

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

“Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cáscara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA QUÍMICA

Presentado por:

Jéssica Kely Hernández Pereira

Tutor: Patricia Manzano Santana, Ph. D

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2015

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi guía en el transcurso de mi vida, por los buenos y los malos momentos que me han permitido mejorar cada día.

A mis padres por su apoyo incondicional durante esta etapa de educación profesional.

A mis hermanas.

A mis amigas.

A mi directora de tesis, la Dra. Patricia Manzano por haberme brindado su apoyo y consejos en la realización de este trabajo.

A la Ing. María Fernanda Quijano, la Ing. Ana Barragán e Ing. Iván Chóez por su aporte de conocimientos.

Jéssica.

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional.

Jéssica

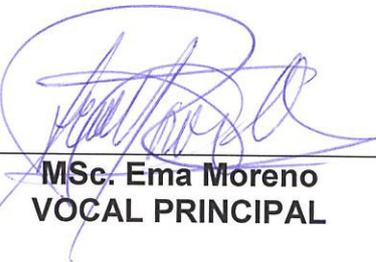
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Oswaldo Valle
Decano FCNM



Ph.D Patricia Manzano
DIRECTORA DE TESIS



MSc. Ema Moreno
VOCAL PRINCIPAL



Ph.D Pamela Caicedo
VOCAL ALTERNO

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”
(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Jéssica Hernández

Jéssica Kely Hernández Pereira

RESUMEN

Ecuador es un país esencialmente productor de cacao con un modelo de producción de elaborados y semielaborados a partir de esta materia prima, pero durante el proceso de transformación de estos productos se genera una cantidad significativa de residuos, entre los cuales se encuentra la cáscara de cacao que genera un gran impacto ambiental (1).

Como alternativa para la utilización de estos residuos se tiene la elaboración de alimentos destinados al consumo animal (2), como abono orgánico (3) y material combustible (4). Sin embargo diferentes estudios han comprobado la presencia de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en la cáscara de cacao, los cuales podrían ser utilizados en la obtención de productos de mayor valor para el consumo humano (5).

El presente estudio tiene como objetivo darle valor agregado a estos residuos, con la obtención de polifenoles, para lo cual se optimizó el proceso de extracción, considerando diferentes métodos (microondas, reflujo, ultrasonido) (5, 6, 7), tipo de solventes (agua, etanol) y el acondicionamiento de la muestra (con grasa, sin grasa); y se mantuvo constante la cantidad de muestra, solvente, el tiempo de extracción y la temperatura (5).

El extracto crudo pasó por un proceso de filtración, centrifugación y microfiltración, se determinó el contenido de polifenoles totales (CPT) utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (5). El análisis de resultados se realizó mediante el programa Minitab 16.1 versión 2010, y se determinó un mayor rendimiento de 6.408 ± 0.119 mg EAG·g⁻¹ en el residuo desengrasado, en agua a reflujo.

Luego se estabilizó los polifenoles a forma de polvo mediante un proceso de liofilización (8) obteniendo un rendimiento del 11% y se los utilizó como aditivos conservantes que eviten la degradación en los aceites (9) en concentraciones de 0, 0.02 y 0.04 %m/m para la fritura de plátano verde con frecuencia de uso del aceite de 0, 10, 20 veces (10).

Se recolectó muestras del aceite con diferente cantidad añadida de polifenoles para las 3 frecuencias de uso y se les determinó los parámetros ácidos grasos libres, índice de peróxido, claridad del aceite, actividad antioxidante DPPH (10), obteniendo mejores resultados con una concentración del 0.04% del polifenol.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	III
DECLARACIÓN EXPRESA	IV
RESUMEN	V
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ABREVIATURAS	XI
SIMBOLOGÍA	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1. GENERALIDADES.....	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	5
1.3 Planteamiento del problema	7
1.4 Hipótesis	8
1.5 Objetivos	8

1.5.1	Objetivo General	8
1.5.2	Objetivos Específicos	8
	CAPÍTULO 2	10
2.	MARCO TEÓRICO	10
2.1	Theobroma cacao L.	10
2.1.1	Distribución y variedades de cacao que se cultivan en el país	11
2.1.2	Cáscara de cacao	12
2.1.3	Composición de la cáscara de cacao.....	14
2.1.4	Usos.....	15
2.2	Polifenoles	15
2.2.1	Definición y propiedades	15
2.2.2	Tipos de polifenoles	17
2.2.3	Factores que intervienen en la extracción de polifenoles.....	18
2.2.4	Determinación de polifenoles totales	19
2.3	Oxidación en los aceites	20
2.4	Determinación de la calidad de los aceites vegetales comestibles	22
2.4.1	Ácidos grasos libres	22
2.4.2	Índice de peróxido.....	23
2.4.3	Claridad del aceite	24
2.4.4	Actividad antioxidante DPPH	25
2.5	Fundamentos del proceso de liofilización	26

CAPÍTULO 3	28
3. EXPERIMENTACIÓN	28
3.1 Proceso de obtención de polifenoles	28
3.2 Descripción del proceso	29
3.2.1 Obtención y preparación de la materia prima	30
3.2.2 Obtención de polifenoles.....	31
3.2.3 Purificación de la solución que contiene polifenoles	33
3.2.4 Determinación del contenido de polifenoles totales: Método Folin-Ciocalteu	33
3.3 Diseño del experimento	34
3.3.1 Variables y niveles para pruebas experimentales	34
3.3.2 Determinación de corridas experimentales	37
3.4 Obtención de polifenoles en polvo mediante liofilización	38
3.5 Preparación de condiciones de uso de polifenoles como aditivo en aceites	38
3.6 Diseño de experimento	41
3.6.1 Variables y niveles de las pruebas experimentales.....	41
3.6.2 Determinación de corridas experimentales	42
3.7 Caracterización de las muestras de aceite usado y sin usar	42
3.7.1 Ácidos grasos libres	42
3.7.2 Índice de peróxido.....	44
3.7.3 Claridad del aceite	46

3.7.4 Actividad Antioxidante DPPH	47
3.8 Optimización de respuestas	48
CAPÍTULO 4	49
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	49
4.1 Validación estadística para el diseño experimental del contenido de polifenoles totales.....	49
4.2 Análisis estadístico ANOVA	51
4.3 Evaluación del rendimiento de los polifenoles obtenidos	55
4.4 Pruebas de calidad en los aceites.....	57
4.4.1 Prueba de Ácidos grasos libres.....	57
4.4.2 Prueba Índice de peróxido	62
4.4.3 Prueba de claridad	67
4.4.4 Prueba de Actividad Antioxidante DPPH	70
4.5 Optimización	75
4.6 Resumen ANOVA de las variables	76
CAPÍTULO 5	78
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
5.1 Conclusiones.....	78
5.2 Recomendaciones	80
ANEXOS	81
BIBLIOGRAFÍA.....	88

ABREVIATURAS

CCN51	Colección Castro Naranjal 51
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
CPT	Contenido de polifenoles totales
M	Concentración molar
AGL	Ácidos grasos libres
IP	Índice de peróxido
%T	Porcentaje de transmitancia
%AA	Porcentaje de Actividad Antioxidante
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
CODEX	Código Alimentario
STAN	Estándar
UV	Radiación Ultravioleta

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
kg	Kilogramo
g	Gramo
mg	Miligramo
L	Litro
mL	Mililitros
kHz	Kilohercio
rpm	Revoluciones por minuto
um	Micrómetro
mbar	Milibar
nm	Nanómetro
F	F calculado
GL	Grados de Libertad
P	Valor P
SC	Suma de Cuadrados
CM	Cuadrado Medio
SD	Desviación estándar
R-cuad	Coefficiente de determinación
%	Porcentaje
Ho	Hipótesis nula

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cáscara de cacao	13
Figura 2. Cambios durante el proceso de fritura.	21
Figura 3. Diagrama del proceso de obtención de polifenoles	29
Figura 4. Diseño del experimento de polifenoles	35
Figura 5. Diagrama de proceso del uso de polifenoles como aditivo.	40
Figura 6. Gráfico de efectos principales para polifenoles.....	54
Figura 7. Gráfico de interacción para polifenoles.....	55
Figura 8. Diagrama del mejor proceso de obtención de polifenoles.....	56
Figura 9. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia y ácidos grasos libres.	59
Figura 10. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre ácidos grasos libres.....	60
Figura 11. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre ácidos grasos libres.....	61
Figura 12. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia e índice de peróxido.	64
Figura 13. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre índice de peróxido.	65
Figura 14. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre índice de peróxido.	66

Figura 15. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia y claridad. ..	68
Figura 16. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre claridad.	69
Figura 17. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre claridad..	70
Figura 18. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia y actividad antioxidante DPPH.....	73
Figura 19. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre actividad antioxidante DPPH.....	74
Figura 20. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre actividad antioxidante DPPH.....	75
Figura 21. Curva de calibración de ácido gálico.....	82
Figura 22. Optimización de la concentración de polifenoles	83
Figura 23. Método Reflujo.....	84
Figura 24. Método ultrasonido.....	84
Figura 25. Método microondas.....	84
Figura 26. Filtración.....	85
Figura 27. Centrifugación.....	85
Figura 28. Microfiltración.....	85
Figura 29. Liofilización	85
Figura 30. Preparación de las muestras.....	86
Figura 31. Dilución	86
Figura 32. Muestras en microplaca para lectura en el espectrofotómetro.....	86
Figura 33. Prueba de AGL	87
Figura 34. Prueba de IP	87

Figura 35. Prueba de claridad.....	87
Figura 36. Actividad antioxidante DPPH	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de la cáscara de cacao (% de materia seca)...	14
Tabla 2. Factores y niveles del diseño experimental de polifenoles	35
Tabla 3. Hipótesis del experimento	37
Tabla 4. Factores y niveles de diseño de experimento en aceites	42
Tabla 5. Contenido de polifenoles totales.....	50
Tabla 6. Datos estadísticos ANOVA.....	51
Tabla 7. Hipótesis analizadas de los diferentes factores del diseño.....	52
Tabla 8. Ácidos grasos libres en los aceites formulados	58
Tabla 9. Índice de peróxido en los aceites formulados.....	63
Tabla 10. Claridad en los aceites formulados.....	67
Tabla 11. Actividad antioxidante DPPH en aceites formulados.....	71
Tabla 12. Valores de optimización.....	76
Tabla 13. Resumen ANOVA de las variables de acuerdo al diseño	77
Tabla 14. Datos de curva de calibración de ácido gálico.....	82

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los polifenoles han ganado interés recientemente debido a su capacidad para actuar como antioxidantes, actividad que le permite contribuir a la salud humana como defensa contra los rayos ultravioleta o agresión debida a patógenos, en la prevención de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas, además de tener propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladora, anti-microbiana, vasodilatador y efectos analgésicos (11).

El cacao (*Theobroma cacao*) es propio de las zonas templadas, por lo que en Ecuador su producción se da principalmente en la región costera y amazónica. Ecuador es uno de los principales países productores de cacao aportando con las dos terceras partes de cacao que se producen a nivel mundial (2). Debido a sus propiedades el cacao es utilizado ampliamente en la industria, pero del fruto de la planta de cacao solo se utiliza la semilla sin cáscara, por lo que se producen diversos residuos sólidos (4).

Los aceites vegetales tienen un amplio consumo en nuestra sociedad, principalmente en la elaboración de frituras. Para mantener las características de los productos elaborados y evitar la degradación de estos comúnmente se utilizan antioxidantes sintéticos (9).

El siguiente tema de tesis tiene como finalidad darle un valor agregado a la cáscara del cacao con la obtención de polifenoles y la optimización de su extracción por diferentes métodos. Los polifenoles extraídos de la cáscara de cacao se obtendrán en forma de polvo, los cuales serán utilizados como aditivos conservantes que eviten la degradación en los aceites (10).

Con la adición del extracto de polifenoles se buscará reemplazar a los antioxidantes sintéticos que comúnmente se utilizan en los aceites vegetales comestibles. Para lograrlo se determinará la cantidad adecuada en que los polifenoles cumplen con su actividad antioxidante a través de la determinación de diferentes parámetros (10).

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1 Antecedentes

Los estudios realizados sobre los componentes de la cáscara de cacao se han incrementado recientemente, tal como se muestra en la investigación realizada por Nsor-Antidana y col. en el año 2012, en la cual evalúan la composición proximal de la cáscara y reportan la presencia de polifenoles mediante extracción por el método microondas, utilizando diferentes solventes (acetona, etanol, metanol y agua) para determinar cuál permite obtener un mayor rendimiento. Además, buscan establecer la actividad

antimicrobiana de los extractos obtenidos aunque no plantean una utilidad realmente importante para los compuestos obtenidos (5).

En el artículo publicado en el 2006 por D. Boskou y col. se menciona la utilización de compuestos fenólicos obtenidos a partir de desechos agroindustriales como conservante de aceites, en productos farmacéuticos o para incrementar el contenido fenólico en aceites (12).

En estudios realizados en el 2014 por Misnawi y col. extraen polifenoles a partir de la semilla del cacao mediante el método de maceración, con una mezcla de etanol y agua como solvente y plantean utilizarlos como antioxidantes en aceites vegetales comestibles (10).

Lo novedoso de la presente investigación es que se va a utilizar los polifenoles extraídos de las cáscaras de la semilla para sustituir los antioxidantes sintéticos (5).

1.2 Justificación

Gracias al excelente clima tropical y extensas tierras de cultivo fértiles que posee nuestro país, es que se ha podido desempeñar como un país netamente agrícola, siendo el cultivo de cacao una parte representativa de este sector y se produce aproximadamente 200.000 toneladas métricas al año (13), ubicándose en la sexta posición entre los países productores de cacao a nivel mundial (14) de los cuales, el 93.2% se exporta y el 6.8% se destina al consumo nacional (15).

Para la industria de cacao del país, representa un problema deshacerse de los desechos generados durante el proceso de obtención de chocolate y sus derivados, constituyendo la cáscara una parte considerable de estos desechos, ya que representa aproximadamente un 12% en peso de la semilla de cacao. En base a esto se puede decir que en Ecuador se produce un total de 1.632 toneladas métricas al año de cáscara de cacao (2).

Gran parte de la cáscara se desperdicia debido a que no se ha realizado una investigación realmente profunda en el país del

aprovechamiento de estos desechos, por lo cual generalmente es utilizada como material combustible para calderas (4), simplemente como abono (3) y en el mejor de los casos como alimento para pequeños mamíferos (2), lo cual se traduce en que no se le da una aplicación realmente importante.

Lo que no se ha tomado en consideración es que antes de utilizar la cáscara de cacao en cualquiera de las actividades anteriormente mencionadas se le podría extraer polifenoles, los cuales tienen capacidad antioxidante, para de esta forma ayudar a incrementar su valor comercial, además de darle una utilidad extra en la salud humana (10).

Los antioxidantes que comúnmente se utilizan para la preservación de aceites son el ácido cítrico y los antioxidantes BHT y BHA, estos últimos mencionados, en investigaciones previas han demostrado tener potenciales riesgos para la salud humana (9).

Por esta razón se pretende sustituir los antioxidantes sintéticos que actualmente se utilizan en los aceites vegetales comestibles (16) por una elección más natural, con menos riesgo para la salud humana, como lo son los polifenoles obtenidos a partir de la cáscara de cacao (5).

La importancia de este proyecto radica en obtener información confiable que se pueda poner a disposición de cualquier persona o entidad interesada, en la cual apoyarse para su posterior desarrollo a escala industrial y generar un cambio en la matriz productiva al crear valor en la cadena de producción de la industria del cacao.

1.3 Planteamiento del problema

¿Qué efecto tiene el empleo de polifenoles obtenidos de la cáscara de la semilla de cacao CCN51 sobre la calidad de aceites comestibles?

1.4 Hipótesis

El uso de polifenoles, extraídos de la cáscara de la semilla de cacao, sustituye el empleo de antioxidantes sintéticos en aceites comestibles al conservar las propiedades de calidad de aceites.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Extraer polifenoles a partir de la cáscara de la semilla de cacao para utilizarlo como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar el mejor proceso para extraer polifenoles considerando las variables: método de extracción, solvente, presencia de grasa en la muestra.
- Cuantificar el rendimiento de polifenoles crudos obtenidos luego de su estabilización a forma de polvo.

- Evaluar las propiedades ácidos grasos libres, índice de peróxido, claridad, actividad antioxidante DPPH de los aceites para determinar el porcentaje adecuado de adición de polifenoles en el producto.
- Optimizar la adición de polifenoles en el aceite mediante la metodología de superficie de respuesta.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Theobroma cacao L.*

El cacao es un árbol procedente de la región comprendida entre América central y América del sur, es también conocido por su nombre científico de origen griego *Theobroma cacao L.*, el cual significa “comida de los dioses” (15). El árbol crece a una altura de aproximadamente 4 a 5 m y el tiempo que se demora en producir frutos es de 5 años, dependiendo de la especie de cacao y de las condiciones presentes en la zona de cultivo (1).

Su cotizado fruto, conocido también como mazorca, mide entre 10 y 30 cm de largo y 8 y 10 cm de ancho, con forma de haba alargada, tiene aspecto leñoso y crece debajo de las ramas. En su interior se encuentran entre 20 y 30 semillas en forma de almendra, rodeadas por una pulpa agridulce y gelatinosa, con una longitud de 2-3 cm y ancho de 1.2-1.6 cm. Cuando el fruto alcanza la madurez es recogido, sus semillas son extraídas, fermentadas y secadas, obteniendo como resultado un grano de color oscuro, de agradable olor y sabor (1).

2.1.1 Distribución y variedades de cacao que se cultivan en el país

Ecuador es uno de los principales países de América del sur en producir cacao debido a que posee el clima cálido adecuado para el crecimiento de la planta, precipitaciones abundantes y humedad. Entre las variedades de cacao que produce nuestro país se encuentran: Criollo, Forastero y Trinitario, distribuidas principalmente en las provincias de Guayas, Manabí, Los Ríos, Guayas y El Oro (1).

Criollo: Esta variedad produce mazorcas de tamaño mediano, con semillas grandes que pueden ser blancas o ligeramente pigmentadas, aromáticas y de buena calidad, aunque de producción muy baja (12).

Forastero: Produce mazorcas pequeñas inicialmente de color verde y al madurar cambia a color amarillo (12). Dentro de este grupo se encuentra aquel conocido como cacao nacional, es aromático y más resistente a enfermedades que la variedad criollo (1).

Trinitario: Es un híbrido, resultado de la mezcla del criollo y forastero con diferentes grados de cruzamiento. Dentro de este grupo se encuentra el CCN-51 (Colección Castro Naranjal), con alta resistencia a enfermedades y elevada producción (12).

2.1.2 Cáscara de cacao

En el proceso de industrialización del cacao se producen diversos residuos, entre los cuales se encuentra la cáscara

de la mazorca, el mucílago y la cáscara del grano conocida también como cascarilla (2). La cáscara es la corteza, de color oscuro, que cubre al grano de cacao y en la industria es separada de la semilla mediante la fricción de las almendras entre dos superficies o por el impacto contra una superficie. Es considerada como desecho debido a que no se le da ninguna aplicación en la industria chocolatera (17).



Figura 1. Cáscara de cacao

Por cada 100 kg de producción de semillas de cacao el rendimiento que se tiene es de aproximadamente un 85%, lo cual quiere decir que el porcentaje restante es considerado como desecho. La cascarilla de cacao

constituye aproximadamente el 12% de los desechos mencionados anteriormente (2).

2.1.3 Composición de la cáscara de cacao

La cáscara de la semilla de cacao posee algunos componentes tales como la fibra dietética, proteína y componentes bioactivos entre los cuales se encuentran los polifenoles que tienen funciones únicas como actividad antioxidante (5). En la Tabla 1 puede observarse de forma más detallada su composición proximal.

Tabla 1. Composición proximal de la cáscara de cacao (% de materia seca). Fuente: Nsor-Atindana y col., 2012

Parámetro	% m/m
Humedad	3.73±0.46
Cenizas	5.96±0.26
Grasa cruda	6.87±0.52
Proteína Cruda	16.93±0.59
Fibra dietética soluble	11.08±0.05
Fibra dietética insoluble	48.94±1.21
Polifenoles	4.85±0.81

2.1.4 Usos

Entre los usos que se le ha dado convencionalmente a la cáscara de cacao en nuestro país se encuentra su aplicación como abono, es decir como fertilizante para plantas (3). Además, actualmente han surgido nuevas propuestas sobre otras formas de uso, tales como la formulación de dietas experimentales con diferentes niveles de cáscara de cacao para la alimentación de pequeños mamíferos (2) o aprovechando el potencial energético de estos residuos como material combustible para la alimentación de calderas en la producción de energía (4).

2.2 Polifenoles

2.2.1 Definición y propiedades

Los polifenoles tienen diversas propiedades y características únicas, entre las cuales se encuentran la capacidad para actuar como antioxidante, además de actividad antimicrobiana y antimutagénica. Debido a su propiedad antioxidante tienen la capacidad de retardar o

impedir la oxidación de los alimentos (5), mientras que en las personas la ingesta de antioxidantes tiene efectos positivos, debido a que previene el desarrollo de enfermedades crónicas las cuales tienen como factor desencadenante el daño oxidativo, tales como alzhéimer, cáncer, etc (5).

Los polifenoles tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres, los cuales son moléculas nocivas que se pueden encontrar en nuestras células.

Los radicales libres contienen electrones no apareados lo cual produce que sean altamente reactivos, teniendo la capacidad de causar daño mediante el ataque a los componentes de nuestras células (19).

Los radicales libres pueden crearse como un subproducto de las reacciones naturales que ocurren en nuestras células, o pueden provenir de otras fuentes entre las cuales se incluyen: la contaminación del aire, el humo del

cigarrillo, la exposición a la luz UV o la radiación. Una vez que los radicales libres se forman, estos pueden crear más radicales libres mediante la eliminación de los electrones de otras moléculas, creándose de esa manera un efecto dominó (19).

Los polifenoles actúan como antioxidantes debido a que neutralizan los radicales libres, ya sea cediendo el electrón extra que es necesario para formar el par de electrones o mediante el rompimiento de la molécula del radical libre para volverla inofensiva. Además de lo anteriormente mencionado, los antioxidantes detienen la reacción en cadena que produce la formación de los radicales libres, beneficiando así al sistema inmune (19).

2.2.2 Tipos de polifenoles

En el cacao se encuentran diferentes clases de compuestos polifenólicos, tales como: fenoles simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácido fenilacético, fenilpropenos, cumarinas, cromonas,

naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, lignanos y ligninas (18).

Los polifenoles presentes en el cacao se pueden clasificar principalmente en tres grupos: proantocianidinas (58%), catequinas (37%) y antocianinas (4%) (18).

2.2.3 Factores que intervienen en la extracción de polifenoles

De acuerdo a investigaciones realizadas previamente, en la extracción de polifenoles pueden influir ciertos factores tales como: relación líquido-sólido, concentración del solvente, pH, temperatura, tiempo de calentamiento y extracción, por lo cual, dependiendo de la combinación adecuada de estos factores se puede optimizar la extracción (20).

2.2.4 Determinación de polifenoles totales

Uno de los métodos que se utilizan ampliamente para la determinación de polifenoles totales presentes en extractos de plantas es el método de Folin-Ciocalteu, debido a que es una reacción colorimétrica determinada en el espectrofotómetro UV / VIS, lo cual es rápido, fácil y no muy costoso (21).

En este método es necesaria la utilización de una sustancia de referencia (estándar), para poder medir el total de concentración de los grupos hidroxilos fenólicos presentes en los extractos (21).

Los polifenoles presentes reaccionan con reactivos redox específicos (reactivo de Folin-Ciocalteu) formando un complejo azul, el cual puede ser cuantificado mediante la luz visible de la espectrofotometría (21).

Durante la reacción se forma un cromóforo azul, constituido por un complejo de fosfotungstato-fosfomolibdato, donde la

máxima absorción de los cromóforos depende de la concentración de compuestos fenólicos (21).

2.3 Oxidación en los aceites

La oxidación en los aceites se produce debido a una serie de reacciones químicas indeseables en las cuales tiene participación el oxígeno, degradando la calidad del aceite. Generalmente la oxidación produce lo que se conoce como rancidez en los aceites, además de sabores y olores no deseados. Todo aceite está en un estado de oxidación y aunque no se puede detener totalmente, hay maneras de reducir este proceso durante cada etapa de fabricación del aceite (22).

La oxidación de un aceite comprende una serie de reacciones complejas, produciéndose un desglose de productos en etapas, comenzando con productos de oxidación primarios (peróxidos, dienos, ácidos grasos libres), seguido de productos secundarios (carbonilos, aldehídos, trienos) y finalmente productos terciarios (22).

El avance y velocidad de la oxidación dependerá de diferentes factores, tales como: luz, temperatura, disponibilidad de oxígeno, presencia de humedad y metales y tipo de aceite (22).

Durante los procesos de fritura los aceites son expuestos a elevadas temperaturas, lo cual conlleva a un proceso de degradación tal como la oxidación, así como la hidrólisis y polimerización (10).

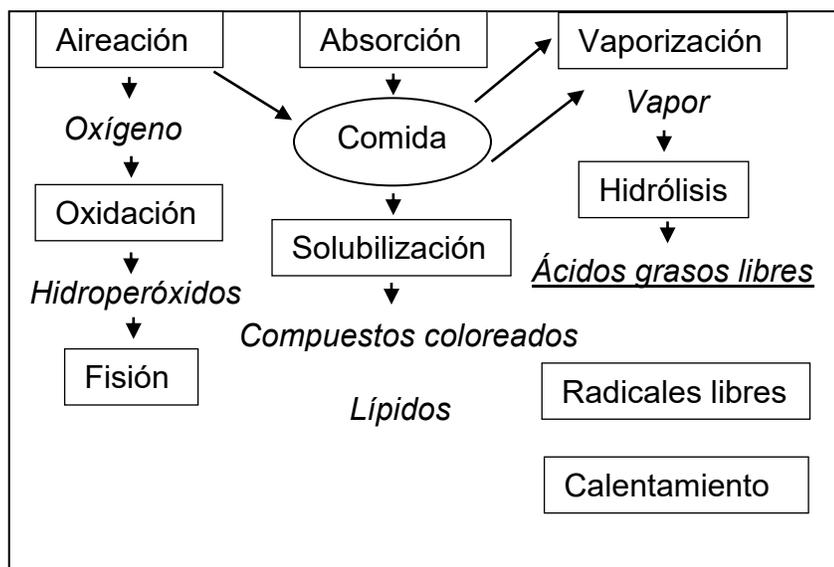


Figura 2. Cambios durante el proceso de fritura.
Fuente: S. Melton y col., 2002.

2.4 Determinación de la calidad de los aceites vegetales comestibles

Para la determinación del grado de oxidación de los aceites se requieren de diferentes pruebas para determinar los productos de degradación primarios y secundarios. Entre las pruebas más comunes se tiene la determinación de los ácidos grasos libres, el índice de peróxido, claridad y actividad antioxidante DPPH (10).

2.4.1 Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres (AGL) se encuentran de manera natural en todos los aceites vegetales crudos y son considerados como un componente indeseable, por lo cual es eliminado tanto como sea posible durante el proceso de refinación para obtener aceites vegetales comestibles de excelente calidad (24).

La razón por la cual la presencia de AGL es indeseable en cualquier aceite vegetal es debido principalmente a su capacidad de actuar como pro-oxidante, es decir que son capaces de inducir o iniciar la oxidación, además de estar

relacionado con la presencia de humo cuando se calienta el aceite a elevadas temperaturas durante el proceso de fritura (24).

Los AGL son valores regulados tanto por normas internacionales como por normas nacionales. Según la norma CODEX STAN 210-1999, en aceites vegetales refinados este valor no debe exceder de 0.3%, expresado como % de ácido oleico, mientras que en las Normas Técnicas Ecuatorianas NTE INEN 33, el valor máximo permisible es de 0.2% expresado como % de ácido oleico.

2.4.2 Índice de peróxido

La determinación del índice de peróxido (IP) es una de las mediciones más importantes para controlar la calidad en los aceites debido a que es un indicador del estado de oxidación primaria en estos, es decir que mide la concentración de estos productos que consisten principalmente en hidroperóxidos, que al no ser estables se descomponen originando productos de oxidación

secundaria, tales como cetonas y aldehídos, responsables del desarrollo de sabores extraños (25).

Mientras más alto es el valor del IP, más baja es la estabilidad oxidativa, con efectos perjudiciales en la calidad del aceite (25).

El índice de peróxido es un valor regulado tanto por normas nacionales como internacionales. Según la norma CODEX STAN 210-1999 y la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 33 este valor no debe exceder $10 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$.

2.4.3 Claridad del aceite

Este parámetro se determina generalmente debido a que el desarrollo de una coloración oscura (café) en los aceites está relacionado con el proceso de oxidación y polimerización (10).

2.4.4 Actividad antioxidante DPPH

La molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, también conocida como DPPH, está caracterizada como un radical libre estable y debido a la deslocalización de un electrón libre dentro de la molécula tiene lugar la formación del color violeta profundo (26).

Cuando la solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, esto da lugar a la forma reducida de la molécula de DPPH, con lo cual se produce la pérdida del color violeta, quedando un color amarillo pálido residual. Este cambio en la coloración puede ser medido espectrofotométricamente en un rango de 517 nm aproximadamente (26).

La reacción mencionada anteriormente tiene como objetivo proporcionar una idea de las reacciones que tienen lugar en un sistema oxidante, como por ejemplo en la auto-oxidación de lípidos o de otra sustancia insaturada,

representando la molécula DPPH a los radicales libres formados en el sistema (26).

2.5 Fundamentos del proceso de liofilización

La liofilización es un proceso de secado el cual consiste en congelar la muestra, seguido de la eliminación del agua congelada presente en la misma mediante un proceso de secado primario conocido como sublimación y de secado secundario llamado desorción (8).

En la sublimación el agua pasa directamente del estado sólido (hielo) al estado de vapor sin tener la necesidad de pasar por el estado líquido. Para lograr esto, las condiciones de temperatura y presión deben estar por debajo del punto triple de $0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.00603 atm respectivamente (8).

Durante este proceso la muestra congelada es sometida al vacío, lo cual permite al agua congelada de la muestra vaporizarse además de someter a calor la muestra congelada para acelerar el proceso de sublimación. De esta manera el líquido congelado se

sublima, dejando sólo los componentes sólidos y secos, obteniendo como producto final una muestra sólida estable, con bajo contenido de humedad y que puede ser almacenada fácilmente, además de conservar las características de olor, color y sabor y demás propiedades fisiológicas (8).

A pesar de que este proceso de secado tiene muchas ventajas en comparación con otros métodos de secado, presenta algunas desventajas, tales como tiempos largos de procesamiento, manipulación y costos elevados (8).

CAPÍTULO 3

3. EXPERIMENTACIÓN

El proceso de experimentación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), en el área de Bioproductos, de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus “Gustavo Galindo” en la ciudad de Guayaquil, Ecuador.

3.1 Proceso de obtención de polifenoles

En la Figura 3 se muestra el diagrama del proceso de obtención de polifenoles.

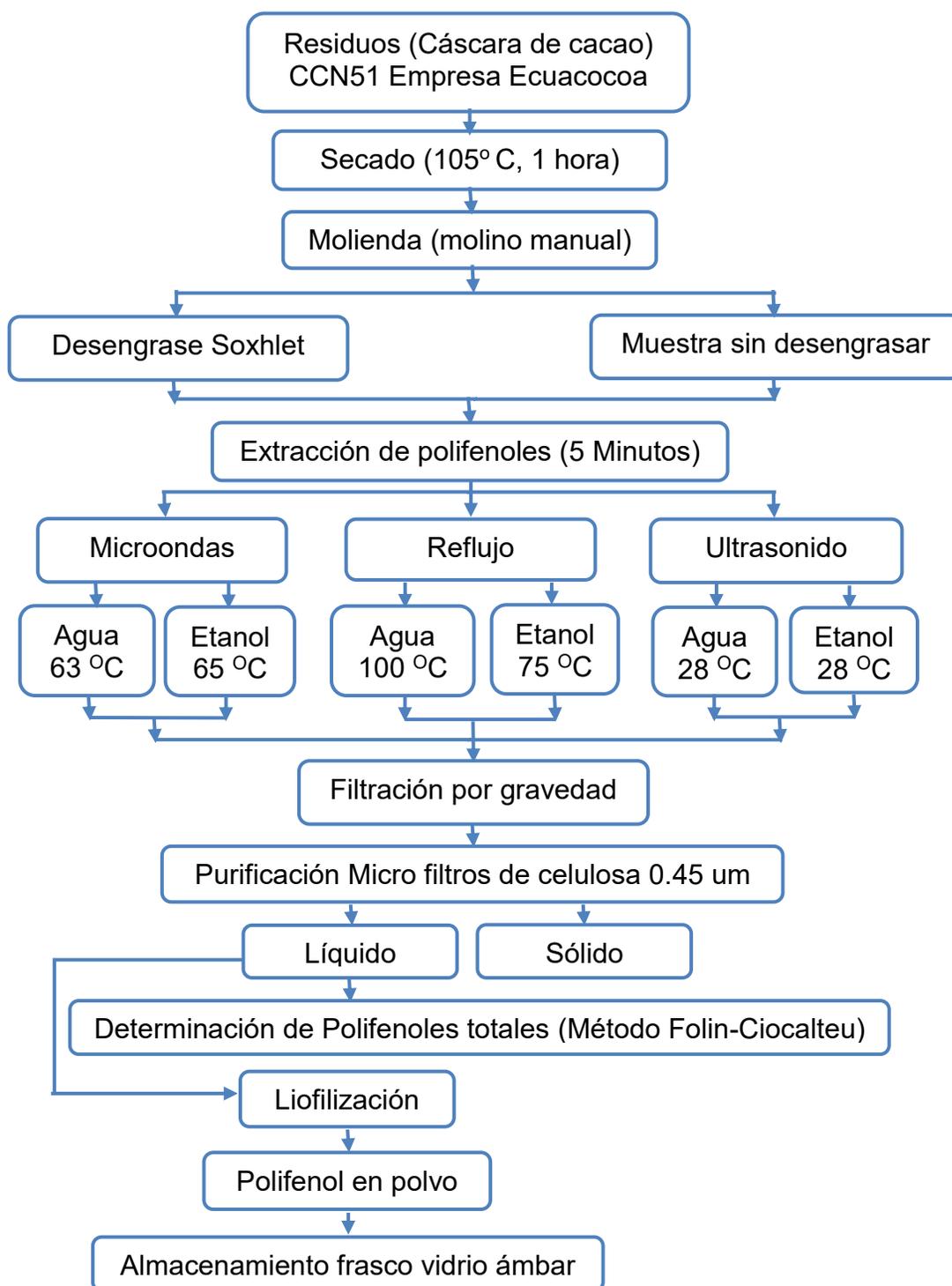


Figura 3. Diagrama del proceso de obtención de polifenoles

3.2 Descripción del proceso

3.2.1 Obtención y preparación de la materia prima

La cáscara de cacao se obtuvo de la empresa Ecuacocoa, ubicada en la ciudad de Guayaquil. Para su preparación adecuada primero pasó por un proceso de secado, eliminando el posible exceso de humedad y facilitando su posterior molienda y reducción de tamaño. Se empleó una estufa eléctrica, marca Quimis, a una temperatura de 105 °C durante una hora y un molino manual metálico.

En diferentes procedimientos establecidos se encontró que los autores recomiendan desengrasar la muestra antes de realizar la extracción de polifenoles (5) (10). Debido a lo anteriormente mencionado, en la presente investigación se utilizó muestra con grasa y desengrasada para verificar si efectivamente hay variaciones en los resultados obtenidos.

Para desengrasar la muestra se aplicó el protocolo CBE-PROT-PT27, empleando 5 g de muestra sobre papel filtro y depositándolo en un cartucho de celulosa, en el sistema de

extracción Soxhlet. Fueron adicionados 60 mL de hexano como disolvente, realizando la extracción de grasa durante aproximadamente 4 horas. La muestra desengrasada se retiró del cartucho para su enfriamiento.

3.2.2 Obtención de polifenoles

Para obtener una solución que contenga polifenoles, se empleó la muestra pulverizada de la cáscara de cacao con dos solventes: agua y etanol, manteniendo constante la cantidad de muestra a utilizar (2 g), solvente (50 mL) y el tiempo de duración de la extracción (5 minutos). Esto se realizó con la muestra desengrasada y con la muestra sin desengrasar (5).

Método Microondas

Se utilizó un equipo microondas (marca General Electric, potencia 1100 W). La muestra y el solvente fueron colocados en un matraz Erlenmeyer de 100 mL e introducidos en el equipo durante 5 minutos, luego se retiró

y dejó enfriar. La temperatura del proceso fue aproximadamente 63 °C en agua y 65 °C en etanol.

Método Reflujo

En el método de reflujo se utilizó un equipo Soxhlet (marca Quimis), colocando la muestra con el solvente en balones de vidrio de fondo plano, de capacidad de 100 mL. El balón unido al condensador se sometió a calentamiento sobre la placa en el equipo, retirándose después de 5 minutos para su enfriamiento. La temperatura del proceso fue aproximadamente 100 °C en agua y 75 °C en etanol.

Método Ultrasonido

En la extracción mediante ultrasonido se utilizó un equipo marca VWR, potencia 35 kHz. En un matraz Erlenmeyer de capacidad de 100 mL fue colocada la muestra más el solvente, sumergiéndose el matraz en un baño de agua ultrasónico a una temperatura de aproximadamente 28 °C para los solventes agua y etanol durante 5 minutos, luego se retiró y dejó enfriar.

3.2.3 Purificación de la solución que contiene polifenoles

A cada una de las soluciones obtenidas anteriormente se le realizó un proceso de filtración para eliminar los sólidos de mayor tamaño mediante papel filtro, tamaño de poro 20 μm . Posteriormente el filtrado obtenido se centrifugó en un equipo marca Thermo Scientific durante 15 minutos a 4000 rpm y 4 $^{\circ}\text{C}$ y se separó el sobrenadante del precipitado. Al sobrenadante obtenido se le realizó microfiltración a través de una membrana con tamaño de poro de 0.45 μm .

3.2.4 Determinación del contenido de polifenoles totales:

Método Folin-Ciocalteu

Para la determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) presentes en las soluciones obtenidas anteriormente se utilizó el protocolo CBE-PROT-BP046, para lo cual se empleó el reactivo Folin-Denis. La medición de la absorbancia de las muestras se realizó a 765 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible marca Synergy HT BioTek, expresando los resultados obtenidos como

miligramos equivalente de ácido gálico por gramo de muestra ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$).

Para la determinación de la curva de calibración (Anexo I) se utilizó como solución estándar ácido gálico, con concentración de 0, 1, 2, 3, 4, 5 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

3.3 Diseño del experimento

3.3.1 Variables y niveles para pruebas experimentales

Se tomó en consideración como constantes: la cantidad utilizada de cáscara y de solvente, el tiempo de extracción y la temperatura. Los factores o variables independientes considerados fueron: grasa, solvente y método de extracción. La variable de respuesta o variable dependiente del experimento obtenida fue la cantidad de polifenoles totales, expresado como miligramos equivalente de ácido gálico por gramo de muestra ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$).

En la Figura 4 se puede observar el diseño factorial del experimento.

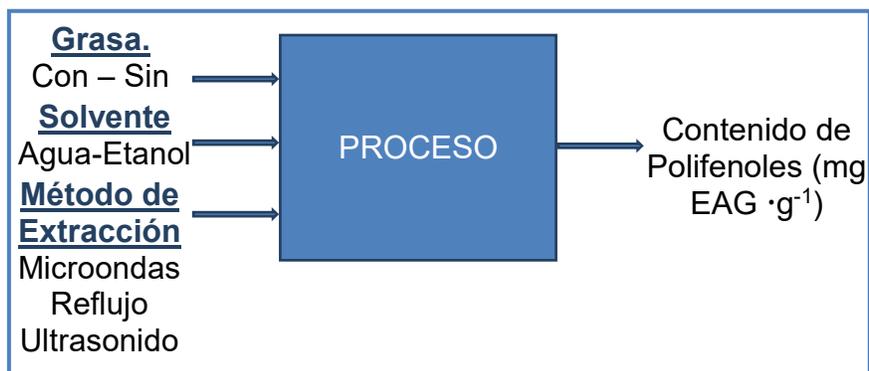


Figura 4. Diseño del experimento de polifenoles

El diseño de experimento se realizó en el programa MINITAB 16.1, el cual se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores y niveles del diseño experimental de polifenoles

Factor Nivel	Grasa	Solvente	Método de extracción
-1	sin grasa	etanol	microondas
0	-	-	reflujo
+1	con grasa	agua	ultrasonido

Para determinar las condiciones óptimas que permitirán obtener la mayor cantidad de polifenoles se utilizó un diseño factorial 2x2x3, el cual se expresa en la ecuación 1.

$$y_{ijkl} = \mu + g_i + s_j + m_k + (gs)_{ij} + (sm)_{jk} + (gm)_{ik} + (gsm)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \text{ (Ec. 1)}$$

Donde:

y_{ijkl} : es el valor de la variable de respuesta con la repetición

l de los niveles i, j, k

μ : es la media general del experimento

g_i : es el efecto de la presencia o ausencia de grasa en la muestra, $i = -1, +1$

s_j : es el efecto del solvente a utilizar, $j = -1, +1$

m_k : es el efecto del método de extracción $k = -1, 0, +1$

g_{ij}, s_{jk}, m_{ik} : efecto de las interacciones de los factores

ε_{ijkl} : es el error experimental en la repetición $l = 1, 2, 3$

De acuerdo a la ecuación 1 en el experimento se tendrán 7 hipótesis, las cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Hipótesis del experimento

Hipótesis nula (H_0)	Fuente
La presencia de grasa no afecta la extracción	Grasa
El solvente utilizado no afecta la extracción	Solvente
El método de extracción no influye	Método de Extracción
Su combinación no potencia los resultados	Grasa * Solvente
Su combinación no potencia los resultados	Grasa * Método de Extracción
Su combinación no potencia los resultados	Solvente * Método de Extracción
Su combinación no potencia los resultados	Grasa * Solvente * Método de Extracción

3.3.2 Determinación de corridas experimentales

Al establecerse el diseño factorial $2 \times 2 \times 3$, esto dio lugar a 12 experimentos por réplica y como se desarrolló 3 réplicas, al final resultó un total de 36 experimentos.

3.4 Obtención de polifenoles en polvo mediante liofilización

La solución que resultó tener la mayor cantidad de polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu fue secada en un liofilizador marca Labconco Freezone 4.5 para obtener los polifenoles en forma de polvo.

La muestra líquida se colocó en tubos Falcon de 50 mL y se llevó a un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizándose posteriormente durante 4 días aproximadamente, siendo las condiciones de operación 133×10^{-3} mbar y $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los polifenoles en forma de polvo fueron almacenados en un recipiente oscuro y hermético hasta su posterior uso.

3.5 Preparación de condiciones de uso de polifenoles como aditivo en aceites

Una vez obtenidos los polifenoles en polvo se procedió a determinar su efectividad como agente retardante de la oxidación en el aceite comestible, para la fritura de plátano verde (*Musa paradisiaca*), considerándose las siguientes variables:

- La frecuencia de uso del aceite: 0, 10 y 20 veces.
- La cantidad añadida del polifenol en polvo: 0%, 0.02%, 0.04% (%m/m) para cada una de las frecuencias de uso.

El aceite utilizado en la experimentación fue aceite vegetal de soya refinado, sin la adición de antioxidantes sintéticos, el mismo que fue facilitado por Industrias Ales, ubicada en la ciudad de Manta, provincia de Manabí.

El proceso de fritura se realizó en un recipiente profundo, para permitir la inmersión completa de la muestra de plátano verde. Por cada 2 L litros de aceite la cantidad a freír fue 200 g de plátano verde, manteniendo constante la temperatura del aceite a 180 °C y el tiempo de fritura de la muestra de plátano fue de 3 minutos (27). A las muestras recolectadas del aceite se le realizó las siguientes pruebas para poder determinar si se produjo cambio en sus propiedades:

- Ácidos grasos libres (Método de AOAC, 940.28)(28)
- Índice de peróxido (Método de AOAC, 965.33)(28)

- Claridad del aceite (Método del espectrofotómetro) (10)
- Actividad antioxidante DPPH (Método Espin y col., 2010) (29)

En la Figura 5 se muestra el diagrama de procesos.

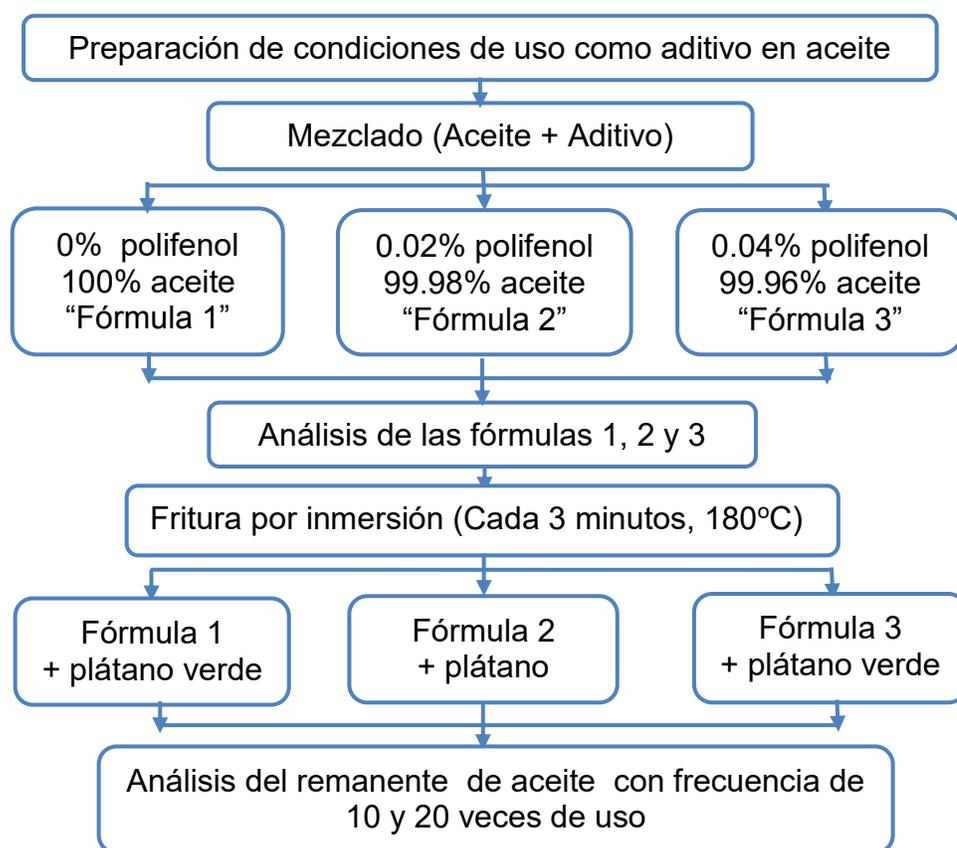


Figura 5. Diagrama de proceso del uso de polifenoles como aditivo.

3.6 Diseño de experimento

3.6.1 Variables y niveles de las pruebas experimentales

En la determinación de las condiciones óptimas de la utilización de polifenoles como aditivo conservante en los aceites vegetales comestibles se empleó un diseño factorial 3^k , considerándose 2 factores o variables independientes: la concentración de polifenol añadida al aceite (0%, 0.02%, 0.04%) y las veces de uso (0, 10 y 20 veces).

Además, se consideró como variables de respuesta o variables dependientes del experimento los valores obtenidos de AGL, IP, claridad y actividad antioxidante DPPH.

El diseño de experimentos se realizó en el programa MINITAB 16.1 y en la Tabla 4 se muestran los factores y niveles experimentales.

Tabla 4. Factores y niveles de diseño de experimento en aceites

Factor Nivel	Frecuencia de uso (veces)	Concentración de polifenoles (%)
-1	0	0
0	10	0.02
+1	20	0.04

3.6.2 Determinación de corridas experimentales

Se estableció como diseño factorial el modelo 3^2 , lo cual dio como resultado 9 experimentos por cada réplica (3 repeticiones) obteniendo un valor final de 27 experimentos.

3.7 Caracterización de las muestras de aceite usado y sin usar

3.7.1 Ácidos grasos libres

Para la determinación de AGL se utilizó el procedimiento establecido en AOAC *Official Method* 940.28 (28) el cual se describe a continuación:

1. Se preparó alcohol neutralizado, con 50 mL de alcohol, unas gotas del aceite y 2 mL de fenolftaleína.
2. Se colocó el recipiente con alcohol neutralizado en un baño de agua a 60-65 °C y se añadió suficiente solución 0.1 M de hidróxido de sodio hasta observar una coloración rosada débil y permanente.
3. Se pesó 56.4 g de aceite y se mezcló con el etanol neutralizado, para su posterior titulación con solución 0.1 M de hidróxido de sodio, agitando vigorosamente y ocasionalmente calentando hasta obtener una coloración rosada débil y permanente en el alcohol sobrenadante.

El porcentaje de ácidos grasos libres (%AGL) expresado como ácido oleico se calculó en base a la ecuación 2.

$$\%AGL = \frac{V \times M \times 28.2}{W} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde V es el volumen utilizado de solución 0.1 M de hidróxido de sodio en mL; M es la molaridad de la solución de hidróxido de sodio y W es el peso del aceite expresado en g.

3.7.2 Índice de peróxido

Para la determinación del IP se utilizó el procedimiento establecido en *AOAC Official Method 965.33 (28)*, el cual se describe a continuación:

1. Se preparó una solución de ácido acético y cloroformo, en proporción 3:2; una solución saturada de yoduro de potasio, solución de almidón al 1% y una solución de tiosulfato de sodio 0.1 y 0.01 M.
2. 5 g de la muestra de aceite fueron colocados en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 30 mL de la mezcla de ácido acético-cloroformo y se agitó.

3. Se añadió 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio, manteniendo en reposo durante un minuto, con agitación ocasional para luego añadir 30 mL de agua.
4. La titulación se realizó de manera lenta con la solución 0.1 M de tiosulfato de sodio agitando continuamente hasta la desaparición parcial del color amarillo.
5. Finalmente, se añadió 0.5 mL de solución de almidón continuando la titulación hasta que el color azul casi desapareció. Si el volumen utilizado de la solución 0.1 M fue menos de 0.5 mL se repitió la titulación utilizando la solución 0.01 M de tiosulfato de sodio.

El IP expresado como meq $O_2 \cdot kg^{-1}$ aceite se calcula en base a la ecuación 3.

$$IP = \frac{S \times M \times 28.2}{g} \quad (Ec.3)$$

Donde S es el volumen utilizado de solución 0.1 M o 0.01 M de tiosulfato de sodio en mL; M es la molaridad de la solución de tiosulfato de sodio; g es el peso del aceite expresado en g.

3.7.3 Claridad del aceite

La claridad del aceite se determinó en un espectrofotómetro UV, en una microplaca de 96 pocillos con 200 ul de la muestra de aceite, midiéndose la absorbancia a 587 nm.

La claridad se determina de acuerdo al porcentaje de transmitancia (%T) detectada por el espectrofotómetro, en base a la ecuación 4, mientras mayor sea el porcentaje de transmitancia mayor será la claridad en el aceite.

$$\%T = \frac{100}{10^{Abs}} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde Abs es la absorbancia de la muestra medida a 587 nm

3.7.4 Actividad Antioxidante DPPH

En la determinación del porcentaje de la actividad antioxidante (%AA) se utilizó el método de Espin y col. 2010 con algunas modificaciones (29).

Se preparó una solución DPPH 0.1 mM en etanol, mezclándose 2 mL de esta solución con una alícuota de 40 mg de aceite o etanol (como blanco) con agitación fuerte, permitiéndole reposar en la oscuridad por una hora para su posterior lectura en el espectrofotómetro marca Synergy HT BioTek a 517 nm, en una microplaca con 200 ul de la muestra.

El porcentaje de actividad antioxidante se determinó en base a la ecuación 5 (30).

$$\%AA \text{ con DPPH} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

En donde Abs control es la absorbancia del control (blanco) y Abs muestra es la absorbancia de la muestra a 517 nm

3.8 Optimización de respuestas

La optimización de la cantidad de polifenol a utilizar en los aceites se realizó en el programa MINITAB 16.1 con la metodología de superficie respuesta, considerando las variables que tuvieron un efecto significativo en el diseño factorial y que están regulados por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 33, es decir, ácidos grasos libres e índice de peróxido.

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Validación estadística para el diseño experimental del contenido de polifenoles totales

De acuerdo al ensayo realizado de la determinación del contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu resultó que la solución con mayor contenido de polifenoles fue aquella en la que se utilizó muestra sin grasa, el método de reflujo y como solvente agua, con un valor promedio de 6.408 ± 0.119 mg EAG \cdot g $^{-1}$. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de las combinaciones de los factores y niveles.

Tabla 5. Contenido de polifenoles totales

Grasa	Solvente	Método de extracción	Polifenoles Totales (mg EAG·g ⁻¹)
-1	-1	-1	1.529±0.094
-1	-1	0	1.986±0.074
-1	-1	1	1.121±0.038
-1	1	-1	5.457±0.142
-1	1	0	6.408±0.119
-1	1	1	4.937±0.121
1	-1	-1	1.607±0.018
1	-1	0	1.917±0.180
1	-1	1	1.135±0.062
1	1	-1	4.888±0.286
1	1	0	5.141±0.277
1	1	1	4.350±0.353

Como se puede observar los valores del contenido de polifenoles totales es diferente para cada combinación de los factores y niveles, pero se desconoce si esa diferencia es significativa y si además existe una relación entre los factores.

4.2 Análisis estadístico ANOVA

En la Tabla 6 se muestran los factores que fueron analizados mediante el análisis estadístico ANOVA, con los respectivos resultados.

Tabla 6. Datos estadísticos ANOVA

Fuente	GL	SC	SC	CM	F	P
A: Grasa	1	1.436	1.436	1.436	43.44	0.000
B: Solvente	1	119.87	119.87	119.87	3625.89	0.000
C: Método	2	5.733	5.733	2.867	86.72	0.000
AB	1	1.501	1.501	1.501	45.39	0.000
AC	2	0.332	0.332	0.167	5.02	0.015
BC	2	0.148	0.148	0.074	2.24	0.129
ABC	2	0.167	0.167	0.083	2.52	0.102
Error	24	0.793	0.793	0.033		
Total	35	129.98				
SD = 0.182 R-cuad. = 99.39% R-cuad.(ajustado) = 99.11%						

El valor de R cuadrado es de 99.39% y al ser este valor superior al 70% esto indica que el modelo es confiable y adecuado para el diseño estadístico.

Los valores P menores a 0.05 presentan suficiente evidencia estadística para rechazar las hipótesis, por lo cual en la Tabla 7 se detallan las hipótesis con los respectivos valores P para determinar si los factores influyen en la variable de respuesta.

Tabla 7. Hipótesis analizadas de los diferentes factores del diseño

Hipótesis nula (H_0)	Fuente	P
La presencia de grasa no afecta la extracción	Grasa	0.000
El solvente utilizado no afecta la extracción	Solvente	0.000
El método de extracción no influye	Método de Extracción	0.000
Su combinación no potencia los resultados	Grasa*Solvente	0.000
Su combinación no potencia los resultados	Grasa*Método de Extracción	0.015
Su combinación no potencia los resultados	Solvente*Método de Extracción	0.129
Su combinación no potencia los resultados	Grasa*Solvente* Método de Extracción	0.102

Los valores P menores a 0.05 permiten rechazar las hipótesis nulas (H_0), por lo cual podría ser que existan efectos sinérgicos entre los factores. De esta manera, se tuvo que la presencia de

grasa en la muestra, el solvente a utilizar y el método de extracción sí influyen en la extracción de polifenoles, además la combinación de los factores grasa-solvente, grasa-método de extracción sí potencian los resultados obtenidos, mientras que la combinación de los factores solvente-método de extracción y grasa-solvente-método de extracción no los potencian.

En la Figura 6 se muestra la gráfica de efectos principales de los factores experimentales en la cual se puede observar que se tienen líneas con pendiente para todos los factores, siendo la de mayor pendiente aquella que representa los resultados para el factor solvente, lo cual indica que aunque estos tres factores son significativos, el más significativo para la extracción de polifenoles es el solvente a utilizar.

Además, se observa un mayor rendimiento en las muestras sin grasa, utilizando agua como solvente y el método de extracción reflujo. Asimismo, de los tres métodos de extracción se obtuvo el menor rendimiento con el método de ultrasonido.

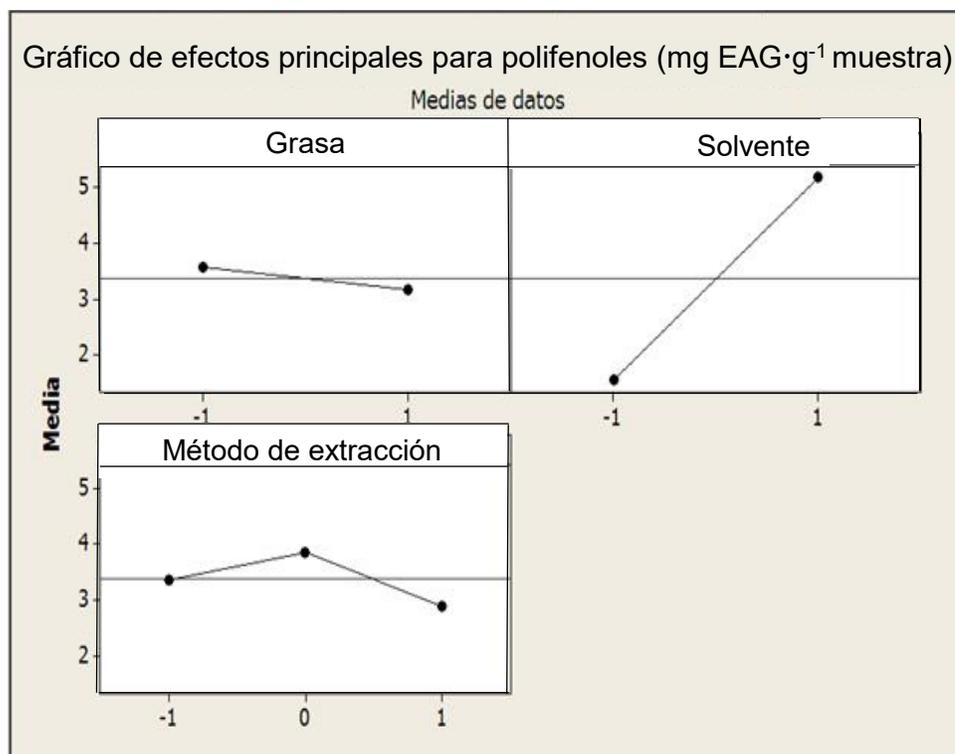


Figura 6. Gráfico de efectos principales para polifenoles

En la Figura 7 se muestra la interacción existente entre los 3 factores experimentales grasa-solvente, grasa-método de extracción y método de extracción-solvente.

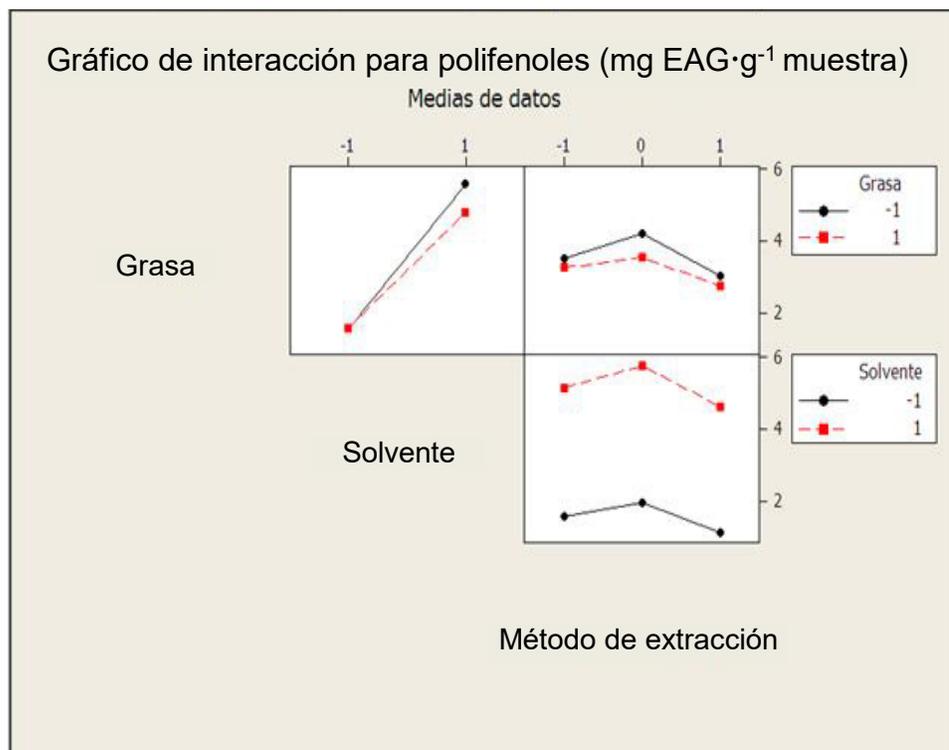


Figura 7. Gráfico de interacción para polifenoles

4.3 Evaluación del rendimiento de los polifenoles obtenidos

En la Figura 8 se muestra el balance de materia del proceso que permite obtener mayor cantidad de polifenoles, en el cual se observa que por cada 9 kg de cascarilla de cacao se obtiene un rendimiento de 1 kg de polifenol, lo cual representa el 11% en peso.

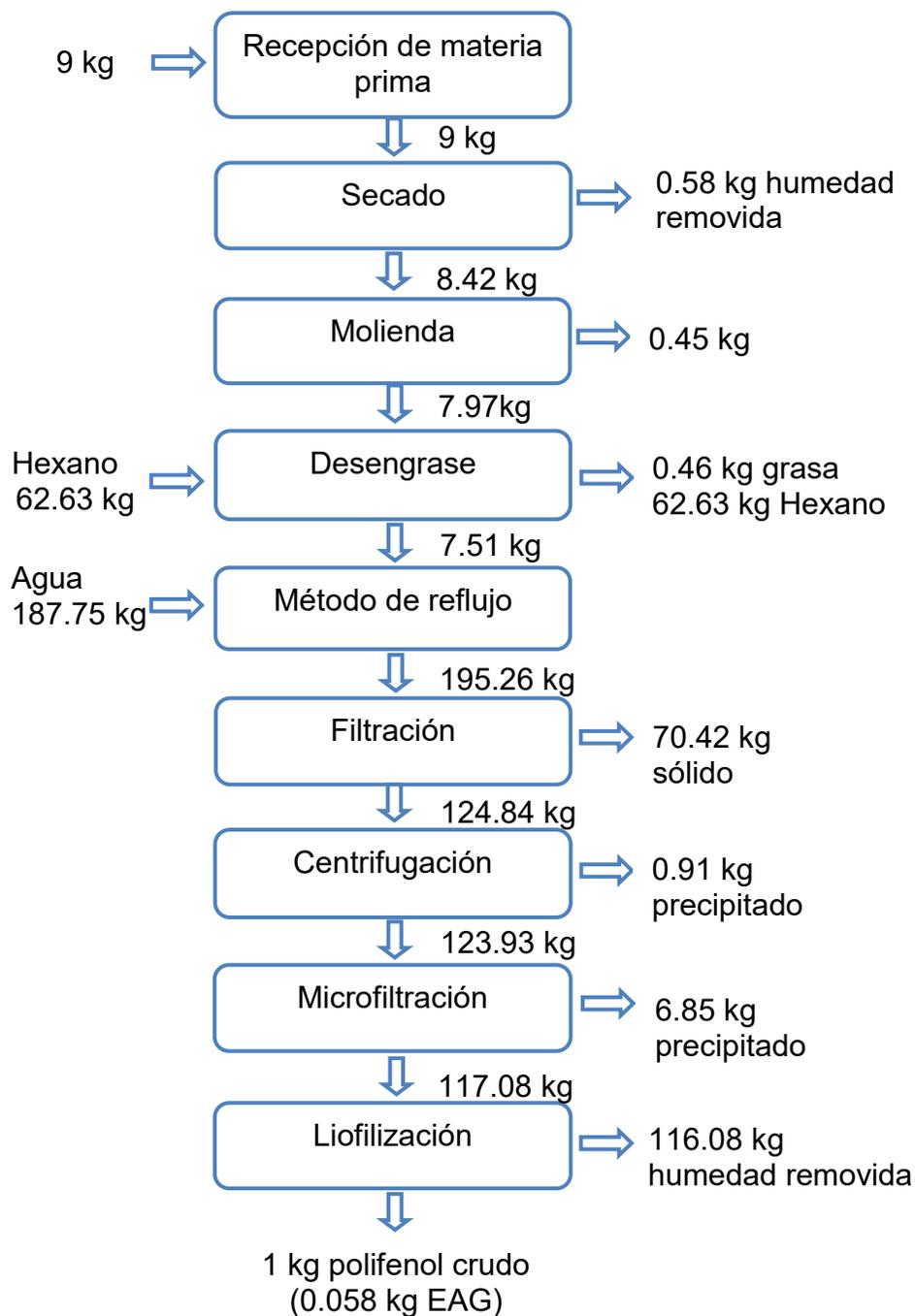


Figura 8. Diagrama del mejor proceso de obtención de polifenoles.

El CPT fue de 6.408 ± 0.119 mg EAG·g⁻¹ muestra, lo cual quiere decir que a partir de 9 kg de muestra se va a obtener 1 kg de extracto lo que representa un contenido de polifenoles de 0.058 kg EAG, esto quiere decir que en 1 kg solo el 0.64% son polifenoles, siendo el porcentaje restante impurezas y otros compuestos arrastrados por el solvente.

4.4 Pruebas de calidad en los aceites

Dentro de las pruebas de calidad realizadas a los aceites están: ácidos grasos libres, índice de peróxido, claridad, actividad antioxidante DPPH, con frecuencia de uso de 0, 10, 20 veces de uso y con concentración de polifenoles de 0%, 0.02% y 0.04%.

4.4.1 Prueba de Ácidos grasos libres

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de AGL para cada una de las combinaciones de los factores y niveles, en la cual se puede observar que ninguno de los valores excede el máximo permisible de 0.2 % (como ácido oleico) establecido en las normas NTE INEN 33. También se puede verificar que el valor más alto de AGL fue

0.126±0.012% y se dio cuando la concentración de polifenol en el aceite fue del 0%, con frecuencia de uso 20 veces. Mientras que el valor más bajo fue 0.046±0.002% y se dio con una concentración de 0.04% y frecuencia de 0 veces seguido de 0.057±0.004% con frecuencia de 10 veces y concentración del 0.04% lo cual muestra un incremento del 0.011%.

Tabla 8. Ácidos grasos libres en los aceites formulados

Frecuencia de uso (veces)	Concentración polifenoles (%)	Ácidos Grasos Libres (%Ácido oleico)
-1	-1	0.055±0.002
-1	0	0.047±0.001
-1	1	0.046±0.002
0	-1	0.086±0.011
0	0	0.064±0.005
0	1	0.057±0.004
1	-1	0.126±0.012
1	0	0.083±0.008
1	1	0.073±0.004

En la Figura 9 se puede apreciar una relación directamente proporcional con la frecuencia de uso y la presencia de AGL, aunque cuanto más alta fue la concentración de polifenoles en el aceite menor fue la cantidad de AGL en todas las frecuencias de uso. Es por esto que la mayor cantidad de AGL se observa cuando la frecuencia de uso es de 20 veces y con concentración de 0%.

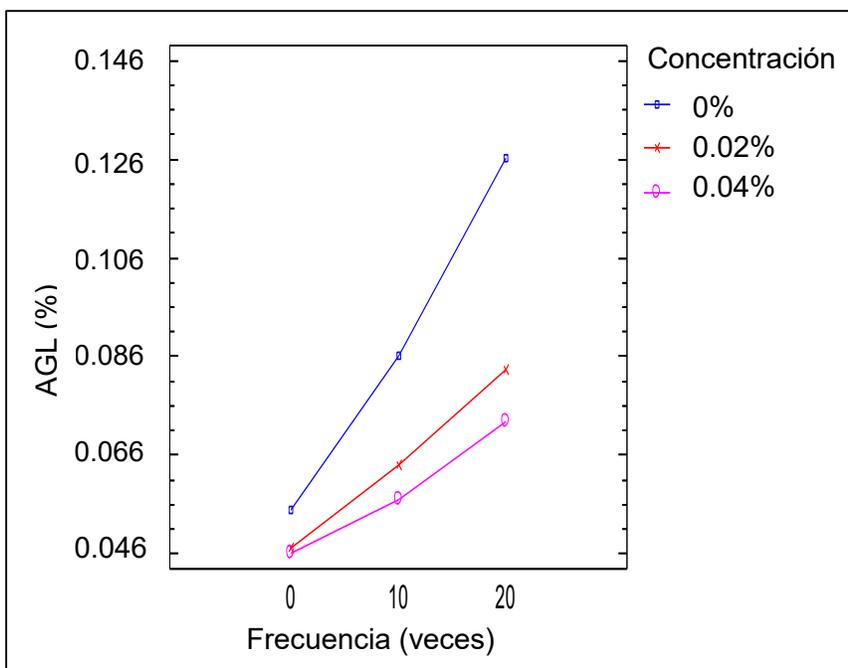


Figura 9. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia y ácidos grasos libres.

En la Figura 10 y Figura 11 se presentan los valores más bajos de AGL para una concentración de 0.04% para todas las frecuencias de uso, comparando con las otras concentraciones. Esto significa que los resultados más favorables se obtienen con una concentración de 0.04%, ya que lo que se busca es reducir la cantidad generada de AGL a medida que aumenta la frecuencia de uso.

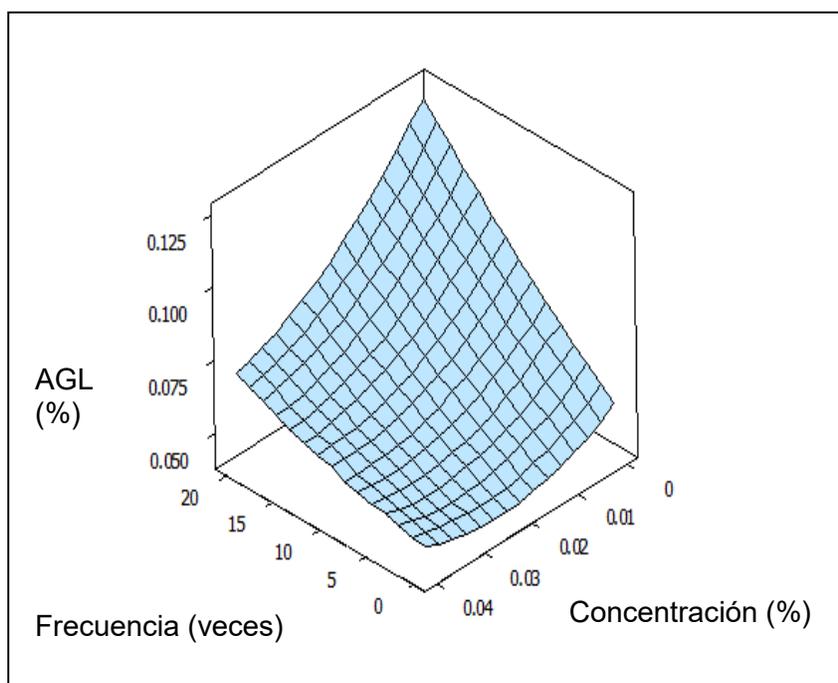


Figura 10. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre ácidos grasos libres.

Además, en la Figura 11 se observa que para que la frecuencia de uso no exceda el límite de 20 veces, la concentración requerida de polifenoles requerida sería menor a 0.01%.

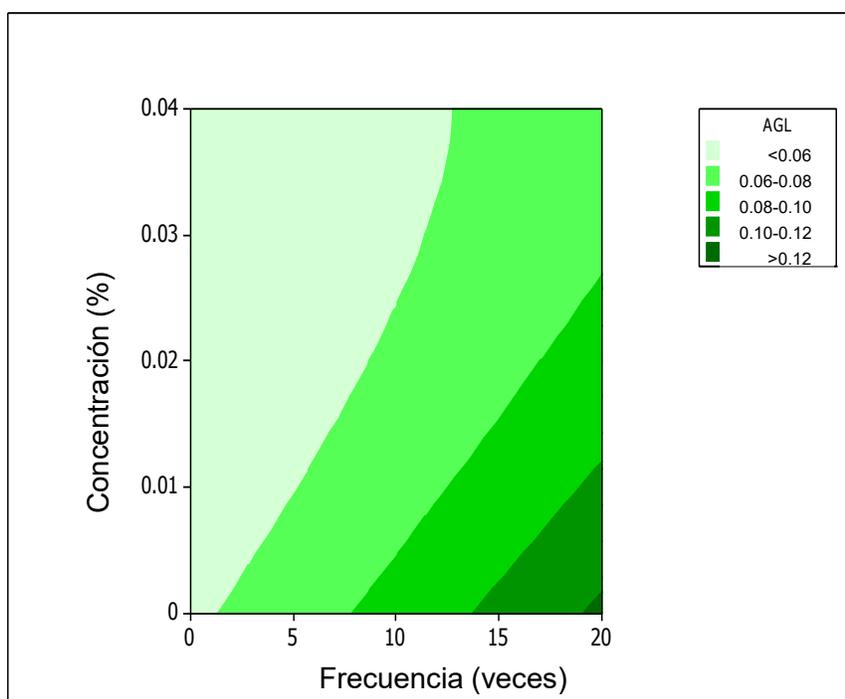


Figura 11. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre ácidos grasos libres.

4.4.2 Prueba Índice de peróxido

En la Tabla 9 se muestran los valores del índice de peróxido para los diferentes valores de frecuencia y concentración y se puede observar que un valor no cumple con el límite máximo permisible de $10 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ establecido en la norma NTE INEN 33.

El mayor valor fue $12.843 \pm 0.417 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ y se dio cuando la concentración de polifenol en el aceite fue del 0%, con frecuencia de uso 20 veces, mientras que el menor valor fue $2.187 \pm 0.158 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$, para una concentración de 0.04% y frecuencia de uso de 0 veces, seguido de $3.398 \pm 0.088 \text{ meq O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ con una concentración de 0.04% y frecuencia de uso de 10 veces lo cual muestra un incremento del 1.21%.

Tabla 9. Índice de peróxido en los aceites formulados

Frecuencia de uso (veces)	Concentración polifenoles (%)	Índice de Peróxido (meq O ₂ ·kg ⁻¹)
-1	-1	2.254±0.102
-1	0	2.254±0.084
-1	1	2.187±0.158
0	-1	3.898±0.058
0	0	3.732±0.067
0	1	3.398±0.088
1	-1	12.843±0.417
1	0	8.356±0.374
1	1	6.887±0.347

En la Figura 12 se puede observar que en la frecuencia de uso de 0 a 10 veces el incremento del IP no es significativo mientras que en la frecuencia de uso de 10 a 20 veces el incremento fue significativo, aún más cuando la concentración fue 0%. Esto se debe a que con el comienzo de la oxidación lipídica se produce una reacción en cadena durante la cual el incremento del IP es controlado en la fase inicial (0 a 10 veces), luego se produce la propagación

debido a la rápida acumulación de oxígeno y de peróxidos dando lugar a un elevado incremento del IP (después de 10 veces de uso). Se observa además, que la adición de polifenoles retarda el proceso de propagación es así que se obtienen valores bajos de IP mientras mayor sea la concentración de polifenoles.

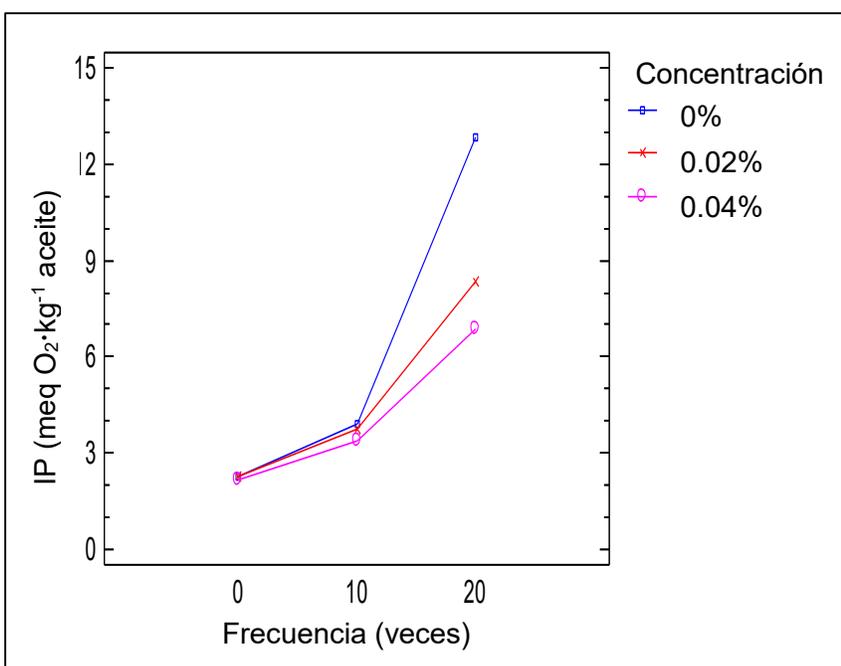


Figura 12. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia e índice de peróxido.

En la Figura 13 y Figura 14 se observa una relación inversa entre la concentración de polifenoles y el valor IP para todas las frecuencias de uso, es decir que los valores más bajos de IP se observaron con la concentración de 0.04% en todas las frecuencias de uso, siendo estos los resultados más favorables ya que lo que se busca reducir la generación de IP a medida que aumenta la frecuencia.

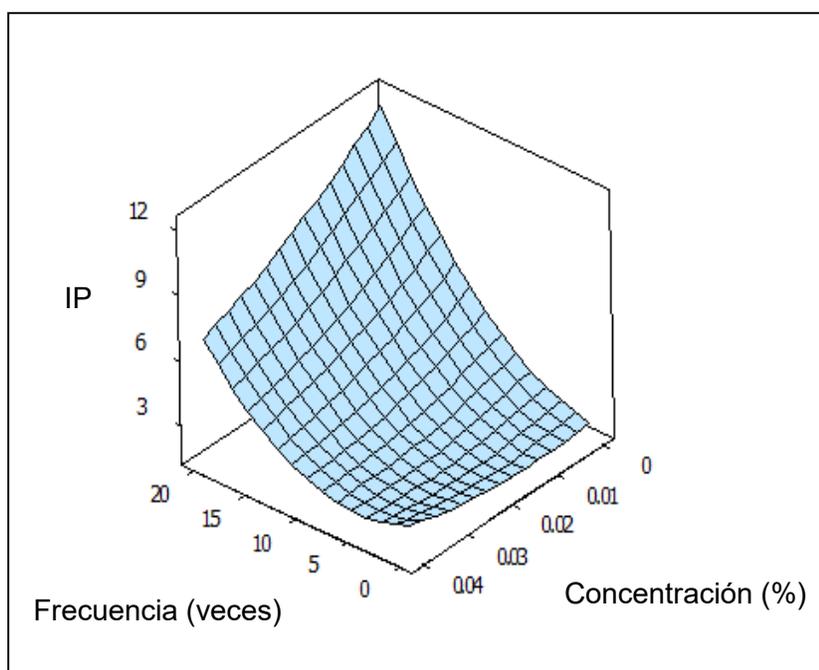


Figura 13. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre índice de peróxido.

Para que la frecuencia de uso de 20 veces no exceda el límite, en la Figura 14 se puede observar que la concentración requerida de polifenoles sería aproximadamente 0.01%.

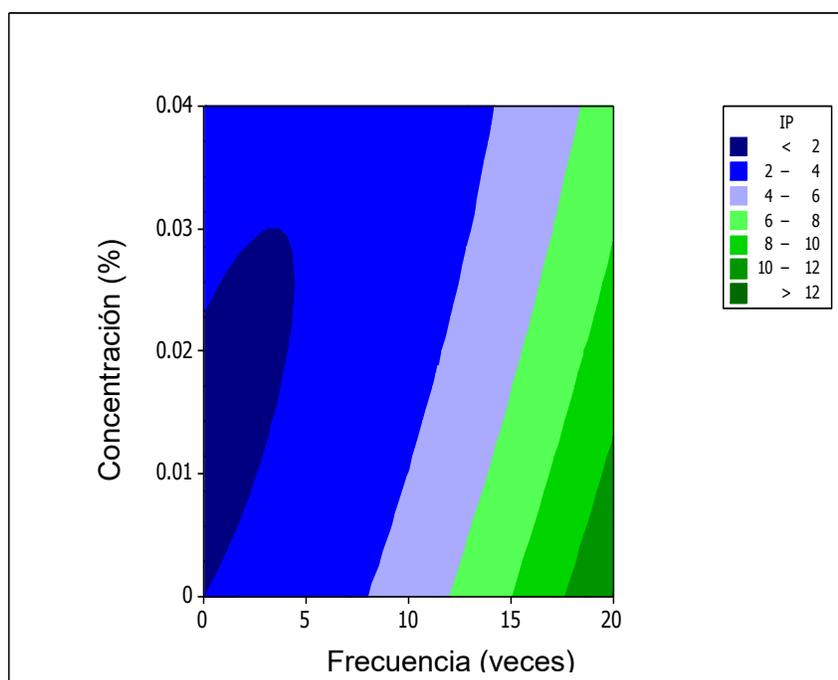


Figura 14. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre índice de peróxido.

4.4.3 Prueba de claridad

En la Tabla 10 se muestra los valores de la claridad de los aceites para las diferentes combinaciones de los factores, mientras mayor sea el porcentaje de transmitancia mayor será la claridad del aceite.

Tabla 10. Claridad en los aceites formulados

Frecuencia de uso (veces)	Concentración polifenoles (%)	Claridad (%T)
-1	-1	89.847±0.052
-1	0	88.360±0.176
-1	1	86.192±0.379
0	-1	86.502±1.168
0	0	85.155±1.005
0	1	82.406±0.407
1	-1	83.704±1.484
1	0	82.630±3.295
1	1	80.345±1.548

En la Tabla 10 el mayor valor fue 89.847±0.052%, para una concentración de 0% y frecuencia de 0 veces, seguido de

86.502±1.168% para una concentración de 0% y frecuencia de 10 veces lo cual muestra una disminución del 3.5%, mientras el menor valor fue 80.345±1.548 y se dio con una concentración de 0.04% y frecuencia de 20 veces.

En la Figura 15 se observa que mientras menor fue el contenido de polifenoles mayor fue el porcentaje de transmitancia, es decir que el aceite era más claro.

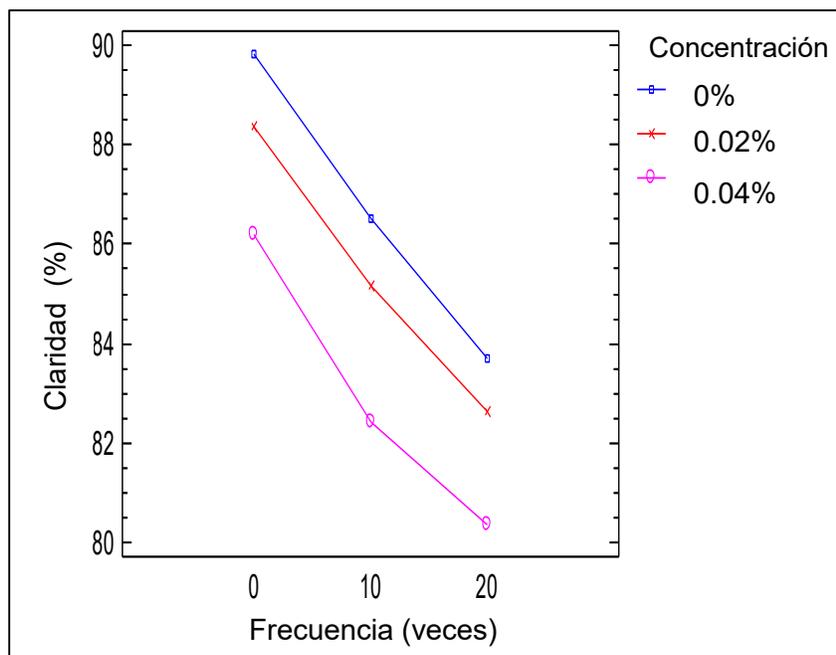


Figura 15. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia y claridad.

En la Figura 16 y Figura 17 se observaron los valores más bajos de claridad para una concentración de 0.04% para todas las frecuencias de uso y los valores más altos para una concentración de 0% para todas las frecuencias de uso. Es decir que a medida que aumentó la frecuencia de uso, la claridad del aceite disminuyó independientemente de la adición de polifenoles.

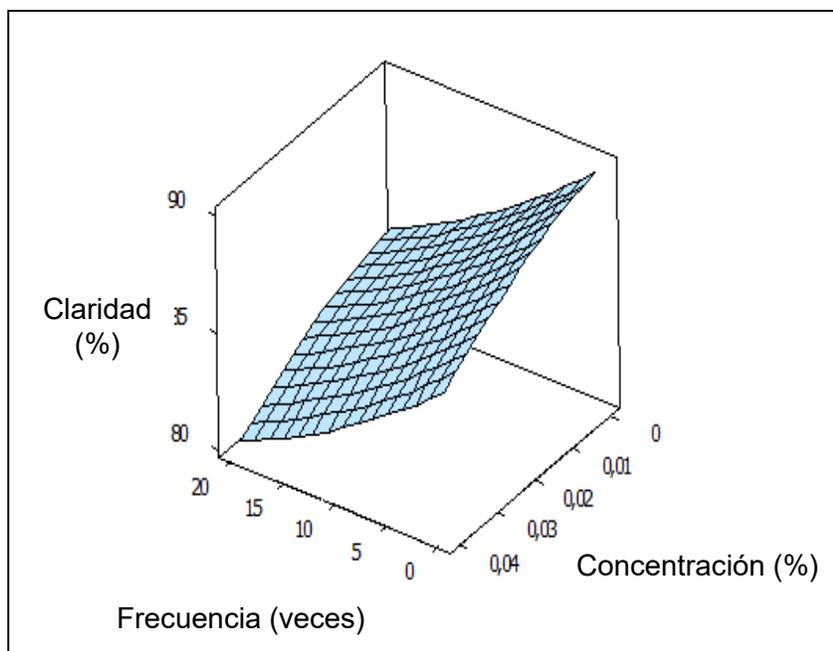


Figura 16. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre claridad.

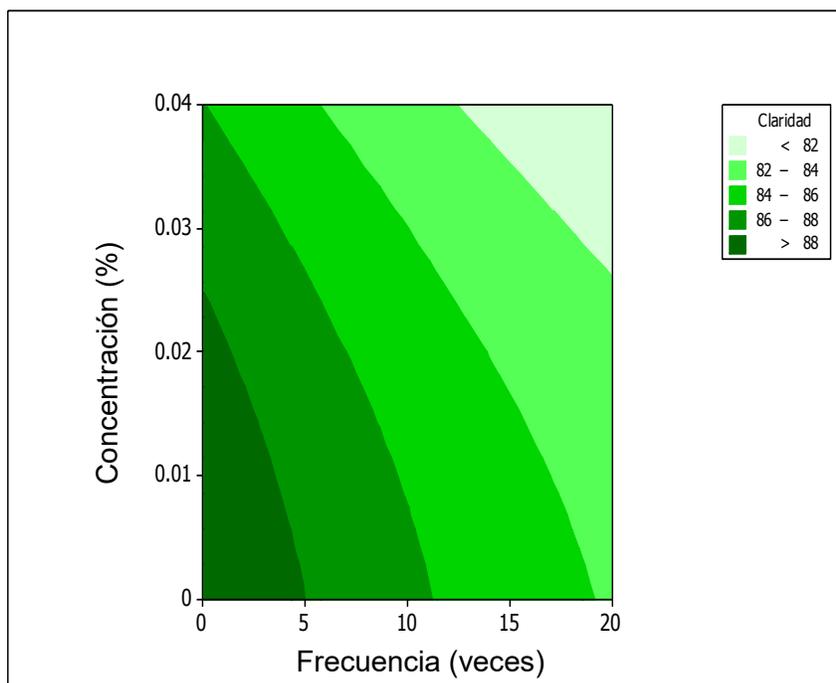


Figura 17. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre claridad.

4.4.4 Prueba de Actividad Antioxidante DPPH

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la prueba y se puede observar que mientras mayor fue la concentración de polifenoles mayor fue la actividad antioxidante (%AA) en los aceites, es decir que el mayor valor fue $83.975 \pm 1.19\%$, con una concentración de 0.04% y frecuencia de 0 veces de uso seguido de 80.108 ± 1.177 con

una concentración de 0.04% y frecuencia de 10 veces lo cual refleja una disminución del 4%. El menor valor fue de $34.934 \pm 2.328\%$ y se obtuvo con concentración de 0% y frecuencia de uso de 20 veces.

Tabla 11. Actividad antioxidante DPPH en aceites formulados

Frecuencia de uso (veces)	Concentración polifenoles (%)	Actividad Antioxidante DPPH (%AA)
-1	-1	45.026 ± 3.123
-1	0	73.767 ± 2.100
-1	1	83.975 ± 1.190
0	-1	42.944 ± 1.106
0	0	70.835 ± 0.616
0	1	80.108 ± 1.177
1	-1	34.934 ± 2.328
1	0	65.682 ± 0.698
1	1	75.124 ± 0.723

En la Figura 18, se aprecia de forma gráfica el comportamiento de %AA DPPH para los diferentes valores de frecuencia y concentración. Se puede observar que a medida que aumenta la frecuencia de uso disminuye el %AA para todas las concentraciones.

Esto se debió a que durante el proceso de fritura una parte de los antioxidantes se quedan en el producto frito y otra parte es utilizada para estabilizar los radicales libres lipídicos producidos por la oxidación y el proceso de descomposición térmica que se produce debido a la exposición a la humedad, las altas temperaturas y la luz, mientras mayor sea la frecuencia de uso del aceite mayor será el consumo de polifenoles para estabilizar el aceite. Aunque para las concentraciones de 0.02% y 0.04% con frecuencia de 20 veces aún se observa un %AA alto.

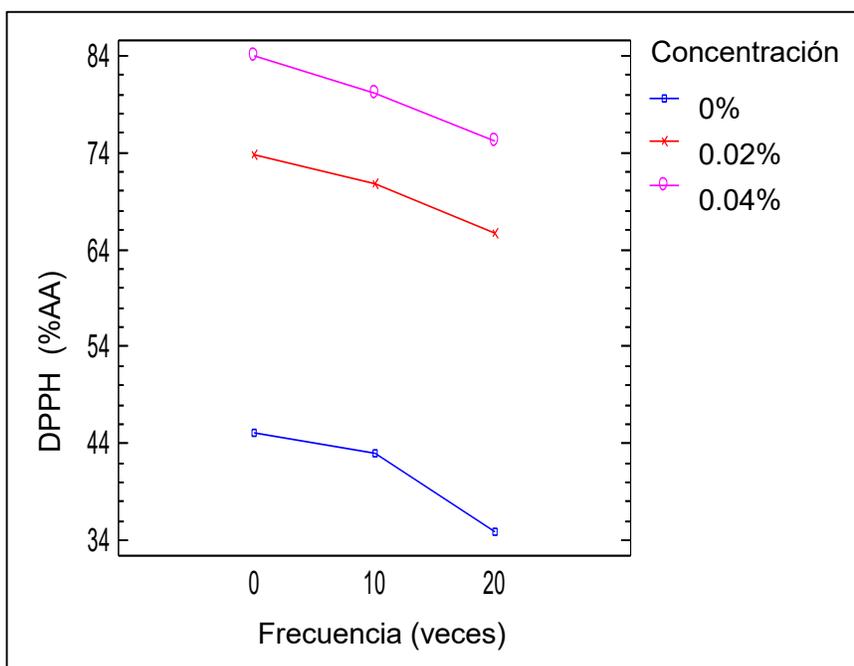


Figura 18. Gráfico de interacciones de concentración, frecuencia y actividad antioxidante DPPH.

En la Figura 19 y Figura 20 los valores más bajos de %AA se observaron para una concentración de 0% en todas las frecuencias y los valores más altos para una concentración de 0.04% en todas las frecuencias.

Esto significaría que utilizar una concentración de 0.04% sería más favorable si lo que se busca es alargar la frecuencia de uso del aceite más de 20 veces.

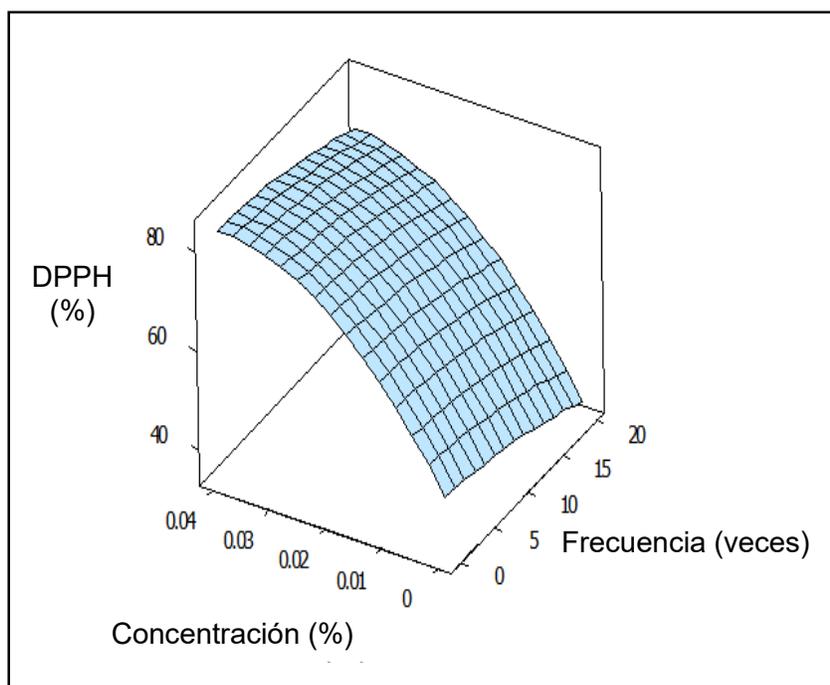


Figura 19. Gráfico de superficie de concentración y frecuencia sobre actividad antioxidante DPPH.

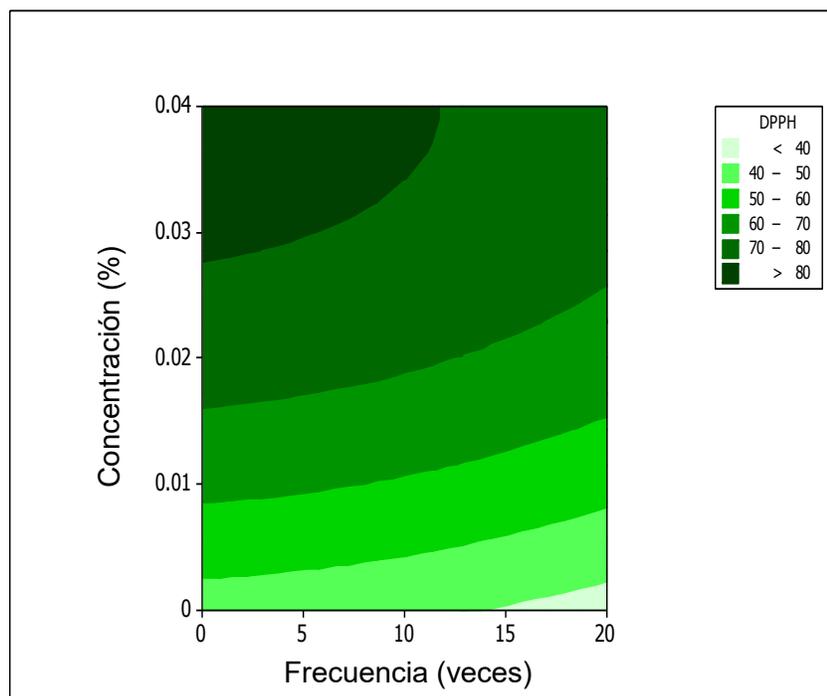


Figura 20. Gráfico de contorno de concentración y frecuencia sobre actividad antioxidante DPPH

4.5 Optimización

El proceso de optimización se basó en determinar la cantidad mínima de polifenol que se necesita añadir al aceite para poder utilizarlo hasta 20 veces sin que se excedan los valores máximos permisibles establecidos en la norma NTE INEN 33 para IP ($<10 \text{ meqO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$) y AGL ($<0.2\%$).

La optimización es obtenida a partir de los valores mostrados en la Tabla 12 y de acuerdo al análisis, la concentración requerida de polifenol fue de aproximadamente 0.01% con un valor de deseabilidad de 97.59% (Anexo II).

Tabla 12. Valores de optimización

Respuesta	Objetivo	Límites de la Norma	Condiciones del proceso
AGL (%)	0.1	0.2	0.01% de polifenol 20 veces uso de aceite
IP (meq)	9.99	10	

4.6 Resumen ANOVA de las variables

En la Tabla 13 se muestra el resumen ANOVA de las variables del diseño. Los factores significativos A y B representan la frecuencia y concentración respectivamente. El valor de R cuadrado para todas las pruebas es superior al 70% lo cual indica que el modelo es adecuado para el diseño estadístico.

Tabla 13. Resumen ANOVA de las variables de acuerdo al diseño

	AGL	IP	Claridad	%AA
Modelo	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático
Falta de ajuste	Significativo	No significativo	Significativo	Significativo
R ²	93.92	96.64	85.77	99.25
R ² ajustado	92.48	95.85	82.38	99.07
Ecuación	Y=0.06+ 0.02A- 0.02B+ 0.01B ² - 0.01AB	Y=3.4+3.6A- 1.1B+2.1A ² - 1.5AB	Y= 85.1- 2.9A-1.9B	Y= 71.1 - 4.5A+ 19.4B- 1.6A ² - 9.7B ²
Factor significativo	A, B, AB, B ²	A, B, AB, A ²	A, B	A, B, A ² , B ²

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De acuerdo al análisis estadístico realizado el método de extracción de reflujo permitió obtener un mayor contenido de polifenoles totales, utilizando muestra desengrasada y agua como solvente.

El rendimiento del proceso de obtención de polifenoles en polvo fue de 11% con respecto a la cáscara de cacao y de ese porcentaje el 0.64% son polifenoles, lo que denota que el proceso de extracción no es selectivo para polifenoles ya que un gran

porcentaje del extracto corresponde a impurezas y otros compuestos.

De acuerdo a las pruebas de calidad realizadas a los aceites formulados con frecuencia de uso de 0, 10 y 20 veces se comprobó que los polifenoles mejoraron la estabilidad de los aceites obteniendo como resultado que a mayor concentración de extracto de polifenol el IP, AGL y %AA DPPH serían más favorables con la desventaja de que la claridad disminuyó.

Se determinó mediante la optimización de superficie de respuesta que para alargar la frecuencia de uso de los aceites hasta 20 veces sin que se excedan los límites establecidos de IP y AGL se requiere la adición de solo 0.01% de polifenol.

La información presentada en este estudio podría ser utilizada por la industria alimenticia para sustituir los antioxidantes sintéticos que normalmente se utilizan en los aceites.

5.2 Recomendaciones

Realizar estudios de factibilidad económica de la obtención de polifenoles a partir de la cáscara de la semilla de cacao para su utilización como aditivo conservante en aceites vegetales comestibles.

Ampliar estudios de los polifenoles totales que se obtienen utilizando los métodos de extracción reflujo, microondas y ultrasonido utilizando tiempos de extracción más largos.

Desarrollar estudios comparativos entre antioxidantes sintéticos y polifenoles para diferenciar sus usos como aditivos antioxidantes.

Aprovechar los residuos que quedan luego del proceso de obtención de polifenoles en la agricultura o en la industria alimenticia.

ANEXOS

ANEXO I- CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO.

Tabla 14. Datos de curva de calibración de ácido gálico

Con. Ac. Gálico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Absorbancia
0	0
1	0.054
2	0.124
3	0.191
4	0.245
5	0.335

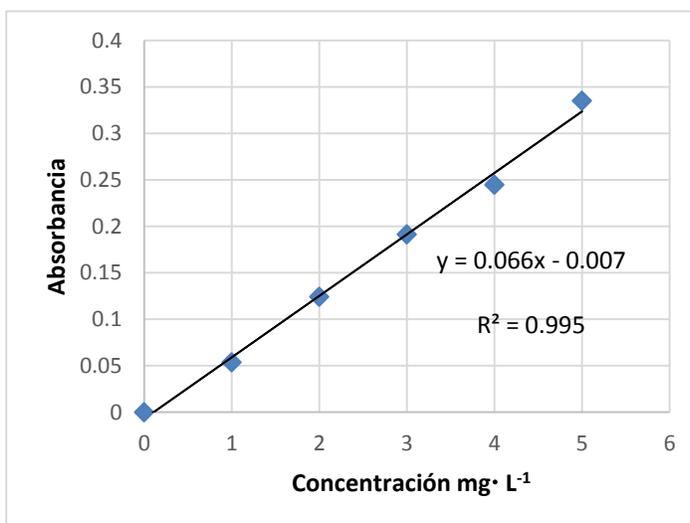


Figura 21. Curva de calibración de ácido gálico

ANEXO II – OPTIMIZACIÓN DE ANTIOXIDANTES A UTILIZAR EN ACEITES PARA OBTENER EL EFECTO DESEADO

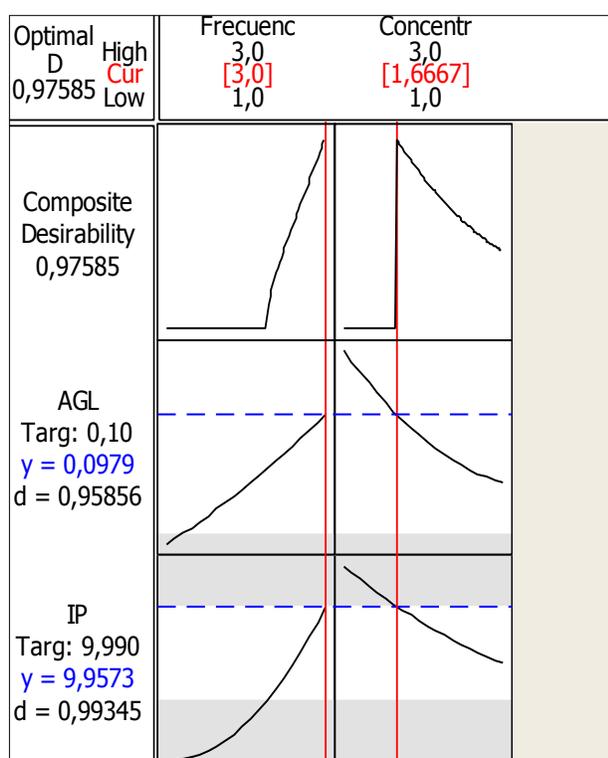


Figura 22. Optimización de la concentración de polifenoles

ANEXO III – MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENÓLES CRUDOS



Figura 23. Método Reflujo



Figura 24. Método ultrasonido



Figura 25. Método microondas

ANEXO IV – OBTENCIÓN DE POLIFENOLES



Figura 26. Filtración



Figura 27. Centrifugación



Figura 28. Microfiltración



Figura 29. Liofilización

ANEXO V - DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES MEDIANTE MÉTODO FOLIN- CIOCALTEU



Figura 30. Preparación de las muestras



Figura 31. Dilución

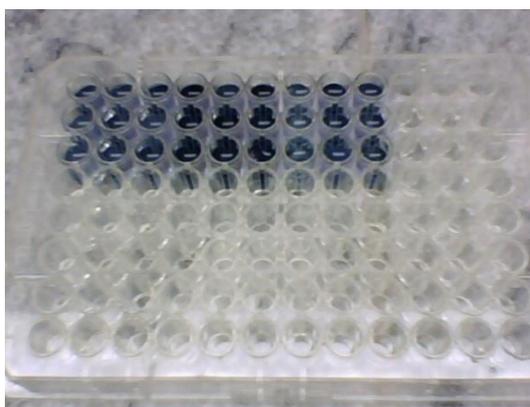


Figura 32. Muestras en microplaca para lectura en el espectrofotómetro

ANEXO VI - DETERMINACIÓN DE AGL, IP, CLARIDAD Y %AA DPPH.

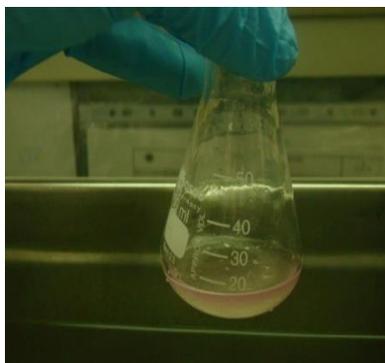


Figura 33. Prueba de AGL



Figura 34. Prueba de IP



Figura 35. Prueba de claridad

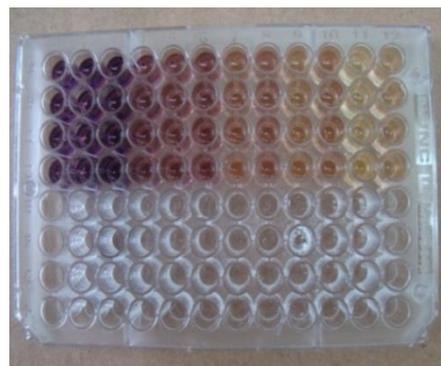


Figura 36. Actividad antioxidante

BIBLIOGRAFÍA

1. Winkel, T. (2013). *Ecuador and cacao: an old alliance. A peace corps masters international project*. Colorado state university: Department of horticulture and landscape architecture. Fecha de recuperación: 19 de agosto de 2014, de http://wsnet.colostate.edu/cwis30/websites/international_ed/forms/rip%20thesis.pdf
2. Murillo, I., Quilambaqui, M. (2008). *Evaluación de 2 dietas experimentales con diferentes niveles de cascarilla de cacao (theobroma cacao l.) en las fases de crecimiento y acabado de cuyes (cavia porcellus l.) de raza andina*. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Tesis de grado. Fecha de recuperación: 22 de agosto de 2014, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/.../primera%20parte.doc>
3. International cocoa organization. (2003). *Products that can be made from cocoa*. Fecha de recuperación: 25 de agosto de 2014, de:

<http://www.icco.org/faq/52-by-products/115-products-that-can-be-made-from-cocoa.html>.

4. Sánchez, J. (2013). *Evaluación energética de cáscaras de cacao nacional y ccn-51*. Ecuador: Universidad de Cuenca. Tesis de grado. Fecha de recuperación: 27 de agosto de 2014, de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/tesis.pdf>
5. Nsor-atindana, J., Fang, Z., Kebitsamang, J., Lamine, M. & Camel, I., 2012. *Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (theobroma cacao l.) Bean shells*. Pakistan journal of nutrition. 11(7), pp.574-579.
6. Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). *Techniques for analysis of plant phenolic compounds*. *Molecules*. 18, pp. 2328-2375.
7. Santos, D., Cavalcanti, R., Rostagno, M., Queiroga, C., Eberlin, M. & Meireles, M. (2013). *Extraction of polyphenols and anthocyanins from the jambul (syzygium cumini) fruit peels*. Food and public health. 3(1), pp. 12-20.

8. Nireesha, Gr., Divya, I., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjana, M., & Lavakumar, V. *Lyophilization/freeze drying - a review*. International journal of novel trends in pharmaceutical sciences. pp. 2277 – 2782.
9. Aditivos alimentarios. (1991). *Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud. Antioxidantes*. Fecha de recuperación: 15 de septiembre de 2014, de <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bromatologia/nutybro/higiene-alimentaria/documentos/conferenciaaditivos.pdf>
10. Misnawi, Teguh, W., Susijahadi, Eka, N., & Noor A. F. (2014). *The utilization of cocoa polyphenol extract to improve the shelf life of bulk frying oil used in open and deep frying*. International food research journal. 2(1), pp. 111-118.
11. Bhooshan, K. & Rizvi, S. (2009). *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxid med cell longev. 2(5), pp. 270-8.

12. Boskou, D., Tsimidou, M., & Blekas, G. (2006). *Olive oil: chemistry and technology. Polar phenolic compounds*. Laboratory of food chemistry and technology. Aristotle university of Thessaloniki. pp. 11-14. Fecha de recuperación: 27 de agosto de 2014, de: <http://aevnmont.free.fr/sach-books/petrochemistry/olive%20oil%20chemistry%20and%20technology/ao9788ch5.pdf>

13. Agencia pública de noticias del ecuador. (2013). *Todo el cacao que produce ecuador se vende*. Fecha de recuperación: 28 de agosto de 2014, de <http://www.andes.info.ec/es/reportajes/todo-cacao-produce-ecuador-vende.html>.

14. El universo. (2005). *Cacao CCN-51 se reconoce como de alta productividad*. Fecha de recuperación: 29 de agosto de 2014, de <http://www.eluniverso.com/2005/07/19/0001/9/2d498eac6a2c48f5b794afa40f1f83e0.html>

15. Ministerio de relaciones exteriores, comercio e integración. Instituto de promoción de exportaciones e

inversiones (Proecuador). (2013). *Estudio: análisis del sector cacao y elaborados*. Fecha de recuperación: 2 de septiembre de 2014, de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/proec_as2013_cacao.pdf

16. Botanical online. (2014). *Aceites vegetales*. Fecha de recuperación: 5 de septiembre de 2014, de http://www.botanical-online.com/aceites_vegetales.htm.

17. La seguridad alimentaria del chocolate. (2014). Fecha de recuperación: 7 de septiembre de 2014, de http://canacacao.org/uploads/smartsection/19_la_seguridad_alimentaria_del_chocolate.pdf.

18. Hii, C., Law, C., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. (2009). *Polyphenols in cocoa (theobroma cacao l.)*. *As. J. Food ag-ind.* 2(4), pp. 702-722.

19. Penn state news. (2008). *Probing question. How do antioxidants work*. Fecha de recuperación: 9 de septiembre de 2014, de

<http://news.psu.edu/story/141171/2008/08/18/research/probing-question-how-do-antioxidants-work>.

20. Wu, X. Yu, X., & Jing, H. (2011). *Optimization of phenolic antioxidant extraction from wuweizi (schisandra chinensis) pulp using random-centroid optimization methodology*. *Int j mol sci*. 12(9), pp. 6255–6266.
21. Blainski, A., Lopes, G., & Palazzo, J. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules*. 18(6), pp. 6852-6865.
22. Plant and food research. (2014). *Oxidation of food grade oils*. Fecha de recuperación: 10 de septiembre de 2014, de <http://www.oilsfats.org.nz/documents/oxidation%20101.pdf>.
23. Melton, S., Jafar, S., Sykes, D., & Trigiano, M. (2002). *Review of stability measurements for frying oils and fried food flavour*. University of Tennessee, Department of food science and

technology. Fecha de recuperación: 15 de septiembre de 2014, de <http://link.springer.com/article/10.1007%2F02541345#page-1>.

24. Rukunudin, I., White, P., Bern, C., & Bailey, T. (1998). *A modified method for determining free fatty acids from small soybean oil sample sizes*. JAOCS. 75(5): 563-8.
25. Pizarro, C., Esteban-díez, I., Rodríguez, S. & González, J. (2013). *Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra*. Food Control. 34(1), pp. 158-167.
26. Molyneux, P. (2004). *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 26(2), pp. 211-219.
27. Quiles, J., Ramírez, M., Gómez, J., Huertas, J., & Mataix, J. (2002). *Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying*. Food chemistry. 76, pp. 461–468.

28. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18th edition. Published by AOAC International. 2005. Oils and Fat. Chapter 41, pp. 11, 12, 13.
29. Minioti, K. & Georgiou, C. (2010). *Comparison of different tests used in mapping the greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant activity*. Grasas y aceites. 61(1), p. 45.
30. G. Unal. Antioxidant activity of commercial dairy products. Agro food industry hi-tech. (2012); 23(1): 39– 42.