sciences*, 2: 276-286.
- ODEPA. (2015). Cifras de la agricultura. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr?idcla=2&idcat=4&idn=1909>. Leído el 20 de junio 2015.
- Ojewole J., Amabeoku G. (2006). Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill. (*Lauraceae*) (avocado) leaf aqueous extract in mice. *Phytotherapy Research*, 20: 696-700.
- Oliveira W., Bott, R., Souza C. (2006). Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. *Drying Technology*, 24: 523–533.
- Oroian M., Escriche I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74: 10–36.
- Owolabi M., Jaja S.I., Coker H. (2010). Bioactivity of the phytoconstituents of the leaves of *Persea americana*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 1130-1135.

- Pace-Asciak C., Hahn S., Diamandis E., Soleas G., Goldberg D. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clínica Chimica Acta*, 235: 207-219.
- Pandey K., Rizvi S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2: 270-278.
- Pedrielli P., Skibsted L. (2002). Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin and (+)-catechin on  $\alpha$ -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7138-7144.
- Pekkarinen S., Heinonen M., Hopia A. (1999) Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and p)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 79: 499–506.
- Puiggró's F., Sala E., Vaque M. (2009). In vivo, in vitro, and in silico studies of Cu/Zn-superoxide dismutase regulation by molecules in grape seed procyanidin extract. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3934–3942.
- Prabha T., Ravindranath B., Patwardhan M. (1980) Anthocyanins of avocado (*Persea americana*) peel. *Journal of Food Science and Technology*, 17: 241-242.
- Ramalho V., Neuza J. (2008). Antioxidant action of rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas y Aceites*, 59: 128-131.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. (1996). Decreto Supremo N° 977/996, Ministerio de Salud.

- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933–956.
- Robert P., Gorená T., Romero N., Sepúlveda E., Chavez J., Saenz C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 1386-1394
- Rohr G.E., Meier B., Sticher O., (1999). Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers. *Journal of Chromatography*, 835: 59–65.
- Rodríguez-Carpena J., Morcuende D., Estévez M. (2011a). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, 89: 166–173.
- Rodríguez-Carpena J., Morcuende D., Andrade M., Kylli P., Estévez M. (2011b). Avocado (*Persea americana Mill.*) Phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5625–5635.
- Roginsky V., Pliss E. (2010). Natural polyphenols as chain-breaking antioxidants during methyl linoleate peroxidation. *Journal of Food Science and Technology*, 6: 220-250.
- Serra A., Macia A., Romero M., Valls J., Blade C., Lluís A., Motilva M. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects *in vitro* and *in vivo* models. *British Journal of Nutrition*, 103: 944–952.
- Silva C.L., Haesen N., Câmara J. (2012). A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure

liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. *Journal of Chromatography*, 1260: 154–63.

- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, 16: 144-158.
- Shahidi F., Wanasundara, P.K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32: 67-103.
- Shahidi F., Zhong Y. (2005). Lipid oxidation: measurement methods. *Biochemistry of Foods*, 11: 419-478.
- Shahidi F., Zhong Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Review*, 39: 4067-407.
- Shahidi F., Ambigaipalan P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18: 820–897.
- Soong Y., Barlow P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88: 411–418.
- Sun D. (2008). Introduction for food authentication. In Da Wen-S (eds). *Modern techniques for food authentication*. El sevier, Irlanda. pp 1-17.
- Terasawa N., Sakakibara M., Murata M. (2006). Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. *Food Science and Technology Research*, 12: 55-58.
- Torres A., Mau-Lastovicks T., Rezaaiyan R. (1987). Total phenolics and high performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 921–925.

- Valenzuela A., Nieto S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47: 186-196.
- Villa-Rodríguez J., Molina F., Ayala J., Olivas G., González J. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. *Food Research International*, 44: 1231–1237.
- Wang W., Bostic T., Gu L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122: 1193–1198.
- Warner K. (2004). Chemical and physical reactions in oil during frying. In Gupta K, Warner y P. White (eds), *Frying Technology and Practices*. AOCS Press Champaign, Illinois, USA. pp 16-28.
- Watson R. (2014). Extraction Polyphenols. In Watson (ed). *Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation*. Academic Press, London. pp 130-150.
- Yahia E. (2011). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical Fruits. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, 8: 450–474.
- Yamanaka K., Watanabe Y., Yoshimoto K. (2010). Suppressive effect of defatted rice bran on the oxidation of methyl linoleate. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 123: 1132-1135.
- Yamashita Y., Okabe M., Natsume M., Ashida H. (2012). Comparison of anti-hyperglycemic activities between low- and high-degree of polymerization procyanidin fractions from cacao liquor extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20: 283-287.

- Yanishlieva N., Marinova E. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *European Food Research and Technology*, 203: 220–223.
- Yanishlieva N., Marinova E. (2001). Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 752-767.
- Yanishlieva N. (2004). Inhibición de la oxidación. In N. Yanishlieva, J. Pokorny y M. Gordon (eds). *Antioxidantes de los Alimentos, Aplicaciones prácticas*. Acribia, Zaragoza, España. pp 33-38.
- Zhu Q., Liang Ch., Cheng K., Peng X., Lo Ch., Shahidi F., Chen F., Ho Ch., Wang M. (2009). Trapping effects of green and black tea extracts on peroxidation-derived carbonyl substances of seal blubber oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1065–1069.

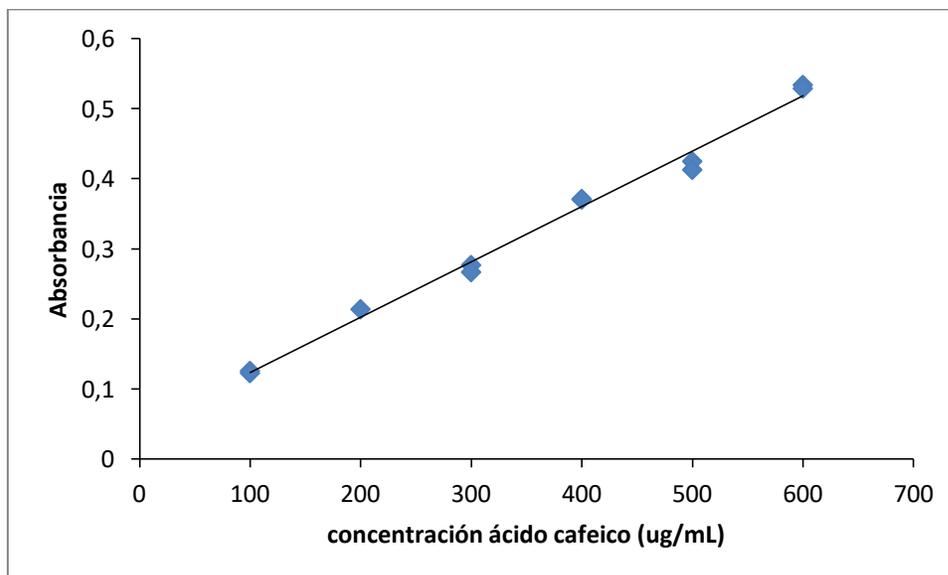
## ANEXOS

### Anexo 1

Curva de calibración de estándar de ácido cafeico para cuantificación de polifenoles en los extractos de hojas y cáscaras de palto.

Se realizó una curva de calibración de ácido cafeico en duplicado (n=10). La absorbancia para cada concentración se obtuvo de la aplicación del método de Folin-Ciocalteu. Según los datos obtenidos, se determinó una regresión lineal con la ecuación:

$$Y = 0,0008x + 0,0444, \text{ con } R^2 = 0,991$$



**Figura 15.** Curva de calibración de ácido cafeico

Para obtener los datos de la concentración de polifenoles en la muestra se reemplazaron los valores de la absorbancia en la ecuación de la recta dada por la curva estándar de ácido cafeico, de tal forma que el contenido de polifenoles totales se expresó como equivalentes de ácido cafeico (Eac).

## Anexo 2

Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante de polifenoles en los extractos de hojas y cáscaras de palto.

Se realizó una curva de calibración del estándar en duplicado (n=10). La absorbancia para cada concentración se obtuvo por aplicación de método FRAP. Según los datos obtenidos, se determinó una regresión lineal con la ecuación:

$$Y = 0,5785x + 0,062, \text{ con } R^2 = 0,9966$$

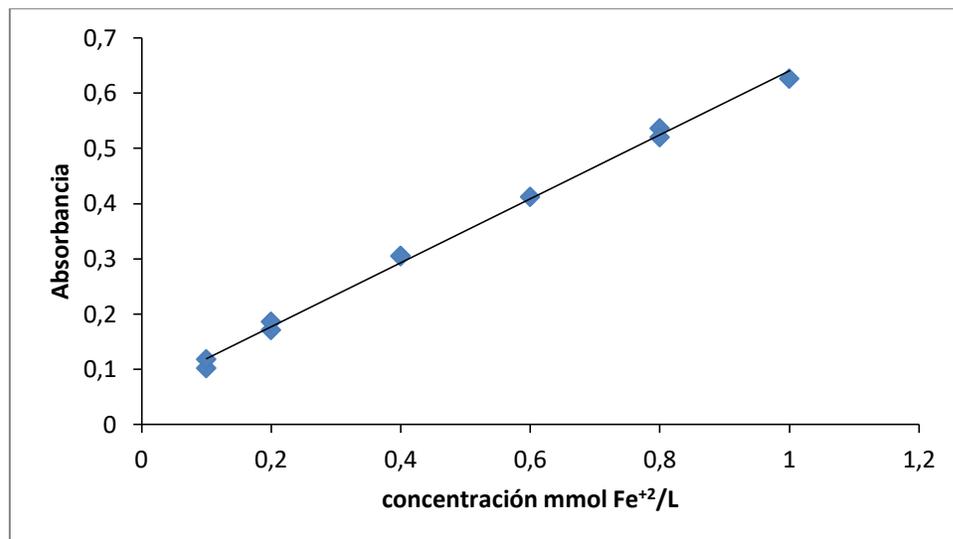


Figura 16. Curva de calibración

Para la determinación de la capacidad antioxidante en la muestra, se reemplazaron los valores de la absorbancia en la ecuación de la recta dada por la curva, de tal forma que la capacidad antioxidante se expresó como mmoles de Fe<sup>+2</sup>/ L de solución.

### Anexo 3

La tabla 11, muestra la capacidad antioxidante de los extractos de hoja y cáscaras de palto medida por método DPPH

**Tabla 11.** Determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH para los extractos de hojas y cáscaras palto.

Extractos	Alícuota ( $\mu$ L)				
EHC	100	150	200	300	350
EHH	100	150	200	300	350
EAC	100	150	200	300	350
EAH	100	150	200	300	350
Alícuotas se aforaron con metanol hasta un volumen de 10 mL					
	<b>Control</b>				
Metanol (mL)	0,1				
DPPH (mL)	3,9				
	<b>Muestra</b>				
Alícuota (mL)	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000
DPPH (mL)	3,9000	3,9000	3,9000	3,9000	3,9000
	<b>Blanco</b>				
Alícuota (mL)	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000
Metanol (mL)	3,9000	3,9000	3,9000	3,9000	3,9000
Absorbancia (EHC)	0,4627	0,3545	0,2720	0,2343	0,1355
Conc. Polifenoles (mg Eac/mL)	0,0085	0,0256	0,0427	0,0512	0,0683
Absorbancia (EHH)	0,4357	0,3926	0,3291	0,2722	0,1152
Conc. Polifenoles (mgEac/mL)	0,0203	0,0339	0,0474	0,0677	0,1016
Absorbancia (EAC)	0,2749	0,2525	0,2104	0,0732	0,0861
Conc. Polifenoles (mgEac/mL)	0,0055	0,0183	0,0366	0,0915	0,1268
Absorbancia (EAH)	0,4801	0,4377	0,3178	0,2628	0,1876
Conc. Polifenoles (mgEac/mL)	0,0180	0,0360	0,0720	0,0900	0,1079

EHC: extracto hidroalcohólico de cáscaras; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas; EAC: extracto acuoso de cáscaras; EAH: extracto acuoso de hojas.

#### Anexo 4

**Tabla 12.** Perfil de principales polifenoles de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) de hoja y cáscara de palto en polvo en modo de ionización positivo e ionización negativo.

Extracto	Peak	T <sub>R</sub> (min)	Compuesto	m/z (M+H <sup>+</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Compuesto	m/z (M+H <sup>-</sup> )
EAC	14				24,0	Ácido cafeico	178,9
	15	21,7	Procianidina dimero tipo B	579,3	21,9	Procianidina dimero tipo B	577,8
	17				24,0	Epicatequina	289,2
EAH	22				19,2	Ácido clorogénico	353,1
	23				20,8	Ácido clorogénico	353,2
	23				20,8	Procianidina dimero tipo B	577,2
EHC	15				19,6	Ácido clorogénico	353,1
	17	22,1	Procianidina dimero tipo B	579,2	22,3	Procianidina dimero tipo B	577,4
	19	24,2	Procianidina dimero tipo A	577,3	24,3	Procianidina dimero tipo B	577,2
	19				24,3	Epicatequina	289,2
EHH	17	19,7	Procianidina dimero tipo B	579,1	19,6	Procianidina dimero tipo B	577,2
	17				19,6	Ácido clorogénico	353,1

## Anexo 5

Comportamiento representativo de los compuestos fenólicos ácido clorogénico y procianidina dímero en los sistemas con la adición de extractos hidroalcohólicos (cáscara y hoja) de palto durante 216 horas (9 días) de almacenamiento a 80 °C.

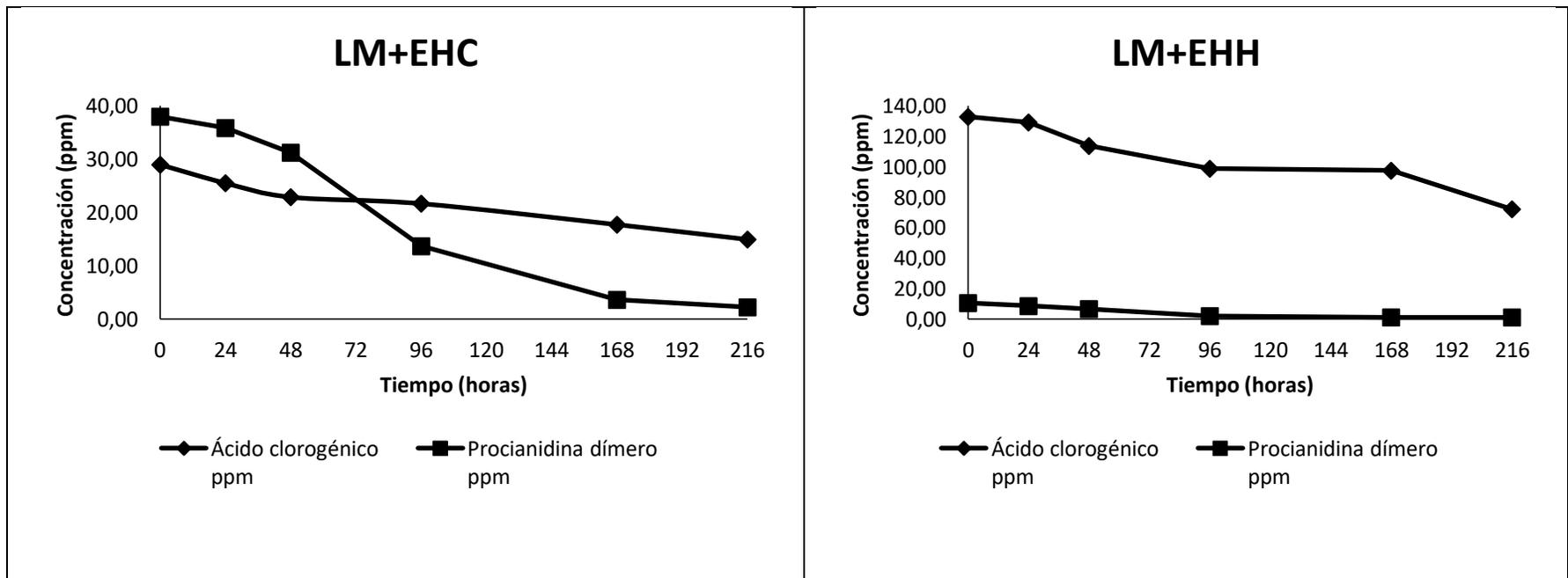


Figura 17. Degradación de AC y PD en los sistemas LM con los extractos hidroalcohólicos hasta las 216 horas de almacenamiento.

## Anexo 6

Comportamiento representativo de los compuestos fenólicos ácido clorogénico y procianidina dímero en los sistemas con la adición de extractos acuosos (cáscara y hoja) de palto durante 216 horas (9 días) de almacenamiento a 80 °C.

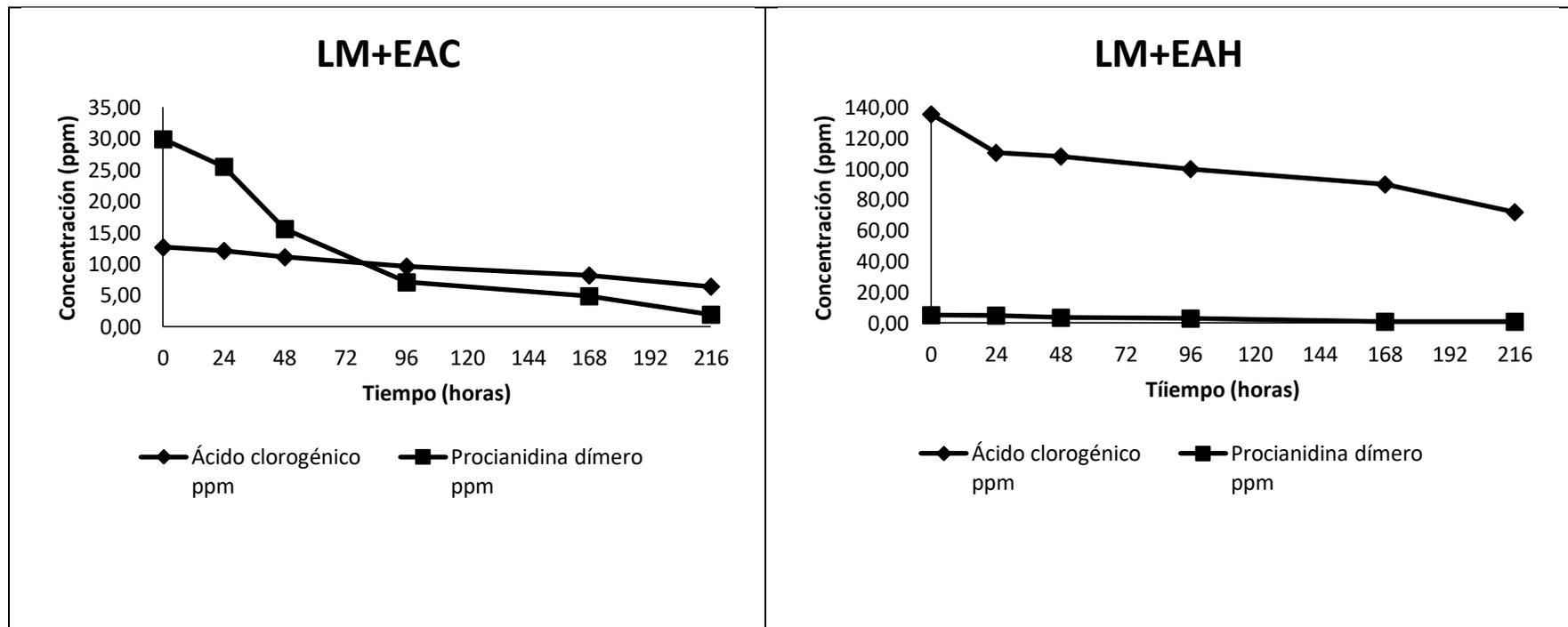


Figura 18. Degradación AC y PD en los sistemas LM con los extractos acuosos de hasta las 216 horas de almacenamiento.

## Anexo 7

Valores ajustados a modelo de primer orden, para determinación representativa de las constantes de velocidad de ambos compuestos fenólicos, en los sistemas con la adición de los extractos hidroalcohólicos (cáscara y hoja) de palto.

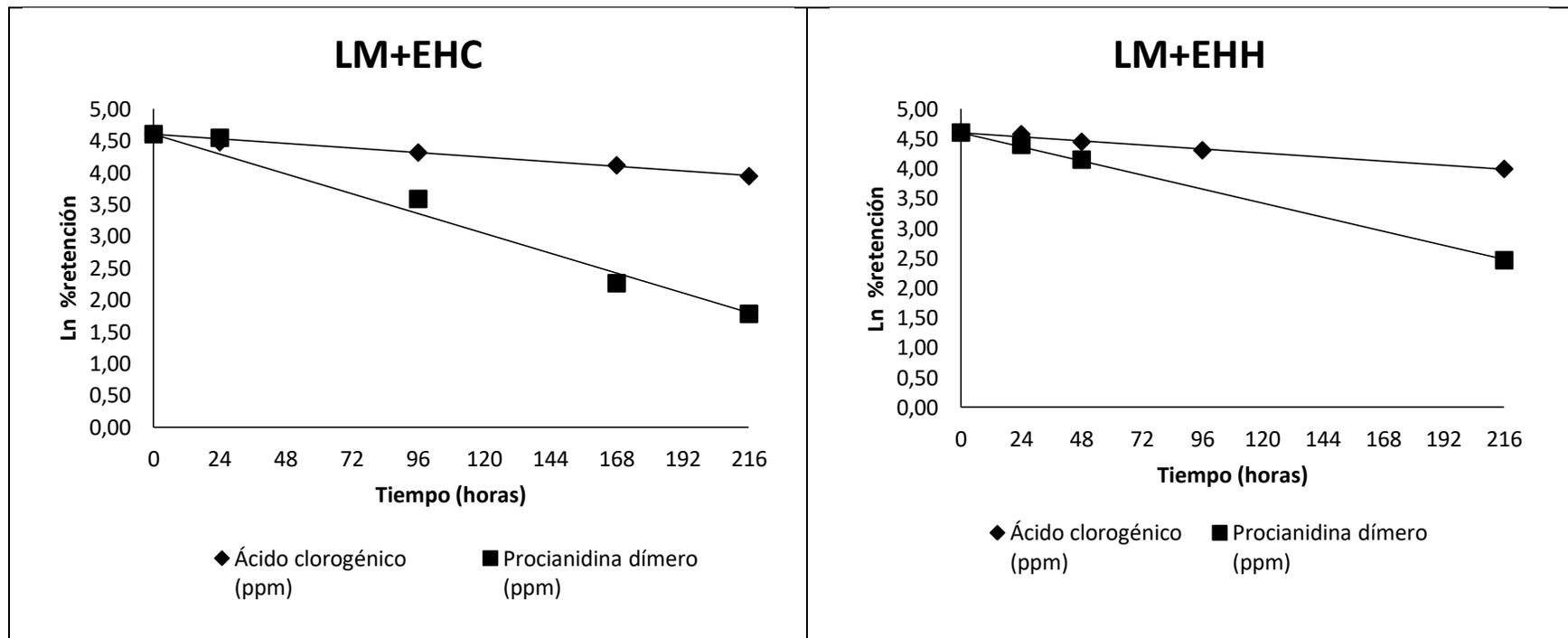


Figura 19. Comportamiento de AC y PD en los sistemas LM con los extractos hidroalcohólicos hasta las 216 horas de almacenamiento.

## Anexo 8

Valores ajustados a modelo de primer orden, para determinación representativa de las constantes de velocidad de ambos compuestos fenólicos, en los sistemas con la adición de los extractos acuosos (cáscara y hoja) de palto.

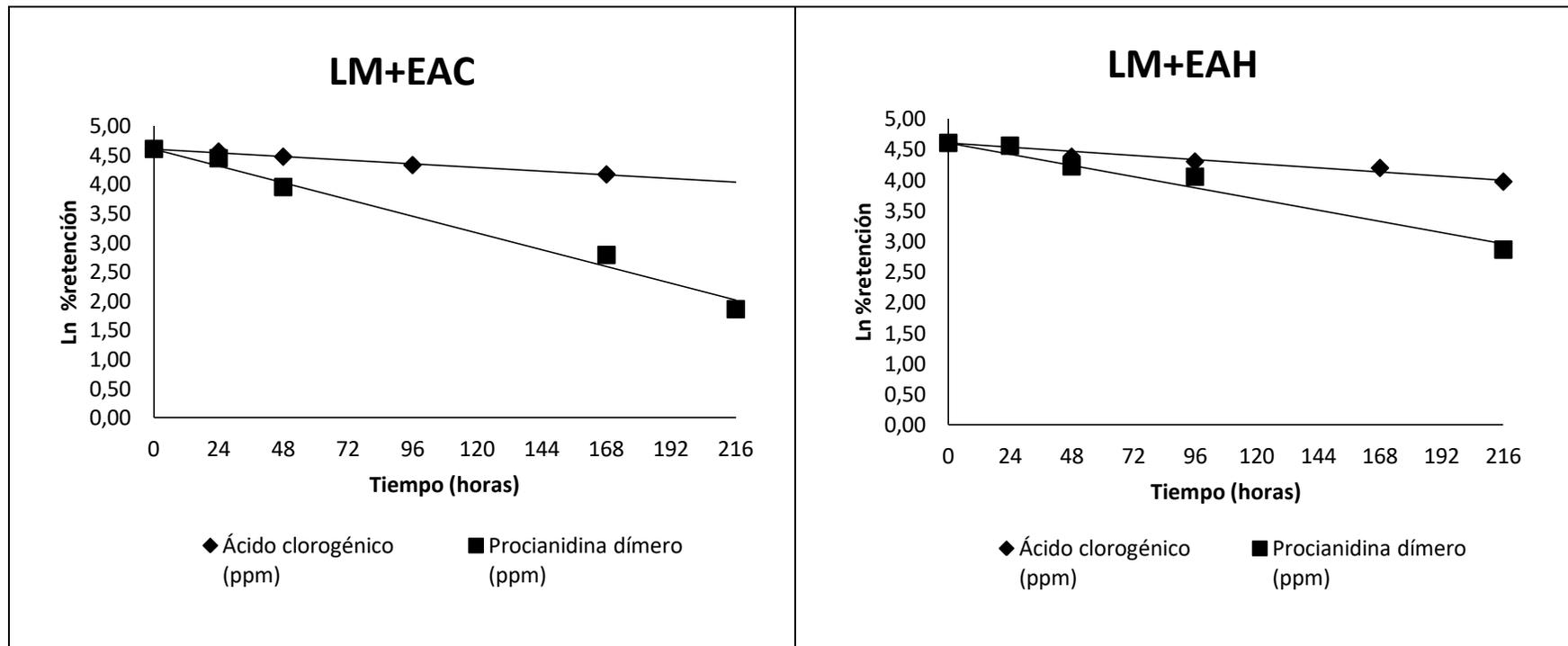


Figura 20. Comportamiento de AC y PD en los sistemas LM con los extractos acuosos de hasta las 216 horas de almacenamiento.