

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**“DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SU RELACION
CON LOS COMPONENTES FENOLICOS PRESENTES EN EL ALPECHIN”**

Tesis presentada por la bachiller:

**FLORES RIVERA,
EMILLE DEL PILAR**

**Para optar el Título Profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO**

Asesor de tesis:

JOSE VILLANUEVA SALAS, PH D

AREQUIPA – PERU

2014

DEDICATORIA

A mis padres, Lilia y Edilberto, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación y me han apoyado en cada momento.

Alejandro, “Verus amor nullum novit habere modum”, gracias por tu apoyo y tus ánimos en todo momento.

A mis hermanos, Carla, Fernando y Paul por su paciencia y sobre todo su apoyo emocional a lo largo de mi vida.

A mis amigas y amigos por estar siempre en las buenas y malas.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial al Sr. Jose Carmona y al Sr Dennis Torres quienes me facilitaron las muestras.

También agradecer de manera especial al Dr. Villanueva, mi asesor, que orientó, apoyó y corrigió mi labor científica, sobrepasando las expectativas que deposité en su persona.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS	7
HIPOTESIS	8
CAPITULO I	9
1. ALPECHIN.....	9
1.1. Procesos de extracción.....	9
1.1.1. Proceso tradicional.....	10
1.1.2. Procesos modernos.....	11
1.2. Composición química	12
1.3. Usos.....	14
1.3.1. Recuperación de compuestos fenólicos	14
1.3.2. Agrícolas	14
1.3.3. Otros.....	15
1.4. Impacto ambiental.....	15
1.4.1. Suelo	15
1.4.2. Agua.....	16
1.4.3. Aire	16
2. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	16
3. ANTIOXIDANTES	19
3.1. Clasificación	19
3.1.1. Antioxidantes endógenos o enzimáticos	20
3.1.2. Antioxidantes exógenos o no enzimáticos	20
3.2. Mecanismo de acción.....	21
3.3. Capacidad antioxidante	22

4. COMPUESTOS FENOLICOS	23
4.1 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos	25
 CAPITULO II	 27
1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	27
2. MATERIALES	27
2.1. Muestras.....	27
2.2. Reactivos.....	27
2.3. Material De Vidrio	28
2.4. Otros.....	28
2.5. Equipos	28
3. MÉTODOS	28
Obtención de las muestras	28
Determinación cualitativa de compuestos fenólicos	29
Preparación de las muestras	29
3.1. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)	29
3.2. Determinación de Actividad antioxidante por el método CUPRAC.....	31
3.3. Determinación de Actividad antioxidante por el método DPPH	33
3.4. Análisis Estadístico	35
 CAPITULO III.....	 36
3.1. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)	39
3.2. Determinación de Actividad antioxidante por el método CUPRAC.....	42
3.3 Determinación de Actividad antioxidante por el método DPPH	45
3.4 Determinación de la relación entre la actividad antioxidante y los componentes fenólicos.....	49
 CONCLUSIONES	 51
RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53
ANEXOS	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lugar de daño producido por los radicales libres	18
Tabla 2. Clasificación de antioxidantes	19
Tabla 3. Preparación de estándares (CFT)	30
Tabla 4. Procedimiento para Folin-Ciocalteu	31
Tabla 5. Esquema del procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método CUPRAC	33
Tabla 6. Preparación de estándares de Trolox	34
Tabla 7. Esquema del procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	35
Tabla 8. Características fisicoquímicas de las muestras de alpechín	37
Tabla 9. Absorbancias para grafico de calibración	40
Tabla 10. Concentraciones y error estándar de las muestras CFT	41
Tabla 11. Absorbancias para grafico de calibración para CUPRAC	43
Tabla 12. Actividad antioxidante por el método CUPRAC	44
Tabla 13. Absorbancias para DPPH	45
Tabla 14. Datos de %INHIBICION para grafico de calibración	46
Tabla 15. Actividad antioxidante por el método DPPH	48
Tabla 16. Contenido de Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante del Alpechín	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso tradicional.....	10
Figura 2. Proceso moderno de tres fases.....	11
Figura 3. Proceso moderno de dos fases.....	12
Figura 4. Estructura de ácido ascórbico (vitamina C).....	20
Figura 5. Estructura de α - tocoferol (Vitamina E).....	21
Figura 6. Estructura de fenol.....	23
Figura 7. Estructura de hidroxitirosol.....	24
Figura 8. Estructura de oleuropeina.....	25
Figura 9. Muestras rotuladas (acuoso 1 y 2, acetato 1 y 2).....	29
Figura 10. Reacción de Folin-Ciocalteu.....	30
Figura 11. Reacción de CUPRAC.....	32
Figura 12. Reacción DPPH.....	34
Figura 13. Prueba positiva de acetato de plomo.....	37
Figura 14. Prueba positiva de cloruro férrico.....	38
Figura 15. Prueba negativa de gelatina-sal.....	38
Figura 16. Extracción con acetato de etilo.....	39
Figura 17. Gráfico de calibración para los Compuestos Fenólicos Totales.....	40
Figura 18. Contenido de compuestos fenólicos totales (*grupos iguales).....	42
Figura 19. Complejo coloreado.....	43
Figura 20. Gráfico de calibración CUPRAC.....	44
Figura 21. Actividad Antioxidante por método CUPRAC.....	45
Figura 22. Gráfico de calibración de DPPH.....	47
Figura 23. Decoloración de solución de DPPH.....	47
Figura 24. Actividad antioxidante por el método DPPH.....	48



RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la determinación de la actividad antioxidante y su relación con los componentes fenólicos presentes en el alpechín, agua residual de la extracción de aceite de oliva. Para ello se utilizó una técnica espectrofotométrica, para la medición del contenido fenólico se empleó el método Folin-Ciocalteu, y para determinar la actividad antioxidante se emplearon dos métodos: CUPRAC y DPPH.

Se obtuvieron muestras de alpechín de lugares diferentes, la primera muestra proviene del distrito de Yauca, Caravelí y la segunda de Ilo, Moquegua, ambas muestras corresponden a residuos de un proceso de extracción de aceite por métodos tradicionales usando presión.

Las diferentes muestras pasaron por un proceso de extracción con una pera de decantación usando como solvente: acetato de etilo en proporción 1:1, obteniéndose una fase orgánica y otra acuosa, en ellas se evaluó el contenido fenólico y su actividad antioxidante. Luego por métodos estadísticos se evaluó la diferencia significativa de los resultados hallados entre las muestras y también entre las fases,

también se determinó si existe una relación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico del alpechín.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la actividad antioxidante de las muestras de alpechín proveniente de Yauca y de Ilo. Se pudo demostrar que el mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante se encuentra en la fase acuosa debido a la polaridad de los mismos. El alpechín puede ser considerado como una fuente potencial, de alto valor en contenido polifenólico y estos por su capacidad antioxidante se pueden aprovechar con fines farmacéuticos.





ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antioxidant activity and its relationship with the content of phenolic compounds present in olive oil mill wastewater. For this a spectrophotometric technique was used, for measuring the phenolic content the Folin-Ciocalteu method was applied and to determine the antioxidant activity two methods were used: CUPRAC and DPPH.

Samples from different places were obtained, the first one is from Yauca, Caraveli and the second one from Ilo, Moquegua, both samples are residues of an extraction process by traditional methods using pressure.

The different samples went through an extraction process with a solvent: ethyl acetate was used in the proportion 1:1, to give an organic and aqueous phase, in this phenolic content and antioxidant activity were evaluated in the different phases: aqueous and organic. Then statistical methods for the significant difference between the samples and between the phases were evaluated, it was also determined whether there is a relationship between antioxidant activity and phenolic content of OMW.

The results obtained show the antioxidant activity of samples from different places: Yauca and Ilo. It was possible to demonstrate that the higher polyphenol content is in the aqueous phase and is due to the polarity of the same and also higher antioxidant activity. The OMW can be considered as a potential source of high value for its polyphenolic content and antioxidant activity. These features can be exploited in pharmaceutical industries.



INTRODUCCION

En la última década, la producción de aceite de oliva se ha incrementado aproximadamente un 40% en todo el mundo.¹ Los procesos de la extracción del aceite de oliva ya sea por método tradicional, ampliamente utilizado, o por métodos modernos generan grandes cantidades de residuos tales como: alpechín y bagazo o bagazo húmedo.

El alpechín es un líquido oscuro compuesto por 83-94% de agua, 4-16% de materia orgánica (polisacáridos, ácidos orgánicos, polifenoles) y 0,4-2,5% de minerales (potasio, calcio, etc.). Es por estas características que su manejo y eliminación representan un problema ambiental.²

Los antioxidantes tienen la función de proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres. El incremento en el organismo de estos radicales conduce a un estado de estrés oxidativo en el que se producen daños perjudicando el metabolismo normal, causando alteraciones en lípidos, proteínas y ácidos. El daño oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de diversas enfermedades degenerativas.³

Siendo el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras sustancias con acción antioxidante, tales como los compuestos fenólicos una fuente exógena que ayudaría a combatir el daño producido por el estrés oxidativo.⁴ Los polifenoles presentes en el alpechín han mostrado poseer importante poder antioxidante, anti-inflamatorio, anti-aterogénico, y antimicrobiano e incluso efecto anticancerígeno.⁵

Por lo expuesto el objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de fenoles totales y su actividad antioxidante presentes en las diferentes muestras mediante técnicas espectrofotométricas.

Los resultados muestran resultados favorables en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante sobre todo en la fase acuosa constituyendo el alpechín un recurso interesante que en la actualidad no se utiliza con la finalidad de aprovechar sus características antioxidantes, las mismas que pueden ser utilizadas en el sector farmacéutico para el desarrollo de nuevos productos.





OBJETIVOS

1. Extraer y fraccionar con acetato de etilo las muestras provenientes de Yauca y de Ilo
2. Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en las muestras de alpechín provenientes de Yauca y de Ilo.
3. Determinar la actividad antioxidante de las muestras por los métodos CUPRAC y DPPH provenientes de Yauca y de Ilo.
4. Relacionar la actividad antioxidante del alpechín con su contenido de compuestos fenólicos totales.



HIPOTESIS

Dado que existen referencias de que el alpechín presenta en su composición química compuestos fenólicos; es posible que los extractos presenten actividad antioxidante.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. ALPECHIN

El alpechín es un producto de desecho del proceso de elaboración del aceite de oliva.⁶⁻⁹ Hoy en día, alrededor de 900 millones de cultivos de aceituna cubren más de 10 millones de hectáreas en todo el mundo, 98% de los cuales se encuentra en la cuenca del Mediterráneo.¹⁰ Anualmente la producción de aceite de oliva llega casi a 1750 millones de toneladas siendo países mediterráneos como España, Italia, Grecia, Túnez y Portugal los mayores productores.^{7, 8}

Cada olivo produce entre 15 y 40 kg de aceitunas/año, dependiendo de las condiciones climáticas.⁸ Aproximadamente el 21% del peso de la aceituna corresponde a aceite y el 79% restante (agua, piel, pulpa y semilla) formaría parte de los residuos de dicha extracción.^{7, 2}

El alpechín es un líquido oscuro compuesto en su mayoría de agua (83-92%), materia orgánica (4 – 16%) y minerales (1-2%). Su reutilización se ve limitada debido a su contenido fenólico y pH ácido que le darían propiedades antimicrobianas y fitotóxicas.

1.1. Procesos de extracción

La extracción del aceite implica diferentes procesos que incluyen lavado de las aceitunas, molienda, mezcla y extracción.

Existen diferentes procesos de extracción:

- i. Tradicional, llevado a cabo por un sistema de prensado y filtración.
- ii. Moderno, llevado a cabo por medio de centrifugación continua directa (dos fases o de tres fases).^{9- 11}

El proceso de extracción tradicional y moderno de tres fases genera dos tipos de residuos: alpechín y bagazo, mientras que el proceso moderno de dos fases genera un solo residuo: Bagazo húmedo.¹²

1.1.1. Proceso tradicional

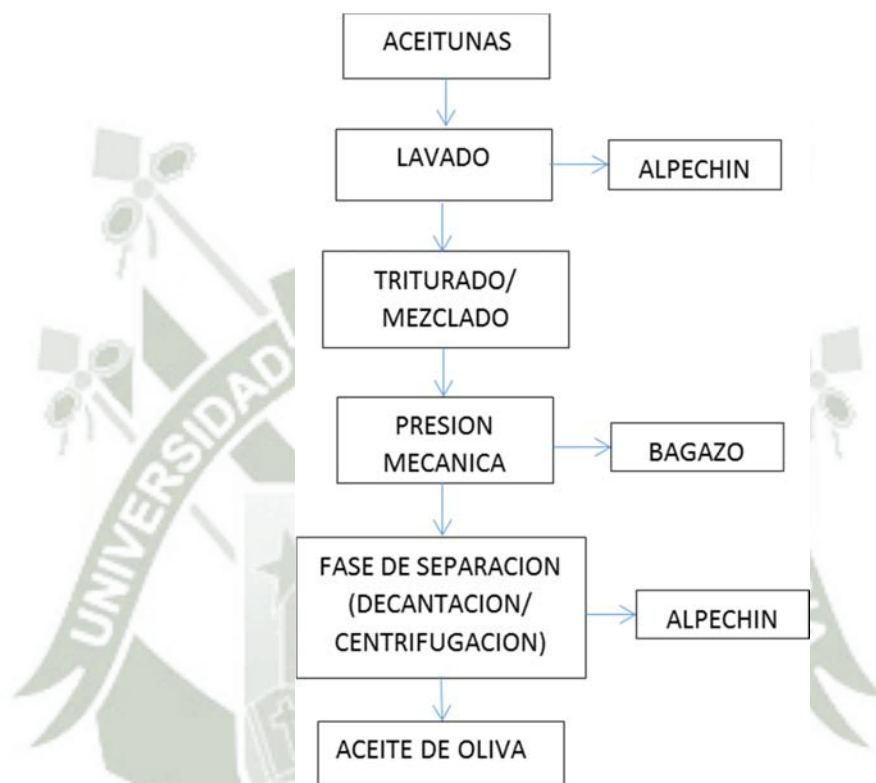


Figura 1. Proceso tradicional

Después del lavado, las aceitunas pasan por un proceso de trituración y luego de mezclado para facilitar la separación de fases y aumentar el porcentaje de aceite disponible. Después del mezclado la pasta resultante es extendida en discos que son apilados unos sobre otros, para aplicar presión y compactar la fase sólida (bagazo) y separar la fase líquida: aceite y alpechín. Luego por un proceso de centrifugación o decantación el alpechín es eliminado obteniéndose aceite de oliva.

Este método ofrece ventajas porque es un proceso simple y barato, además, genera un volumen de alpechín de alrededor 40 a 60 L/100 kg

de aceitunas. Sin embargo, también tiene desventajas como discontinuidad del proceso y los altos costos de mano de obra.⁹

1.1.2 Procesos modernos

Extracción de tres fases: Llamado así ya que el decantador centrífugo permite la separación de tres flujos de materia: aceite de oliva, bagazo y alpechín, basándose en la diferencia de densidad de los productos. Sin embargo, este proceso requiere agua caliente para diluir la pasta de aceitunas antes de pasar por una centrifuga horizontal. Ocasionando aumento del volumen de alpechín.

Las ventajas que este proceso ofrece como automatización, requerimientos de menor área para trabajo, etc. se ven opacadas por los niveles de alpechín producido (80-120L/kg de aceitunas) y los elevados consumos de agua y energía.⁹⁻¹¹

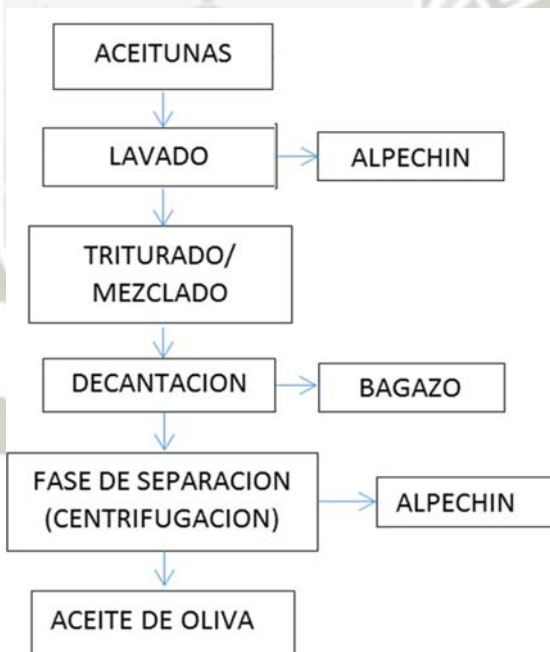


Figura 2. Proceso moderno de tres fases

Extracción continua de dos fases: Este sistema se denomina eco-amigable ya que su objetivo principal es eliminar la producción de

alpechín, al no adicionar agua se obtienen dos productos: aceite de oliva y bagazo húmedo. La composición de este residuo es una combinación de semillas, piel, pulpa y agua propia de la aceituna.

La ventaja que este proceso ofrece es que disminuye un 75% la producción de alpechín (10L/100 kg de aceituna); sin embargo, el residuo resultante es difícil de manejar por estar muy concentrado.⁹⁻¹²



Figura 3. Proceso moderno de dos fases

1.2. Composición química

La composición del alpechín varía cualitativa y cuantitativamente dependiendo de diferentes parámetros como: variedad de oliva, condiciones climáticas, tiempo de cosecha, tiempo de almacenamiento de la aceituna, proceso de extracción, etc.^{5, 7-9}

Básicamente el alpechín está compuesto por aguas de lavado de aceituna, agua de la pulpa (40-50% del peso inicial de aceitunas), agua añadida a la pasta de aceituna en la etapa de centrifugación y agua procedente de lavado de equipos. Además de agua, los principales componentes son compuestos

fenólicos, azúcares, y ácidos orgánicos, también contiene valiosos recursos como los nutrientes minerales.⁵

Es caracterizado por ser un líquido de color oscuro, de olor intenso, con alto contenido de materia orgánica.¹⁶ Con pH ácido (3 – 6) y conductividad eléctrica que le da características salinas¹⁷, posee además valores elevados de demanda química de oxígeno DQO (en el rango de 40-200 g/L) y demanda biológica de oxígeno DBO (12-60 g/L), su contenido total de sólidos esta entre 40-150 g/L y su contenido en polifenoles llega hasta 24 g/L.²

En promedio está constituido por un 83 a 96% de agua, 3,5 a 15,0% de compuestos orgánicos y de 0,5 a 2% de minerales. El material orgánico, a su vez, se compone de grasa (1-14%), polisacáridos (13-53%), proteína (8-16%), ácidos orgánicos (3-10%), polialcoholes (3-10%) y polifenoles (2-15%).¹⁸

Los principales constituyentes de la fracción orgánica son azúcares, compuestos nitrogenados, ácidos volátiles, polialcoholes, pectinas, grasas y compuestos fenólicos responsables de las actividades antimicrobianas lo que dificulta su degradación.^{10-12, 17-20}

El fruto del olivo es rico en compuestos fenólicos, pero sólo el 2% del contenido fenólico total fluye a la fase aceitosa, perdiéndose la fracción restante en la fase acuosa.¹⁸⁻²⁰

En la actualidad, más de 50 compuestos fenólicos diferentes se han identificado en el alpechín. Siendo los principales y que se encuentran en mayor cantidad la oleuropeína, hidroxitirosol y tirosol, que poseen un alto espectro de actividades biológicas.²⁴⁻²⁷ De éstos, el hidroxitirosol es el principal compuesto fenólico natural y se caracteriza por tener una alta actividad antioxidante. Junto con otros fenoles simples y flavonoides, que también exhibe diversas actividades biológicas, como antiinflamatorias,

antibacterianas y antivirales, incluyendo posibles actividades cardioprotectoras y anticancerígenas.²⁸

El alpechín contiene algunos iones importantes como magnesio y calcio que son importantes para minimizar el riesgo de enfermedades del corazón.¹¹⁹

Además se evidencia la presencia de potasio seguido por calcio y sodio.^{9, 30}

1.3. Usos

Los componentes del alpechín pueden ser reutilizados para diversos tipo de aplicaciones¹², como biotecnológicas.^{13,28} o farmacéuticas aprovechando sus propiedades bioactivas, como por ejemplo el desarrollo de productos antioxidantes y antimicrobianos^{15, 10}, Pasando por procesos de extracción y purificación.²⁹

1.3.1. Recuperación de compuestos fenólicos

Debido a sus excelentes propiedades biológicas como antioxidantes, captadores de radicales libres, antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos.³⁰ La recuperación de estos compuestos es de gran interés para las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias.²⁶

Por lo tanto, para la valorización de compuestos fenólicos y para su uso como agentes bioactivos es importante su fraccionamiento y/o purificación.

1.3.2. Agrícolas

El alto contenido de agua, materia orgánica y diferentes nutrientes como potasio⁷ indica que puede ser utilizado como fertilizante orgánico.²⁹

El compost es un proceso que implica la mineralización y la humidificación parcial de la materia orgánica para producir un producto final¹³. Compost producido con el alpechín podría ser utilizado en la agricultura como un fertilizante de buena calidad.

Diferentes estudios realizados reportan resultados que indican este producto como eficiente, mejora la calidad de suelo, además posee un alto valor agronómico como aditivo del suelo.^{6c, 7}

El uso de desecho orgánico como compost en tierras agrícolas podría aumentar el contenido orgánico del suelo, y el compostaje puede desempeñar un papel vital en las prácticas agrícolas sostenibles modernas.²⁷

1.3.3. Otros

- Para la producción de materiales de construcción¹⁰
- Aprovechar el valioso potencial de abundantes sustancias colorantes disponibles en grandes cantidades como colorantes naturales para la tinción de materiales textiles.
- Conversión de alpechín a biodiesel, siendo este una alternativa prometedora ya que no es toxica, es biodegradable y una fuente de combustible renovable.¹¹
- Suplementos de alimentos para animales.³⁰
- Biopolímeros^{9, 13}

1.4. Impacto ambiental

El alpechín sin tratar causa problemas al medio ambiente debido al uso de lagunas o tanques para su eliminación, demostrándose efectos negativos sobre las poblaciones microbianas del suelo, ecosistemas acuáticos y también efectos negativos en el aire a través de la liberación y emisión de gases.^{9-12,28}

1.4.1. Suelo

Los efectos fitotóxicos pueden deberse a factores como contenido de amonio, ácidos orgánicos volátiles, metales pesados y sales que en concentraciones elevadas pueden generar efectos negativos en el desarrollo de plantas, además, inhiben la germinación de semillas o crecimiento de raíces.¹⁸ El contenido de lípidos disminuye la retención de agua y filtración.¹⁰

1.4.2. Agua

Si el alpechín es eliminado directamente a ríos o lagunas reduciría la disponibilidad de oxígeno creando un desbalance en el ecosistema, además, por el contenido de polifenoles pueden colorear la superficie de las aguas. Los lípidos presentes pueden crear una película impenetrable en la superficie que bloquearía los rayos solares y el oxígeno inhibiendo así el crecimiento de plantas.¹¹

1.4.3. Aire

Ya sea almacenado en tanques abiertos o descargados sobre la tierra o en aguas naturales, el alpechín se fermenta y emite gases con olores fuertes y desagradables.⁵

2. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Un radical libre es una especie química que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, convirtiéndolo en un compuesto altamente inestable con capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena con el fin de estabilizarse.^{31, 32}

El estado fundamental del oxígeno molecular (O_2) es esencial para tornarse en aceptor de electrones e indispensable en muchas de las vías metabólicas, en donde su utilización permite un mejor aprovechamiento para la conversión de energía necesaria.

En el metabolismo normal existe formación de intermediarios denominados especies reactivas de oxígeno (ERO). Este término frecuentemente utilizado para describir no solamente radicales libres como: radical hidroxilo ($OH\bullet$), anión radical superóxido ($O_2\bullet$), óxido nítrico ($NO\bullet$), radical peróxido ($ROO\bullet$), sino también radicales libres como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3), singuletes de oxígeno (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) los cuales pueden inducir reacciones en el organismo.³³

A concentraciones elevadas, pueden dañar (reversible o irreversiblemente) los constituyentes celulares, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos, por lo tanto pueden alterar la actividad celular, funcionamiento de membrana, metabolismo o expresión génica.³²

Las reacciones de radicales a menudo se llaman reacciones en cadena y pasan por tres etapas: iniciación (genera un radical), propagación (este radical reacciona con una molécula estable para producir otro) y terminación con el fin de estabilizarse (Varias reacciones suceden con los reactivos electrofilicos).^{30, 34}

ESTRES OXIDATIVO:

El estrés oxidativo se ha definido como una alteración en el estado de equilibrio del sistema prooxidante y el antioxidante de las células. Esta definición implica que aquellas células que tienen este sistema pro/antioxidante normal, continuamente generan y detoxifican oxidantes durante el metabolismo aeróbico, pero cuando suceden procesos oxidativos adicionales, el sistema prooxidante desequilibra el sistema antioxidante, dañando lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos y conduciendo por último a la muerte celular por estrés oxidativo severo.³⁵

El daño oxidativo produce diversas alteraciones sobre las macromoléculas (Tabla 1). Cuando se dañan las proteínas se producen modificaciones en las actividades enzimáticas, en la permeabilidad de las membranas celulares y en la traducción de señales inter e intracelulares.

El daño a los lípidos se produce mediante la peroxidación lipídica, produciendo alteraciones en la homeostasis y en las membranas celulares.³⁶ Los peróxidos lipídicos, formados como consecuencia del daño en las membranas celulares, son inestables y descomponen formando una serie de compuestos entre ellos el más abundante malonildialdehído (MDA). Además cuando este aldehído se

acumula se une a las proteínas y otras macromoléculas, formando aductos con las bases del ADN que pueden ser mutagenicos.

El daño oxidativo en el ADN produce alteraciones genéticas, mutaciones, enfermedades autoinmunes y cáncer, el daño en el ADN mitocondrial está involucrado con los procesos de envejecimiento. Los carbohidratos sufren modificaciones de tipo redox, relacionados con la formación de cataratas o la diabetes.

Tabla 1. Lugar de daño producido por los radicales libres

LUGAR	DAÑO	CONSECUENCIA
ADN/ARN	Ruptura de anillo de desoxirribosa, daño de la base, ruptura de cadena.	Mutaciones, errores en traslación, inhibición en la síntesis de proteínas.
PROTEINAS	Agregación y entrelazamiento, fragmentación y ruptura de grupo tiol	Transporte de iones modificado, incremento de flujo de calcio, actividad enzimática modificada.
LIPIDOS	Perdida de instauración, formación de metabolitos reactivos (MDA)	Alteración en la fluidez de lípidos, Alteración de permeabilidad de membrana, Efectos sobre las enzimas unidas a las membranas.

Fuente: *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology Techniques In Free Radical Research.*³⁶

Un estrés oxidativo ligero o crónico modificaría el sistema antioxidante por inducción o inhibición de las proteínas que participan en estos sistemas antioxidantes de defensa o disminuiría la reserva celular de materiales antioxidantes como el glutatión y la vitamina E. Un estrés oxidativo ligero

conduciría a una apoptosis, mientras que un estrés oxidativo severo conduce a la muerte celular por necrosis.³²

Los antioxidantes son esencialmente importantes para el organismo por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo.³⁷

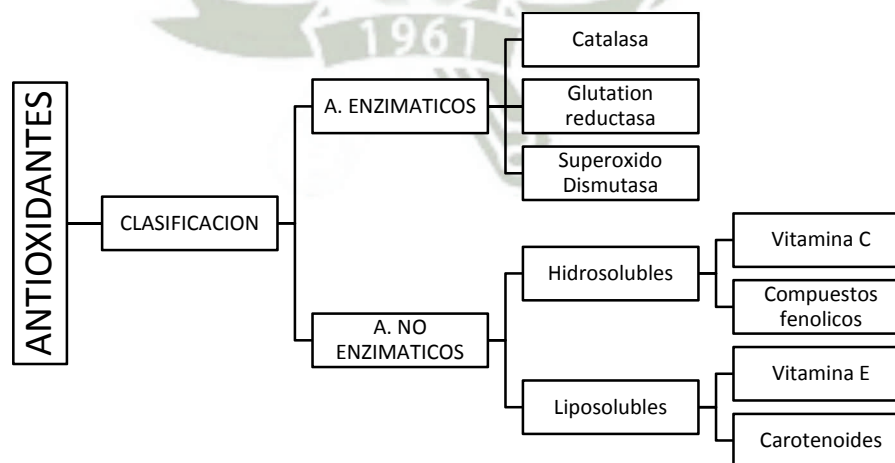
3. ANTIOXIDANTES

Una definición amplia para el término antioxidante es una sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con el sustrato puede evitar o prevenir significativamente la oxidación del mismo.^{38, 39, 14} Los antioxidantes son compuestos que experimentan fácilmente la oxidación para formar radicales libres, que luego no son suficientemente reactivos para llevar a cabo la reacción en cadena.^{31, 34}

Así por ejemplo, entre los compuestos de origen natural se encuentran: carotenoides, vitaminas C y E, tocoferoles, flavonoides, entre otros.⁴⁰ Estos tienen una alta capacidad antioxidante y son abundantes en frutas y vegetales, se ha demostrado que existe una relación entre su consumo y la incidencia en diversas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares y cáncer.⁴¹

3.1. Clasificación

Tabla 2. Clasificación de antioxidantes



3.1.1. Antioxidantes endógenos o enzimáticos

- Catalasa: Una hemoproteína citoplasmática que cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O y O_2 .
- Glutación peroxidasa (GSH-Px): cataliza la reducción de H_2O_2 y peróxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes por la conversión de glutación reducido a oxidado.
- Glutación reductasa (GSH-Rd): es una flavoproteína dependiente de NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido) y recupera el glutación reducido.
- Superoxido desmutasa: Cataliza la dismutación del radical peróxido en H_2O_2 y O_2 en la presencia de protón H^+ .

3.1.2. Antioxidantes exógenos o no enzimáticos

- Hidrosolubles:

VITAMINA C: esencial para el funcionamiento normal de las células vivas y participa en muchas reacciones enzimáticas.

El ácido ascórbico (Figura 4), antioxidante que detiene la descomposición por oxidación.³⁴ Es un inhibidor de radicales libres presentes en los sistemas biológicos.³¹ Se puede encontrar en frutas y verduras.⁴²

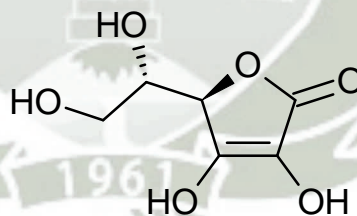


Figura 4. Estructura de ácido ascórbico (vitamina C)

- Liposolubles:

VITAMINA E: El α -tocoferol (figura 5) es el ejemplo más común de inhibidor de radicales presentes en los sistemas biológicos.

³¹Actúa como antioxidante previniendo la peroxidación lipídica.⁴³

La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites

de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas.⁴²

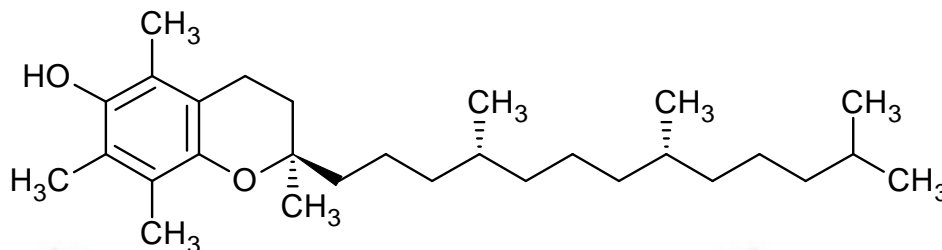


Figura 5. Estructura de α - tocoferol (Vitamina E)

CAROTENOIDES: Los carotenoides son un amplio grupo de compuestos con diferentes estructuras y acciones biológicas. Son absorbidos y metabolizados de diferente manera. Como resultado, los carotenoides pueden competir o actuar sinérgicamente o con otros componentes en los alimentos. Esta diversidad hace difícil la tarea de descubrir el mecanismo exacto para cada uno y relacionarlo con su potencial benéfico en diferentes enfermedades.^{42, 44}

3.2. Mecanismo de acción

Los antioxidantes pueden actuar en diferentes niveles en el proceso oxidativo por lo cual se han clasificado en primarios, secundarios y terciarios:

- i. Primarios: Evitan la formación de radicales libres, actúan en fase de iniciación, frenan la reacción en cadena de radicales libres, especialmente de las especies reactivas de oxígeno (ERO) o son quelantes de metales de transición. Se comportan como captadores como es el caso de vitamina E, C, polifenoles o enzimas antioxidantes, con lo que indirectamente reducen el daño en el ADN y en membranas.
- ii. Secundarios: Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las especies reactivas de oxígeno. De este modo,

inhiben la generación de ERO, impidiendo la activación metabólica de carcinógenos.

- iii. Terciarios: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellas que se han estropeado. Modifican el potencial redox sobre todo los antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C o polifenoles. El estado redox regula la actividad de muchos factores de transcripción y puede tener un efecto positivo mejorando la eficiencia de la reparación del ADN.³²⁻³⁵

3.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Estos mecanismos son adecuados frente a la vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides.

Los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y aceitunas (polifenoles). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto y té.⁴²

La capacidad antioxidante de la oleuropeína y otros fenoles se han estudiado utilizando diferentes métodos.⁴¹ Estos se basan en la medición de la capacidad antioxidante mediante reacciones químicas que pueden dividirse en dos categorías:

- i. Transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) que mide la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrogeno.

- ii. Transferencia de electrones individuales (ET) que mide la capacidad de reducción de un oxidante (que cambia de color) por la acción de un antioxidante. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración en la muestra determinada⁴⁵

4. COMPUESTOS FENOLICOS

Los compuestos fenólicos son aquellos que tienen en su estructura uno o más grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. El fenol (Figura 6) es la estructura base, el anillo aromático al que se une es el benceno. Debido al anillo aromático, el hidrógeno del hidroxilo fenólico es lábil, lo que hace a los fenóles ácidos débiles.¹⁵

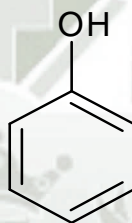


Figura 6. Estructura de fenol

Los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios de las plantas. Más de 8000 diferentes compuestos han sido identificados y están ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal.⁴⁶

La naturaleza, la síntesis y distribución de compuestos fenólicos vegetales pueden variar significativamente y depende de las especies de plantas, condiciones y tipo de tejido en crecimiento. La principal vía de síntesis es por medio del ácido shikímico, fenilpropanoides y vías de biosíntesis de flavonoides.

Se pueden clasificar por el número y la disposición de sus átomos de carbono, son generalmente conjugados con azúcares y ácidos orgánicos, y pueden agruparse en flavonoides y no flavonoides.³⁶

Las aceitunas contienen polifenoles como la oleuropeína, hidroxitirosol y tirosol, rutina, quercetina, ácido cafeico, vanílico, y cumárico, todos con excelentes propiedades antioxidantes.⁴⁷ Los polifenoles presentes en el alpechín aparecen en proporciones que van desde 0,1% a 0,3%, dependiendo de la variedad, la madurez, y la preparación de la aceituna.^{14, 46}

Los compuestos fenólicos se encuentran en cantidades relativamente grandes en las aceitunas, en particular oleuropeína, un glucósido que da lugar a la mayor parte de fenoles en la aceituna. Por acción enzimática los glucósidos se transforman en moléculas menos complejas, llamada agluconas (ésteres) y fenoles simples.⁴⁶

TIROSOL E HIDROXITIROSOL: Estos dos compuestos son análogos de fenoles simples y son importantes constituyentes de la aceituna, poseen propiedades anticancerígenas, cardiovasculares y antioxidantes.⁴⁰

Hidroxitirosol (figura 7) posee marcada actividad antioxidante y es un buen eliminador de radicales libres. Protege eficazmente contra el deterioro inducido por el estrés oxidativo, previene el daño de ADN expuesto a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se ha demostrado que tienen efectos anticancerígenos.^{47, 48} Inhibe significativamente la oxidación de los lípidos y tiene un efecto positivo en la salud.⁴⁶

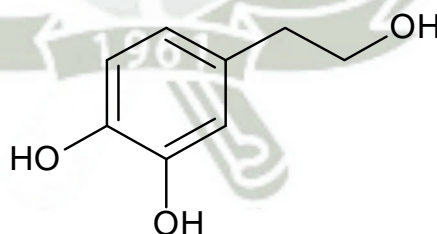


Figura 7. Estructura de hidroxitirosol

OLEUROPEINA: Presente como glucósido esterificado, se le atribuye propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorios.^{45,46}

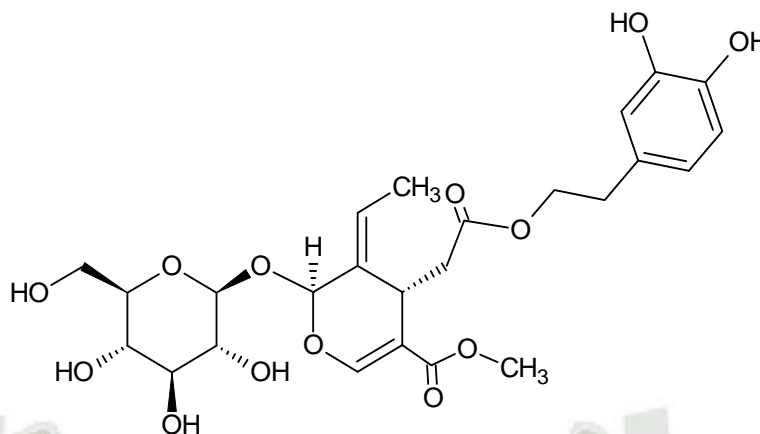


Figura 8. Estructura de oleuropeina

Numerosos estudios se han centrado en las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos extraídos del alpechín ya que son una fuente asequible y abundante de sustancias biológicamente activas con un potencial benéfico para la salud.^{28, 16}

4.1 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

En la actualidad, la calidad nutricional de muchos alimentos está garantizada por la presencia de compuestos antioxidantes como polifenoles que se encuentran en abundancia en plantas, frutas y verduras.³⁶

Los antioxidantes presentes en el cuerpo humano actúan como defensa frente a los radicales libres generados durante el metabolismo celular. La capacidad de polifenoles, flavonoides y otras moléculas para eliminar los radicales libres está conectada a la especificidad de su estructura química resultante de la presencia de anillos aromáticos.⁵²

Cuando estos compuestos reaccionan con un radical libre el electrón desapareado del radical se neutraliza a través de la deslocalización sobre el anillo aromático. El electrón capturado se estabiliza por el efecto de resonancia del núcleo aromático provocando la terminación de la reacción en cadena de

radicales libres. Hay que subrayar que los compuestos polifenólicos inhiben la oxidación por medio de una variedad de mecanismos.⁴⁹⁻⁵³

El potencial redox de polifenoles les permite actuar como donadores de electrones y como donadores de hidrógeno frente a los radicales libres. La estabilización del radical es posible debido a la unión intramolecular de los puentes de hidrogeno.

Las especies reactivas del oxígeno son productos en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y el metabolismo.⁴⁹

Los polifenoles presentes en las hojas de olivo han mostrado importante poder antioxidante, anti-inflamatorio, anti-aterogénico y la actividad antimicrobiana, e incluso efecto anticancerígeno.⁵⁰ De acuerdo a diferentes estudios los compuestos fenólicos (hidroxitirosol) presentan efectos beneficios^{51, 17} frente a enfermedades crónicas y degenerativas.⁵⁴

En relación a estos efectos protectores, se pueden resaltar la reducción de la peroxidación de los fosfolípidos en liposomas, la protección frente a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, la reducción del daño oxidativo de los eritrocitos, la inhibición de la agregación plaquetaria y su participación en la síntesis de tromboxanos en las células humanas y la inhibición en el cambio en las bases del ADN producidas por peroxinitritos, asociadas a su contenido en oleuropeína.^{51, 55}

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La parte experimental se llevó a cabo en la Universidad Católica de Santa María, en los laboratorios H-104 y H-103.

2. MATERIALES

2.1. Muestras

Las muestras de alpechín son procedentes de Yauca, Caraveli y de Ilo, Moquegua.

2.2. Reactivos

Acetato de etilo P.A (MERCK)

Folin –Ciocalteu P.A (MERCK)

Carbonato de sodio P.A (SIGMA ALDRICH)

Acido Gálico P.A (SIGMA ALDRICH)

Neocuproína P.A (SIGMA ALDRICH)

Cloruro de Cobre P.A (MERCK)

Acetato de amonio P.A (MERCK)

Etanol 96° P.A (DELTA QUIMICA)

Trolox P.A (SIGMA ALDRICH)

DPPH P.A (CALBIOCHEM)

Acetato de plomo P.A (MERCK)

Cloruro férrico P.A (SIGMA ALDRICH)

Gelatina

Cloruro de sodio P.A (MERCK)

2.3. Material De Vidrio

Embudo de decantación

Vaso de precipitado 25, 50 y 100mL

Probeta 25 y 100mL

Pipetas 2 y 10 mL

Embudo

Tubos de ensayo

Varilla

Micropipeta 25 – 250 uL

Micropipeta 100 – 1000 uL

2.4. Otros

Gradilla

Vortex

Cubetas

2.5. Equipos

Balanza analítica Ohaus Adventurer

Potenciómetro Jenway

Centrifuga Centra CL2 Thermo IEC

Espectrofotómetro UV-160SA Shimadzu

3. MÉTODOS

Obtención de las muestras

La muestra 1 se obtuvo del distrito de Yauca, provincia de Caravelí y la muestra 2 se obtuvo de Ilo, Moquegua. Las muestras fueron rotuladas y posteriormente refrigeradas hasta su utilización.

Determinación cualitativa de compuestos fenólicos

Se realizó diferentes pruebas cualitativas para comprobar si las muestras contenían componentes fenólicos.

Prueba de Acetato de Plomo: se basa en la precipitación de los compuestos fenólicos por la presencia de acetato de plomo formando un precipitado de color gris.⁵⁶

Prueba con cloruro férrico: se basa en la formación de complejos en la presencia de cloruro férrico al 5%.

Prueba de gelatina-sal: se fundamenta en el hecho de que los taninos precipitan proteínas. Se agregó gota a gota la solución de gelatina-sal a la muestra. Si se evidencia turbidez indicaría un resultado positivo.^{57,58}

Preparación de las muestras

La muestra se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm, se eliminó el sedimento y se trabajó con el sobrenadante.

Para la extracción se trabajó con acetato de etilo en proporción 1:1 obteniéndose dos fases, fase acuosa (ACU) y fase de acetato (ACE) para las diferentes muestras, siendo el acrónimo 1ACU para la fase acuosa de la muestra proveniente de Yauca, 2ACU correspondiente a la fase acuosa de la muestra proveniente de Ilo, y de igual manera para las muestras 1 ACE y 2 ACE.



Figura 9. Muestras rotuladas (acuoso 1 y 2, acetato 1 y 2)

3.1. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

Para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT), se usa el método colorimétrico de Folin- Ciocalteu. Este método se basa en la

reducción del reactivo, que es una mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico a una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno. La oxidación de los fenoles presentes causa la aparición de una coloración azul en la muestra que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 765 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fenoles en la muestra.⁵⁹

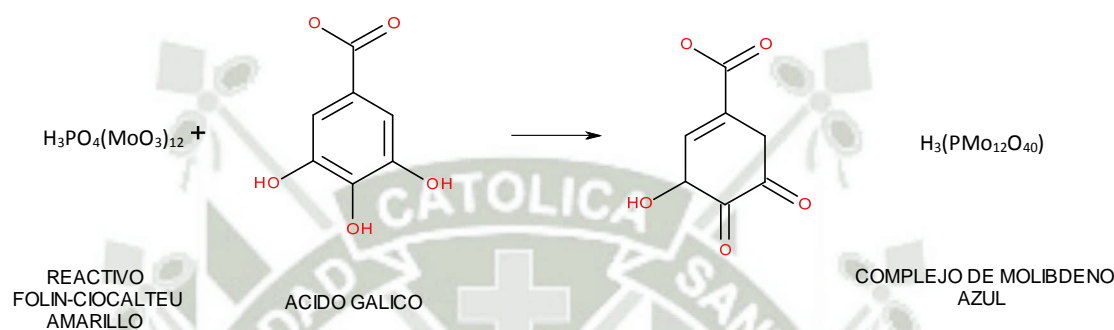


Figura 10. Reacción de Folin-Ciocalteu

Curva de calibración:

Se disolvió 100 mg de ácido gálico en 10 mL de etanol, se llevó luego a un volumen de 100 mL con agua destilada, obteniéndose una solución madre de 1000 ppm. A partir de esta solución se prepararon 5 estándares (St) de diferentes concentraciones en un rango entre 50 – 800 ppm.

El procedimiento de preparación de estándares se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de estándares (CFT)

	St1	St2	St3	St4	St5
Solución patrón de ácido gálico (mL)	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
Agua destilada (mL)	9.5	9.0	8.0	6.0	2.0
Concentración (ppm)	50	100	200	400	800

Se tomó 0.1 mL de cada solución y se diluyó con 3.4 mL de agua destilada y con 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Se agitó para homogenizar y después de 3 minutos se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20% (Na_2CO_3), se dejó reposar por 60 minutos en la oscuridad.

Los estándares fueron medidos a una longitud de onda de 765 nm por espectrofotometría.

Ensayo con muestras

Se tomó 1 mL de cada muestra y se llevó a un volumen de 10 mL. De estas soluciones se tomaron 0.1 mL se adicionaron 3.4 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de homogenizar y dejar en reposo por tres minutos, se adicionó 1 mL de la solución de carbonato de sodio al 20%. Pasado 60 minutos las muestras fueron leídas a 765 nm por espectrofotometría. Este procedimiento se realizó por triplicado.

El esquema del procedimiento se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Procedimiento para Folin-Ciocalteu

	1ACU	2ACU	1ACE	2ACE
Muestra (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
Agua destilada (H_2O) (mL)	3.4	3.4	3.4	3.4
Reactivo Folin – Cioucalteu (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
Carbonato de sodio al 20% (Na_2CO_3) (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0

3.2. Determinación de Actividad antioxidante por el método CUPRAC

El método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) está basado en la reducción de Cu^{+2} en la presencia de neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) para reaccionar con el compuesto en estudio formando un

quelato coloreado de Cu^{+1} : $[\text{Cu-Nc}_2]^{+1}$, el cual es soluble en agua y en medios orgánicos. Esta reacción se lleva a cabo a pH 7, controlado por el buffer acetato de amonio. El quelato formado con el cobre reducido es medido a 450 nm. Normalmente, la formación de este complejo se completa en 30 minutos.^{60, 61}

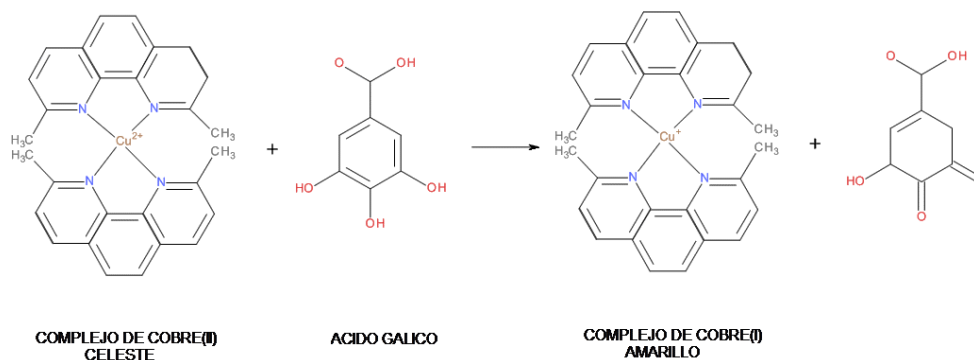


Figura 11. Reacción de CUPRAC

Curva de calibración

Se disolvió 100 mg de ácido gálico en 10 mL de etanol, se llevó luego a un volumen de 100 mL, obteniéndose una solución madre de 1000 ppm. A partir de esta solución se prepararon 5 estándares (St) de diferentes concentraciones en un rango entre 2 - 12.5 ppm.

Se tomó 0.1 mL de cada solución de estándar preparado, se adicionó 1 mL de agua destilada, 1 mL de buffer de acetato de amonio (NH_4OAc), 1 mL de neocuproína y 1 mL de cloruro de cobre (CuCl_2), se homogeniza y se deja reposar por 30 minutos. Los estándares fueron medidos a una longitud de onda de 450 nm por espectrofotometría.

Ensayo con muestras

Se hicieron las diluciones correspondientes tanto para las muestras acuosas como para las muestras de acetato. Se tomó 0.1 mL de muestra, se adicionó 1 mL de agua destilada, 1 mL de buffer de acetato de amonio (NH_4OAc), 1 mL de neocuproína y 1 mL de cloruro de cobre (CuCl_2). Se homogeniza y

se deja reposar. Pasado 30 minutos las muestras fueron leídas a 450 nm por espectrofotometría. Este procedimiento se realizó por triplicado.

El esquema del procedimiento se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Esquema del procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método CUPRAC

	1ACU	2ACU	1ACE	2ACE
Muestra (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
Agua destilada (H ₂ O) (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
Neocuproina (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
Cloruro de cobre (CuCl ₂) (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
Buffer acetato de amonio (NH ₄ OAc) (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0

3.3. Determinación de Actividad antioxidante por el método DPPH

Este método se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo para reaccionar con donadores de hidrogeno. El radical DPPH absorbe luz a una longitud de onda de 517 nm, generando un producto incoloro o amarillo pálido en la presencia de un antioxidante. De esta forma mide la disminución de la absorbancia de una solución estable. Se utiliza el método establecido por Brand- Williams et al modificado.^{62, 63}

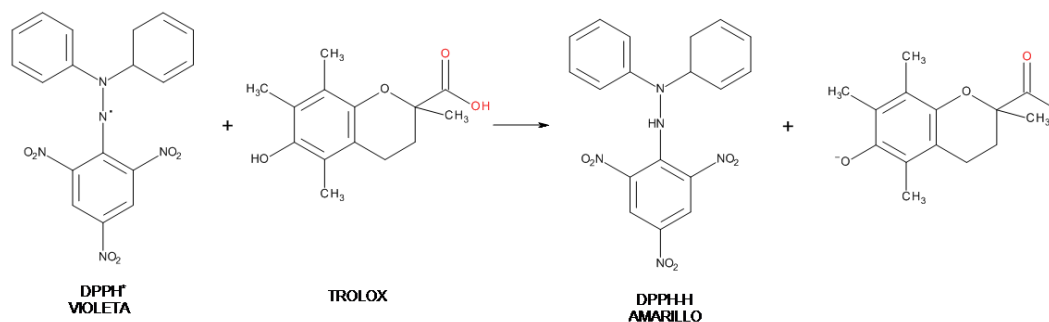


Figura 12. Reacción DPPH

Curva de calibración

Preparación de solución de reactivo Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico)

Se disolvió 12.53 mg de reactivo Trolox en 10 mL de etanol, se llevó luego a un volumen de 50 mL, obteniéndose una solución madre de 1 mM. A partir de esta solución se prepararon 5 estándares (St) de diferentes concentraciones en un rango entre 200 y 1000 μM .

Tabla 6. Preparación de estándares de Trolox

	St1	St2	St3	St4	St5
Solución de Trolox (mL)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Etanol (mL)	4.0	3.0	2.0	1.0	-
Concentración (μM)	200	400	600	800	1000

Preparación de solución de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Se pesó 4.8 mg de reactivo y se disolvió en 100 mL de etanol, obteniéndose una solución de DPPH con una concentración de 120 mM.

Se tomó 0.05 mL de cada estándar preparado, se adicionó 1 mL de solución de DPPH y 1 mL de etanol. Pasado 30 minutos en oscuridad, las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 517 nm por espectrofotometría.

Ensayo con muestras

Se hicieron las diluciones correspondientes tanto para las muestras acuosas como para las muestras de acetato. De estas soluciones se tomaron 0.05 mL, se adicionó 1mL de solución de DPPH y 1 mL de etanol. Se homogeniza y se deja reposar en la oscuridad. Pasado 30 minutos las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 517 nm por espectrofotometría. Este procedimiento se realizó por triplicado. El procedimiento se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Esquema del procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

	1ACU	2ACU	1ACE	2ACE
Muestra (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05
Solución de DPPH 120mM (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
Etanol 96° (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5

3.4. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa EXCEL y MINITAB 17, se realizó una prueba de ANOVA con un nivel de significancia al 95% ($p < 0.05$) también se realizó un estudio *post hoc*, para hallar la relación entre la actividad antioxidante y los componentes fenólicos se realizó una prueba de correlación (Pearson).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

En esta investigación se evaluó la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las muestras de alpechín, ya sea en la muestra 1 (Yauca) o en la muestra 2 (Ilo) en sus diferentes fases (acuosa y acetato) mediante métodos espectrofotométricos.

La muestra proveniente de la provincia de Yauca, Caravelí se obtuvo de la “Olivícola Don Jose” que para el proceso de extracción de aceite de oliva usa el método tradicional o de presión en discontinuo. Las aceitunas que se usaron para la elaboración del aceite, fueron aceitunas botija cosechadas en los meses de enero a abril del presente. De igual manera la muestra proveniente de Ilo, Moquegua se obtuvo de la empresa Frutoleg que utiliza el método tradicional para la extracción del aceite, las aceitunas utilizadas para esta extracción fueron aceitunas botija cosechadas los meses de enero a mayo.

La muestra 1 (Yauca) se obtuvo en el mes de Abril y la muestra 2 (Ilo) se obtuvo el mes de Mayo. Estas muestras fueron almacenadas en refrigeración hasta su análisis. Ambas muestras contenían pequeñas cantidades de productos insolubles que se encontraban en la superficie del líquido, es por ello que se centrifugó y se trabajó solamente con el sobrenadante, eliminándose el sedimento que correspondía a restos de aceituna entre ellos cascara, pulpa y semilla.

Las características organolépticas y valor de pH de las muestras se observan en la Tabla 8, ambas muestras presentan características de pH, color y olor relacionados a los reportados por otros investigadores como Dermeche, Cassano o Mekki.^{8, 29,5} Se encuentran similitud en los resultados comparándose a estudios realizados por Capitan (4.5 – 5) y Khayer (4.7 – 7).^{2, 67} estudios realizados en países de zonas mediterráneas como España y Grecia. El valor promedio de pH de las muestras 4.8.

Tabla 8. Características fisicoquímicas y organolépticas de las muestras de alpechín

	MUESTRA 1	MUESTRA 2
Color	Rojizo	Negrusco
Olor	Característico a aceite de oliva	Característico a aceite de oliva
pH	4.73	4.88

Se realizó la determinación cualitativa de los compuestos fenólicos para verificar que en la muestra había la presencia de dichos compuestos, para así después con los resultados obtenidos realizar las pruebas cuantitativas correspondientes.

Estos métodos se fundamentan en la precipitación de los grupos hidroxilo de las muestras en la presencia de compuestos como acetato de plomo o cloruro férrico.

Prueba con acetato de plomo: Se obtiene un precipitado color grisáceo casi inmediato con el reactivo, dando un resultado positivo. Se observa en la Figura 13 el resultado positivo de las muestras A y B frente a muestras sin reactivo C y D.

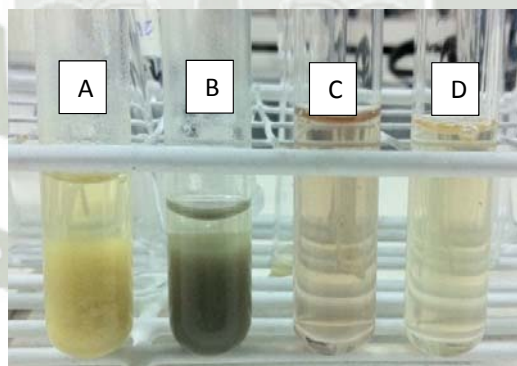


Figura 13. Prueba positiva de acetato de plomo A y D (Yauca), B y C (Ilo)

Prueba de cloruro férrico: Se observan precipitados y cambio de coloración en las muestras, estos cambios se observan en la Figura 14, esta precipitación nos da un

resultado positivo indicando así la presencia de compuestos fenólicos. La formación de una coloración roja, azul, verde, o púrpura indica la presencia de fenoles.⁶⁸



Figura 14. Prueba positiva de cloruro férrico

A. muestra 1 “Yauca” en comparación con muestra precipitada,

B. muestra 2 “Ilo” en comparación con muestra precipitada)

Prueba de gelatina – sal: Se preparó la solución gelatina-sal al 1% y se agregó gota a gota a las muestras 1 y 2, no se evidenció ningún cambio, para verificar el resultado negativo de esta reacción se procedió a la saturación de las muestras confirmando así el resultado.

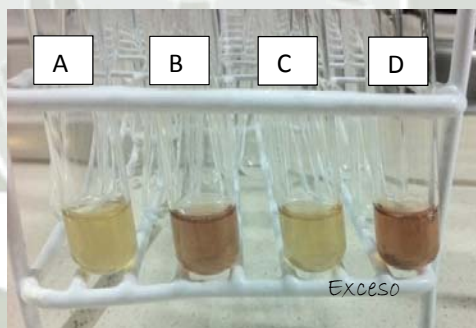


Figura 15. Prueba negativa de gelatina-sal

(A y C “Yauca”, B y D “Ilo” muestras en comparación con exceso de solución de gelatina-sal)

Posteriormente se realizó la extracción con acetato de etilo, solvente de polaridad intermedia comúnmente empleado para extraer compuestos fenólicos, separando dos fases: acuosa y acetato. La proporción que se utilizó fue de 1:1. Realizándose tres particiones.



Figura 16. Extracción con acetato de etilo

Sin embargo, se observa que diferentes autores utilizan diferentes solventes como hexano, acetato de etilo, etanol o combinaciones de ellos para la extracción de compuestos fenólicos en diferentes muestras, dando como resultado que el solvente más apropiado para la extracción de estos componentes fue etanol > acetato de etilo.

En los trabajos de investigación presentados por Allouche y De Marco usan una extracción líquido-líquido con acetato de etilo para la extracción de componentes fenólicos.^{69, 70} Fki encontró que entre solventes como dietil éter, butanona, el acetato de etilo era el que extraía la mayor cantidad de compuestos.⁷¹

3.1. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

Para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) en las muestras se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. Este método es usado mediante una técnica espectrofotométrica empleando ácido gálico como patrón.

En la Tabla 9 se observan los valores obtenidos en las diferentes mediciones, y también los datos obtenidos de su análisis estadístico de regresión lineal, obteniéndose un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9993, mientras más cercano a la unidad más cercano a la linealidad, por lo tal se escogió la siguiente ecuación:

$$y = 0.0008x + (-0.001)$$

Tabla 9. Absorbancias para grafico de calibración

cc (ppm)	Abs1	Abs2	Abs3
50	0.132	0.037	0.042
100	0.165	0.071	0.080
200	0.248	0.155	0.154
400	0.413	0.319	0.270
800	0.817	0.615	0.646
$y = ax + b$			
a	0.0009	0.0008	0.0008
b	0.0706	-0.001	0.0084
r ²	0.9967	0.9993	0.9911

Esta ecuación vincula las dos variables, dependiente “y” (Absorbancia) e independiente “x” (concentración de ácido gálico mg/L). Con una pendiente (a) de -0.001y un intercepto de (b) 0.0008. (Figura 17)

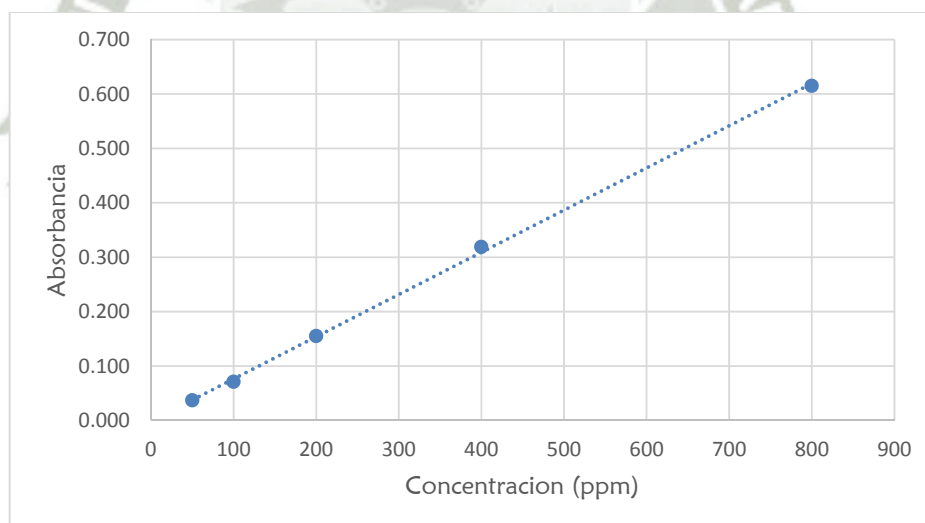


Figura 17. Gráfico de calibración para los Compuestos Fenólicos Totales

El contenido de compuestos fenólicos totales encontrados en las muestras se expresó como gramos de ácido gálico/L de muestra. En la Tabla 10 se muestran los valores de las concentraciones promedio y su error estándar encontrada a través de las absorbancias medidas (ver ANEXO I), se observa que las mayores concentraciones de CFT equivalentes en ácido gálico pertenecen a las muestras

acuosas y menores en las muestras de acetato. La máxima concentración promedio obtenida pertenece a la muestra 2ACU con 10.363 g GA/L \pm 0.435 perteneciente a Ilo.

El-Abbasi reportó un valor promedio de 9,8 g/L de contenido de polifenoles expresados en gramos de tirosol, valor que está en relación al encontrado,⁶⁴ así también Sassi reportó que en alpechín extraído por métodos tradicionales se encontraban mayor cantidad de contenido fenólico (11,50 g/L) en comparación con alpechín extraído por el método moderno de tres fases (7.0 g/L) esta variable en resultados se debe a la diferencia en método y también al lugar de procedencia de las muestras.

Sin embargo autores como Hanifi et al presentan valores que oscilan de 2 a 6 g/L esto se debe a la diferencia de lugar de la muestra recolectada y también a los procesos de extracción (tradicional y moderno)⁶⁵

Tabla 10. Concentraciones y error estándar de las muestras CFT

MUESTRA	CONC (g/L)	ESM
1ACU	10.225	0.304
2ACU	10.363	0.435
1ACE	1.300	0.088
2ACE	1.238	0.075

Valores promedio expresados en gramos de ácido gálico

Al realizar el análisis estadístico (Figura 18) encontramos diferencia significativa entre las muestras de fase acuosas y acetato, pero no existe diferencia significativa entre 1ACU y 2ACU o 1ACE y 2ACE.

Estos resultados nos indican que factores como lugar o tipo de suelo no alteraron el contenido fenólico, esto se podría deber a que tanto Yauca e Ilo pertenecen a una zona con características similares y que el tiempo de cosecha de aceitunas fueron parecidos, además que el sistema de extracción (tradicional) en ambas muestras no marcó diferencia.

También observamos que existe una notable diferencia de las concentraciones obtenidas entre ambas fases de las diferentes muestras, siendo las muestras pertenecientes a la fase de acetato (1 y 2) las que presentaban una menor concentración, esto se debería a que los compuestos fenólicos son compuestos hidrosolubles o polares y que después de la extracción solo componentes de bajo o mediano peso molecular se quedaron en esa fase y los demás pasaron a la fase acuosa, confirmando el hecho de que los componentes fenólicos se encuentran en mayor fracción en la fase acuosa.

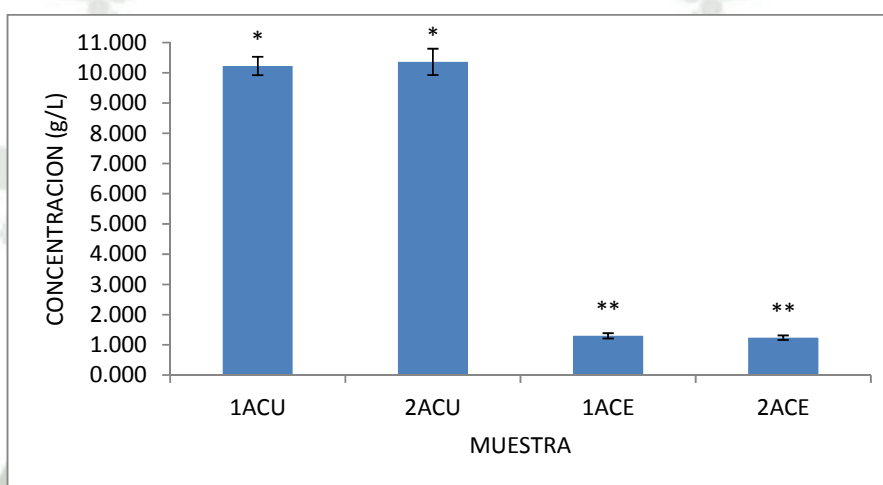


Figura 18. Contenido de compuestos fenólicos totales (*grupos iguales)

3.2. Determinación de Actividad Antioxidante por el método CUPRAC

El método CUPRAC está basado en la formación de un complejo coloreado, este color está en relación directa a la actividad antioxidante, es decir a mayor coloración mayor actividad antioxidante.

La coloración está directamente relacionada al contenido de compuestos fenólicos, a mayor intensidad en la coloración mayor será su contenido.



Figura 19. Complejo coloreado

En la siguiente tabla encontramos los datos obtenidos de las diferentes mediciones realizadas y también del análisis estadístico de regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9994 que sobrepasa el valor mínimo (0.995) indicándonos que posee una buena linealidad.

Tabla 11. Absorbancias para grafico de calibración para CUPRAC

Cc(ppm)	ABS1	ABS2	ABS3
2	0.130	0.123	0.125
5	0.316	0.324	0.320
7.5	0.479	0.487	0.485
10	0.639	0.670	0.663
12.5	0.832	0.850	0.845
$y=ax+b$			
a	0.0664	0.0692	0.0685
b	-0.0118	-0.0212	-0.0194
r^2	0.9983	0.9994	0.9993

En la Figura 20, se observa la recta obtenida, indicando que ambas variables dependiente e independientes están vinculadas. Obteniendo los valores de pendiente e intercepto, como se ve en la siguiente ecuación:

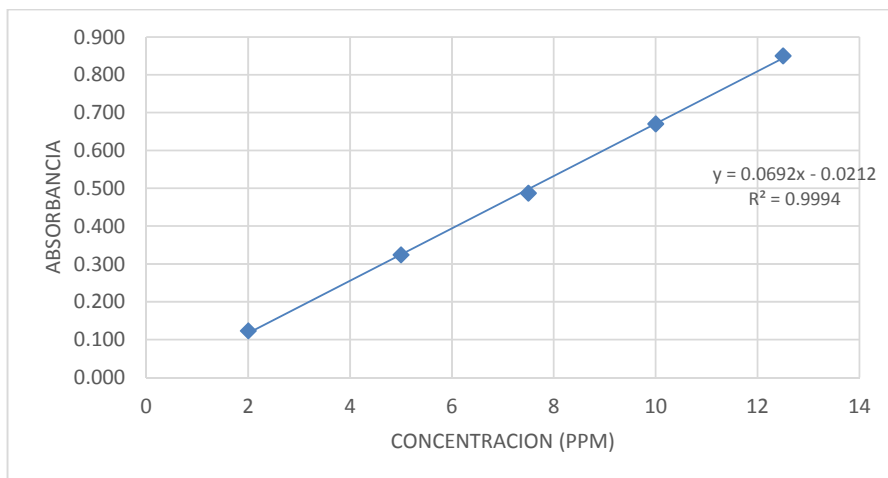


Figura 20. Gráfico de calibración CUPRAC

Se observa en la Tabla 12 que las mayores concentraciones equivalentes en ácido gálico para expresar la actividad antioxidante se encuentran en las muestras acuosas ya sea 1 o 2 y menores en las muestras de acetato. La máxima concentración promedio obtenida pertenece a la muestra 2ACU con 1.409 GAE/L \pm 0.0300 este resultado guardaría relación aparente con el resultado obtenido en contenido fenólico.

Tabla 12. Actividad Antioxidante por el método CUPRAC

MUESTRA	Conc (g/L) \pm ESM
1ACU	1.360 \pm 0.014
2ACU	1.409 \pm 0.030
1ACE	0.181 \pm 0.008
2ACE	0.083 \pm 0.002

Valores de promedios expresados en ácido gálico \pm Error estándar

Después de realizar el análisis estadístico se observa en la Figura 21 que no hay diferencia significativa entre las muestras acuosas (1ACU y 2ACU), pero si entre las fases de acetato, siendo la de menor actividad antioxidante 2ACE con el valor 0.083 g/L \pm 0.002 este resultado guarda relación con la extracción realizada con acetato de etilo en la cual en estas fases por tener menor cantidad de contenido fenólico se iba evidenciar una menor actividad antioxidante.

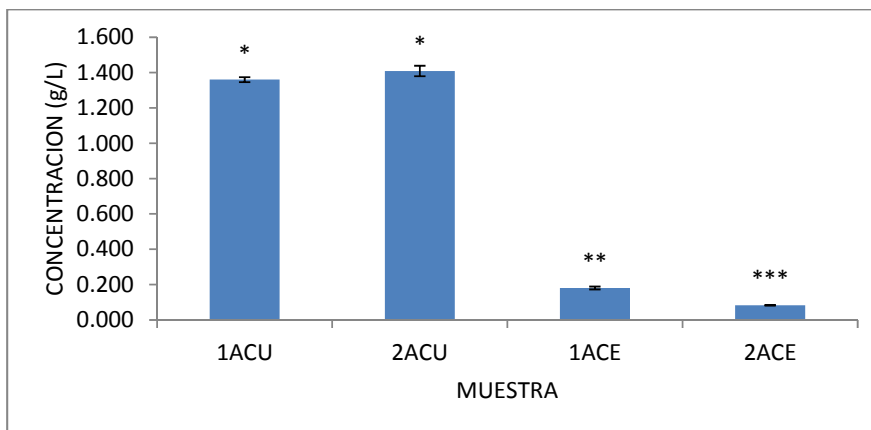


Figura 21. Actividad Antioxidante por método CUPRAC

3.3 Determinación de Actividad Antioxidante por el método DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el método DPPH, el cual utiliza el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo de color violeta que se decolora en la presencia de una sustancia antioxidante llegando al color amarillo, este cambio es medido espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancias se determina el porcentaje de captación o de inhibición (%INHIBICION).

Se preparó una solución patrón de Trolox de 1mM y una solución de DPPH de 120mM ambas muestras fueron preparadas en etanol y protegidos de la luz. Para la obtención del grafico de calibración se preparó soluciones a diferentes concentraciones a partir de la solución madre de Trolox, que reaccionó con el reactivo DPPH, para dar distintos valores de absorbancia, que pueden observarse en la siguiente tabla

Tabla 13. Absorbancias para DPPH

MUESTRAS	ABS1	ABS2	ABS3
200	0.688	0.707	0.707
400	0.570	0.576	0.570
600	0.464	0.444	0.450
800	0.365	0.316	0.323
1000	0.218	0.222	0.220
BLANCO	0.719	0.750	0.724

La actividad antioxidante es expresada como el porcentaje de inhibición o de captación del radical DPPH. En la siguiente tabla se observan los valores obtenidos reemplazando la fórmula dada a continuación:

$$\%INHIBICION = \left(1 - \frac{Ax}{Ab}\right) * 100$$

Dónde: Ax = Absorbancia de la muestra
 Ab = Absorbancia de solución a tiempo 0

En la Tabla 14 observamos los datos de la gráfica de calibración en porcentaje de inhibición convertidos usando la formula ya mencionada

Tabla 14. Datos de %INHIBICION para grafico de calibración

μM	%INHIBICION		
	ABS1	ABS2	ABS3
200	4.312	5.859	2.348
400	20.723	23.302	21.271
600	35.466	40.879	37.845
800	49.235	57.923	55.387
1000	69.680	70.439	69.613
$y = ax + b$			
a	0.0796	0.0819	0.0843
b	-11.892	-9.4541	-13.301
r^2	0.9956	0.9963	0.9979

En la Figura 22 se observa la recta obtenida del porcentaje de inhibición frente a la concentración, obteniéndose un valor de r^2 de 0.9979 cercano a la unidad, indicando linealidad, por lo tanto la ecuación con una pendiente (b) de -13.301 y un intercepto (a) de 0.0843 sirve de referencia para la realización de los cálculos correspondientes:

$$y = 0.0843x + (-13.301)$$

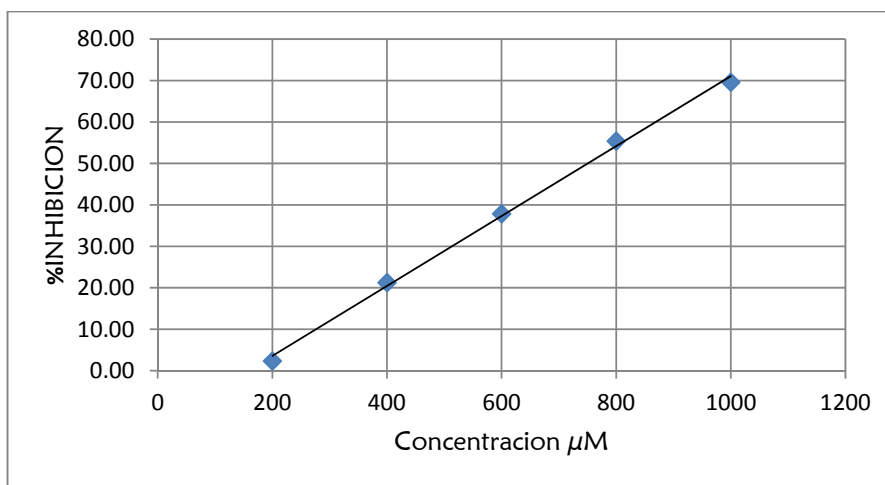


Figura 22. Gráfico de calibración de DPPH

Se observa en la Figura 23 como el color violeta propio de la solución de DPPH se va decolorando hasta llegar a un amarillo guardando una relación inversa con la actividad antioxidante, es decir a mayor coloración menor actividad antioxidante y a menor coloración mayor actividad antioxidante.



Figura 23. Decoloración de solución de DPPH en presencia de antioxidante

El porcentaje de inhibición indica la actividad antioxidante de la muestra, en la Tabla 15 se observa que la muestra 1ACU posee la actividad antioxidante más alta, este resultado no guardaría relación aparente con el contenido fenólico siendo la muestra 2ACU la que presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos, este

resultado se podría explicar a posibles interferencias que pueden dar un resultado positivo al momento de realizar el ensayo.

Tabla 15. Actividad antioxidante por el método DPPH

MUESTRA	%INHIBICION ± ESM
1ACU	38.400 ± 0.856
2ACU	21.930 ± 1.463
1ACE	9.025 ± 1.716
2ACE	2.288 ± 1.401

Valor promedio ± Error estándar

Observamos en la Figura 24 que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos las muestras, esta diferencia se puede deber al uso de acetato de etilo para su extracción que principalmente contiene fenoles de bajo y mediano peso molecular.

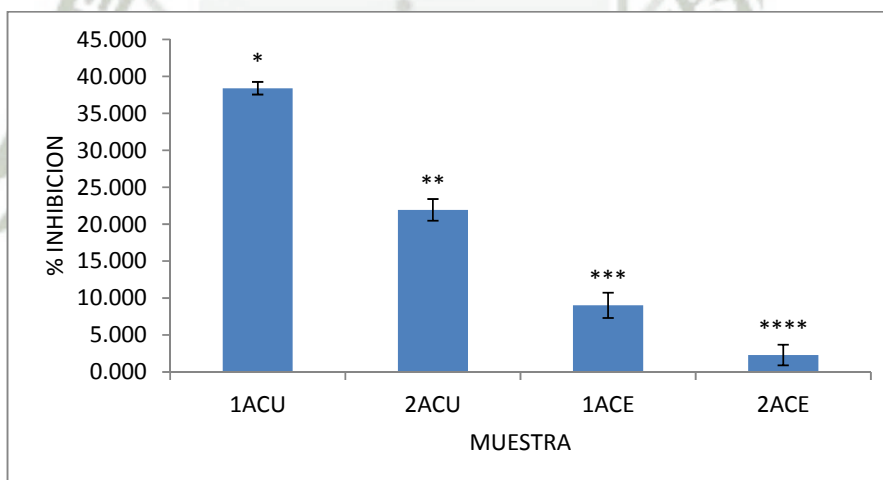


Figura 24. Actividad antioxidante por el método DPPH

En la Tabla 16 encontramos un cuadro que resume los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, vemos que ambas muestras Yauca e Ilo presentan compuestos fenólicos, también observamos que por distintos métodos (CUPRAC y DPPH) se observa mayor actividad antioxidante en la fase acuosa, también se

observa que la muestra 2ACE presentó los valores más bajos en cuanto a contenido fenólico y actividad antioxidante.

Tabla 16. Contenido de Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante del Alpechín

MUESTRA	CFT	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
	FOLIN-CIOCALTEAU	CUPRAC	DPPH
	CONC (g/L) ± ESM	CONC (g/L) ± ESM	%INH ± ESM
1ACU	10.225 ± 0.304 ^a	1.360 ± 0.014 ^a	38.400 ± 0.856 ^a
2ACU	10.363 ± 0.435 ^a	1.409 ± 0.030 ^a	21.930 ± 1.463 ^b
1ACE	1.300 ± 0.088 ^b	0.181 ± 0.008 ^b	9.025 ± 1.716 ^c
2ACE	1.238 ± 0.075 ^b	0.083 ± 0.002 ^c	2.288 ± 1.401 ^d

Valores promedio ± error estándar ($p < 0.05$).

Diferentes letras en el grupo indican diferencia significativa

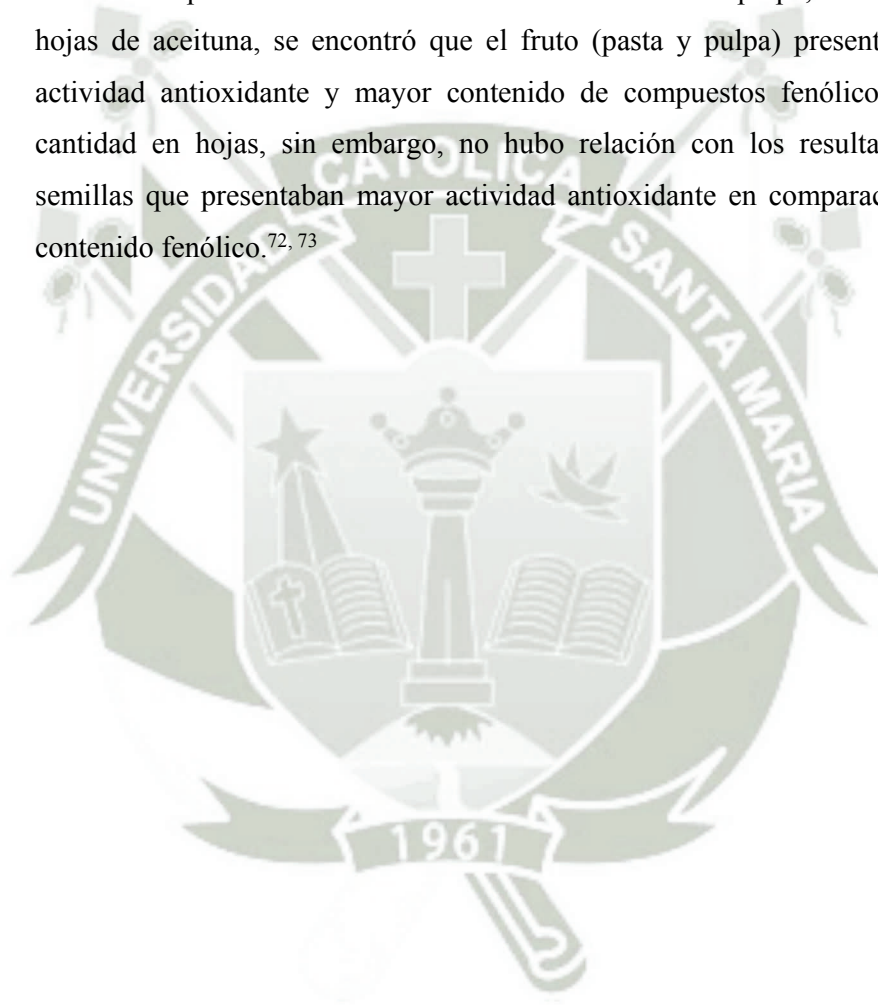
3.4 Determinación de la relación entre la actividad antioxidante y los componentes fenólicos

Se determinó si existe relación entre la actividad antioxidante y los componentes fenólicos del alpechín, mediante análisis estadístico hallando el coeficiente de correlación de Pearson, en este análisis si $r = 1$, existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.

- Actividad antioxidante por el método CUPRAC y compuestos fenólicos: si hubo relación ($r^2=0.999$)
- Actividad antioxidante por el método DPPH y compuestos fenólicos si hubo relación ($r^2=0.886$)

Estos resultados logran establecer una relación positiva. Sin embargo, existen publicaciones que reportan un comportamiento en el que la actividad antioxidante en el alpechín no está directamente relacionada con el contenido total de polifenoles cuando se trabaja con quimioluminiscencia (Atanassova et al) o en el trabajo presentado por Lafka en el que usando el método DPPH no se encuentra relación entre ambos.⁶⁶

En estudios para determinar la actividad antioxidante en pulpa, semilla, pasta y hojas de aceituna, se encontró que el fruto (pasta y pulpa) presentaba mayor actividad antioxidante y mayor contenido de compuestos fenólicos y menor cantidad en hojas, sin embargo, no hubo relación con los resultados de las semillas que presentaban mayor actividad antioxidante en comparación con el contenido fenólico.^{72, 73}

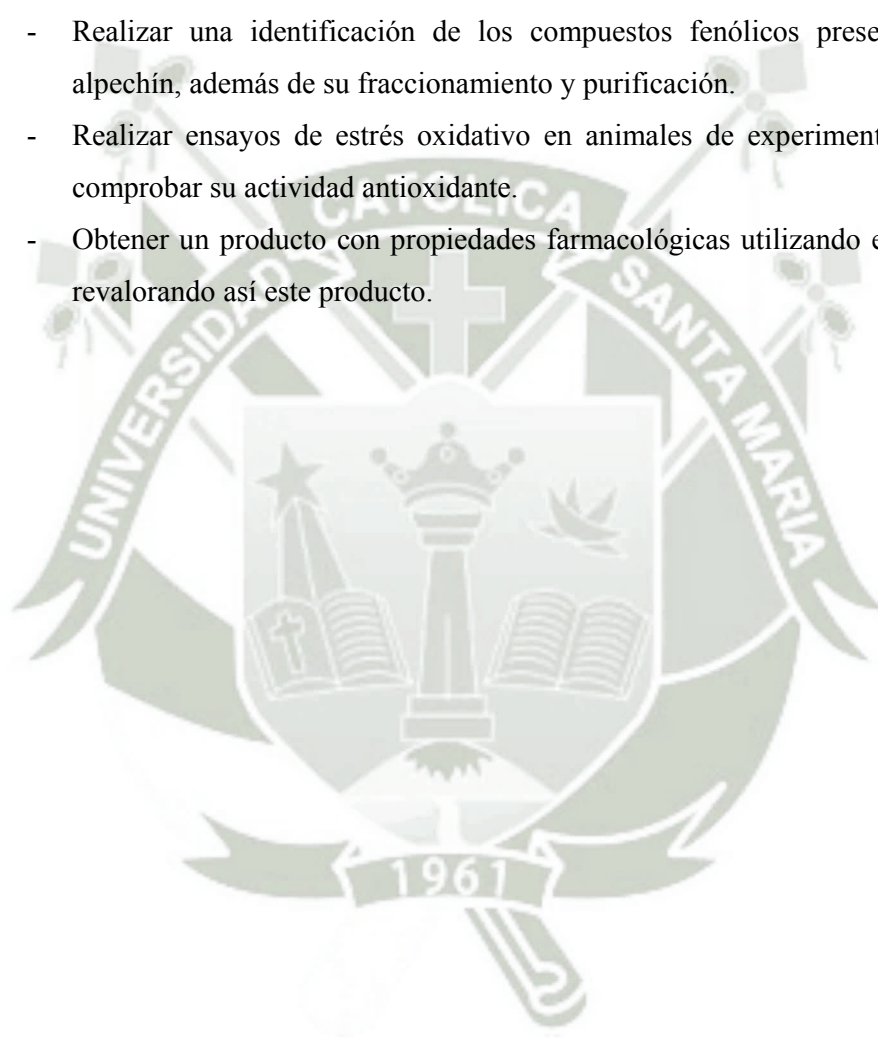


CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un extracto de alpechín con acetato de etilo obteniéndose dos fases: acuosa (ACU) y orgánica (ACE).
2. Se determinó el contenido fenólico presente en las muestras encontrándose los siguientes valores, para la muestra de Yauca: 10.225 ± 0.304 g/L (1ACU) y 1.300 ± 0.088 g/L (1ACE) y para la muestra proveniente de Ilo 10.363 ± 0.075 g/L (2ACU) y 1.238 ± 0.075 g/L (2ACE) expresados en gramos de ácido gálico.
3. Se demostró que las muestras presentan actividad antioxidante. Con el método CUPRAC se encontró mayor actividad antioxidante en las muestras de Ilo con valores para 2ACU de 1.409 ± 0.014 g/L y 2ACE de 0.181 ± 0.008 g/L y para las muestras de Yauca 1.360 ± 0.014 g/L para 1ACU y 0.083 ± 0.002 g/L para 1ACE. Con el método DPPH se encontró mayor actividad antioxidante en la muestra 1ACU de Yauca, con un porcentaje de inhibición de 38.400 ± 0.856 y para 1ACE 9.025 ± 1.716 , para las muestras de Ilo los porcentajes de inhibición fueron 21.930 ± 1.463 para la muestra 2ACU y 2.288 ± 1.401 para la muestra 2ACE.
4. Se estableció que existe relación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante para ambas muestras, con resultados de coeficiente de correlación de 0.999 para CUPRAC y 0.886 con el método DPPH.

RECOMENDACIONES

- Incluir aceitunas o aceite de oliva en la dieta ya que contienen demostrada acción antioxidante con efectos beneficios para la salud.
- Realizar una identificación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín, además de su fraccionamiento y purificación.
- Realizar ensayos de estrés oxidativo en animales de experimentación para comprobar su actividad antioxidante.
- Obtener un producto con propiedades farmacológicas utilizando el alpechín, revalorando así este producto.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. A. Ramos-Cormenzana, Bioremediation of Alpechin. *Intemational Biodeterioration & Biodegradation* 1995, pp 249-268.
2. Capitan, F. C., El Alpechin: Un problema mediterraneo. 1995, pp 141-154.
3. Angela Maria Rizzo, P. B., Stefania Zava, Gigliola Montorfano, Manuela Negroni, Paola Corsetto and Bruno Berra, Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Landes Bioscience and Springer Science. 2010.
4. Loft, P. M. a. S., The Role of Antioxidants in the Prevention of Oxidative Damage to Nucleic Acids. In *Oxidative Damage to Nucleic Acids*, Cooke. Landes Bioscience and Springer Science. 2007.
5. Ali Mekki, A. D. a. S. S., Review: Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 2013, 2 (15).
6. El-Abbassi, A.; Kiai, H.; Hafidi, A., Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry* 2012, 132 (1), pp 406-412;
7. Meksi, N., Haddar, W., Hammami, S., Mhenni, M. F., , Olive mill wastewater: A potential source of natural dyes for textile dyeing. *Industrial Crops and Products* 2012, 40, pp 103-109;
8. Dermeche, S.; Nadour, M.; Larroche, C.; Moulti-Mati, F.; Michaud, P., Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 2013, 48 (10), pp 1532-1552.
9. Ben Sassi, A.; Boularbah, A.; Jaouad, A.; Walker, G.; Boussaid, A., A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry* 2006, 41 (1), pp 74-78.
10. Torrecilla, J. S., Phenolic Compounds in Olive Oil Mill Wastewater. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, pp 357 - 365.
11. Evagelia Tsagaraki, H. N. L., and Konstantinos B. Petrotos, Olive Mill Wastewater Treatment. pp 133-157

12. Ramos-Comerzana A, Monteoliva-Sánchez, M., Potencial Biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola. *Ars Pharmaceutica* 2000, 41 (1), pp 129-136
13. Silva, C. B. d. Aplicación directa de residuos de almazaras de dos fases en un olivar con riego localizado: Efectos en las propiedades edáficas y el cultivo. Universidad de Extremadura, 2009
14. Zbakh, H.; El Abbassi, A., Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. *Journal of Functional Foods* 2012, 4 (1), pp 53-65.
15. María T. Pozzi Ana J., F. C. M. y. A. H., Posibilidad de uso del Alpechín en Fertilización de Tierras Agrícolas. *Informacion Tecnologica* 2010, 21 (4), pp 117 - 123.
16. He, J.; Alister-Briggs, M.; Lyster, T. d.; Jones, G. P., Stability and antioxidant potential of purified olive mill wastewater extracts. *Food Chemistry* 2012, 131 (4), pp 1312-1321.
17. Mahmoud, M.; Janssen, M.; Haboub, N.; Nassour, A.; Lennartz, B., The impact of olive mill wastewater application on flow and transport properties in soils. *Soil and Tillage Research* 2010, 107 (1), pp 36-41.
18. Hanifi, S.; Hadrami, I., Phytotoxicity and fertilising potential of olive mill wastewaters for maize cultivation. *Agronomy for Sustainable Development* 2008, 28 (2), pp 313-319.
19. Luca Martirani, P. G., Liberato Marzullo, Giovanni Sannia, Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *pleurotus ostreatus*. *War. Res.* 1996, 30 (8), pp 1914-1918.
20. Perez, T, R., Moreno, J. Martinez, Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1992, II, pp 489-495.
21. Acquaviva, R.; Di Giacomo, C.; Sorrenti, V.; Galvano, F.; Santangelo, R.; Cardile, V.; Gangia, S.; D'Orazio, N.; Abraham, N. G.; Vanella, L., Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International journal of oncology* 2012, 41 (1), pp 31-38.

22. Jemai, H., Sami Sayadi, Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, 14 (4).
23. Yangui, T.; Dhouib, A.; Rhouma, A.; Sayadi, S., Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry* 2009, 117 (1), pp 1-8.
24. Obied, H. K. B., D. R., Jr.; Prenzler, P. D.; Robards, K., Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2007, 45 (7), pp 1238-1248.
25. Aunon-Calles, D.; Canut, L.; Visioli, F., Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2013, 55, pp 498-504.
26. Kallel, M.; Belaid, C.; Mechichi, T.; Ksibi, M.; Elleuch, B., Removal of organic load and phenolic compounds from olive mill wastewater by Fenton oxidation with zero-valent iron. *Chemical Engineering Journal* 2009, 150 (2-3), pp 391-395.
27. Odiatou, E. M.; Skaltsounis, A. L.; Constantinou, A. I., Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Cancer letters* 2013, 330 (1), pp 113-121.
28. Ramos, P.; Santos, S. A. O.; Guerra, Â. R.; Guerreiro, O.; Felício, L.; Jerónimo, E.; Silvestre, A. J. D.; Neto, C. P.; Duarte, M., Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Industrial Crops and Products* 2013, 46, pp 359-368.
29. Cassano, A.; Conidi, C.; Giorno, L.; Drioli, E., Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of hazardous materials* 2013, 248-249, pp 185-93.

30. Muktadirul Bari Chowdhury, A. K. M.; Akrotos, C. S.; Vayenas, D. V.; Pavlou, S., Olive mill waste composting: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013, 85, pp 108-119.
31. Satyajit D. Sarker, L. N., *Chemistry for Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry*. John Wiley & Sons. 2007.
32. López, M. J. O. Calidad del aceite de oliva virgen extra antioxidantes y función biológica. UNIVERSIDAD DE GRANADA. 2005.
33. Pedriali, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. 2005.
34. Parsons A, *An Introduction to Free Radical Chemistry*. Wiley - Blackwell. 2000
35. Arrazola P, Díaz D., Capacidad antioxidante de cinco cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) y evaluación de su comportamiento en una matriz alimentaria. *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS*. 2013, 7 (2), pp 161-172.
36. Catherine A. Rice-Evans, A. T. D., Martyn C.R. Symons, *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology Techniques In Free Radical Research*. Elsevier Science Publishers. 1991(22).
37. Avalos Llano, Sonia C, Avanza, Jorge R., Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional.
38. Martinez Nieto, L.; Hodaifa, G.; Lozano Pena, J. L., Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness. *Journal of the science of food and agriculture* 2010, 90 (14), pp 2393-2398.
39. Vásquez A, Miranda I, garcía T, Martinez J, elena e. Stashenko. Actividad Antioxidante Y Contenido Total De Fenoles De Los Extractos Etanólicos De Salvia Aratocensis, Salvia Sochensis, Bidens Reptons Y Montanoa Ovalifolia. *Scientia et Technica Año XIII*, 2007, (33), pp 205 - 207.
40. Heo, B.-G., Park, Yun-Jum, Park, Yong-Seo, Bae, Jong-Hyang, Cho, Ja-Yong, Park, Kun, Jastrzebski, Zenon, Gorinstein, Shela, Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant. *Industrial Crops and Products* 2014, 56, pp 9-16.

41. Cioffi, G.; Pesca, M. S.; De Caprariis, P.; Braca, A.; Severino, L.; De Tommasi, N., Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry* 2010, *121* (1), pp 105-111.
42. Avello M, Suwalsky M,. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de accion. *Atenea* 2006.II (494). pp 161-172
43. Trease and Evans, *Pharmacognosy*. Elsevier.2009
44. Cardenas E, Lester P. *Handbook of antioxidants*.Marcel Dekker.2002.
45. Reşat Apak , Kubilay Güçlü , Birsen Demirata , Mustafa Özyürek , Saliha Esin Çelik ,Burcu Bektaşoğlu 1, K. Işıl Berker and Dilek Özyurt Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 2007(12), pp 1496-1527.
46. WILFRED VERMERRIS, R. N., *Phenolic compound biochemistry*. Springer: 2006; p 276.
47. Klaus W.J. Wahle, I. B., Dino Rotondo, and Steven D. Heys, Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Maria Teresa Giardi, G. R. a. B. B., Ed. Landes Bioscience and Springer Science.2010.
48. Lafka, T.-I.; Lazou, A. E.; Sinanoglou, V. J.; Lazos, E. S., Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry* 2011, *125* (1), 92-98.
49. Hagiwara, K.; Goto, T.; Araki, M.; Miyazaki, H.; Hagiwara, H., Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European journal of pharmacology* 2011, *662* (1-3), pp 78-84.
50. Simona Carmen Litescu, S. E. a. G. L. R., Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Maria Teresa Giardi, G. R. a. B. B., Ed. Landes Bioscience and Springer Science.2010.
51. Simona Carmen Litescu, S. E. a. G. L. R., Biosensors for the Determination of Phenolic Metabolites. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Maria Teresa Giardi, G. R. a. B. B., Ed. Landes Bioscience and Springer Science.2010.

52. Ilavarasi, K.; Kiruthiga, P. V.; Pandian, S. K.; Devi, K. P., Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 2011, 84 (7), pp 888-893.
53. Caballero, M. d. P. G. Nuevas propuestas de procedimientos analíticos sencillos para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en la fracción minoritaria del aceite de oliva. Universidad de Extremadura, 2013.
54. Herrero, M.; Temirzoda, T. N.; Segura-Carretero, A.; Quirantes, R.; Plaza, M.; Ibanez, E., New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A* 2011, 1218 (42), pp 7511-7520
55. Solà-Alberich, R.; Valls-Zamora, R. M.; Fernández-Castillejo, S.; Catalán-Santos, Ú.; Pedret-Figuerola, A.; Giralt-Batista, M.; Konstantinidou, V., ¿Los compuestos fenólicos ejercen sus efectos en nuevas vías o mecanismos que explicarían efectos cardiosaludables del aceite de oliva virgen? *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 2011, 23 (6), pp 275-277.
56. Hohtola, A., Bioactive Compounds from Northern Plants. In *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Maria Teresa Giardi, G. R. a. B. B., Ed. Landes Bioscience and Springer Science. 2010.
57. de Sousa Araujo, T. A.; Alencar, N. L.; de Amorim, E. L.; de Albuquerque, U. P., A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of ethnopharmacology* 2008, 120 (1), pp 72-80.
58. Cardona N., Actividad alelopática y antibacteriana de fracciones polares fl-c, fl-d y fl-f obtenidas de *henriettella trachyphylla triana* (melastomataceae). UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, 2012.
59. John Whitaker, D., California, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. 2003.
60. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R., The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry* 2011, 30 (4), pp 652-664;

61. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Başkan, K. S.; Erçağ, E.; Esin Çelik, S.; Baki, S.; Yıldız, L.; Karaman, Ş.; Apak, R., A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods* 2011, 3 (11), 2439.
62. W. Brand-Williams, M. E. C. a. C. B., Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*. 1995, 28, pp 25-30
63. Tsantili, E.; Konstantinidis, K.; Christopoulos, M. V.; Roussos, P. A., Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistachia vera* L.) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Scientia Horticulturae* 2011, 129 (4), pp 694-701.
64. El-Abbassi, A.; Kiai, H.; Hafidi, A., Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry* 2012, 132 (1), pp 406-412.
65. Hanifi, S.; Hadrami, I., Phytotoxicity and fertilising potential of olive mill wastewaters for maize cultivation. *Agronomy for Sustainable Development* 2008, 28 (2), pp 313-319.
66. Atanassova D, Kefalas P, Psillakis, Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence. *Environment International*. 2005 163(5), pp 592-599
67. Khayer A, Chowdhury M, Akrotos C, Olive mill waste composting: A Review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013(85), pp 108-119
68. Guerrero, C.A Principios de química orgánica. *Guía de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia*. Departamento de Química. 2013.
69. Allouche N, Fki I, Sayadi S, Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters olive oil by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 2006 (70), pp 213-218.
70. De Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R, Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*. 2007 (104), pp 858-867
71. Fki I, Allouche N, Sayadi S, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*. 2005 (93), pp 197-204

72. Silva S. Phenolic compounds in samples of olive tree cultivars (*Olea europaea* L.). M.Sc. thesis.2004. Faculty of Pharmacy, Lisbon University, Lisbon, Portugal

73. Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho A, Vilas B. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves S. *Antioxidant Activity of Olea europae*. pp 386-395



ANEXOS

METODO FOLIN-CIOCALTEU

ANEXO I. TABLA DE ABSORBANCIAS

MUESTRAS	ABS1	ABS2	ABS3
1ACU	0.285	0.273	0.257
2ACU	0.253	0.292	0.281
1ACE	0.033	0.030	0.038
2ACE	0.030	0.030	0.036

