

INFORME TÉCNICO

CONTRATO DE SUBVENCIONES

Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (*Caesalpinia spinosa*) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales

CO-INVESTIGADORES:

Dra. Rosana Chirinos-Gallardo

Dr. Milber Ureña Peralta

Ms.Sc. Indira Betalleluz Pallardel

Ms.Sc. Ana Aguilar Gálvez

Ms.Sc. Freddy Yavar Villanueva

Ing. Pablo Trellez Morales

Ing. Noemí Bravo Aranibar

Ing. Flor Chambi Jallurana

NOMBRE DE LA INSTITUCION EJECUTORA

Universidad Nacional Agraria La Molina

Av. La Molina s/n

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr. David Campos Gutierrez

Calle 7, Residencial Santa Patricia F-107, Urb Santa Patricia 2da Etapa. La Molina

dcampos @lamolina.edu.pe

Telefax 3495764

Celular: 998431508

RESUMEN

En el estudio de los factores que afectan el proceso de extracción de los taninos a partir de las vainas de tara en polvo, se encontró que el pH y la relación materia prima/solvente no influyen de forma significativa ($p < 0.05$). Sin embargo el solvente presenta una influencia significativa, siendo el mejor solvente de extracción la acetona al 80%, seguido del agua, el etanol 80% y finalmente el metanol 80%.

De acuerdo al criterio “mayor es mejor” del método de Taguchi, utilizando el agua como solvente de extracción, se determinó que el factor relación materia prima/solvente no afecta de forma significativa la extracción de los taninos de la tara, pero si la temperatura y el tiempo de extracción. Para la etapa de optimización de la extracción se usó el método Superficie Respuesta utilizando el Diseño Compuesto Central Rotable, obteniéndose el modelo matemático: % *Taninos hidrolizables* = $306,85 + 7,51*Temperatura - 32,46*Tiempo - 0,075*Temperatura^2 + 0,036*Temperatura*Tiempo + 5,97*Tiempo^2$. La máxima recuperación de taninos hidrolizables de la tara fue de 473.4 mg á gálico equi./g (b.s), bajo las siguientes condiciones: solvente agua; pH de extracción: 3.5; relación materia prima solvente: 1/60, temperatura: 57.9°C y tiempo de 0.58 h.

La hidrólisis de taninos de la tara en H_2SO_4 a 100 °C, muestra una cinética de primer orden, obteniéndose la máxima hidrólisis en 20 horas. La capacidad antioxidante se incrementa con el grado de hidrólisis (GH) hasta que este alcanza 38,8 %, luego del cual se mantiene constante en un valor de 26 μ mol trolox equi./ mg á gálico equi.

La eficacia antioxidante de los taninos hidrolizados se midió mediante un análisis isotérmico a 140°C por calorimetría de barrido diferencial (DSC), encontrándose que los taninos hidrolizados poseen un efecto antioxidante favorable en aceite de soya. La eficacia antioxidante se incrementa con el grado de hidrólisis, llegándose a igualar al TBHQ en un GH de 88,4 %, y superarlo cuando el GH fue de 93,8 y 100,0 %. A concentraciones de 50, 100, 200 y 300 ppm y 140 °C mediante DSC, se encontró que la eficacia antioxidante del hidrolizado es dependiente de su concentración en el aceite y llega a superar al TBHQ a partir de 100 ppm.

Mediante la adición de taninos hidrolizados de tara es posible aumentar la estabilidad del aceite de soya a 60 °C. Los hidrolizados redujeron la formación de hidroperóxidos, dienos conjugados y productos secundarios de la oxidación en aceite de soya durante el almacenamiento realizado a 0, 5, 10, 15 y 20 días. Sin embargo el TBHQ fue mas eficiente en la protección del aceite bajo las mismas condiciones de evaluación.

Los extractos de tara entero e hidrolizados por 4 h y 9h protegieron eficientemente a la carne de cerdo sometida a almacenamiento en refrigeración (4°C por 6 días) de la oxidación lipídica a las concentraciones de fenólicos de 100, 200 y 600 ppm. Los mismos extractos presentaron buenas características antioxidantes frente a la oxidación de proteínas de la carne de cerdo a la concentración de 100 ppm.

Palabras clave: tara, *Caesalpinia spinosa*, taninos, galotaninos, hidrólisis, ácido gálico, capacidad antioxidante, aceite,carne.

I. INTRODUCCION

La tara (*Caesalpinia spinosa*) es un árbol de origen peruano que crece en las zonas secas. Sus flores son de color amarillo rojizo dispuestas en racimos, sus frutos son vainas aplanadas de color naranja de 8 a 10 cm de largo que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeadas de 0.6 a 0.7 cm de diámetro cada una. Crece en forma silvestre en la región andina y costa peruana. Es cultivada en terrenos situados entre los 1000 y 2900 msnm; las principales zonas productoras son los departamentos de: Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Ancash y Huánuco (De la Cruz, 2004).

El Perú es el mayor productor de tara en el mundo con el 80% de la producción mundial. La mayor parte de esta producción se destina a la exportación, como polvo de vaina de tara a países como: Argentina, Italia, Estados Unidos, Alemania, Brasil, Uruguay, Bélgica, China, Sudáfrica, México, Corea, Suiza y Francia. La exportación de tara data desde 1942, sin embargo es a partir de la década de los 70 que el volumen y precio se incrementaron, reportándose niveles de 2056 a 5820 TM/año entre los años 1975 y 1979 con precios FOB de 190 a 245 US\$/TM respectivamente. En la década de los 80 la exportación de tara descendió desde 3883 TM/año (1980) a 1644 TM/año (1989) con precios de 359 a 248 US\$/TM, respectivamente. Finalizando esta década aparece un nuevo mercado en Asia, Japón, India y como principal país de destino China; en la década de los 90 se reinicia el incremento de la exportación con 2614 TM/año, con un precio FOB de US\$ 370, llegando en el año 1997 a exportarse 6531 TM a 434 US\$/TM. En los últimos años las exportaciones de tara en polvo sobrepasaron las 12,000 TM y un valor promedio US\$ 750.

La tara, como fuente natural integral (tallo, hojas y frutos) es utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica o popular como: astringente, cicatrizante, antidisentérico, también como mordiente en teñidos. Se atribuye estas propiedades a su gran potencial como antioxidante.

Las vainas, previamente despepitadas, representan aproximadamente el 62% del peso del fruto, en esta se concentra la mayor parte de los taninos. Las vainas secas son molidas para obtener polvo de tara de diferente granulometría (grueso o ultrafino), del que se puede obtener un extracto acuoso que luego de ser decantado/filtrado, concentrado y secado por atomización se obtiene extracto tánico de tara, del que se

puede obtener ácido tánico, ácido galotánico y ácido gálico. De las semillas o “pepas”, mediante un proceso termo-mecánico, se obtiene una goma de uso alimenticio proveniente del endospermo, constituyéndose en una importante alternativa a las gomas tradicionales en la industria mundial de alimentos, pinturas, barnices, entre otros.

En los últimos años se ha incrementado la aplicación industrial de la tara, debido a que sus vainas son fuentes importante de taninos, un compuesto fenólico que se utiliza en la industria como clarificador del vino, como sustituto de la malta en la elaboración de cerveza y como materia prima para la producción de ácido gálico que es utilizado como antioxidante en la industria de los aceites (De la Cruz, 2004).

Los taninos se dividen en, taninos condensados y taninos hidrolizables, la tara en polvo contiene gran cantidad de éstos últimos (50 a 60 g/100 g de tara), principalmente del tipo galotaninos y en menor proporción elagitaninos. Los taninos, se hidrolizan por acción de ácidos o enzimas originando un azúcar, un polialcohol y un ácido fenol carboxílico, de la naturaleza de este último ácido depende su subdivisión en: galotaninos y elagitaninos (figura 1). La hidrólisis completa de los taninos de la tara da cantidades importantes de ácido gálico (o derivados) y en menor concentración ácido elágico (o derivados), compuestos cuya capacidad antioxidante es mayor que la de los taninos; siendo una alternativa interesante determinar la capacidad antioxidante de los hidrolizados de los taninos de la tara y evaluar su eficacia en la conservación de productos oleosos como aceite de soya y carne de pescado.

La transformación de los taninos de la tara en compuestos fenólicos antioxidantes de bajo peso molecular puede ser una alternativa para la obtención de extractos de alto valor agregado cuya demanda actual es creciente por su utilidad como suplemento alimenticio, su aplicación farmacéutica y como sustituto de antioxidantes sintéticos empleados en la industria de alimentos.

Según Srivastava (2000), el ácido tánico (TA) es un típico tanino hidrolizable que consiste en una mezcla de ácido gálico y de ésteres de glucosa. De manera similar a los taninos condensados, también el ácido tánico es conocido por su capacidad de inducir efectos benéficos sobre la salud humana a través de la expresión de algunas

actividades biológicas, incluida antimutagénesis, propiedades antioxidantes y acción anticancerígena.

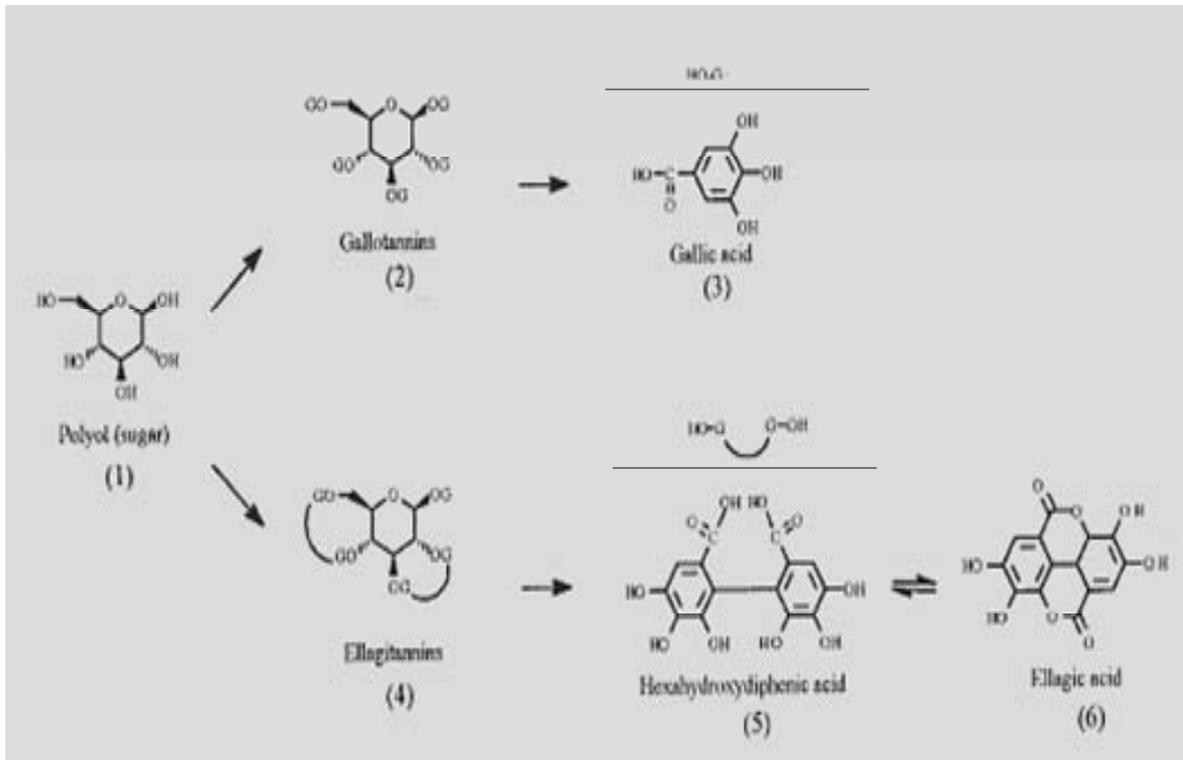


Figura 1. Galotaninos y elagitaninos hidrolizables

Según Garro et al. (1997) las vainas de tara tienen una cantidad importante de taninos hidrolizables cuyo producto principal es el ácido gálico.

Los taninos, junto con las catequinas, están entre los antioxidantes más potentes de origen vegetal conocidos. Pueden formar complejos con los metales reactivos, reduciendo su absorción, evitando que el exceso de tales elementos (cationes del metal) en el cuerpo puedan promover la generación de radicales libres y contribuir a los efectos perjudiciales del daño oxidativo de la membrana celular y del ADN celular; además funcionan como potentes limpiadores de radicales libres dentro del cuerpo, neutralizándolos antes de que puedan causar daños celulares (Hagerman *et al.*, 1998 y Gaulejac *et al.* 1999). Adicionalmente, inciden en la protección y regeneración de otros antioxidantes dietéticos (como la vitamina E).

Dada las características antioxidantes de los taninos hidrolizables y de los productos de su hidrólisis, como el ácido gálico, sus posibles aplicaciones en sistemas alimenticios como en aceites o carnes son muy factibles. El deterioro oxidativo de proteínas y lípidos es uno de los mayores problemas que afectan a la industria de alimentos debido a la pérdida de calidad asociada con dichos procesos. La oxidación lipídica disminuye las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos ya que involucra la pérdida de ácidos grasos esenciales y vitaminas con la consecuente generación de compuestos tóxicos, causando adicionalmente, cambios y deterioro en el color, sabor y textura (Morrisey *et al.*, 1998). De otro lado, el deterioro oxidativo de las proteínas ha sido ampliamente investigado en sistemas biológicos pero apenas considerado en sistemas alimenticios. Diversos estudios han demostrado que los procesos de oxidación proteica producen la polimerización y degradación de las proteínas en la carne, lo que conlleva a la disminución de la funcionalidad y solubilidad de las proteínas, así como también a cambios en cuanto a color y textura en los alimentos (Pokorny *et al.*, 2005).

Con la finalidad de frenar el deterioro oxidativo de los alimentos, generalmente la industria de alimentos usa antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y la terbutilhidroxiquinona (TBHQ) para retardar y/o prevenir el desarrollo de la oxidación en los alimentos (Frankel, 1996). Sin embargo el uso de estos antioxidantes sintéticos ha sido cuestionado debido a su potencial riesgo a la salud, ellos pueden ser responsables de la aparición del cáncer y carcinogénesis (Hou, 2003; Prior, 2004). Frente a esta realidad la búsqueda de antioxidantes naturales se ha convertido en una de las principales tareas a nivel de investigación alimentaria.

Objetivo general

- Determinar las condiciones óptimas para la obtención de extractos antioxidantes de tara y evaluar su eficacia en la protección frente a la oxidación en aceites y carnes.

Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de extracción óptimos para la obtención de taninos hidrolizables a partir de la vaina de tara, determinando en el extracto óptimo los compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de flavanoides y

flavonoides del tipo flavonas, flavonoles e isoflavonas así como el perfil de compuestos fenólicos principales mediante HPLC – DAD.

- Estudiar la cinética de hidrólisis química de los taninos del extracto de tara.
- Determinar la influencia del grado de hidrólisis de los taninos en la capacidad antioxidante “in vitro” y evaluar la eficacia antioxidante en aceite de soya y en carne de pescado.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (IBT), en el área de Biotecnología Industrial.

2.2 Materiales

2.2.1 Materia prima e insumos

Vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) provenientes del departamento de Ancash.

Aceite crudo de soya.

Carne de cerdo molida (parte lomo).

2.2.2 Equipos y materiales de laboratorio

Agitador magnético (Ceramic midi Polimax 2010 Ika), Balanza analítica (Ohaus Adventurer), Balanza semi-micro (Scientech), Balanza electrónica de precisión (Ohaus Scout II), Bomba de vacío (General Electric), Calorímetro de barrido diferencial (Perkin Elmer PYRYS IV), Centrífuga (Hettich Zentrifugen), Congeladora horizontal (Electrolux), Colector de fracciones (Eldex), Espectrofotómetro Génesis 20 (Milton Roy), Estufa (Mettler), Modulo de Separaciones HPLC Alliance Waters 2695 que comprende un Detector de arreglo de diodos Waters 2996 y un Detector de fluorescencia Multi Waters 2996 (Waters), Columna X Terra RP C₁₈ (250* 4.6 mm; 5 µm), Columna Atlantis C₁₈ (250 x 4.6 mm; 5 µm), Potenciómetro 410 (Aplus Termorion), Rotavapor Laborota 4000 (Heidolph), Sistema de liofilización Freezezone 4.5 (Labconco), Ultrasonido (Ultrasonic Cleaners 2510 Brandson) Vortex Mixer Wizard y Classic Velp y otros materiales de laboratorio.

2.2.3 Reactivos

ABTS 2,2 Azino-bis (3 ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid) diammonium salt 98% (Sigma Aldrich), Acetona (Fisher Scientific), Acetato de etilo (Sigma Aldrich), Acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific), Acido acético glacial (Fisher Scientific), Ácido clorhídrico fumante al 37 % (Merck), Ácido fórmico (Sigma Aldrich), Ácido gálico (Sigma Aldrich), Ácido sulfúrico (Merck), Ácido tiobarbitúrico (Sigma), Ácido tricloro acético (Fermont), Albúmina de suero bovina (Sigma), Almidón soluble (J.T.

Baker), Carbonato de sodio (Mallinckrodt), Cloroformo (Fermont), Etanol HPLC (Merck), Folin Ciocalteu 2N (Sigma Aldrich), Isooctano (Fermont), Metanol HPLC 99,8% (Sigma Aldrich), Nitrógeno gaseoso (AGA), Oxígeno (Praxair), p-Anisidina (Sigma Aldrich), Persulfato de potasio (Mallinckrodt), Rodanina (2-thio-4-ketothiazolidine) (Sigma Aldrich), TBHQ (Dresen Química), Tiosulfato de sodio (Merck), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) (Sigma Aldrich), Yoduro de potasio (Merck), Dinitrofenilhidrazina (Sigma), Hidrocloruro de guanidina (Merck), Sulfato de cobre (Riedel de Haën), Tartrato de sodio y potasio (Mallinckrodt).
otros reactivos empleados en los análisis.

2.3 Métodos de análisis

- Determinación de humedad y materia seca. Método gravimétrico reportado por la A.O.A.C (1995).
- Determinación de la actividad antioxidante. Método reportado por Arnao (2001).
- Determinación de compuestos fenólicos totales. Método reportado por Singleton y Rosi (1965).
- Determinación de ácido gálico y galotaninos. Método de Hagerman *et al.* (1998).
- Separación, identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos. Se empleará cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y un detector de arreglo de diodos según el método reportado por Tsao y Yang (2003). Los estándares, extractos y fracciones de fenólicos serán separados en una columna de fase reversa de C₁₈, X Terra RP₁₈ (250mm x 4,6mm; 5 μm) de Waters, con una fase binaria compuesta de ácido acético al 6% y acetonitrilo. Los compuestos fenólicos serán identificados usando un detector de arreglo de diodos (DAD) en el rango de 200 – 700 nm., de acuerdo a su espectro de absorción en la longitud de onda UV – visible y su respectivo tiempo de retención al comparar con los estándares.
- Determinación del periodo de inducción en la oxidación de aceite de soya por Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC). Según el método descrito por Besbes *et al.* (2005) y Tan *et al.* (2002).
- Determinación del índice de peróxido. Método 965.33 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995).
- Determinación del contenido de dienos conjugados. Método 957.13 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995).

- Determinación del índice o valor de p-anisidina (p-AV). Método 2.504 de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987).
- Determinación de la oxidación de proteínas en carne. Se utilizó el método descrito por Oliver *et al.* (1987), donde las proteínas oxidadas son detectadas con 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) el cual reacciona con los derivados de carbonilos de proteína para formar hidrazonas estables. Estas hidrazonas muestran una absorción visible con un máximo de absorbancia a 370 nm. Los resultados se expresan como nmol de carbonilos/ mg de proteína.
- Determinación de la oxidación lipídica en carne. Para medir la oxidación lipídica se empleó el método reportado por Rosmini (1996), el cual se basa en la reacción del malonaldehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para obtener un pigmento rojo que se forma por la condensación de dos moléculas de TBA con una molécula de MDA. La lectura se efectuará a 532 nm. Los resultados se expresarán como mg de MDA/ g de muestra.

2.4 Metodología experimental

2.4.1 Optimización de la extracción de los taninos de tara

Las vainas de tara fueron procesadas con la finalidad de obtenerla bajo la forma de harina (**Figura 2**), la cual posteriormente fue empleada para la extracción de taninos.

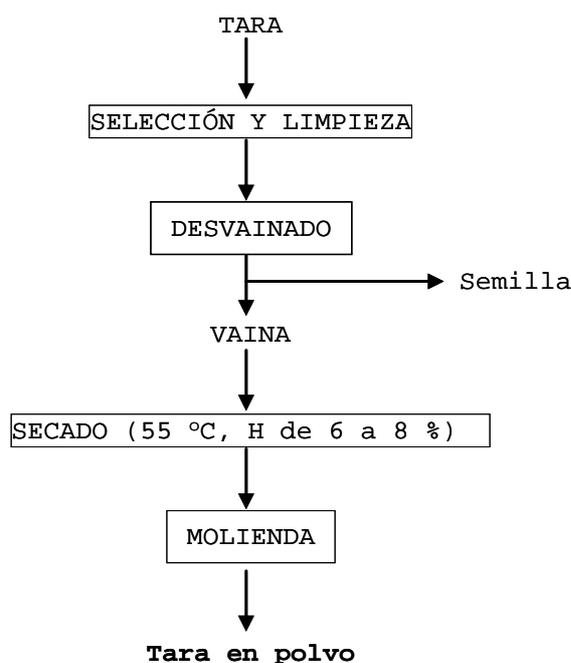


Figura 2. Flujo de operaciones para la obtención de taninos de tara

Para determinar y definir los factores que afectan el proceso de extracción de los taninos a partir de la tara en polvo, se realizaron pruebas preliminares con el fin de determinar el tipo de solvente más adecuado para el proceso de extracción de los taninos así como el pH del medio para lograr la máxima extracción de los taninos. Para ello se procedió a evaluar la extracción bajo las siguientes condiciones:

a. Variables:

Solvente: Metanol 80% (v/v), etanol 80% (v/v), agua y acetona 80% (v/v)

Nivel de pH: 2, 3 y 5

b. Constantes:

Temperatura y tiempo de extracción: 4°C por 20 h

Relación materia prima/solvente: 1/375

Los extractos obtenidos bajo estas condiciones fueron evaluados en contenido de taninos hidrolizables (galotaninos), compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Los resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando un ANOVA (multifactorial a un nivel de significación de $p < 0.05$), en caso existiesen diferencias significativas entre los factores evaluados se procedió a realizar el test de rangos múltiples de medias a través del procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD); seleccionándose finalmente el solvente y el pH más adecuado para la extracción.

Posteriormente para determinar y definir los factores que afectarían al proceso de extracción de los taninos de la harina de tara se realizó un “Screening” preliminar, en el cual se consideró como respuestas el contenido de taninos de los extractos (al ser este el componente fenólico más importante en la tara). Se evaluó la influencia de los siguientes factores: relación de materia prima/solvente (m/v), temperatura de extracción (°C) y tiempo de extracción (min). De la prueba preliminar se seleccionó el agua como el solvente de extracción de taninos más adecuado y se determinó que el pH, en el rango estudiado, es un factor que no influye en la extracción de los taninos. Se aplicó el diseño experimental correspondiente al criterio de “mayor es mejor” del método de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$ (Marfil, 1999), evaluando en forma simultánea, los tres factores que condicionarían la extracción de los taninos. La distribución de los factores, sus interacciones y los niveles mínimos y máximos de cada factor evaluado se presentan

en las **tablas 1 y 2**. Se realizó un análisis de varianza utilizando el programa STATISTICA® para determinar las diferencias significativas entre los factores.

Tabla 1. Niveles mínimos y máximos para el “screening” de los factores en el diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal $L_8 (2^7)$

Factores	Niveles	
	1	2
	Mínimo	Máximo
Materia prima/solvente (p/v) (A)	10	60
Temperatura (°C) (B)	25	75
Tiempo (h) (C)	0.5	3

Tabla 2. Distribución de los factores y sus niveles en el diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$

Tratamientos (corridas)	Factores de control		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Para la optimización de la extracción de taninos por el método de Superficie de Respuesta (MSR) se empleó el Diseño Central Compuesto Rotable (DCC). Se consideraron los factores que resulten significativos, según el análisis de varianza realizado en el “screening” de Taguchi. Asimismo, los niveles por factor se establecieron a partir del criterio “el mayor es mejor” obtenido del screening. El DCC se realizó con 13 corridas (por triplicado) y cinco réplicas alrededor del punto central (Montgomery, 2003). Los efectos de la variabilidad en la respuesta observada debido a variables extrañas serán minimizados aleatorizando el orden de los experimentos.

En la optimización del proceso de extracción de los taninos se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus®, para la obtención de los coeficientes de regresión, los datos

experimentales se ajustaron al modelo que presente el mejor ajuste. Como etapa final se procedió a validar los resultados obtenidos.

2.4.2 Estudio de la cinética de hidrólisis de taninos

Se realizó un proceso de extracción de los taninos y una hidrólisis ácida; teniendo como variable independiente el tiempo de hidrólisis (15 niveles) y variables dependientes la concentración de ácido gálico libre y compuestos fenólicos totales. Para la evaluación de las características antioxidantes de los taninos hidrolizados, se procedió a una purificación del ácido sulfúrico, mediante una separación líquido-líquido con acetato de etilo.

En la Figura 3 se reporta el flujo de operaciones para la obtención del extracto hidrolizado.

a. Extracción.- Se realizó una extracción con acetona al 80% (solvente que no interfiere con el proceso de hidrólisis y que garantiza una máxima extracción), con una relación materia prima:solvente de 1: 100 (p/v), durante 20 horas a 4 °C; luego se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, obteniéndose el extracto entero (EE). El EE se concentró a vacío a 38 °C, para eliminar la acetona luego se resuspendió en agua destilada; se enfrió a ~ 4 °C y mantuvo durante 16 horas a esta temperatura y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 15 min, con el fin de conseguir una clarificación adecuada. El extracto acuoso obtenido se denomina extracto bruto (EB).

b. Hidrólisis.- Al EB con una concentración de taninos de 20 mg á gálico equi./ml se adicionó H₂SO₄ hasta una concentración 2N y se sometió en baño María a 100°C por diferentes tiempos: 0; 0.5; 1; 1; 2; 4; 5; 6; 8; 9; 20; 24 y 28 horas. El extracto fue centrifugado para obtener el extracto hidrolizado (EH), al cual se determinó su concentración de ácido gálico y compuestos fenólicos totales y se determinó el grado de hidrólisis (GH) mediante la siguiente relación:

$$GH (\%) = \frac{AG_{EH} - AG_I}{AG_{HC} - AG_I} \times 100 \%$$

Donde: AG_{EH} = Acido gálico en el extracto hidrolizado a un tiempo t

AG_I = Acido gálico en el extracto antes de hidrolizar

AG_{HC} = Acido gálico en el extracto sometido a hidrólisis completa

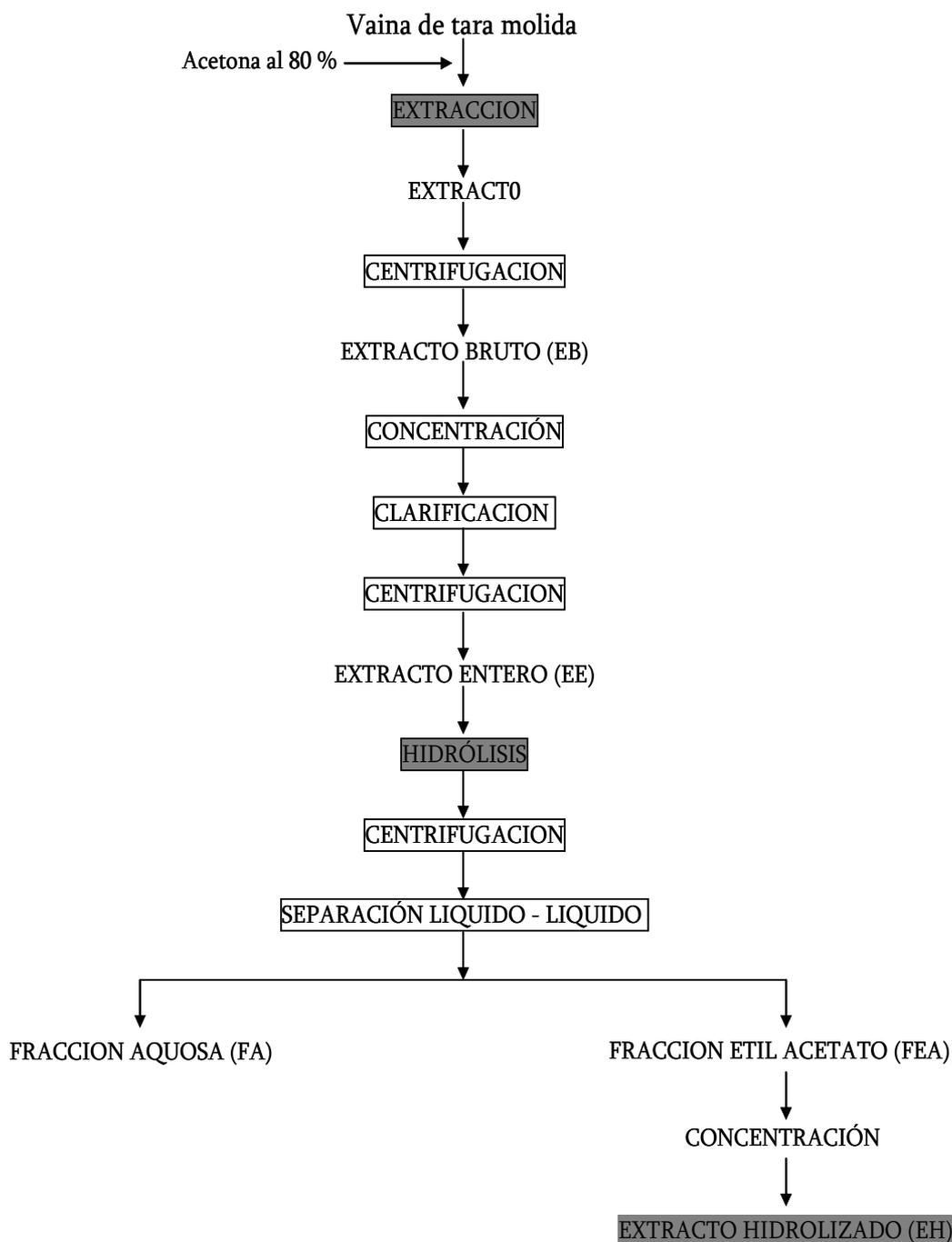


Figura 3. Flujo de operaciones para la obtención de taninos hidrolizados de tara

c. Purificación.- El EH, se sometió a una purificación mediante una separación liquido-liquido con acetato de etilo (González, 2004), en una relación 1:2 (v/v) hidrolizado: acetato de etilo, dos veces consecutivas con la finalidad de eliminar el ácido sulfúrico en la fase acuosa. El acetato de etilo fue removido por evaporación al vacío a 38 °C hasta sequedad, aproximadamente 5 minutos, recuperándose los compuestos con etanol absoluto.

Se determinó en los extractos purificados el contenido de ácido gálico, compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, y el perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC – DAD.

2.4.2.1. Determinación de la capacidad antioxidante de los taninos hidrolizados

En esta etapa se evaluó la capacidad antioxidante de los hidrolizados frente al radical ABTS⁺, en esta evaluación se tomó como variable independiente el tipo de hidrolizado (con diferente grado de hidrólisis) y como variable dependiente la actividad antirradical. Para evaluar la capacidad antioxidante específica se divide la capacidad antioxidante entre compuestos fenólicos totales (μmol trolox equi./ mg de á gálico equi). El diseño experimental usado en esta etapa es un diseño completamente al azar con un solo factor con 9 niveles y 3 repeticiones. Se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), además se empleó la prueba de Duncan para poder comparar la actividad antirradical para diferentes grados de hidrólisis, utilizando el programa STATGRAPHICS Plus ®.

2.4.3. Estudio de la eficacia antioxidante de los hidrolizados en aceite de soya

2.4.3.1. Evaluación de la eficacia antioxidante de los taninos y taninos hidrolizados de tara en aceite de soya, mediante calorimetría de barrido diferencia (DSC)

La fracción acetato de etilo fue concentrada y resuspendida en etanol (FAEC), seguidamente se aplicaron 100 ppm de compuestos fenólicos al aceite crudo de soya (0,1 mg á gálico equi / g aceite), homogenizó y analizó por DSC. Las condiciones de trabajo para el análisis por DSC fueron: velocidad de calentamiento 40 °C/min, temperatura 140 °C, flujo de oxígeno 35 mm³/min. Se consideró un blanco: aceite crudo de soya sin antioxidantes y se comparó un antioxidante sintético (TBHQ).

El periodo de inducción de la reacción de oxidación se determinó por la intersección de las tangentes de la curva isoterma (Tan *et al.*, 2002). Luego se calculó el factor de estabilización (Belitz *et al.*, 2009; Farhoosh *et al.*, 2007; Marinova y Yanishlieva, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Pokorny *et al.*, 2005):

$$F = \text{PI}_{\text{inh}} / \text{PI}_0$$

Donde: PI_{inh}= periodo de inducción en presencia de un inhibidor y PI₀= periodo de inducción en el sistema no inhibido, este calculo comparativo sirve para medir la eficacia del antioxidante.

En esta etapa se tomó como variable independiente el tipo de antioxidante añadido (hidrolizados con diferente grado de hidrólisis y TBHQ) y como variable dependiente el factor de estabilización. El diseño experimental usado en esta etapa es un diseño completamente al azar con un solo factor con 10 niveles y 3 repeticiones. Se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), además se empleó la prueba de Duncan para poder comparar la actividad antirradical para diferentes grados de hidrólisis, utilizando el programa STATGRAPHICS Plus ®.

2.4.3.2. Efecto de la concentración de los extractos hidrolizados en la estabilidad oxidativa de aceite de soya a 140°C

De acuerdo a los resultados precedentes de capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa, se seleccionó dos hidrolizados con las mejores características (uno con mayor capacidad antioxidante específica y otro con mayor factor de estabilización - aceite). El hidrolizado con mayor capacidad antioxidante específica fue llamada $H_{>CAOX}$ y el hidrolizado con mayor factor de estabilización, $H_{>F}$.

Se evaluó la estabilidad oxidativa del aceite de soya con diferentes concentraciones de estos dos hidrolizados. Se realizó un ensayo con un control sin antioxidante uno con TBHQ como referencia. Este análisis se realizó mediante DSC a 140 °C. Se tomaron como variables independientes el tipo de antioxidante añadido ($H_{>CAOX}$, $H_{>F}$ y TBHQ) y la concentración del antioxidante (0, 50, 100, 200 y 300 ppm), siendo la variable dependiente, el factor de estabilización. Se sabe que el valor en ppm es de interés tecnológico y asimismo sirve para comparar antioxidantes complejos como extractos de plantas (Cuvelier *et al.*, 1992; Khan y Shahidi, 2001).

El diseño experimental usado en esta etapa fue un diseño multifactorial al azar con un arreglo de 3 x 4 con 3 repeticiones. Se realizó un análisis multifactorial de la varianza del factor de estabilización, determinando si los antioxidantes y la concentración añadida tienen un efecto significativo sobre este factor. Seguidamente se realizó un análisis de regresión polinomial para evaluar el efecto de la concentración sobre el factor de estabilización.

2.4.3.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa de aceite de soya con los extractos hidrolizado a 60°C.

Se adicionó al aceite crudo de soya los hidrolizados ($H_{>CAOX}$, $H_{>F}$) y TBHQ en concentraciones de 100 y 200 ppm, se almacenaron a 60 °C durante 0, 5, 10, 15 y 20 días. Para cada periodo de tiempo se determinó el índice de peróxido, valor de p-anisidina, dienos conjugados y tiempo de inducción residual a 140 °C mediante DSC. Una muestra de aceite de soya sin antioxidantes añadidos se trató bajo las mismas condiciones para ser usada como control (blanco). Todas las muestras de aceite (20 g) fueron puestas en botellas color ámbar (40 mL) con un área superficial de 12,5 cm² en estufa con recirculación de aire. Cada 5 días se tomó una botella de aceite para realizar los análisis correspondientes.

Esta etapa fue realizada en base a un diseño multifactorial con tres variables independientes: tipo de antioxidante ($H_{>CAOX}$, $H_{>F}$ y TBHQ), concentración del antioxidante (100 y 200 ppm) y tiempo de almacenamiento (0, 5, 10, 15 y 20 días); con 3, 2 y 5 niveles respectivamente. Se realizaron análisis multifactoriales de varianza del índice de peróxidos, contenido de dienos conjugados, valor de p-anisidina y tiempo de inducción residual, determinando si el tipo de antioxidante, concentración y el tiempo de almacenamiento tienen un efecto significativo sobre estos factores (efectos principales). Seguidamente se realizó un análisis de varianza para cada antioxidante y tiempo con el fin de evaluar sus efectos simples.

2.4.3.4. Evaluación de la eficacia antioxidante de los extractos hidrolizados en carne de cerdo

En esta etapa del trabajo se trabajó con los extractos entero (EE) e hidrolizado de tara (EH_{4h} y EH_{9h}) que fueron previamente purificados por medio de una partición líquido-líquido con acetato de etilo tal como se indica en la sección 2.4.2.c. Cada uno de los extractos fueron resuspendidos en etanol absoluto para ser aplicados posteriormente a la carne de cerdo.

Los EE y EH_{4h} y EH_{9h} fueron aplicados a la carne de cerdo molida bajo tres concentraciones de fenólicos: 100, 300 y 600 ppm, con la mezcla se procedió a hacer hamburguesas de 50 g aproximadamente. Paralelamente se evaluó el empleo del antioxidante artificial BHT a la dosis recomendada de 200 ppm y un blanco (carne de

cerdo sin antioxidantes), el cual actuará como patrón de comparación respecto a los antioxidantes. Las hamburguesas fueron colocadas bajo refrigeración a 4 °C por un periodo máximo de 6 días. Al inicio y cada dos días (tiempo 0, 2, 4 y 6 días) se procedió a sacar las muestras para realizar la evaluación de la oxidación de proteínas (formación de carbonilos) y oxidación de lípidos (formación de malonaldehído).

Todos los ensayos se realizaron con tres repeticiones. Por cada tratamiento (dosis de fenólicos por cada extracto) se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA del factor (contenido de malonaldehído, contenido de carbonilos) para determinar si existen diferencias significativas ($p < 0.05$). En caso existieron diferencias significativas se empleó la Prueba de Duncan para comparar las medias. Se utilizó el programa StatGraphics®.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Optimización de la extracción de los taninos de tara

Muchos factores tales como la composición del solvente, tiempo de extracción, temperatura de extracción, relación materia prima/solvente, presión de extracción entre otros, pueden influenciar significativamente la eficacia de extracción de cualquier proceso (Cacace y Mazza, 2003; Liyana-Patirana y Shahidi, 2005). Dada la importancia que juega cada uno de los factores en el proceso de extracción, se hace necesario realizar un estudio en el cual inicialmente se establezcan que factor/es influye/n directamente en el proceso extracción, lo cual dependerá en gran medida del tipo de compuesto de interés a extraer y de la matriz vegetal donde se encuentra dicho compuesto; para que posteriormente con los factores identificados se llegue a una optimización que asegure la mayor recuperación de los compuestos de interés.

Es así que no existe un proceso único de extracción, sino que este debe ser desarrollado y optimizado para cada tipo de matriz vegetal en función al compuesto a obtener. Como en la presente investigación se va a trabajar con los taninos hidrolizables de la tara en diferentes pruebas (grado de hidrólisis, aplicación en aceites y carnes), se decidió comenzar el trabajo experimental con la optimización del proceso de extracción de los taninos hidrolizables de la harina de tara.

3.1.1. Pruebas preliminares

Las pruebas preliminares tuvieron como objetivo determinar el tipo de solvente más idóneo para la extracción de los taninos de la tara, así como determinar si el pH del solvente tiene influencia en la extracción de los mismos.

Los solventes evaluados fueron: el metanol 80%, etanol 80%, acetona 80% y agua; para la selección de los mismos se consultó trabajos previos realizados en procesos de extracción de taninos a partir de diferentes matrices de origen vegetal (Cacho *et al.*, 1980; Ossipov *et al.*, 1997 y 2003; Inoue & Hagerman, 1988;

Salminen, 2003; Muchuweti *et al.*, 2006). De otro lado, el pH es un factor poco estudiado en los procesos de extracción de taninos, así que con el fin de evaluar si es necesario tomar en cuenta este factor en el proceso de optimización de los taninos se decidió trabajar a tres niveles de pH: 2, 3 y 5.

Los resultados de esta prueba se aprecian en la **tabla 3**, donde se presentan la cantidad de taninos, contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante obtenidos.

Tabla 3. Contenido de taninos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en los extractos obtenidos con diferentes solventes de extracción y a diferentes niveles de pH^a

Solvente de extracción ^b	Contenido de taninos hidrolizables Galotaninos (mg GAE/g, b.s) ^c			Compuestos fenólicos (mg GAE/g, b.s)			Capacidad antioxidante (μmol TE/g, b.s) ^e		
	Nivel de pH								
	2.08	3.06	5.05	2.08	3.06	5.05	2.08	3.06	5.05
Agua	485.0	505.1	472.6	338.2	431.5	345.8	8775.9	10020.6	9610.1
Metanol 80%	289.3	251.1	302.9	569.9	591.8	526.4	12018.4	11300.4	12838.5
Etanol 80%	373.5	355.2	338.4	435.4	445.1	448.8	12232.4	12815.5	11807.5
Acetona 80%	542.3	538.8	526.4	582.4	641.5	552.7	11827.9	11691.5	11908.1

^a Promedio de dos repeticiones

^b Condiciones de temperatura y tiempo de extracción: 4 °C por 20 h y relación materia prima solvente: 1/375.

^c mg de á. gálico equivalente en base seca

^e micromol equivalente de trolox en base seca

De los resultados de la **tabla 3**, se observa que el solvente de extracción influyó en la cantidad de taninos, compuestos fenólicos (CF) y capacidad antioxidante (CAOX) recuperados en los extractos. La mayor cantidad de taninos, para todos los niveles de pH evaluados, fueron recuperados con la acetona al 80% seguido del agua, etanol 80% y metanol 80%, respectivamente. La acetona sido

reportada como uno de los mejores solventes de extracción (Inoue & Hagerman, 1987). Hagerman (2002) indica que el empleo de metanol en la extracción de los taninos hidrolizables puede traer consigo una reacción denominada metanólisis. La metanólisis se produce cuando el metanol es empleado como solvente de extracción de los taninos hidrolizables, así se ha reportado que los galotaninos (principal tanino hidrolizable de la tara) en presencia del metanol y buffer acetato pasan a formar metil galato y penta galoil glucosa (PGG) (estructura base de los galotaninos); también puede producirse la metanólisis cuando los galotaninos son mezclados con metanol y ácido sulfúrico produciéndose metil galato y glucosa; ambas reacciones producen estructuras químicas diferentes a los galotaninos iniciales lo que disminuye considerablemente la cantidad recuperada de los mismos. De otro lado, cabe señalar que el empleo de metanol así como el de la acetona con fines futuros de aplicación en alimentos, presentarían restricciones al ser considerados como solventes de grado no alimentario. De acuerdo a lo mencionado, el solvente más apropiado para la extracción de taninos hidrolizables (galotaninos) de la tara resultaría ser el agua por su buena eficiencia de extracción y su bajo costo, tal como ha sido señalado previamente por Cacho et al. (1980). Sin embargo, si se requiere identificar y cuantificar taninos, el mejor solvente de extracción resulta ser la acetona al 80%, lo que concuerda con otras investigaciones (Sun, 1992; citado por Tian *et al.*, 2009).

El análisis de variancia (multifactorial) para la extracción de los taninos, mostró que hubo diferencias significativas para el factor solvente, mientras que para el pH no se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$); esto último quiere decir que el pH no resultó ser un factor influyente en el proceso de extracción de los taninos, por lo que esta variable no será considerada dentro de los factores de optimización de la extracción de los taninos de tara. El análisis de comparación de medias de Fisher (LSD, $p < 0.05$), para el factor solvente de extracción indicó que la acetona 80% fue el mejor solvente (535.9 mg á gálico equi./g) seguido del agua (487.6 mg á gálico equi./g), etanol 80% (355.7 mg á gálico equi./g) y metanol 80% (281.1 mg á gálico equi./g), corroborando los resultados encontrados experimentalmente.

Muchos son los solventes propuestos en la extracción de los compuestos fenólicos (CF) reportados en la literatura; la selección del tipo de solvente dependerá en gran medida de la afinidad que muestre el CF hacia el solvente (donde la solubilidad y polaridad del CF). Escribano-Bailon y Santos-Buelga (2003) y Silva et al. (2007) indican que la extracción de CF por solventes de un material vegetal incluye en primer lugar una etapa de humedecimiento la cual consiste en la sorción del solvente en la fase sólida. Luego se da un fenómeno de difusión, primero dentro del material vegetal y luego a través de las paredes externas que rodean a las partículas de las plantas.

En la **tabla 3** se observa que el tipo de solvente juega un rol importante en la extracción de los CF de la tara para todos los niveles de pH evaluados. Al establecer la eficiencia de extracción de los CF de la tara en orden de importancia se encontró lo siguiente: acetona 80% > metanol 80% > etanol 80% > agua. La acetona fue el mejor solvente de extracción de los CF y el agua el menos eficiente. Estos resultados indican que los CF de la tara presentarían mayor afinidad (solubilidad) hacia un solvente de polaridad intermedia (tal como la acetona 80% y metanol 80%). Los taninos hidrolizables representan la mayor proporción de los CF de la tara es por ello que la acetona 80% resultó ser eficaz para la extracción de ambos compuestos.

Con respecto al pH, se observa que este factor si influyó en la extracción de los CF, siendo el mejor pH de extracción para todos los solventes estudiados el de 3.06. El empleo de pH dentro del rango ácido provocaría la rotura de las paredes celulares del material vegetal favoreciendo la liberación de los CF encerrados dentro de ellas con la consecuente mayor extracción de los mismos (Chirinos *et al.*, 2007). Niveles de pH bajos (2.08) producirían la hidrólisis de los CF dando origen a compuestos inestables, mientras que el empleo de pH más altos (5.05) no aseguraría una buena desintegración de las paredes celulares limitando la extracción de los CF.

El análisis de variancia para la extracción de los CF, indicó que se presentaron diferencias significativas para el factor solvente de extracción y pH ($p < 0.05$). El análisis de comparación de medias de Fisher (LSD, $p < 0.05$) confirmó a la acetona 80% como mejor solvente de extracción (592.2 mg á gálico equi./g) seguido del metanol 80% (562.7 mg á gálico equi./g), etanol 80% (443.1 mg á gálico equi./g) y agua (371.8 mg á gálico equi./g). En lo que respecta al pH el mejor fue el pH 3.0 (527.5 mg á gálico equi./g) seguido del pH 2.0 y 5.0 (481.5 y 468.4 mg á gálico equi./g, respectivamente), no existiendo diferencias significativas entre los dos últimos.

Respecto a la capacidad antioxidante (CAOX), la **tabla 3** muestra que ella también se ve influenciada por el tipo de solvente de extracción empleado a los diferentes niveles de pH. De forma global la mayor recuperación de la CAOX se presentó con el metanol 80%, etanol 80% y acetona 80%, quedando el agua como el solvente de extracción menos eficiente. Tomando en cuenta los niveles de pH a los diferentes solventes empleados se observa que ellos no influyen de manera decisiva en la CAOX.

El análisis de variancia para la CAOX, indicó que hubo diferencias significativas para el factor solvente, pero no para el factor pH ($p < 0.05$). El análisis de comparación de medias de Fisher (LSD, $p < 0.05$) confirmó que el etanol 80% (12185 μmol trolox equi./g), metanol 80% (12052 μmol trolox equi./g) y la acetona 80% (11809 μmol trolox equi./g) fueron los mejores solventes para recuperar la CAOX de la tara no existiendo diferencias significativas entre ellos, mientras que el agua no asegura una buena recuperación de esta propiedad (9468 μmol trolox equi./g).

De acuerdo a los resultados de las pruebas preliminares presentadas arriba se decidió tomar como variable importante a optimizar, en el proceso de extracción, al contenido de taninos hidrolizables (del tipo gallotaninos), al representar ellos la familia de CF más representativa en la tara y responsables en buena parte de la CAOX de la misma. Así, en función a esta variable se determinó

que el pH no es un factor que afecta a la extracción de los taninos, sin embargo el solvente de extracción si influyó en la extracción de los mismos. En el presente estudio de optimización de la extracción de los taninos de la tara se decidió continuar el trabajo con el agua como solvente (por su buena eficiencia de extracción y bajo costo), tomándose al agua como factor constante para las siguientes pruebas y trabajando al pH que brinde la mezcla de la tara en polvo en agua, dado a que el pH no es un factor influyente en la extracción de los taninos.

3.1.2. Screening de los factores relevantes en la extracción de los taninos de la tara utilizando el método de Taguchi

Se realizó un screening de Taguchi para determinar los factores que serían significativos en la extracción de los taninos de la tara así como los rangos experimentales a evaluar. Los factores en estudio considerados en esta parte del trabajo fueron la relación materia prima/solvente (dentro del rango de 1/10 a 1/60), la temperatura (rango de 25 a 75°C) y el tiempo de extracción (rango de 0.5 a 3 h), tomando al agua como solvente de extracción (factor constante). Los rangos experimentales establecidos como niveles mínimos y máximos para los factores a evaluar utilizando el método de Taguchi, han sido tomados de las referencias bibliográficas en la extracción de taninos hidrolizables de diversas materias vegetales.

Luego de aplicar el diseño experimental correspondiente al criterio de “mayor es mejor” del método de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$ (Marfil, 1999) para los diferentes factores de extracción considerados, se obtuvo la distribución de los factores y sus correspondientes niveles (mínimos y máximos) que se aprecian en el **Tabla 4**.

Tabla 4. Distribución de los factores y sus niveles en el diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$ para la extracción de los taninos hidrolizables de la tara

Tratamientos (corridas)	Factores de control		
	Relación	Temperatura	Tiempo
	materia prima/solvente	(°C)	(h)
1	1/10	25	0.5
2	1/10	75	3
3	1/60	25	3
4	1/60	75	0.5

En la **Tabla 5**, se presentan los resultados de la extracción de los taninos hidrolizables recuperados según los tratamientos (corridas) establecidos del diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$.

Tabla 5. Contenido de taninos hidrolizables de la tara de acuerdo al diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal $L_4 (2^3)$ *

Tratamientos (corridas)	Factores de control			Contenido de taninos hidrolizables (mg á gálico equi./g)
	Relación	Temperatura	Tiempo	
	materia prima/solvente	(°C)	(h)	
1	1/10	25	0.5	294.1
2	1/10	75	3	468.3
3	1/60	25	3	462.8
4	1/60	75	0.5	460.5

(*) Los tratamientos se realizaron por triplicado y aleatoriamente. Solvente de extracción agua y pH ~ 3.50.

Luego de aplicar el programa STATISTICA® para determinar las diferencias significativas entre los factores en estudio, se obtuvieron los resultados que se presentan en la **Figura 4**.

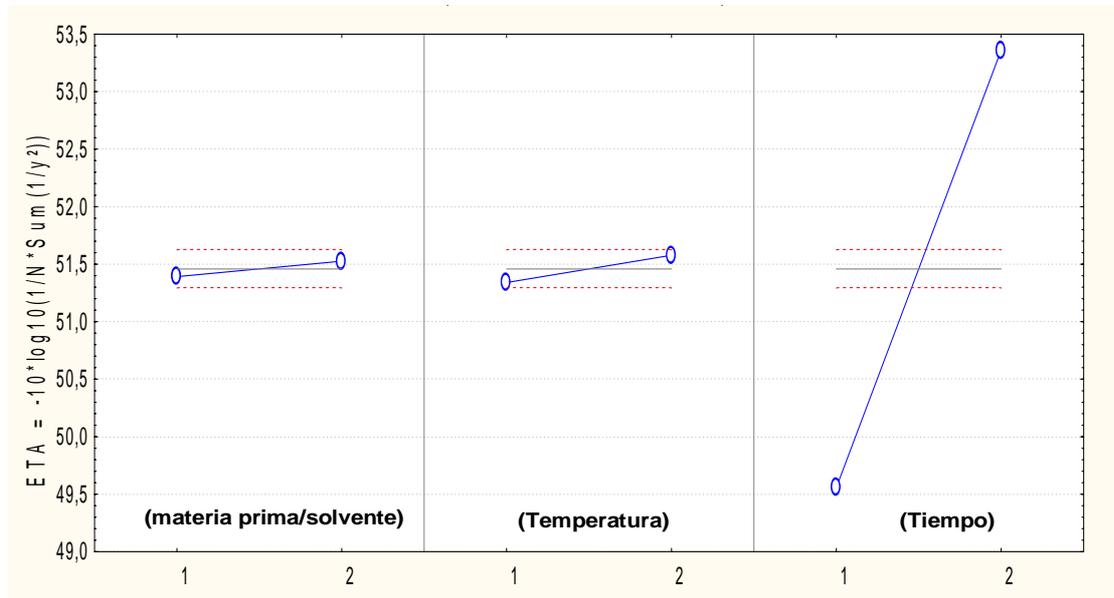


Figura 4. Valores señal/ruido (ETA) de cada factor evaluado para el contenido de taninos hidrolizables extraídos aplicando el diseño Taguchi con arreglo ortogonal $L_4(2^3)$

De acuerdo a la **Figura 4** y según el ANOVA ($p < 0.05$), se determinó que el factor relación materia prima/solvente no es un factor significativo en la extracción de los taninos de la tara, mientras que la temperatura y el tiempo de extracción resultaron ser factores altamente significativos. De acuerdo a estos resultados la temperatura y el tiempo fueron los factores a ser tomados en cuenta para diseñar los ensayos a realizar mediante la Superficie Respuesta, en donde se trabajaron con los niveles máximos (Temperaturas alrededor de 70 °C y tiempo alrededor de 3 h) según la premisa empleada por Taguchi de que “mayor es mejor” tomando la relación materia prima/solvente de 1/60 como factor constante.

3.1.3. Superficie-Respuesta para la optimización de la extracción de los taninos de la tara

La optimización de un proceso (como el de extracción) puede ser alcanzada por medio de métodos empíricos o estadísticos. Así los estudios clásicos usan el método un factor por tiempo (One-factor-at-a-time), en donde sólo un factor es variable en un tiempo mientras que todos los otros son constantes. Este método consume tiempo y es costoso. Además de que las posibles interacciones entre los factores en estudio no pueden ser evaluadas y pueden obtenerse conclusiones engañosas. El método Superficie Respuesta puede superar estas dificultades, dado a que las interacciones son tomadas en cuenta (Montgomery y Runger, 2003; Silva et al. 2007). Si la Superficie Respuesta es llevada adecuadamente, esta resulta una herramienta poderosa para encontrar las condiciones óptimas de un proceso que aseguren su mejora (Bas y Boyac, 2007). Dada las ventajas que presenta esta metodología, es que en los últimos años ha sido utilizada como herramienta en la optimización de extracción de muchos compuestos bioactivos (Liu et al., 2000), tales como antocianinas (Fan et al., 2008); compuestos fenólicos (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Silva et al., 2007), entre otros.

Para la optimización de la extracción de taninos por el método de Superficie Respuesta (MSR) se empleó el Diseño Central Compuesto Rotable (DCC). Aplicando el diseño y considerando los factores seleccionados arriba se trabajó con los códigos de niveles y valores presentados en el **tabla 6**.

Tabla 6. Factores independientes, códigos de niveles y sus valores para la optimización de la extracción de los taninos de tara utilizando el método Superficie Respuesta

Factor independiente	Códigos de niveles			
	Símbolo	-1	0	+1
Tiempo (h)	X ₁	1	2	3
Temperatura (°C)	X ₂	60	65	70

Al introducir los factores y sus respectivos niveles en el Diseño Central Compuesto Rotable (DCC) del método de Superficie Respuesta se tuvieron 13

corridas (bloque) con sus tres repeticiones haciendo un total de 39 corridas a ser evaluadas, además de contar por cada bloque con 5 repeticiones alrededor del punto central, tal como se muestra en la **tabla 7**.

En la **Tabla 7** también se muestran los valores del contenido de taninos hidrolizables para las 39 corridas realizadas.

Tabla 7. Diseño Central Compuesto Rotable (DCC) del método de superficie de respuesta para la extracción de los taninos hidrolizables de la tara*

Corridas	Bloque	Temperatura °C	Tiempo h	Taninos hidrolizables (mg á. gálico equiv./g, m.s)
1	1	65	2	443.1
2	1	60	1	459.4
3	1	65	3.41421	447.4
4	1	65	2	448.6
5	1	65	0.585786	463.7
6	1	72.0711	2	427.5
7	1	65	2	440.0
8	1	70	3	421.8
9	1	70	1	435.0
10	1	65	2	452.2
11	1	60	3	455.4
12	1	57.9289	2	458.8
13	1	65	2	419.3
14	2	65	2	440.6
15	2	60	1	456.4
16	2	65	3.41421	449.0
17	2	65	2	448.3
18	2	65	0.585786	463.8
19	2	72.0711	2	421.6
20	2	65	2	442.2
21	2	70	3	425.5
22	2	70	1	436.6
23	2	65	2	450.0
24	2	60	3	443.6
25	2	57.9289	2	457.0

26	2	65	2	417.9
27	3	65	2	440.9
28	3	60	1	458.5
29	3	65	3.41421	451.2
30	3	65	2	447.4
31	3	65	0.585786	466.7
32	3	72.0711	2	427.2
33	3	65	2	445.7
34	3	70	3	420.1
35	3	70	1	435.8
36	3	65	2	451.6
37	3	60	3	443.2
38	3	57.9289	2	455.2
39	3	65	2	419.9

(*) Los tratamientos (bloques) se realizaron por duplicado. Condiciones de extracción constantes: solvente de extracción agua, pH ~3.50 y relación materia prima/solvente: 1/60.

Introduciendo los resultados de los taninos hidrolizables de las 13 corridas de Superficie Respuesta con sus respectivas repeticiones (3 repeticiones) y realizando un Análisis de varianza ($p < 0.05$ se observó que tanto el factor tiempo y temperatura resultaron ser altamente significativos mientras que sus interacciones no. Cuando los mismos datos de taninos hidrolizables para las diferentes combinaciones temperatura-tiempo fueron introducidos al DCC del método Superficie Respuesta se encontró que ellos se ajustaban en un 65.56% al siguiente modelo matemático:

$$TH = 306,85 + 7,51*T - 32,46*\theta - 0,075*T^2 + 0,036*T\theta + 5,97*\theta^2$$

TH = Taninos hidrolizables (mg á. gálico equi/ gms)

T = Temperatura

θ = Tiempo

El modelo matemático dio origen a las gráficas presentada en las **Figuras 5 y 6.**

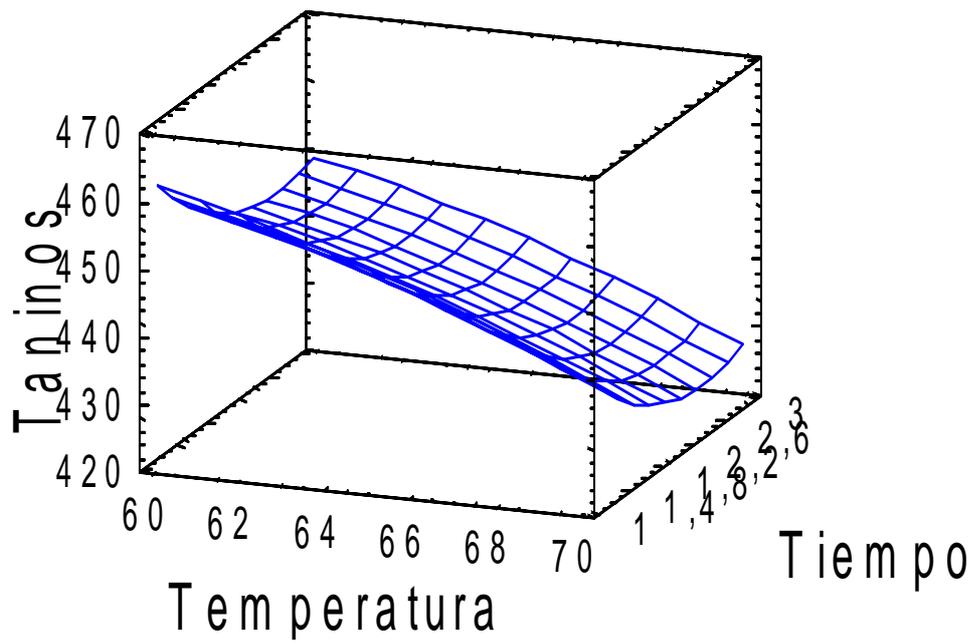


Figura 5. Superficie Respuesta para el contenido de taninos de la tara en función a la temperatura y tiempo de extracción

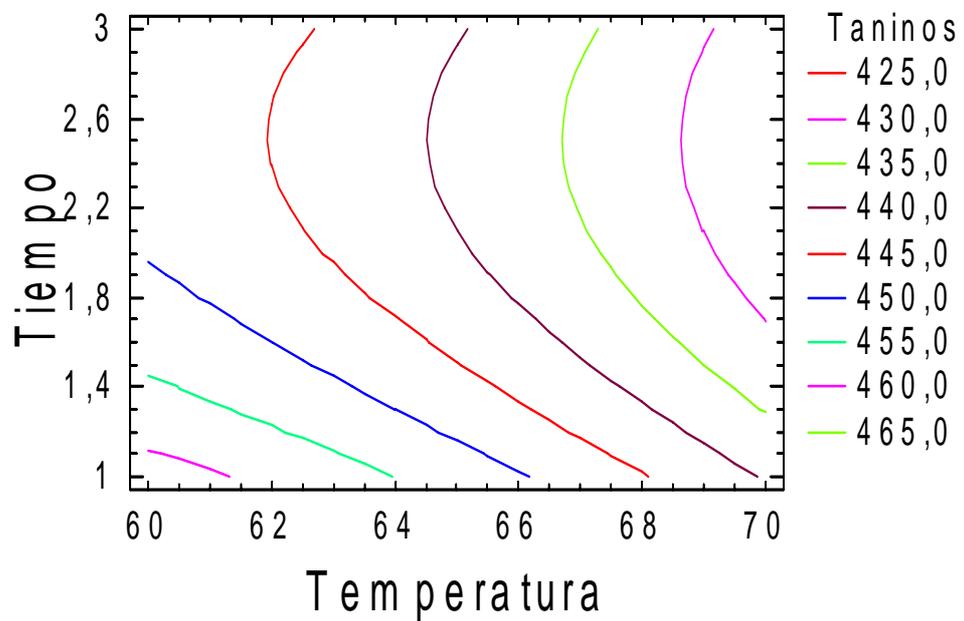


Figura 6. Curva de nivel de la Superficie Respuesta para los factores tiempo y temperatura en la recuperación de los taninos de la tara

De acuerdo a los resultados obtenidos de la **tabla 7** y **Figuras 5** y **6** y del análisis estadístico realizado, se obtuvo que los parámetros para extraer el mayor contenido de taninos hidrolizables de la tara serían: temperatura de 57.9 °C por un tiempo de 0,58 h; además de utilizar como solvente el agua, un pH ~ 3.56 y una relación materia prima/solvente de 1/60; bajo estas condiciones la cantidad máxima de taninos recuperados sería de 473.4 mg á gálico equi./g de ms.

Como se puede apreciar de la **Figura 6**, no se llegó a una optimización por que en ningún momento se encontró un punto central en la curva de nivel, por lo que se habría llegado a una maximización de los factores temperatura y tiempo de extracción de los taninos de la tara. Para lograr una optimización tendría que volver a realizarse una Superficie Respuesta con los mismos factores pero considerando niveles más ajustados como por ejemplo temperaturas entre 68 y 75°C y tiempos entre 2.8 y 3.0 h.

Las condiciones de extracción fueron validadas realizando un nuevo ensayo con tres repeticiones bajo las condiciones maximizadas el resultado fue la recuperación de taninos hidrolizables a partir de la tara de 468.8 mg á gálico equi./g ms, valor muy cercano al encontrado con el método Superficie Respuesta.

3.2. Estudio de la hidrólisis de los taninos de la tara

Como se explico anteriormente para estudiar la hidrólisis de los galotaninos de la tara se decidió realizar la extracción con acetona al 80% por ser el mejor solvente para la extracción de taninos hidrolizables y además por su alta volatilidad lo que facilitó su evaporación para el proceso de purificación, ver **Figura 2**.

3.2.1. Caracterización del extracto

En la **Tabla 8** se muestran las características de los extractos bruto y entero. La extracción de galotaninos fue alta debido a que la acetona es el solvente más adecuado para la extracción de galotaninos (Sun, 1992; citado por Tian *et al.*,

2009) y es menos capaz de reaccionar con los mismos, que el agua o metanol (Mueller-Harvey, 2001).

Existe una degradación y pérdida de los compuestos fenólicos durante los procesos extracción, concentración y centrifugación, debido a que se observa una disminución del contenido de compuestos fenólicos, galotaninos y capacidad antioxidante, comparando el EE con el EB (**Tabla 8**).

Garro *et al.* (1997) reportó un contenido de ácido gálico total (esterificado y libre) de 53,1 % (g á gálico equi./100 g, b.h.) para vainas de tara, este valor es semejante al obtenido en la presente investigación el cual es de $52,24 \pm 1,45$ % (g á gálico equi./100 g, b.h.). En las vainas de tara el contenido de ácido gálico libre es relativamente pequeño, en partir del extracto bruto (acetónico) se encontró $1,74 \pm 0,54$ % (g á gálico equi./100 g, b.h.) que es comparable al contenido reportado por Garro *et al.* (1997), el cual es 2,6 % (g á gálico equi./100 g, b.h.). OmniChem (2007) y Basurto (2006) reportan que el contenido de taninos hidrolizables en las vainas de tara puede oscilar entre el 45 y 60%. La cantidad de compuestos fenólicos es influenciada por factores como la variedad, condiciones de crecimiento y almacenamiento (Vijayakumari *et al.*, 1998; King y Young, 1999). Asimismo es conocido que métodos de secado y almacenamiento de la muestra, elección del solvente de extracción y método de análisis influyen sobre el análisis y extracción de galotaninos (Salminen, 2003).

Los taninos hidrolizables son sintetizados por una amplia variedad de plantas y pueden estar presentes en la madera, corteza, hojas, frutos y agallas (Mueller-Harvey, 2001). Asimismo *Galla chinensis*, agallas producidas por algunos parásitos áfidos (de la familia *Pemphigidae*) en las hojas de *Rhus*, tiene un contenido total de taninos de 616,0 mg á gálico equi./g ms y compuestos fenólicos de $762,5 \pm 20,5$ mg á gálico equi./g de ms, siendo 25% mayor al presente en las vainas de tara. Sin embargo el contenido de galotaninos en las vainas de tara es mayor que el de otras fuentes como los frutos *Terminalia chebula* (Myrobalans), los cuales contienen 40 % de taninos y 35 % de galotaninos (Lokeswari y Jaya, 2007); hojas de *Betula pubescens* es $6,067 \pm 0,154$ % b.s.

(Salminen, 2003) y el contenido de fenólicos en hojas de *M. flabellifolius* está entre $39,3 \pm 16,7$ y $73,6 \pm 9,6$ % como g equivalentes de ácido tri-O-galoilquinico b.s. (Moore *et al.*, 2005).

Tabla 8. Contenido de compuestos fenólicos totales, galotaninos, ácido gálico libre y capacidad antioxidante en los extractos bruto y entero

Contenido de:	Extracto Bruto (EB)	Extracto Entero (EE)
Compuestos fenólicos totales (mg á. gálico equiv./g. ms)	$568,76 \pm 14,97$	$516,46 \pm 1,89$
Galotaninos (mg á. gálico equiv./g, ms)	$537,2 \pm 17,51$	$521,17 \pm 15,59$
Ácido gálico libre (mg á. gálico equiv./g, ms)	$17,96 \pm 5,57$	$22,51 \pm 6,31$
Capacidad antioxidante (μmol trolox equiv./g, ms)	$10\ 557,42 \pm 344,98$	$9\ 730,89 \pm 445,39$

Cada valor es el promedio \pm desviación estándar ($n=3$)

EB: Extraído con acetona 80%, relación materia prima:solvente de 1:100 (p/v), durante 20 horas a 4 °C; y centrifugado a 4000 rpm durante 15 min (el sobrenadante es denominado extracto bruto).

EE: EB concentrado a vacío a 38 °C, enfriado a ~ 4 °C durante 12 h y centrifugado a 4000 rpm por 15 min (el sobrenadante es denominado extracto entero).

3.2.2. Estudio de la cinética de hidrólisis

En las **Figuras 7 A y B** se presenta los resultados de la evolución del contenido de compuestos fenólicos, el de ácido gálico libre y del grado de hidrólisis en función del tiempo. Se observa que la concentración de compuestos fenólicos totales no varía con respecto al tiempo, puesto que no hay diferencias significativas en las determinaciones realizadas a los diferentes tiempos de hidrólisis (nivel de confianza de 95,0%). Esto demuestra que los taninos son estables a la concentración de H_2SO_4 2N y 100 °C durante las 28 horas de estudio, Inoue y Hagerman (1988) reportan la hidrólisis de taninos de diferentes fuentes, en condiciones similares a las realizadas en este trabajo, señalando que el ácido gálico es más estable en medio ácido que alcalino. Se encontró la máxima concentración de ácido gálico liberado después de 20 horas de hidrólisis, luego se observa un descenso a las 24 y 28 horas, por lo cual se tomó las 20 horas para referirse a la hidrólisis completa.

El grado de hidrólisis (**Figura 7B**) aumenta considerablemente hasta las 9 horas en el que llega a un 93,7 %; luego la pendiente decrece hasta llegar al máximo grado de hidrólisis obtenido, no existe diferencia significativa del grado de hidrólisis entre 20 y 16 horas. En cuanto a la cinética se observa que hasta aproximadamente 8 horas, se trata de una reacción de primer orden. Ossipov *et al.* (1997) encontró que con 4 horas y bajo las mismas condiciones de temperatura y concentración de ácido, es suficiente para hidrolizar los galotaninos. Sin embargo Inoue y Hagerman (1988) consideraron 26 horas para el mismo fin, se debe considerar la fuente de galotanino analizado en ambos casos fueron hojas, entonces es razonable asumir que el tiempo de hidrólisis es dependiente de la estructura de los galotaninos y debido a esto puede ser diferente para fenólicos de diferentes especies de plantas (Ossipov *et al.*, 1997).

La hidrólisis de los galotaninos causa la ruptura de los enlaces depsídicos entre dos grupos galoil liberando una mezcla de penta-, tetra-, y tri-galoil glucosa, ácido gálico y ácido digálico; los enlaces depsídicos son más fáciles de romper que los enlaces estéricos (Mueller-Harvey, 2001), que también se rompen en la hidrólisis, liberando, luego, el poliol céntrico de la molécula y el ácido gálico. Se presume que debido a la diferencia en la ruptura de estos enlaces, se observa una mayor desviación en los tiempos de hidrólisis de 4 y 5 (**Figura 7A y B**).

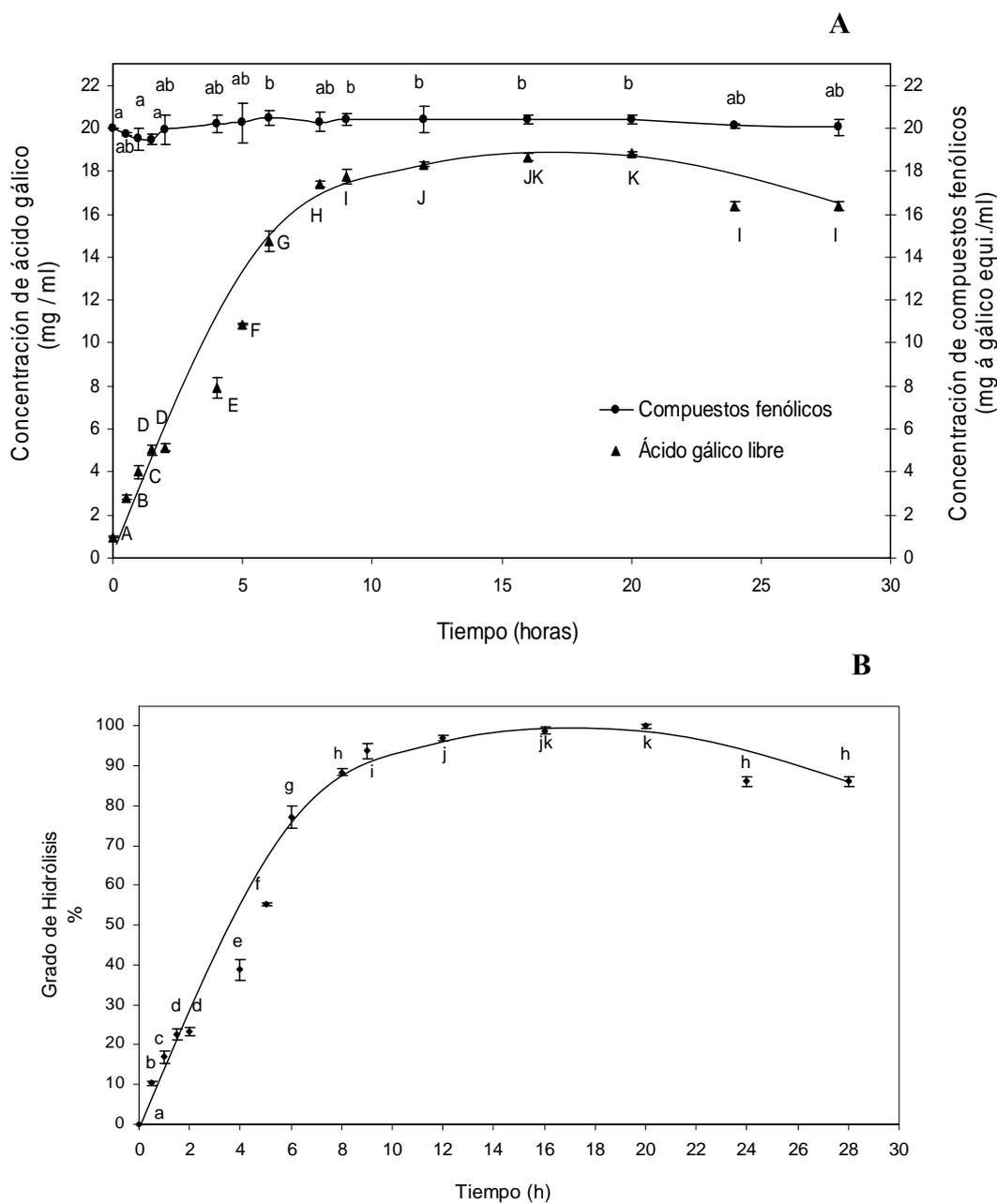


Figura 7. Evolución de la concentración de compuestos fenólicos (●) y ácido gálico libre (▲) (A) y del grado de hidrólisis (B), durante la hidrólisis ácida de extracto de tara a 2 N H₂SO₄, 20 mg EAG/mL y 100 °C. Las letras mayúsculas y minúsculas indican la existencia de diferencia significativa (p < 0,05).

3.2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de los taninos hidrolizados

De los extractos hidrolizados obtenidos en la etapa anterior se consideraron 9 tratamientos con diferente grado de hidrólisis (GH) para evaluar su actividad antirradical y eficacia antioxidante en aceite de soya. La capacidad antioxidante se determinó mediante el método ABTS⁺, en los extractos hidrolizados en diferentes tiempos (fracción acetato de etilo resuspendida en etanol, (FAEC)).

Se puede observar en la **Figura 8-A**, que la capacidad antioxidante aumenta con el tiempo de hidrólisis, llegando a un máximo entre 7 y 9 horas, sin embargo para los dos últimos puntos existe una disminución. La capacidad antioxidante de los taninos hidrolizados fue medida luego de la separación con acetato de etilo, los rendimientos para este proceso se muestran en la **Figura 9**, donde se observa que existe una disminución en el rendimiento para los dos últimos puntos. Es así que la capacidad antioxidante específica puede caracterizar mejor los taninos hidrolizados, sin tener en cuenta las pérdidas que hayan ocurrido durante el proceso de lixiviación.

El GH fue usado como un parámetro para monitorear el proceso de hidrólisis y para una caracterización más precisa de los taninos hidrolizados, después de la extracción con acetato de etilo, se usó el porcentaje de ácido gálico presente en el total de compuestos fenólicos (% m/v). La dependencia de la capacidad antioxidante de éstos parámetros se muestran en la **Figura 8-C y 8-D**.

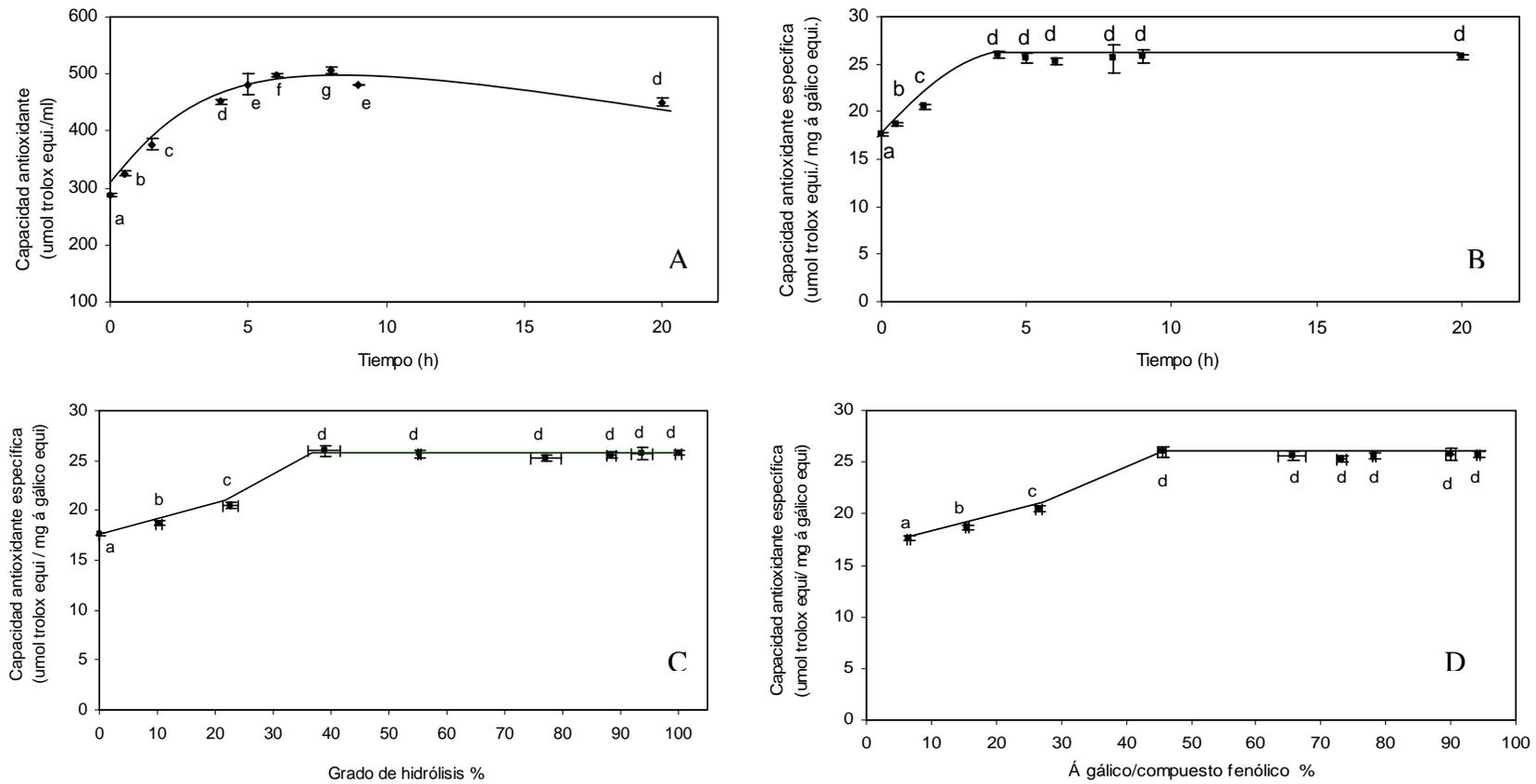


Figura 8. Evolución de la capacidad antioxidante en FAEC durante el tiempo de hidrólisis (A). Evolución de la capacidad antioxidante específica en FAEC, durante el tiempo de hidrólisis (B), en dependencia del grado de hidrólisis (C) y de la relación ácido gálico por compuesto fenólico (D). Las letras minúsculas indican la existencia de diferencia significativa ($p < 0,05$)

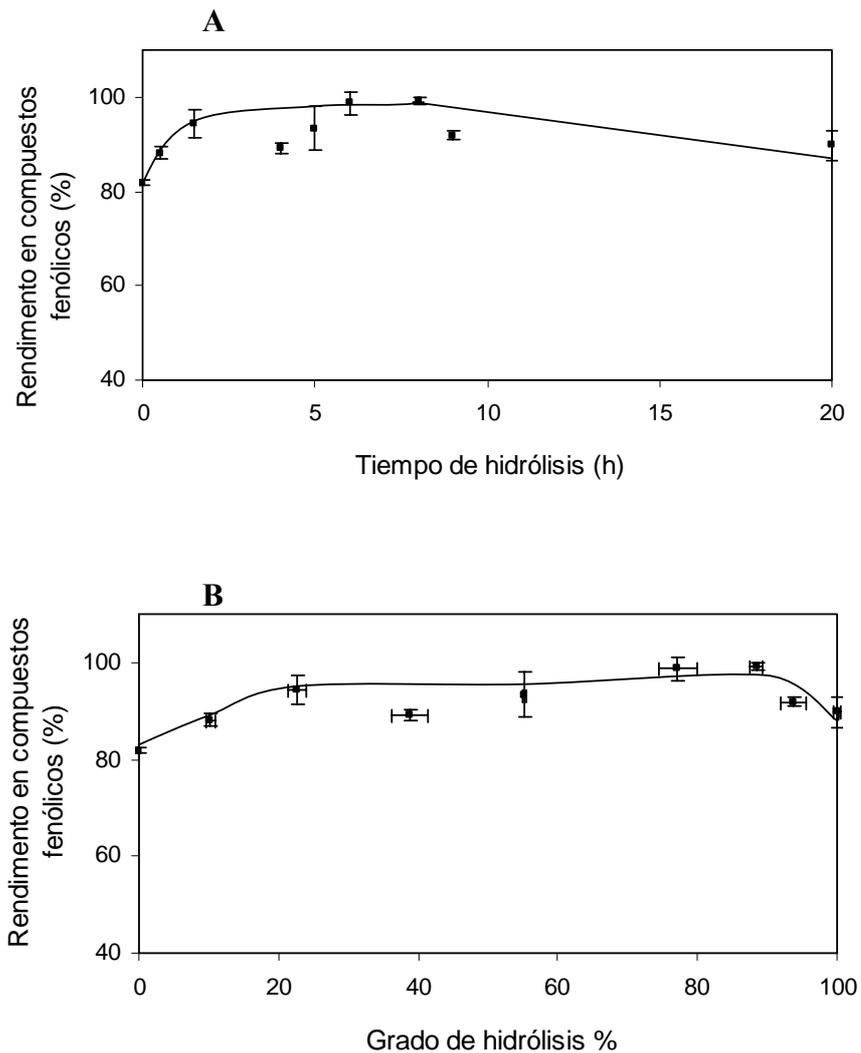


Figura 9. Rendimiento en compuestos fenólicos en la fase de lixiviación acetato de etilo.

Según se muestra en la **Figura 8 -C**, la capacidad antioxidante de los taninos hidrolizados se incrementa con el grado de hidrólisis. Al hidrolizarse las moléculas de los galotaninos, se rompen los enlaces entre las unidades de ácido gálico y el poliol central; los enlaces menos difíciles de romper son los enlaces depsídicos (Mueller-Harvey, 2001). Como muestra la **Figura 10**, los enlaces depsídicos involucran un grupo funcional hidroxilo de una molécula de ácido gálico y que al hidrolizarse queda libre para atrapar radicales libres.

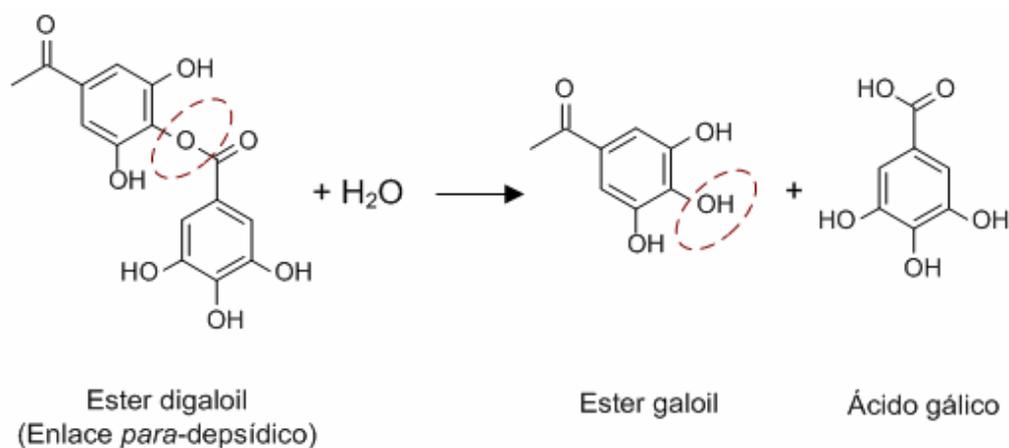


Figura 10. Propuesta de hidrólisis del enlace depsídico de los galotaninos

Los enlaces estéricos sin embargo, cuando se hidrolizan no dejan expuestos los grupos hidroxilos de las moléculas de ácido gálico, puesto que en éstos enlaces no se encuentra involucrado este grupo funcional. Los enlaces estéricos son más difíciles de romper que los enlaces depsídicos e inclusive se mantienen intactos luego de una hidrólisis suave o moderada (Moore *et al.*, 2005).

Existen varios trabajos de investigación que afirman que la actividad antioxidante de un compuesto fenólico se incrementa al aumentar el número de grupos hidroxilo en la molécula, es decir es directamente dependiente del número de unidades hidroxilo fenólicos en posición **ortho** o **para** (Balasundram *et al.*, 2006; Belitz *et al.*, 2009; Cuvelier *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 2006; Naz *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1998). La actividad antioxidante se incrementa debido a la capacidad de donar electrones o iones hidrógeno a partir de los grupos hidroxilo (Murthy *et al.*, 2002).

Una de las características del ácido gálico es que posee tres unidades **-OH**, lo cual incrementa su habilidad de donar hidrógenos o electrones y por consiguiente incrementa su actividad antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006; Brand-Williams *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1996). Así Verma, Hucl y Chibbar

(2009) reportan que el ácido gálico es uno de los ácidos fenólicos con mayor actividad antirradical frente al ABTS⁺, además el ácido gálico es un antirradical más potente que el trolox (Lien *et al.*, 1999).

3.2.4 Perfil de compuestos fenólicos en los extractos hidrolizados

Con el fin de determinar el perfil de compuestos fenólicos en los extractos con diferentes grados de hidrólisis (0%, 38.85 % (4 h), 93.75 (9 h) y 100 % (20h)). Los resultados obtenidos se muestran en los cromatogramas de la **figura 11** determinados a 280 nm, se puede observar para la muestra no hidrolizada que a partir de los 50 min se separan una gran cantidad de picos que no fueron identificados. En la muestra de 4 horas de hidrólisis (38.8 %) aparece un pico a los 13.8 min de elusión, el cual fue identificado como ácido gálico gracias a un estándar externo y al espectro de adsorción; en las muestras de 9 horas (93.75 % de hidrólisis) y de 20 horas (100 % de hidrólisis).

En los cromatogramas se observa que los picos que son eluidos entre 40 y 70 min encontrados principalmente en el extracto no hidrolizado y en menor cantidad en el extracto hidrolizado por 4 horas, no se presentan en los extractos que son sometidos a niveles de hidrólisis mayores (9 y 20 horas); lo que indicaría que dichos picos corresponden a galotaninos que son transformados en ácido gálico por efecto de la hidrólisis con ácido sulfúrico. Se puede observar en los cromatogramas y en la tabla xx que a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis aumenta el contenido de ácido gálico.

Salminen *et al.* (1999) caracterizó los galotaninos de *Betula pubescens* utilizando un método de HPLC-DAD similar al usado en el presente trabajo; y en su informe se observa que los picos de los galotaninos con galoacilaciones mayores presentan un tiempo de retención mayor que los galotaninos de menor tamaño, con una absorbancia máxima entre 273 y 285 nm, resultados similares a los encontrados en el presente trabajo.

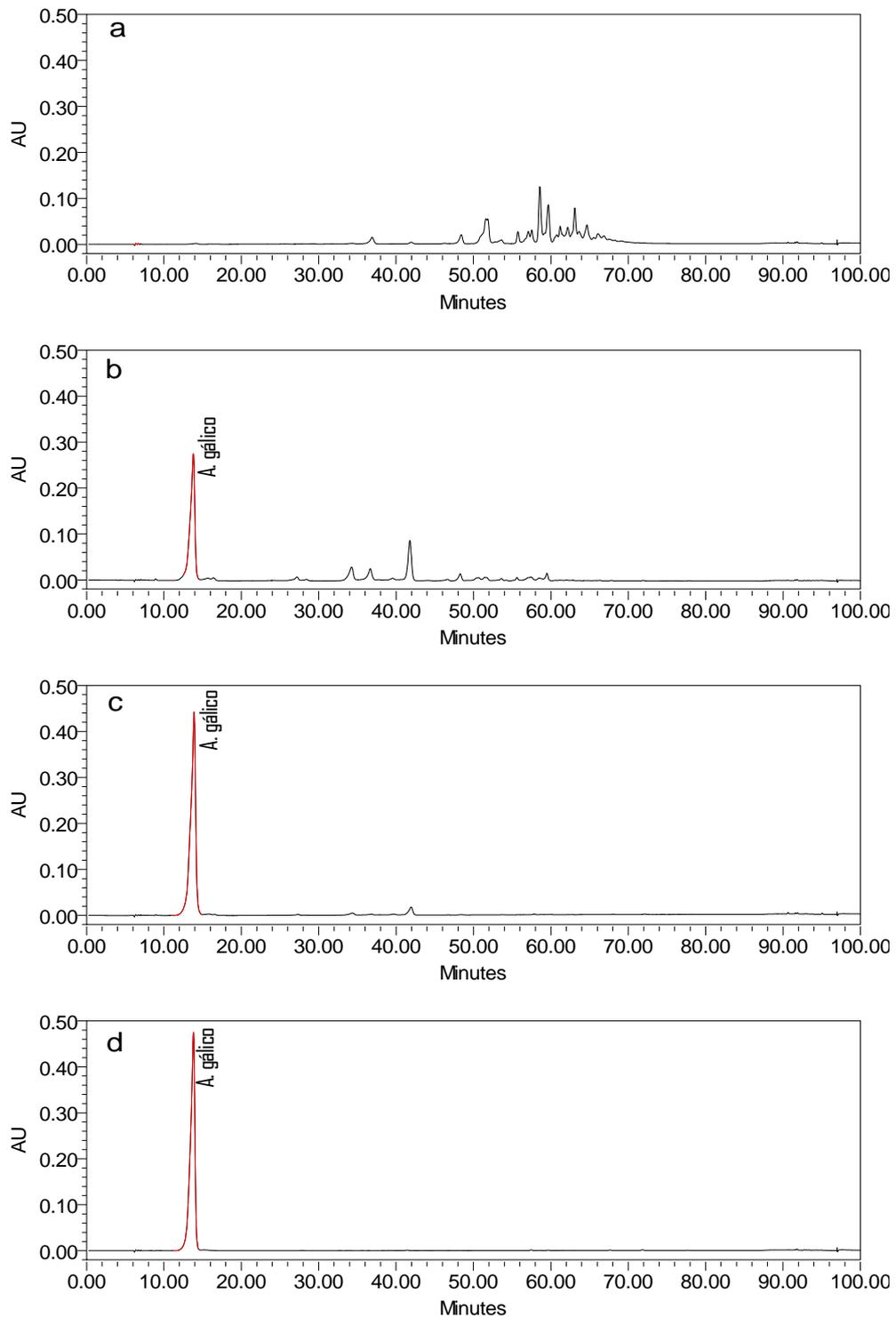


Figura 11. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC – DAD de los extractos de taninos de tara de diferentes grados de hidrólisis: a) 0 horas (no hidrolizado), b) 4 horas (38.8% de hidrólisis), c) 9 horas (93.7 % de hidrólisis) y d) 20 horas (100 % de hidrólisis)

Según la **Tabla 9**, el contenido de ácido gálico para la muestra de 4 horas de hidrólisis fue de 50,66 %, la de 9 horas 88,638 % y la de 20 horas 92,021 % de ácido gálico libre por compuesto fenólico; la diferencia obtenida con respecto a la determinación espectrofotométrica es de 3,653; 0,977 y 1,504 % de ácido gálico libre por compuesto fenólico, respectivamente. Diferencias similares fueron reportadas en las determinaciones espectrofotométricas y cromatográficas hechas por Garro *et al.* (1997).

Tabla 9. Contenido de ácido gálico determinado mediante HPLC y espectrofotometría en extractos de tara sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis

Tiempo de hidrólisis (horas)	Acido gálico libre (mg á gálico/ml) HPLC	Compuestos Fenólicos (mg á gálico equi/ml) Espectrofotometría	AG libre/Compuesto fenólico %		
			HPLC	Espectrofotometría	Desviación estándar entre HPLC-ESPECTRO
0	0,000	0,200	0,000	6,476 ± 0,177	4,579
4	0,105	0,206	50,663	45,497 ± 0,538	3,653
9	0,180	0,203	88,638	90,019 ± 0,677	0,977
20	0,180	0,195	92,021	94,148 ± 0,258	1,504

* promedio de tres repeticiones, n = 3

3.3. Estudio de la eficacia antioxidante de taninos hidrolizados en aceite y carne

3.3.1. Evaluación de la eficacia antioxidante de los taninos hidrolizados en aceite de soya, mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Se consideraron 9 tratamientos con diferente grado de hidrólisis para evaluar su eficacia antioxidante en aceite de soya (los mismos de la etapa anterior). Estas muestras conteniendo 100 ppm de á. gálico se sometieron a una evaluación por calorimetría de barrido diferencial a 140 °C, considerando un blanco (aceite de soya sin antioxidante) para poder calcular el factor de estabilización.

Los resultados de los termogramas obtenidos en el DSC se presentan en la **Figura 12** y en la **Tabla 10** se muestran los valores del factor de estabilización obtenidos a partir del periodo de inducción. Como se observa en la **tabla 10** la actividad antirradical frente al ABTS+ se incrementa hasta en un 47 %, después de 4 horas de hidrólisis, con un grado de hidrólisis intermedio. Sin embargo a mayor grado de hidrólisis el valor de la actividad antirradical no aumenta, se mantiene constante (no existe diferencia significativa a partir de este punto), podría deberse a que ya no hay más grupos hidroxilos que se formen por hidrólisis de los enlaces depsídicos. Todo indicaría que los grupos hidroxilos influyen directamente en la actividad antirradical, a partir de un grado de hidrólisis de 38,8 %, ya se han liberado todos los grupos hidroxilos, lo que sugiere que se habrían hidrolizado todos los enlaces depsídicos de las moléculas de los galotaninos.

Los resultados muestran que las moléculas de galotaninos hidrolizados poseen una actividad antirradical mayor que los galotaninos sin hidrolizar, lo cual concuerda con la conclusión dada por Soong y Barlow (2006) en la cual afirman que algunos fenólicos conjugados pueden ser liberados por hidrólisis y en su forma libre poseen una actividad antioxidante más potente.

En la **tabla 10** se observa que los mejores tratamientos (a 100 ppm de ácido gálico), entre los cuales no existe diferencia significativa, fueron los tratamientos de 9 y 20 horas de hidrólisis; la composición de los mismos es 90.019 y 94.148 % de ácido gálico libre por compuesto fenólico aplicado, con un grado de hidrólisis de 93.7 y 100 %, respectivamente. Los tratamientos de 9 y 20 horas de hidrólisis tienen un mejor efecto en el aceite de soya que el TBHQ a 100 ppm. El TBHQ tiene un efecto igual al de 8 horas de hidrólisis. Asimismo no existe diferencia significativa entre los tratamientos de 4 y 5 horas de hidrólisis.

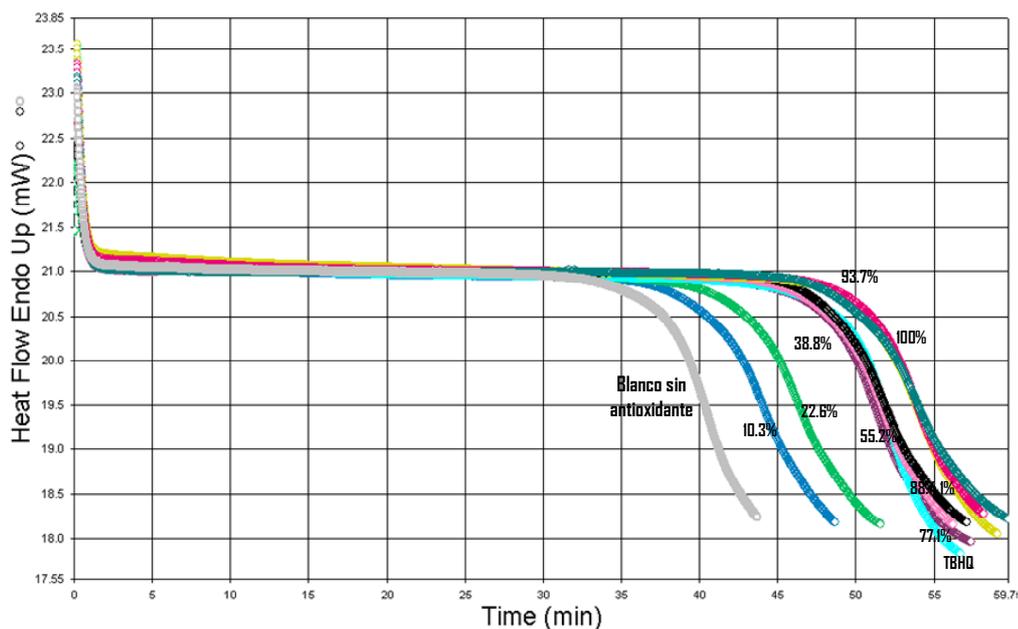


Figura 12. Termogramas (140 °C) obtenidos mediante DSC del aceite de soya con 100 ppm de taninos hidrolizados (\neq GH), blanco (sin antiox.) y TBHQ 100 ppm

Tabla10. Capacidad antioxidante específica de taninos hidrolizados de vainas de tara a diferentes grados de hidrólisis y su eficacia en aceite de soya a 140 °C

Tiempo de hidrólisis (horas)	Grado de Hidrólisis % EH	Á gálico libre/Compuesto fenólico % FEAC	Capacidad antioxidante específica (μ mol trolox equi/ mg á gálico equi.) FEAC	Factor de Estabilización FEAC
0,0	0,000 \pm 0,000 a	6,476 \pm 0,177 a	17,613 \pm 0,194 a	1,075 \pm 0,007 b
0,5	10,265 \pm 0,567 b	15,472 \pm 0,257 b	18,709 \pm 0,199 b	1,125 \pm 0,010 c
1,5	22,606 \pm 1,360 c	26,598 \pm 0,517 c	20,521 \pm 0,315 c	1,160 \pm 0,010 d
4,0	38,844 \pm 2,667 d	45,497 \pm 0,538 d	25,986 \pm 0,566 d	1,265 \pm 0,008 e
5,0	55,252 \pm 0,210 e	65,597 \pm 2,152 e	25,647 \pm 0,423 d	1,276 \pm 0,003 e
6,0	77,163 \pm 2,666 f	73,172 \pm 0,663 f	25,297 \pm 0,330 d	1,295 \pm 0,004 f
8,0	88,447 \pm 0,895 g	78,201 \pm 0,161 g	25,594 \pm 0,334 d	1,314 \pm 0,001 g
9,0	93,767 \pm 1,837 h	90,019 \pm 0,677 h	25,783 \pm 0,619 d	1,350 \pm 0,005 h
20,0	100,00 \pm 0,448 i	94,148 \pm 0,258 i	25,749 \pm 0,240 d	1,345 \pm 0,011 h
Blanco				1,000 \pm 0,002 a*

Cada valor es el promedio \pm desviación estándar ($n=3$)

FEAC: Fracción acetato de etilo concentrada y suspendida en etanol o extracto hidrolizado purificado; EH: Extracto hidrolizado.

* El factor de estabilización es de 1 para el aceite de soya sin antioxidantes añadidos.

Las letras minúsculas en las columnas indican que no existe diferencia significativa entre un grupo con la misma letra.

Los resultados del presente estudio concuerdan con otras investigaciones que demuestran que el ácido gálico y los galotaninos presentan una elevada actividad antioxidante. Lu *et al.* (2006) y Kosar *et al.* (2007) encontraron que el ácido gálico es un potente antioxidante durante la oxidación lipídica, en sistemas modelo como liposomas y ácido linoléico, asimismo Moore *et al.* (2005) encontró que el galotanino ácido 3,4,5 tri-*O*-galoilquínico, compuesto fenólico que se presentaba en mayor cantidad en las hojas de *Myrothamnus flabellifolius*, actúa como antioxidante, consumiéndose durante la oxidación del ácido linoléico y es mejor que otros antioxidantes debido a su potencial redox.

Asimismo los galotaninos de *Galla chinensis* muestran una elevada actividad antioxidante en un sistema de ácido linoléico (Tian *et al.*, 2009); el galotanino de *Hamamelis virginiana* fue mejor antioxidante que el tocoferol (Masaki *et al.*, 1994); los galotaninos de *Pistacia weinmannifolia* con dos unidades de ácido gálico fueron eficaces en la inhibición de la oxidación de liposomas (Zhao *et al.*, 2005).

Se observó un aumento de la protección del aceite de soya a medida que se incrementa el grado de hidrólisis (**Figura 13**). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Dufour *et al.* (2002), a partir de disacáridos y unidades de ácido gálico sintetizados en diferente grado, concluyendo que estos galotaninos sintetizados poseían una elevada actividad antioxidante y que al incrementarse el nivel de galoacilación la actividad antioxidante aumenta.

La paradoja polar consiste en que los antioxidantes más polares protegen mejor un sistema menos polar, como los aceites; por el contrario los antioxidantes menos polares actúan mejor en sistemas más polares como las emulsiones (Cuvelier *et al.*, 1992; Pokorny, 2005).

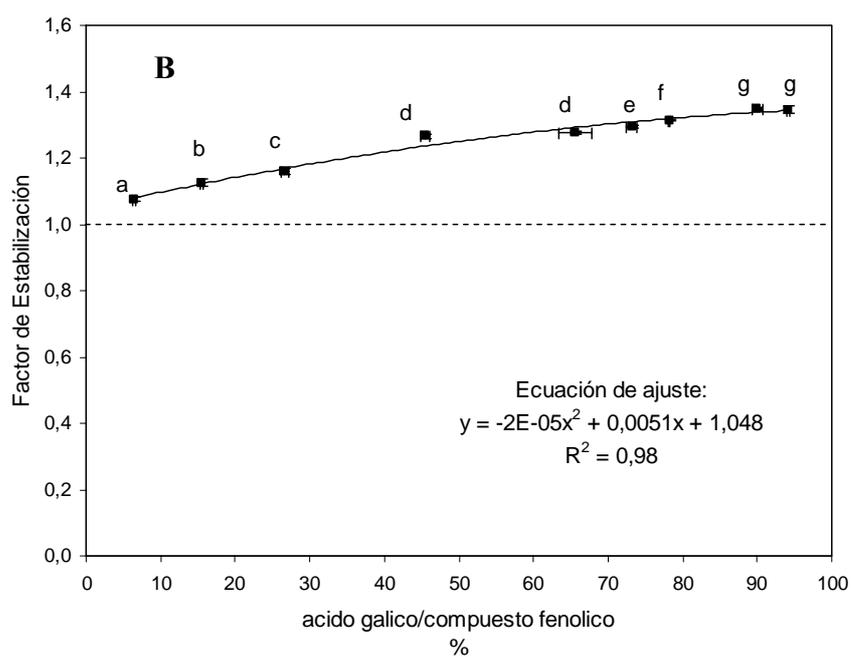
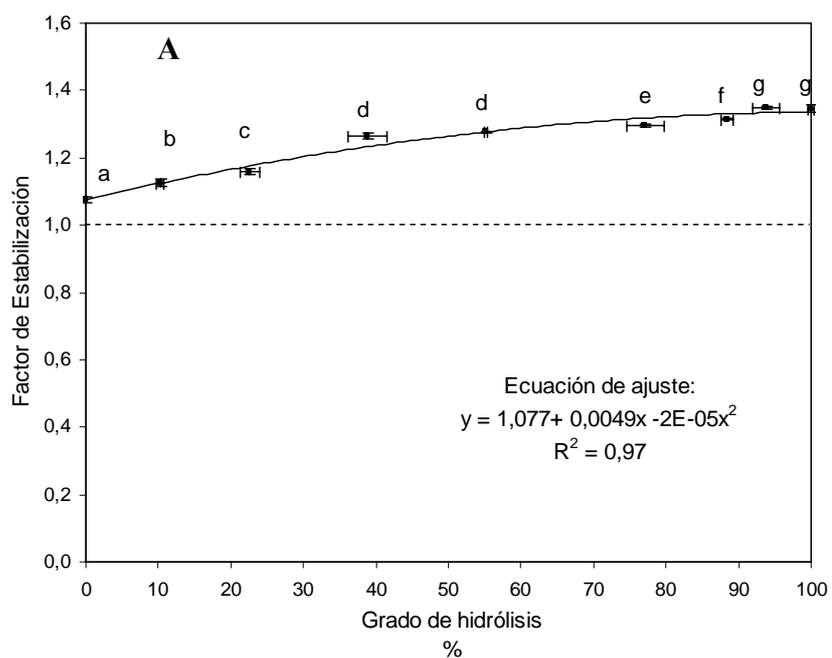


Figura 13. Efecto del grado de hidrólisis (A) y de la relación la ácido gálico por compuesto fenólico (B) de los taninos hidrolizados de tara sobre su eficacia en aceite de soya a 140°C. Las letras minúsculas indican la existencia de diferencia significativa ($p < 0,05$)

Los galotaninos al poseer diferentes estructura, sustituciones y tamaño, poseen diferente polaridad; en general los galotaninos con mayor tamaño poseen menor polaridad y viceversa (Tian *et al.*, 2009). El ácido gálico es más polar que galotaninos con galoacilaciones mayores, debido a esto al liberarse el ácido gálico durante la hidrólisis, se eleva la polaridad de la mezcla (hidrolizado) y puede proteger mejor el aceite que un tratamiento sin hidrolizar, el cual es menos polar, sin embargo se deben tener en cuenta otros factores como la solubilidad en el aceite y estabilidad del antioxidante.

Asimismo en el proceso de hidrólisis, al romperse los enlaces depsídicos, se deja libre un grupo hidroxilo (del ácido gálico), el cual no se encontraba como tal en la molécula del galotanino. Un aumento progresivo de grupos OH, provoca un aumento correspondiente en la actividad antioxidante, este efecto se explicó con mayor detalle en la discusión de la etapa anterior.

3.3.2. Efecto de la concentración de los extractos hidrolizados en la estabilidad oxidativa de aceite de soya a 140 °C

Se seleccionó dos tipos de hidrolizados, los de 4 (Medio GH) y 9 (Alto GH) horas de hidrólisis, denominados EH_{4h} y EH_{9h}, ambos casos representan respectivamente el mínimo grado de hidrólisis para obtener una alta capacidad antioxidante específica ($H_{>CAOX}$) y un alto factor de estabilización ($H_{>F}$).

Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 11** y en la **Figura 14**. Se observa que la protección del aceite aumenta cuando la concentración del antioxidante se incrementa.

Tabla 11. Efecto de la concentración en el factor de estabilización a 140 °C del aceite de soya con diferentes antioxidantes

Antioxidante	Concentración (ppm)			
	50	100	200	300
EH _{4h}	1,114 ± 0,014 aA	1,255 ± 0,004 aB	1,516 ± 0,005 bC	1,767 ± 0,007 bD
EH _{9h}	1,088 ± 0,006 aA	1,350 ± 0,014 bB	1,680 ± 0,006 cC	1,954 ± 0,003 cD
TBHQ	1,124 ± 0,014 aA	1,324 ± 0,010 bB	1,454 ± 0,014 aC	1,543 ± 0,013 aD

Los datos representan el promedio y su desviación estándar ($n=2$)

Las diferencias significativas en la misma fila son mostradas por letras mayúsculas ($p < 0,05$)

Las diferencias significativas en la misma columna son mostradas por letras minúsculas ($p < 0,05$)

La **Figura 14** muestra la tendencia del factor de estabilización con respecto a la concentración de los hidrolizados y TBHQ, entre 50 y 300 ppm.

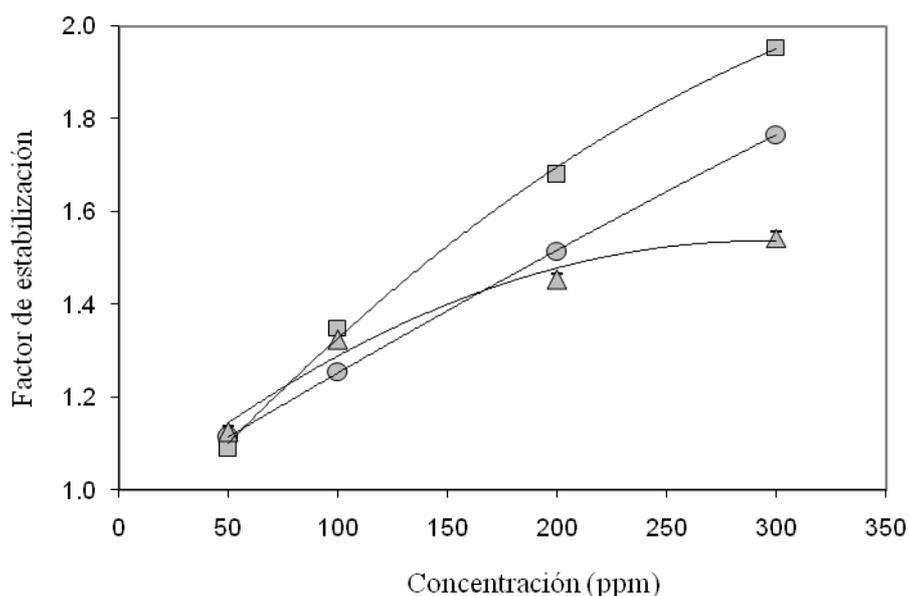


Figura 14. Influencia de la concentración de antioxidantes en el factor de estabilización de aceite de soya a 140 °C. Antioxidantes: EH_{4h}, H_{>F} (■), EH_{9h}, H_{>CAOX} (●) y TBHQ (▲)

La **Figura 14** muestra el factor de estabilización como función de la concentración de los taninos hidrolizados de tara en aceite de soya. Para propósitos de comparación la figura muestra los efectos del TBHQ. Se observó un

efecto cuadrático de la concentración de los antioxidantes sobre el factor de estabilización:

- a) Para el hidrolizado de 4 horas de hidrólisis ($H_{>CAOX}$) el modelo de ajuste es:

$$\text{Factor de estabilización} = 0,973 + 0,00287 * \text{Concentración} - 7,7E-7 * \text{Concentración}^2$$

- b) Para el hidrolizado de 9 horas de hidrólisis ($H_{>F}$) el modelo de ajuste es:

$$\text{Factor de estabilización} = 0,845 + 0,0054 * \text{Concentración} - 0,0000057 * \text{Concentración}^2$$

- c) Para el TBHQ el modelo de ajuste es:

$$\text{Factor de estabilización} = 0,966 + 0,00388 * \text{Concentración} - 0,0000066 * \text{Concentración}^2$$

El efecto fue dosis-dependiente, alcanzándose valores de factor de estabilización de 1,76 y 1,95 para las muestras con hidrolizados (EH_{4h} , $H_{>CAOX}$ y $A\ EH_{9h}$, $H_{>F}$) a 300 ppm. Generalmente la protección del aceite se incrementa cuando aumentamos la concentración del antioxidante, debido a la existencia de un número mayor de grupos hidroxilo capaces de donar átomos de hidrógeno para estabilizar los radicales libres producto del proceso de oxidación (Mokgope, 2006).

Las curvas dosis-dependientes son diferentes para cada antioxidante (Moure *et al.*, 2001). Como se muestra, las ecuaciones de modelo de ajuste son diferentes, al aumentar la concentración de los hidrolizados el factor de estabilización se incrementa en mayor grado que en el TBHQ.

3.3.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrolizados en aceite de soja por el método de la Estufa de Schall

Las muestras de aceite de soja conteniendo los antioxidantes de 4 y 9 horas de hidrólisis ($H_{>CAOX}$ y $H_{>F}$) y el TBHQ, como referencia, a concentraciones de 100 y 200 ppm; se almacenaron a 60 °C durante 0, 5, 10, 15 y 20 días y se sometieron a ensayos de índice de peróxido, valor de *p*-anisidina, dienos conjugados y tiempo de inducción residual por DSC a 140 °C.

3.3.3.1. Índice de peróxidos

El índice de peróxidos es una evidencia directa de los cambios durante la oxidación (Yaghmur *et al.*, 2001), constituyéndose en el método más frecuente para la medición del deterioro oxidativo (Kowalski *et al.*, 1997; Pokorny, 2005).

La **Tabla 12** y **Figura 15** muestra el efecto de los hidrolizados y del TBHQ en la formación de peróxidos. El índice de peróxidos aumenta con el tiempo de almacenamiento, nuestros resultados fueron similares a los encontrados en otros reportes en aceite de soya a 60 °C (Renuka *et al.*, 2007; Goli *et al.*, 2005; Wanasundara *et al.*, 1995).

Los hidrolizados y el TBHQ tuvieron un efecto antioxidante, puesto que tienen un índice de peróxidos significativamente menor al de la muestra sin antioxidantes añadidos. Los tratamientos que dieron mayor estabilidad oxidativa al aceite de soya fueron los del TBHQ a 100 y 200 ppm. Seguidamente se encuentran los hidrolizados a 200 ppm y finalmente a 100 ppm, como se demostró en la etapa anterior una concentración mayor de antioxidante brinda mayor protección al aceite.

Se observó que hasta los 20 días de almacenamiento y un nivel de oxidación de 124 meq peroxido/kg aceite, no existe diferencia significativa entre los hidrolizados. Sin embargo, para el día 5 de almacenamiento el tratamiento Alto EH_{9h} ($H_{>F}$) tiene un efecto antioxidante significativamente mayor al de Medio EH_{4h} ($H_{>CAOX}$) (**Tabla 12**), con un IP menor a 15 meq peroxido/kg aceite para las muestras de 200 ppm, siendo estos valores tolerables para un aceite comestible, según la norma CODEX-STAN 210 (Enmendado 2003, 2005).

El TBHQ tuvo mejor efecto antioxidante que los hidrolizados, observaciones similares han sido reportadas por otros investigadores, el TBHQ fue más efectivo que el tocoferol (Akoh, 1994), que el BHA y BHT (Kaitaranta, 1992; Khan y Shaidi, 2001; Sharma *et al.*, 1997) en aceite de soya.

Cuadro 12. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el índice de peróxidos de aceite de soya almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días

Antioxidante	Concentración (ppm)	IP (meq peroxido/kg aceite) a 0-20 días				
		0	5	10	15	20
Control	0	2,30 ± 0,01 aA	36,67 ± 2,02 aB	79,96 ± 2,58 aC	116,82 ± 8,25 aD	163,36 ± 2,83 aE
EH _{9h}	100	2,30 ± 0,01 aA	17,32 ± 0,93 bB	33,40 ± 0,64 dC	98,93 ± 4,15 bD	154,69 ± 4,18 aE
	200	2,30 ± 0,01 aA	10,77 ± 0,34 dB	24,79 ± 1,17 eC	49,63 ± 4,59 dD	104,47 ± 4,23 cE
EH _{4h}	100	2,30 ± 0,01 aA	19,10 ± 1,57 bB	51,74 ± 1,61 bC	83,91 ± 0,00 cD	119,76 ± 7,91 bE
	200	2,30 ± 0,01 aA	13,65 ± 0,73 cB	38,31 ± 0,58 cC	46,03 ± 3,77 dD	116,37 ± 0,14 bE
TBHQ	100	2,30 ± 0,01 aA	4,49 ± 0,01 eB	5,48 ± 0,27 fC	7,75 ± 0,25 eD	13,34 ± 0,31 dE
	200	2,30 ± 0,01 aA	4,08 ± 0,08 eB	4,96 ± 0,16 fC	6,16 ± 0,18 eD	10,51 ± 0,22 dE

Los datos representan el promedio y su desviación estándar ($n=2$)

Las diferencias significativas en la misma columna mostradas por letras minúsculas ($p < 0,05$)

Las diferencias significativas en la misma fila son mostradas por letras mayúsculas ($p < 0,05$)

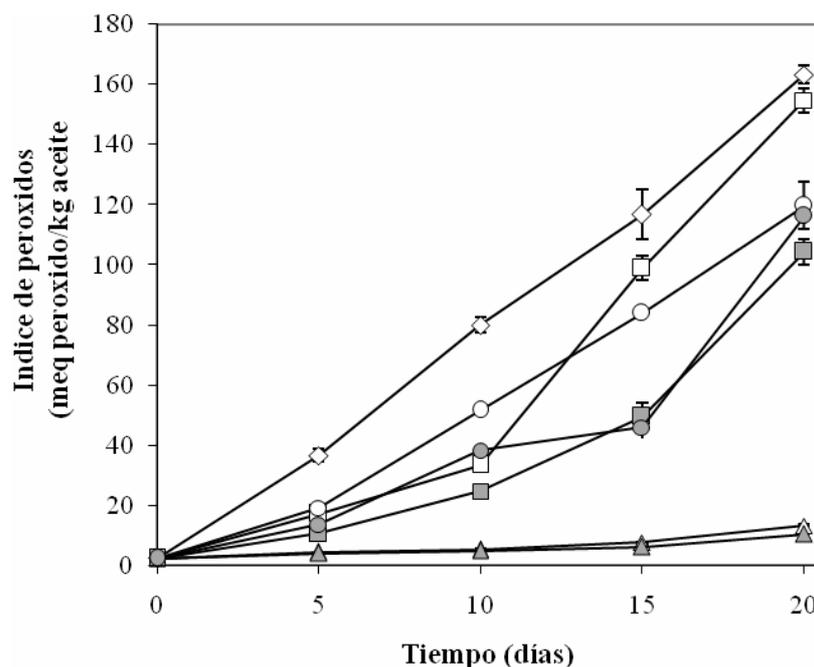


Figura 15. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el índice de peróxidos de aceite de soja almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días. Blanco (◇), EH_{9h} a 100 ppm (○), EH_{9h} a 200 ppm (●), EH_{4h} a 100 ppm (□), EH_{4h} a 200 ppm (■), TBHQ a 100 ppm (Δ) y TBHQ a 200 ppm (▲).

3.3.3.2. Dienes conjugados

Cuando los ácidos grasos poliinsaturados del aceite son oxidados (mayormente el ácido linoléico o linolénico) forman dienos conjugados que pueden ser medidos por absorción ultravioleta a 232 nm (Gutierrez *et al.*, 1988; White, 1991; Melton *et al.*, 1994; citados por Yaghmur *et al.*, 2001). En el aceite de soja el contenido de ácido linoléico y linolénico es de 53 y 8 %, respectivamente (Belitz *et al.*, 2009). Debido esta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados la medida de dienos conjugados es un parámetro importante para evaluar el estado de oxidación de este aceite.

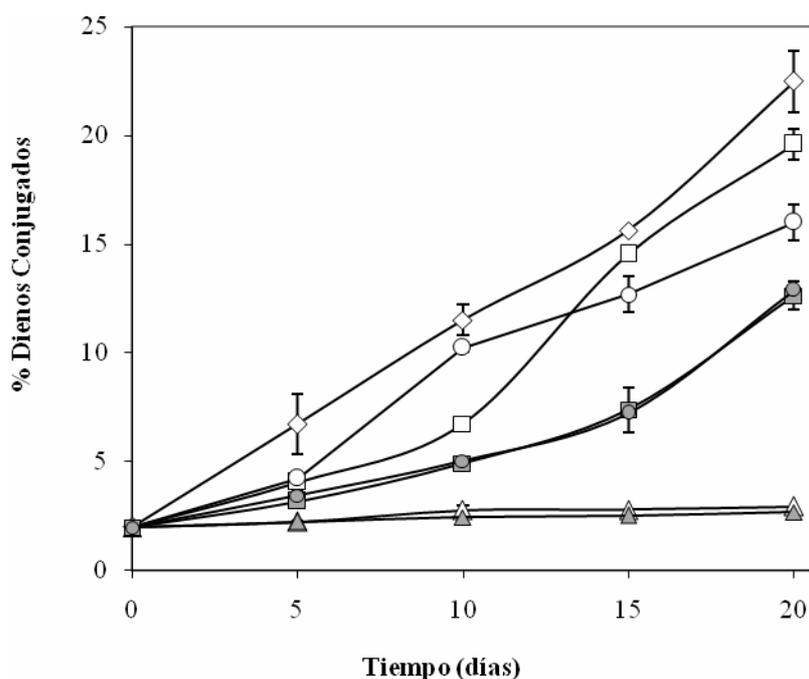


Figura 16. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el contenido de dienos conjugados de aceite de soya almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días. Blanco (◇), EH_{9h} a 100 ppm (○), EH_{9h} a 200 ppm (●), EH_{4h} a 100 ppm (□), EH_{4h} a 200 ppm (■), TBHQ a 100 ppm (Δ) y TBHQ a 200 ppm (▲).

La **Tabla 13** muestra el efecto de los hidrolizados y del TBHQ en la formación de dienos conjugados. El contenido de dienos conjugados aumenta con el tiempo, con una tendencia similar a la de la evolución de peróxidos. Esto se explica porque la cantidad de dienos conjugados está estrechamente relacionada con la cantidad de hidroperóxidos. Durante la oxidación hay, generalmente, un desplazamiento de la posición de los dobles enlaces de los ácidos grasos, debido a la estabilización por resonancia de las especies radicalarias, lo que conduce a la formación de hidroperóxidos isoméricos, que frecuentemente tienen grupos dieno conjugados (atípicos en los acilgliceroles naturales no oxidados) (Fennema, 2000).

Cuadro 13. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el contenido de dienos conjugados de aceite de soya almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días

Antioxidante	Concentración (ppm)	DC (%) a 0-20 días				
		0	5	10	15	20
Control	0	2,00 ± 0,04 aA	6,72 ± 1,37 aB	11,49 ± 0,71 aC	15,64 ± 0,00 aD,	22,47 ± 1,40 aE
EH _{9h}	100	2,00 ± 0,04 aA	4,05 ± 0,22 bB ,	6,74 ± 0,01 cC	14,55 ± 0,23 aD-	19,59 ± 0,70 bE
	200	2,00 ± 0,04 aA	3,18 ± 0,03 bcA	4,91 ± 0,07 dB	7,38 ± 1,02 cC	12,62 ± 0,65 dD
EH _{4h}	100	2,00 ± 0,04 aA	4,22 ± 0,26 bB ,	10,24 ± 0,20 bC	12,67 ± 0,83 bD	16,00 ± 0,82 cE
	200	2,00 ± 0,04 aA	3,42 ± 0,17 bcB	5,01 ± 0,14 dC	7,22 ± 0,03 cD	12,89 ± 0,39 dE
TBHQ	100	2,00 ± 0,04 aA	2,22 ± 0,00 cB,	2,76 ± 0,21 eC	2,77 ± 0,00 dC	2,94 ± 0,01 eC
	200	2,00 ± 0,04 aA	2,23 ± 0,06 cB,	2,44 ± 0,08 eC	2,51 ± 0,12 dCD	2,67 ± 0,01 eD

Los datos representan el promedio y su desviación estándar ($n=2$)

Las diferencias significativas en la misma columna son mostradas por letras minúsculas ($p < 0,05$)

Las diferencias significativas en la misma fila son mostradas por letras mayúsculas ($p < 0,05$)

En la **Figura 16** se observa que los dienos conjugados del aceite de soya sin antioxidantes añadidos presentan un valor inicial de 2% aumentando fuertemente hasta 22,47% a los 20 días de almacenamiento, de manera similar los tratamientos con hidrolizados EH_{4h} y EH_{9h} presentaron al final del periodo de almacenamiento un contenido total de 14,5 y 16,3%, respectivamente. Renuka *et al.* (2007) y Wanasundara *et al.* (1995) realizaron pruebas de oxidación de aceite de soya a 60 °C, obteniendo resultados de contenido de dienos conjugados similares a los obtenidos en este trabajo.

El análisis estadístico señaló que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en cuanto a la evolución en la formación de dienos conjugados para todos los tratamientos con respecto al tiempo. La estabilidad del aceite de soya con diferentes tratamientos se puede ordenar de la misma forma que con el índice de peróxidos.

3.3.3.3. Índice de *p*-Anisidina

Los aldehídos son largamente considerados responsables de los sabores desagradables en aceites y grasas. El cálculo del valor de *p*-anisidina es uno de los métodos más usados en la evaluación de la oxidación secundaria de lípidos. Su fundamento es la formación de una base de Schiff de color amarillento, entre el reactivo *p*-anisidina y el grupo carbonilo de diversos compuestos presentes en el aceite o grasa, los cuales pueden ser volátiles y no volátiles, generando información de los compuestos carbonilo, especialmente de los aldehídos α -insaturados. La descomposición de otros productos de alto peso molecular como dímeros de triglicéridos, pueden ser también medidos por éste método (Laguerre *et al.*, 2007).

El valor *p*-anisidina de las muestras presentan un incremento significativo durante el almacenamiento, como se puede observar en la **Figura 16**. El incremento del valor *p*-anisidina en todas las muestras indican una considerable descomposición de los productos de oxidación primaria (hidroperóxidos) y la formación de productos de oxidación secundaria (carbonilos). Las muestras

presentan valores de *p*-anisidina significativamente menores al blanco, indicando que los hidrolizados de taninos de tara y el TBHQ reducen la oxidación lipídica efectivamente.

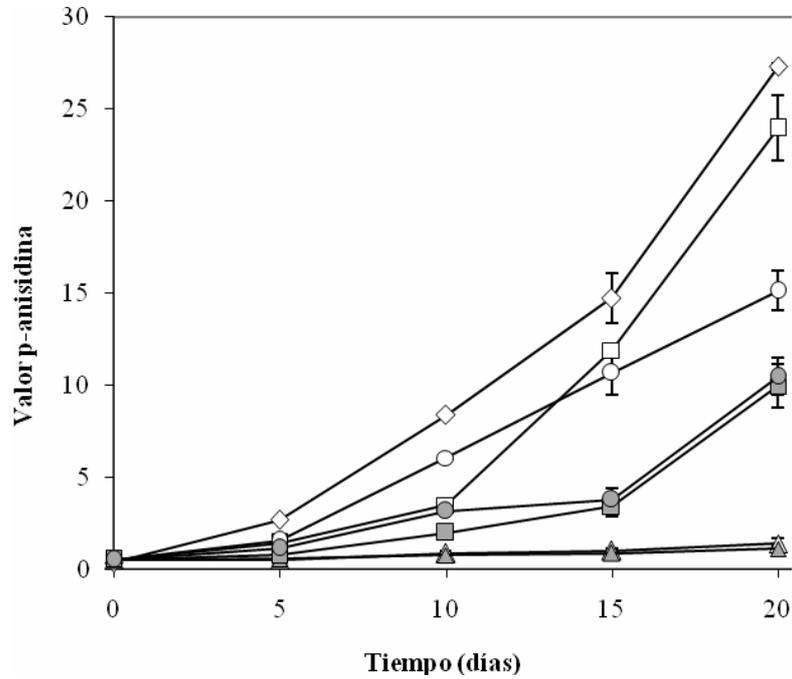


Figura 17. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el valor de *p*-anisidina de aceite de soya almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días. Blanco (◇), EH_{9h} a 100 ppm (○), EH_{9h} a 200 ppm (●), EH_{4h} a 100 ppm (□), EH_{4h} a 200 ppm (■), TBHQ a 100 ppm (△) y TBHQ a 200 ppm (▲).

Tabla 14. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el valor de *p*-anisidina de aceite de soya almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días

Antioxidante	Concentración (ppm)	<i>p</i> -AV a 0-20 días				
		0	5	10	15	20
Control	0	0,34 ± 0,06 aA	2,68 ± 0,05 aB	8,38 ± 0,13 aC ,	14,73 ± 1,36 aD-	27,31 ± 0,19 aE
EH _{9h}	100	0,34 ± 0,06 aA	1,40 ± 0,01 bA	3,49 ± 0,00 cB ,	11,89 ± 0,32 bC,	23,95 ± 1,77 bD
	200	0,34 ± 0,06 aA	0,74 ± 0,04 dA	1,96 ± 0,13 eAB	3,39 ± 0,51 cB,	9,93 ± 1,17 dC
EH _{4h}	100	0,34 ± 0,06 aA	1,57 ± 0,16 bA	6,05 ± 0,00 bB -	10,65 ± 1,16 bC	15,13 ± 1,06 cD
	200	0,34 ± 0,06 aA	1,13 ± 0,04 cA	3,15 ± 0,12 dB -	3,79 ± 0,60 cB-	10,48 ± 0,98 dC
TBHQ	100	0,34 ± 0,06 aA	0,52 ± 0,18 dA	0,85 ± 0,17 fA -	1,02 ± 0,09 dAB	1,39 ± 0,26 eB
	200	0,34 ± 0,06 aA	0,54 ± 0,01 dA	0,74 ± 0,06 fAB	0,85 ± 0,09 dBC	1,10 ± 0,04 eC

Los datos representan el promedio y su desviación estándar ($n=2$)

Las diferencias significativas en la misma columna son mostradas por letras minúsculas ($p < 0,05$)

Las diferencias significativas en la misma fila son mostradas por letras mayúsculas ($p < 0,05$)

La **Tabla 14** muestra que los niveles de valor de *p*-anisidina de muestras almacenadas a 60 °C llegan a 27,31 después de los 20 días para el control, mientras que el valor de *p*-anisidina de las muestras con hidrolizados llegan a 23,95 y 9,93 para el tratamiento de EH_{9h} a 100 y 200 ppm respectivamente, existiendo diferencia significativa con el blanco, por lo cual los hidrolizados tienen un efecto antioxidante en el aceite de soya.

El TBHQ tiene un comportamiento donde se observa que se alarga el periodo de inducción y hasta el día 10 no existe diferencia significativa en el aumento de valor de *p*-anisidina. Estos valores son similares a los reportados por otros autores para el aceite de soya a 60 °C (Rizner *et al.*, 2000), asimismo son menores a 2, que es el límite para que un aceite sea considerado de buena calidad (Subramanian *et al.*, 2000; citado por Labrinea, 2001).

3.3.3.4.Periodo de inducción a 140 °C (actividad residual)

Los resultados del tiempo de inducción residual, por DSC a 140 °C, como función del tiempo de almacenamiento es mostrada en la **Figura 18**. Se realizó esta evaluación para observar el efecto de protección residual de los antioxidantes en el aceite de soya, la oxidación se incrementa con el tiempo, mostrando una disminución del tiempo de inducción (t_{on}), debido a que el aceite oxidado es menos estable (Kowalski *et al.*, 1997).

En todos los casos, la protección residual (tiempo de inducción a 140 °C) disminuye significativamente con el incremento del tiempo de almacenamiento. A medida que la oxidación aumenta, el antioxidante se consume, es así que para el tratamiento control a los 20 días de almacenamiento (una oxidación avanzada con 163 meq peroxido/kg aceite) el periodo de inducción es muy bajo (3 minutos), la explicación es que el antioxidante se habría consumido y no presenta protección residual a 140 °C.

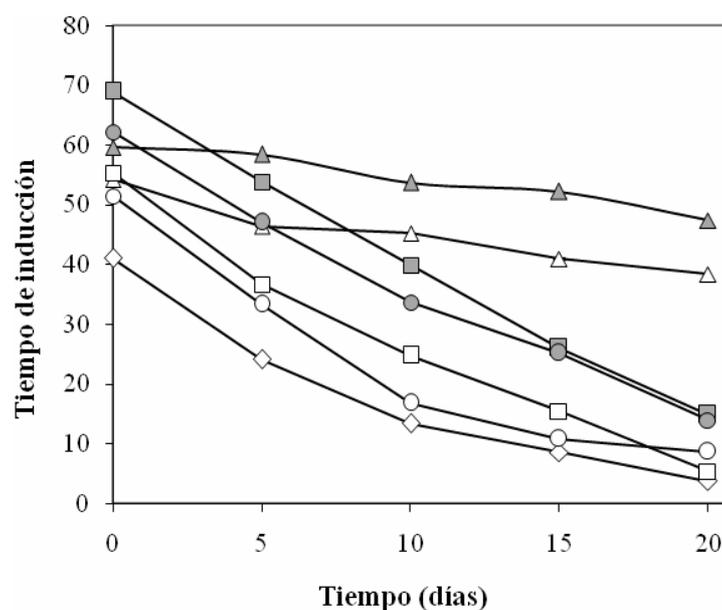


Figura 17. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el tiempo de inducción residual (a 140 °C) de aceite de soya almacenado a 60 °C. Blanco (◇), EH_{9h} a 100 ppm (○), EH_{9h} a 200 ppm (●), EH_{4h} a 100 ppm (□), EH_{4h} a 200 ppm (■), TBHQ a 100 ppm (Δ) y TBHQ a 200 ppm (▲).

El TBHQ muestra una alta eficacia en la prevención de la formación de peróxidos, siendo uno de los antioxidantes más poderosos dentro de los antioxidantes sintéticos a temperatura ambiente (Azeredo, 2004; Kowalski, 1997; Zhang *et al.*, 2004). Sin embargo su poder antioxidante puede decrecer rápidamente con el aumento de la temperatura (Warner *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 2004). Hamama y Nawar (1991) estudiaron la descomposición térmica de algunos antioxidantes fenólicos, entre ellos el TBHQ, indicando que tiene una pérdida de 47.7% luego de un tratamiento a 185 °C por 1 hora. Comparando los resultados a 140 °C y 60 °C, el orden de protección de la estabilidad del aceite de soya difiere, a 140 °C la protección de los hidrolizados es mejor que el TBHQ, sin embargo a 60 °C este orden se invierte. Esto se debe a que el TBHQ es más efectivo a temperatura ambiente y puede volatilizarse en gran medida a 140 °C por 1 hora, condiciones promedio a las que fueron sometidas las muestras.

Tabla 15. Efecto de los taninos hidrolizados de tara y TBHQ en el tiempo de inducción (a 140 °C) de aceite de soya almacenado bajo condiciones de estufa de Schall a 60 °C durante 20 días

Antioxidante	Concentración (ppm)	IP (meq peroxido/kg aceite) a 0-20 días				
		0	5	10	15	20
Control	0	41,00 ± 0,07 aE	24,08 ± 0,04 aD	13,39 ± 0,05 aC	8,52 ± 0,05 aB	3,68 ± 0,10 aA
EH _{9h}	100	55,35 ± 0,04 dE	36,62 ± 0,08 cD	24,74 ± 0,07 cC	15,40 ± 0,07 cB	5,29 ± 0,11 bA
	200	68,88 ± 0,05 gE	53,77 ± 0,03 fD	39,84 ± 0,06 eC	26,00 ± 0,10 eB	14,92 ± 0,06 eA
EH _{4h}	100	51,47 ± 0,07 bE	33,31 ± 0,07 bD	16,80 ± 0,04 bC	10,85 ± 0,08 bB	8,62 ± 0,07 cA
	200	62,15 ± 0,10 fE	47,07 ± 0,07 eD	33,62 ± 0,06 dC	25,15 ± 0,04 dB	13,86 ± 0,09 dA
TBHQ	100	54,28 ± 0,01 cE	46,44 ± 0,11 dD	45,23 ± 0,06 fC	40,92 ± 0,07 fB	38,41 ± 0,10 fA
	200	59,61 ± 0,05 eE	58,36 ± 0,09 gD	53,65 ± 0,07 gC	52,14 ± 0,05 gB	47,32 ± 0,08 gA

Los datos representan el promedio y su desviación estándar ($n=2$)

Las diferencias significativas en la misma columna son mostradas por letras minúsculas ($p < 0,05$)

Las diferencias significativas en la misma fila son mostradas por letras mayúsculas ($p < 0,05$)

3.4. Evaluación de la eficacia antioxidante de los extractos hidrolizados de tara en carne de cerdo

3.4.1. Evaluación de la oxidación de lípidos

La oxidación lipídica es un fenómeno complejo inducido por el oxígeno en presencia de iniciadores como el calor, radicales libres, luz, pigmentos fotosensibles y iones metálicos. Las vías de ésta reacción pueden ser por: a) Autooxidación en cadena no enzimática mediada por radicales libres, b) Fotooxidación no enzimática y no radicalaria y c) oxidación enzimática (Laguette *et al.*, 2007). Muchos son los compuestos formados producto de la oxidación lipídica entre los que destacan los hidroperóxidos y sus productos de descomposición: compuestos carbonílicos, hidrocarburos, furanos y alcoholes; los aldehídos como el hexanal, nonanal y el 2,4 heptadienal, entre otros. Los aldehídos insaturados son a la vez fácilmente oxidables, produciéndose nuevos compuestos volátiles como el malonaldehído (MDA, cuya detección es muy utilizada como medida de la oxidación de aceites y grasas). De otro lado el MDA es un compuesto pro desnaturalizante de las proteínas al promover el entrecruzamiento de dos grupos amino (Navarro-García *et al.*, 2004).

Debido a que la estabilidad oxidativa de los lípidos es de importancia desde el punto de vista económico y de la salud, es que se han hecho largos esfuerzos por controlar estos procesos (Marinova y Yanishlieva, 2003). Una de las rutas a ser empleadas con este fin es el empleo de extractos antioxidantes fenólicos.

Se estudió la inhibición de la oxidación de lípidos de la carne de cerdo por acción de los fenólicos antioxidantes de tara: EE, EH_{4h} y EH_{9h} a diferentes concentraciones (100, 300 y 600 ppm) y del BHT (200 ppm) en hamburguesas de cerdo durante almacenamiento a 4°C por seis días a través de la medida del contenido de MDA (**tabla 16**).

Un constante aumento del contenido de malonaldehído (mg MDA/kg carne) durante el transcurso del tiempo de almacenamiento refrigerado se encontró para todos los antioxidantes evaluados a las diferentes concentraciones estudiadas (**tabla 16**), el mismo efecto se presentó para el control (carne sin antioxidante). Hacia el día 6 de almacenamiento se observó que el tratamiento control incrementó en 3.84 veces el

contenido de MDA respecto al valor inicial (tiempo cero), mientras que para los EH_{4h}, EH_{9h}, EE a la concentración de 100 ppm y el BHT a 200 ppm los incrementos fueron de 3.71, 2.91, 3.85 y 3.10 respectivamente. Según estos resultados el extracto hidrolizado de tara EH_{9h} y el BHT fueron los más efectivos en prevenir la oxidación de los lípidos de la carne de cerdo, presentando incrementos en MDA bastante cercanos.

Una menor cantidad de MDA producido fue encontrada cuando los extractos de tara EH_{4h}, EH_{9h} y EE se aplicaron a la carne de cerdo bajo las concentraciones de 300 ppm. Así, la cantidad de MDA al día 6 de almacenamiento fue menor para todos los extractos respecto a la encontrada a la dosis de 100 ppm. Se obtuvieron incrementos en MDA al día 6 respecto al día inicial de 2.52, 2.71 y 2.69 para los extractos EH_{4h}, EH_{9h} y EE, respectivamente; los mismo que estuvieron por debajo de los valores obtenidos para el BHT a 200 ppm (3.85) y el control sin antioxidante (3.10). Los valores encontrados para los diferentes extractos de tara estuvieron muy próximos entre ellos, lo que indicaría que el empleo de cualquiera de los extractos a la concentración de 300 ppm protege bien a la carne de cerdo de la oxidación de lipídica.

Los mejores resultados de protección de los lípidos de la carne de cerdo frente a la oxidación se consiguieron a las dosis de 600 ppm de los extractos de tara (bajas cantidad de MDA producidas, **tabla 16**). Se encontró incrementos en MDA de 1.76, 1.52 y 2.18, al día 6 de almacenamiento, para los extractos EH_{4h}, EH_{9h} y EE, respectivamente; siendo el extracto EH_{9h} el que mejor resultado de protección presentó frente a la oxidación de lípidos.

Lo resultados indican que los compuestos fenólicos encontrados en los extractos de tara evaluados EE, EH_{4h} y EH_{9h}, bajo la forma de taninos hidrolizables o ácido gálico resultan ser buenos antioxidante naturales al proteger a los lípidos de la carne de cerdo del daño oxidativo. La acción antioxidante de los taninos hidrolizables y el ácido gálico de la tara, durante el almacenamiento en refrigeración de la carne de cerdo, sería producto de la inhibición a la formación de productos de la oxidación de lípidos vía secuestro de los radicales libres o por medio de la quelación de metales (como el hierro presente en la mioglobina de la carne).

Tabla 16. Evolución del contenido de malonaldehído (μmol de malonaldehído/kg)* durante el almacenamiento refrigerado (4°C) de hamburguesas de cerdo con los extractos entero (EE) e hidrolizados ($\text{EH}_{4\text{h}}$ y $\text{EH}_{9\text{h}}$) de tara y BHT

Tiempo de almacenamiento (días)	$\text{EH}_{4\text{h}}$	$\text{EH}_{9\text{h}}$	EE	BHT (200ppm)	Control (sin antioxidante)
Aplicación de extractos de tara a 100 ppm					
0	2.47bC	2.84aC	2.83aD	2.39bC	3.09aD
2	5.54cB	5.67cB	6.16a,bC	5.01dB	6.70aC
4	5.77cB	5.69cB	7.51bB	5.48cB	8.74aB
6	9.18cA	8.27c,dA	10.91bA	7.43dA	11.88aA
Aplicación de extractos de tara a 300 ppm					
0	2.91aD	2.92aD	2.94aD	2.39bC	3.09aD
2	4.80bC	4.78bC	4.78bC	5.01bB	6.70aC
4	5.34cB	5.79bB	5.79bB	5.48bB	8.74aB
6	7.35cA	7.93bA	7.93bA	7.43b,cA	11.88aA
Aplicación de extractos de tara a 600 ppm					
0	2.79bC	2.69bC	2.76bD	2.39bC	3.09aD
2	2.99dC	2.77dC	4.06cC	5.01bB	6.70aC
4	3.88cB	3.10cC	5.20bB	5.48bB	8.74aB
6	4.66dA	4.11eA	6.04cA	7.43b,cA	11.88aA

* Promedio de tres repeticiones. Letras en minúscula diferentes para una misma fila indican que si hubieron diferencias significativas ($p < 0.05$). Letras en mayúscula diferentes para una misma columna indican que si hubieron diferencias significativas ($p < 0.05$).

La actividad antioxidante de extractos de plantas, conteniendo compuestos fenólicos, contra la oxidación lipídica en diversos tipos de carnes ha sido reportada, así el empleo de estos extractos resultan ser una alternativa a ser usados como aditivo alimentario (Vuorela *et al.*, 2005). Se ha reportado que varios extractos de plantas o extractos fenólicos tales como el romero (McCarthy *et al.*, 2001), cáscara de papa (Kanatt *et al.*, 2005), catequinas del té (Tang *et al.*, 2001), corteza del pino y el rape seed (Vuorela *et al.*, 2005), orégano (Hernández-Hernández *et al.*, 2009), polifenoles de la uva (Pazos *et al.*, 2005), entre otros, pueden actuar como antioxidantes lipídicos en carnes diversas. Los polifenoles quercitina (200 ppm), mirecitina (200 ppm), ácido tánico (30 y 200 ppm) y el ácido elágico (30 y 200 ppm), han demostrado ser potentes antioxidantes de los lípidos de la carne de pescado cruda y cocida sometida a refrigeración de 4°C (Ramanathan y Das, 1992). Al respecto Hernández-Hernández *et al.*, (2009) indican que el efecto antioxidante de los extractos fenólicos en productos cárnicos dependerá no solo de la concentración de los compuestos fenólicos utilizados, sino también del método de extracción y el solvente utilizado en la recuperación de los polifenoles. A ello añadimos también la importancia del perfil de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos antioxidantes.

3.4.2. Evaluación de la oxidación proteica

En los alimentos, también la oxidación de las proteínas conduce a un deterioro en la calidad. Shacter (2000) define a la oxidación de las proteínas como la modificación covalente de una proteína inducida ya sea directamente por especies reactivas al oxígeno (EROS) o indirectamente por productos secundarios del stress oxidativo. Las proteínas de la carne pueden ser modificadas por medio de los lípidos oxidados así como por reacciones oxidativas catalizadas por metales o enzimas u otros procesos químicos y biológicos (Xiong, 2000). Es por ello que para que se de inicio a la oxidación proteica de la carne una etapa previa de oxidación de lípidos sería necesario que se produzca.

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intra-proteicos, formación de puentes disulfuro y mayor

susceptibilidad a proteólisis (Carbiscol *et al.*, 2000). Aunque se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a oxidarse que otros, una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación.

De otro lado, la formación de carbonilos es uno de los más importantes cambios en las proteínas oxidadas. Los compuestos carbonilos pueden ser generados vía oxidación directa de un aminoácido de una cadena lateral, por la fragmentación de un péptido estructural, por la reacción con azúcares reductores o por el acoplamiento a compuestos carbonilos no proteicos (Xiong, 2000).

La inhibición de la oxidación de proteínas de los fenólicos antioxidantes de tara: EE, EH_{4h} y EH_{9h} a diferentes concentraciones (100, 300 y 600 ppm) y del BHT (200 ppm) en hamburguesas de cerdo durante almacenamiento a 4°C por seis días a través de la medida del contenido de carbonilos, fue estudiada (**tabla 17**).

Los resultados de la **tabla 17** indican que el contenido de carbonilos formados producto de la oxidación proteica de la carne de cerdo tendió a incrementar constantemente durante el curso del almacenamiento refrigerado (4°C). La carne de cerdo sin antioxidantes (control) al día seis sufrió un incremento de 1.70 veces más respecto al día cero; mientras que los extractos de tara EH_{4h}, EH_{9h} y EE a la concentración de 100 ppm y el BHT a 200 ppm, incrementaron en 1.38, 1.32, 1.40 y 1.29. En función a los resultados encontrados se observa que la aplicación de antioxidantes naturales de la tara a 100 ppm y del BHT a 200 ppm, evitaron en cierta forma la oxidación proteica. A 100 ppm el EH_{9h} y el BHT a 200 ppm resultaron los mejores antioxidantes de la oxidación proteica de la carne de cerdo, seguidos del EH_{4h} y EE

Tabla 17. Evolución del contenido de carbonilos (nmol/kg) durante el almacenamiento refrigerado (4°C) de hamburguesas de cerdo con los extractos entero (EE) e hidrolizados (EH_{4h} y EH_{9h}) de tara y BHT

Tiempo de almacenamiento (días)	EH _{4h}	EH _{9h}	EE	BHT (200ppm)	Control (sin antioxidante)
Aplicación de extractos de tara a 100 ppm					
0	9.29bD	9.45bD	10.21aD	7.18dC	8.10bD
2	10.54bC	10.27bC	11.58aC	7.66cC	10.08bC
4	11.75cB	11.08cB	13.57aB	8.22dB	12.29bB
6	12.88cA	12.49cA	14.36aA	9.26dA	13.81bA
Aplicación de extractos de tara a 300 ppm					
0	6.83cC	6.92cC	6.85cC	7.18bC	8.10aD
2	8.18cB	7.46dB	9.12bB	7.66dC	10.08aC
4	8.55cB	7.98dB	9.82bB	8.22cB	12.29aB
6	10.07cA	9.21dA	11.09bA	9.26dA	13.81aA
Aplicación de extractos de tara a 600 ppm					
0	5.63dC	5.52dC	6.68cD	7.18bC	8.10aD
2	7.13cB	6.76dB	8.19bC	7.66cC	10.08aC
4	7.45dB	6.95eB	9.78bB	8.22cB	12.29aB
6	9.49cA	8.26dA	11.15bA	9.26cA	13.81aA

Letras en minúscula diferentes para una misma fila indican que si hubieron diferencias significativas (p<0.05). Letras en mayúscula diferentes para una misma columna indican que si hubieron diferencias significativas (p<0.05).

Cuando las dosis de los extractos de tara se aumentaron a 300 ppm, se encontraron incrementos en el contenido de carbonilos al día seis respecto al día cero de 1.47, 1.33 y 1.61 para los extractos de tara EH_{4h}, EH_{9h} y EE, respectivamente, siendo el EH_{4h} el que mejor resultado presentó. Según se observa, para todos los casos, los incrementos fueron superiores a los encontrados a las dosis de 100 ppm, pero los valores estuvieron por debajo del encontrado para el control (carne sin antioxidante), por lo que existiría cierto efecto protector por parte de los diferentes extractos evaluados.

A 600 ppm de aplicación de los extractos de tara a la carne de cerdo se observó nuevamente incrementos graduales en el contenido de carbonilos libres en el tiempo de almacenamiento. Los incrementos en carbonilos fueron de 1.68, 1.49 y 1.66 para los extractos de tara EH_{4h}, EH_{9h} y EE, respectivamente. Los valores de los incrementos en carbonilos fueron mayores a la de la aplicación de las dosis de 300 y 100 ppm.

Se observa que a medida que la concentración de los compuestos fenólicos de los diferentes extractos de tara se incrementa, el efecto protector hacia la oxidación de proteínas tiende a disminuir, efecto muy contrario al encontrado en los mismos extractos en los resultados de la evaluación de la oxidación lipídica; por lo que la aplicación de concentraciones mayores a 100 ppm de los diversos extractos de tara estudiados no serían aconsejables. Es posible que se haya presentado un efecto pro-oxidativo hacia las proteínas de la carne por parte de los compuestos fenólicos presentes en los extractos.

Resultados positivos sobre el empleo de extractos fenólicos de diversas plantas en la protección frente a la oxidación proteica han sido reportados, así destacan las investigaciones de Vuorela *et al.* (2005) quienes determinaron que la aplicación de extractos fenólicos del rapeseed y de la corteza del pino, en pastas de carne de cerdo cocida, resultaron excelentes antioxidantes hacia la oxidación de proteínas con inhibiciones entre el 42 al 64%, siendo los compuestos fenólicos más representativos del rapeseed el ácido sinápico y de la corteza del pino el taxifolin y a quienes se les atribuyó el efecto positivo. De acuerdo a Rababah *et al.* (2004) las catequinas del té fueron efectivos inhibidores de la oxidación proteica en carne de pollo irradiada. Smet *et al.* (2008) indican que el empleo de extractos antioxidantes naturales como del

romero, te verde, semilla de uva y de tomate fueron menos efectivos en la protección de la oxidación de proteínas en carne de pollo, respecto a los antioxidantes sintéticos, sin embargo se presentaron marcadas diferencias de protección entre los extractos antioxidantes naturales.

Los resultados presentados dependen en gran medida de la concentración de los compuestos fenólicos en los extractos, el perfil de los compuestos fenólicos y el método de extracción y el solvente utilizado en la recuperación de los polifenoles.

Finalmente indicamos que los extractos de tara EH_{4h}, EH_{9h} y EE, fueron buenos agentes protectores frente a la oxidación lipídica de la carne de cerdo sometida a refrigeración a concentraciones de 100, 300 y 600 ppm, siendo más efectivo el EH_{4h}. Sin embargo dosis mayores a 100 ppm de los mismos extractos no evitan la oxidación proteica.

IV. CONCLUSIONES

- El pH y la relación materia/solvente no influyeron de forma significativa ($p < 0.05$) en la extracción de los taninos de la tara. El mejor solvente de extracción de los taninos de la tara resultó ser la acetona al 80%, seguido del agua, el etanol 80% y finalmente al metanol 80%. Utilizando agua como solvente de extracción, se determinó que el factor relación materia prima/solvente no afecta de forma significativa ($p < 0.05$) la extracción de los taninos de la tara, pero si la temperatura y el tiempo de extracción.
- El método Superficie Respuesta utilizando el diseño Compuesto Central Rotable para evaluar la optimización de la extracción los taninos de la tara indicó que la extracción en función de la temperatura y tiempo de extracción siguió el siguiente modelo matemático: $\% \text{ Taninos hidrolizables} = 306,85 + 7,51 * \text{Temperatura} - 32,46 * \text{Tiempo} - 0,075 * \text{Temperatura}^2 + 0,036 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} + 5,97 * \text{Tiempo}^2$
- El máximo contenido de taninos hidrolizables de la tara recuperados, según el método Superficie Respuesta, sería de 473.4 mg AGE/g (b.s), bajo las siguientes condiciones, solvente: agua; pH de extracción: 3.5; relación materia prima solvente: 1/60, temperatura: 57.9°C y tiempo de 0.58 h.
- Una hidrólisis ácida a 100 °C y 2 N H₂SO₄ es capaz de liberar el ácido gálico presente en los galotaninos de las vainas de tara, siendo 20 horas el tiempo que asegura una hidrólisis completa.
- Los taninos hidrolizados de las vainas tara presentan capacidad antioxidante frente al ABTS+, la cual se incrementa con el grado de hidrólisis hasta 25,986 ± 0,566 μmol trolox equi./ mg á gálico equi. (47 % más de la actividad de un tratamiento sin hidrolizar), después de 4 horas de hidrólisis, tiempo en cual el grado de hidrólisis es de 38,8 %; luego la actividad antirradical se mantiene constante.
- Los taninos hidrolizados tienen una eficacia antioxidante en aceite de soya similar o mejor que el TBHQ, medida a 140 °C; sin embargo a 60 °C el TBHQ protege mejor el aceite de soya que los taninos hidrolizados
- Los extractos con un grado de hidrólisis de 93,7 y 38,8 % no muestran diferencia significativa en la evolución de índice de peróxidos, contenido de

dienos conjugados y valor de *p*-anisidina durante 20 días de almacenamiento del aceite de soya a 60 °C.

- El extracto entero de tara (EE) y los extractos hidrolizados (EH_{4h} y EH_{9h}) a las concentraciones de 100, 300 y 600 ppm mostraron buenos efectos protectores contra la oxidación lipídica de la carne de cerdo sometida a almacenamiento refrigerado (4°C) por seis días.
- Los EE, EH_{4h} y EH_{9h} aplicados a concentraciones de 100 ppm en la carne de cerdo, presentaron buenos efectos inhibidores a la oxidación proteica; dosis superiores no protegen eficientemente.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). (1995). Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists (15th ed.). 41st Chapter: Oils and Fat. Washington DC.
2. Akoh, C. (1994). Oxidative stability of fat substitutes and vegetable oils by the oxidative stability index method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 211–216.
3. Arnao M.; Cano A.; Acosta M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239-244.
4. Azeredo, H.; Faria, J. y da Silva M. (2004). Minimization of peroxide formation rate in soybean oil by antioxidant combinations. *Food Research International* 37, 689–694.
5. Bas, D. y Boyac, I. (2007). Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J. Food Eng.*, 78: 836-845.
6. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191–203.
7. Basurto, L. (2006). Todo sobre la Tara *Caesalpinia spinosa* o *Caesalpinia tinctoria*. ALNICONSA - Productos agroindustriales de exportación. Disponible en: <http://lorenzobasurto.tripod.com/>
8. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 4th revised and extended ed. Cap. 9 y 14.
9. Besbes, S.; Blecker, C.; Deroanne, C.; Lognay, G.; Drira, N.; Attia H. (2005). Heating effects on some quality characteristics of date seed oil. *Food Chemistry*. Vol 91, 469-476.
10. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25-30.
11. Cacace, J.E. y Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Eng.*, 59: 379-389.
12. Cacho, L.R.; Herrera, J.; Lescano, C. (1980). Estudio para la obtención de taninos en polvo a partir de las vainas de tara (*Caesalpinia tinctoria*). *Anales científicos de la UNALM*. 18: 319-328.
13. Carbiscol, E; Tamarin, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3, 3-8.

14. Chirinos, R.; Rogez, H.; Campos, D.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Sep. Purif. Tech.*, 55 : 217-225.
15. Cuvelier, M.; Richard, H.; Berset C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (2), 324-325.
16. CODEX. 2005. Norma del CODEX para aceites vegetales especificados CODEX-STAN 210 (Enmendado 2003, 2005), 1-15.
17. De la Cruz, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la Tara (*Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG*, 7(14), 64-73.
18. Dufour, C.; Da-Silva; E; Potier, P.; Queneau, Y.; Dangles O. (2002). Gallic Esters of Sucrose as Efficient Radical Scavengers in Lipid Peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50. 3425-3430.
19. Escribano-Bailon, M.T., y Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol extraction from foods, in C.Santos-Buelga, G. Williamson (Eds), *Methods in Polyphenol Análisis*, 1-16 p.
20. Fan, G., Han, Y.; Chen, D. (2008). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT*, 41: 155-160.
21. Farhoosh, R.; Golmovahhed, G.; Khodaparast, M. (2007). Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chemistry* 100, 231–236.
22. Fennema, O. (2000). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
23. Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57, 51-55.
24. Garro, J.; Riedl, B.; Conner, A. (1997). Analytical Studies on Tara Tannins. *Holzforschung* 51 (3), 235-243. Gaulejac, C., Provost, C., & Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenols scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chemistry*, 47, 425-431.

25. González, J.; Cruz, J.; Domínguez, J. (2004). Production of antioxidants from *Eucalyptus globules* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chemistry*. Vol 84, 243-251.
26. Goli, A.; Barzegar, M. y Sahara, M. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry* 92, 521–525.
27. Hagerman, A. (1998, 2002). Tannin Chemistry. Miami University-USA. Disponible en: www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf.
28. Hamama, A. y Nawar, W. (1991). Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem* 39, 1063-1069.
29. Hernández-Hernández, E.; Ponce-Alquicira, E.; Jaramillo-Flores, M.E.; Legarreta, G. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officianalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81, 410-417.
30. Hou, D. (2003). Potential mechanism of cancer chemoprevention by anthocyanin. *Current Advancements in Molecular Medicines*, 3, 149–159.
31. Inoue, K. y Hagerman, A. (1988). Determination o gallotannins with rhodanine. *Anal. Biochem.* 169: 363 – 369.
32. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (1987). Standard methods for de analysis of oils, fats and derivates. 7th ed. Method number 2.504- Determinación of the p-anisidine value. Blackwell Scientific Publications, Bostan, MA and Oxfoed, UK.
33. Kaitaranta, J. (1992). Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 810–813.
34. Kannatt, S.R.; Chander, R.; Radhakrishna, P.; Sharma, A. (2005). Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in irradiation processed lamb meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1499-1504.
35. King, A. y Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99, 213-218.
36. Khan, M. y Shahidi F. (2001). Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry* 75, 431–437.

37. Kosar, M.; Bozan, B.; Temelli, F.; Baser, K. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria L.*) extracts. *Food Chemistry* 103, 952–959.
38. Kowalski, B.; Ratusz, K.; Miciula, A. y Krygier K. (1997). Monitoring of rapeseed oil autoxidation with a pressure differential scanning calorimeter *Thermochimica Acta* 307, 117-121.
39. Labrinea, E.; Thomaidis, N. y Georgiou C. (2001). Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta* 448 , 201–206.
40. Laguerre, M. ; Lecomte, J. y Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46:244–282.
41. Lien, E.; Ren, S.; Bui, H.; Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology y Medicine*, Vol. 26, Nos. 3/4, pp. 285–294.
42. Liu, F.F.; Ang, C.Y.W.; Springer, D. (2000). Optimization of extraction conditions for active components in *Hipericum perforatum* using response surface methodology. *J.Agric. Food Chem.*, 48: 3364-3371.
43. Liyana-Patirana, C. y Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.*, 93: 47-56.
44. Lokeswari, N. y Jaya K. (2007). Optimization of Gallic Acid Production from *Terminalia Chebula* by *Aspergillus niger*. *E-Journal of Chemistry*, Vol. 4, No. 2, pp 287-293.
45. Lu, Z.; Nie, G.; Belton, P.; Tang, H.; Zhao, B. (2006). Structure– activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International* 48, 263-274.
46. Marfil, R. (1991). Una herramienta para el mejoramiento de la calidad. *Tecnología de alimentos*. Vol. 25, N°5. México.
47. Marinova, E.M. y Yanishlieva, N.V. (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry* 81, 189-197.
48. Masaki, H.; Atsumi, T.; Sakurai, H. (1994). Hamamelitannin as a new potent active oxygen scavenger. *Phytochemistry* Vol. 37 N° 2 pp. 337-343.

49. Mc Carthy, T.L.; Ferry, J.P.; Ferry, J.F., Lynch, P.B.; Buckley, D.J. (2001). Assesment of the antioxidant potencial of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, 57, 177-184.
50. Montgomery, D.C. y Runger, G.C. (2003). Applied statistics and probability for engineers, 3rd ed. Wiley, New York.
51. Mokgope, L. (2006). Cowpea seed coats and their extracts: Phenolic composition and use as antioxidants in sunflower oil Department of Food Science Faculty of Natural and Agricultural Sciences University of Pretoria South Africa.
52. Moore, J.; Westall, K.; Ravenscroft, N.; Farrant, J.; Lindsey G. Brandt, W. (2005). The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochem. J.* 385, 301–308.
53. Morrissey, P.A.; Sheehy P.J.A.; Galvin K.; Kerry J.P.; Buckley D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, 73-86.
54. Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J.M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nuñez, M.J.; Parajo, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72, 145-171.
55. Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91, 3:20.
56. Muchuweti, M.; Ndhkala, A.R.; Kasiamburu, A. (2006). Análisis of phenolic compounds including tannins gallotannins and flavanols of *Uapaca kirkiana* fruit. *Food Chem.*, 94: 415-419.
57. Murthy, K.N.C; Singh, R.P.; Jayaprakasha, G.K. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5909-5914.
58. Navarro-García, G.; Bringas-Alvarado, L.; Pacheco-Aguilar, R. (2004). Nueva herramienta para el estudio de la oxidación de los ácidos grasos, una de las causas de la pérdida de calidad de los alimentos para acuicultura. En: *Avances en nutrición acuicola VII*. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
59. Naz, S.; Sheikh, H.; Siddiqi, R. Asad-Sayeed, S. (2004). Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions *Food Chemistry* 88, 253–259.

60. Oliver, C. (1987). Aged-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488.
61. Omnichem S. A. (2007). Natural specialities. Disponible en: www.natural-specialities.com
62. Ossipov, V.; Loponen, J.; Ossipova, S.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. (1997). Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. *Biochem. Syst. Ecol.*, 25: 493-504.
63. Pazos, M.; Gallardo, J.M.; Torres, J.L.L.; Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92, 547-557.
64. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (2005). Antioxidantes en los alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia.
65. Prior, R. (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: potential health effects. In M. Meskin, W. R. Bidlack, A. J. Davies, D. S. Lewis, y R. K. Randolph (Eds.), *Phytochemicals: mechanisms of action* (p. 1–19). Boca Raton, FL: CRC Press.
66. Rababah, T.; Hettiarachchy, N.; Horax, R.; Eswaranandam, S.; Mauromoustakos, a.; Dickson, J.; Niebuhr, S. (2004). Effect of electron beam irradiation and storage at 5°C on thiobarbituric acid reactive substances and carbonyl contents in chicken breast meat infused with antioxidants and selected plant extracts. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8236-8241.
67. Ramanathan, L.; Das, N.P. (1992). Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 40, 17-21.
68. Renuka, R.; Jayalekshmy, A. y Arumughan, C. (2007). Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. *Food Chemistry* 104, 658–664.
69. Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 933-956.
70. Rizner, A.; Hadolin, M.; Knez, Z. y Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with a-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry* 71, 229-233.

71. Rosmini, M.; Perlo, A.; Perez-Alvarez, J.; Pagan-Moreno, M. (1996). TBA Test by an Extractive Method Applied to Pate. *Meat Science*, 42, 03-110.
72. Salminen, J-P. (2003). Effects of sample drying and storage, and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of Birch leaf hydrolysable tannins. *J. Chem. Ecol.*, 29: 1289-1305.
73. Salminen, J-P.; Ossipov, V.; Lojonen, J.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. 1999. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Dec 24;864(2):283-91.
74. Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolic Review*, 32, 307-326.
75. Sharma, G.; Semwal, A.; Narashimha, M., y Arya, S. (1997). Stability of antioxidant salts for stabilization of fried snacks. *Food Chemistry*, 60, 19–24.
76. Silva, E.M.; Rogez, H.; Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Tech.*, 55: 381-387.
77. Smet, K.; Raes, K., Huyghebaert, G.; Haak, L.; Arnout, S.; De Smet, S. (2008). Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*, 87, 1682-1688.
78. Soong, Y. y Barlow, P. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan Lour.*) seed and mango (*Mangifera indica L.*) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry* 97, 524–530.
79. Singleton V. y Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphoshotungstic acid reagents. *American. J. Enol. Vitic.*, 6: 144-158.
80. Srivastava, R., Husain, M., Haslam, K., & Atari, M. (2000). *Cancer Lett.*, 153, 1-5.
81. Tan, C.; Chen, Y.; Selamat, J. (2002). Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chemistry*. Vol 76, 385-389.
82. Tang, S.Z.; Kerry, J.P.; Sheehan, D.; Buckley, D.J; Morrissey, P.A. (2001). Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long-term frozen stored chicken meta. *Meat Science*, 57, 331-336.

83. Tian, F.; Li, Bo; Ji, B.; Yang, J.; Zhang, G.; Chen, Y.; Luo, Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry* 113; 173–179.
84. Tsao, R. y Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1018, 29-40.
85. Verma, B.; Hucl, P. y Chibbar R.N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*: doi:10.1016/j.foodchem. 2009.03.060.
86. Vijayakumari, K.; Siddhuraju, P.; Pugalenthi, M.; Janardhanan, K. (1998). Effect of soaking and heat processing on the levels of antinutrients and digestible proteins in seeds of *Vigna aconitifolia* and *Vigna sinensis*. *Food Chemistry* 63, 259-264.
87. Vuorela, S.; Salminen, H.; Mäkelä. M.; Kivikari, R.; Karonen M.; Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8492-8497.
88. Wanasundara, U.; Shaidi, F. y Jablonski, C. (1995). Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils. *Food Chemistry* 52, 249-253.
89. Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; Lavoie, E.J.; Huang, T.C.; Ho, C.T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4869-4873.
90. Xiong, Y.L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. *In* Antioxidants in muscle foods. Nutritional strategies to improve quality; Decaer, E.A., Faustman, C., Lopez-Bote, C.D. Eds.; Willey-Interscience: New Cork, 2000.
91. Yaghmur, A.; Aserin, A.; Mizrahi, Y.; Nerd A. y Garti N. (2001). Evaluation of Argan Oil for Deep-Fat Frying. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 34, 124-130.
92. Zhao, X.; Sun, .; Hou, H.; Zhao, Q.; Weia, T.; Xin, W. (2005). Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725, 103 – 110.
93. Zhang, C.; Wu, H. y Weng X. 2004. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. *Food Chemistry* 84: 219-222.