

**Desarrollo de la técnica de lengua electrónica
voltamétrica para la determinación de la
capacidad antioxidante total de extractos de
plantas y frutas peruanas**

EDWIN O. BALDEÓN CHAMORRO

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Desarrollo de la técnica de lengua
electrónica voltamétrica para la
determinación de la capacidad
antioxidante total de extractos de
plantas y frutas peruanas**

TESIS DOCTORAL

Presentado por:

Edwin O. Baldeón Chamorro

Directores académicos:

Raúl Grau Meló

José Manuel Barat Baviera

Julio de 2015

Colección Tesis Doctorales

© Edwin O. Baldeón Chamorro

© 2015, de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València
Telf.: 963 877 012 / www.lalibreria.upv.es

ISBN: 978-84-9048-431-9 (versión impresa)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

A Dios
A mi madre
A mi mujer Rina
A mis hijos Cecilia y Joshua

"Es, pues, la fe la certeza de lo que se espera, la convicción de lo que no se ve." – Hb 11:1.

Agradecimientos

Un sueño hecho realidad, después de cuatro años luchando para lograrlo. Dejar un país donde tenía construido una vida, decidir hacerlo ha costado mucho. Sin embargo, con el tiempo vas descubriendo el camino y la ayuda oportuna. Lo alcanzado no es más que el esfuerzo de todos los que han sido partícipes de este sueño.

Agradecer en primer lugar a mis tutores de tesis Raúl Grau y José Barat por su dedicación en la ejecución y culminación de la tesis, especialmente a Raúl quien en todo momento me brindó su apoyo, a pesar de la distancia en los períodos en la que me tocó estar en mi país, siempre me animaba y decía que juntos construiremos este castillo, en la que cada uno va aportando lo suyo, conocimientos, experiencias y confianza. Agradecer a Miguel quien fue uno de los primeros que empezó todo esto de la lengua electrónica, por sus comentarios y aportes acertados en la tesis. A Rosana Chirinos por colaborar en el inicio de este trabajo. A los compañeros del laboratorio quienes me brindaron su amistad y apoyo en la ejecución de la tesis.

A la hermandad de la Iglesia Adventista del Séptimo Día Vives de Valencia, por su acogida desde el primer momento de mi llegada, tengo recuerdos muy gratos de todos ellos. A Dios por darme la vida y mucha fe en todo lo que hago en la vida. A mi familia que desde muy lejos me brindaron su apoyo y confianza, en especial a mi mujer que me ha comprendido y a mis hijos quienes son mi motivación. Ha sido tiempos difíciles, pero con la satisfacción de haber terminado la tesis. También, a mi madre que me enseñó con su silencio de empezar hacer y no dejar de terminar.

A La Fundación Carolina por otórgame una beca de estudio en convenio con la universidad Politécnica de Valencia en los periodos que me ha tocado venir para hacer la tesis.

RESUMEN

RESUMEN

En estos últimos años ha aumentado el interés por descubrir y difundir especies de plantas y variedades de frutas con propiedades nutricionales y medicinales, siendo la región andina y amazónica del Perú un área en la que existen muchas de estas, las cuales, entre otros, son fuentes de antioxidantes naturales.

Existen diversos métodos para la determinación de compuestos antioxidantes, siendo los más comunes las técnicas cromatográficas o espectrofotométricas, entre otras. Sin embargo, estas técnicas emplean tratamientos costosos con procedimientos complejos, personal cualificado y normalmente no son adecuados para análisis *in situ*. Además muchas de ellas centran el análisis en la determinación de uno de los compuestos que generan dicha capacidad y no sobre la propia capacidad resultante. En los últimos tiempos se ha propuesto el desarrollo de sensores llamados lengua electrónica como una herramienta para determinar capacidad antioxidante de plantas y frutas.

Así en la presente tesis doctoral se ha planteado el objetivo de desarrollar la técnica de lengua electrónica voltamétrica para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas té, aliso, chincilcoma, pachasalvia e inca muña y las frutas camu camu, tumbo, aguaymanto y kiwi. Para ello se ha utilizado un equipo desarrollado en la propia Universidad Politécnica de Valencia basado en la voltimetría de pulsos que utiliza como electrodos de trabajo metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni), aplicando un patrón de pulsos genérico comprendido entre -850 y 900 mV con una amplitud de pulso de 20 ms.

Los resultados obtenidos han sido capaces de generar modelos matemáticos de predicción de la capacidad antioxidante, expresada como equivalentes de trolox, de todas las plantas evaluadas. En cambio solo se han podido generar modelos para la predicción de las frutas camu camu y tumbo expresándose esta como equivalentes de ácido ascórbico.

ABSTRACT

In recent years, have increased interest by studying plants species and fruit with nutritional and medicinal properties. The Andean and Amazonian region of Peru is where there are many sources of natural antioxidants.

Several methods for the determination of antioxidant compounds including chromatographic or spectrophotometric and other techniques. Although these techniques have disadvantages. Also many analyzes focus in identifying of the compounds generated this capacity and not on the resulting ability. In recent times, it has been proposed the development of electronic sensors called language as a tool to determine the antioxidant activity of plants and fruits.

In this thesis has set itself the objective of developing the electronic tongue voltammetric technique for the determination of the total antioxidant activity of plants extracts green tea, aliso, chincilcoma, pachasalvia and inca muña and camu camu and fruits tumbo, goldenberry and kiwifruit. For this purpose has been used a device developed at the University Politecnica Valencia based on pulse voltammetry using as electrodes of noble metal work (Ir, Rh, Pt and Au) and base metals (Ag, Co, Cu and Ni), applying a pattern of generic pulses between -850 and 900 mV with a pulse width of 20 ms.

The results have been able to generate mathematical models predictive of antioxidant activity expressed as Trolox equivalents, of all tested plants. However only have been able generate models for the prediction of fruits camu camu and tumbo is expressed as ascorbic acid equivalents.

RESUM

Durant a estos últims anys ha augmentat l'interès per descobrir i difondre espècies de plantes i varietats de fruites amb propietats nutricionals i medicinals, sent la regió andina i amazònica del Perú una àrea en la que hi ha moltes d'aquestes, les quals, entre d'altres, són fonts d'antioxidants naturals.

Hi ha diversos mètodes per a la determinació de compostos antioxidants, sent els més comuns les tècniques cromatogràfiques o espectrofotomètriques, entre d'altres. No obstant això, aquestes tècniques fan servir tractaments costos amb procediments complexos, personal qualificat i normalment no són adequats per a anàlisi in situ. A més, moltes d'elles centren l'anàlisi en la determinació d'un dels compostos que generen aquesta capacitat i no sobre la pròpia capacitat resultant. En els últims temps s'ha proposat el desenvolupament de sensors anomenats llengua electrònica com una eina per determinar capacitat antioxidant de plantes i fruites.

En aquest sentit, en la present tesi doctoral s'ha plantejat l'objectiu de desenvolupar la tècnica de llengua electrònica voltamètrica per a la determinació de la capacitat antioxidant total dels extractes de les plantes té, aliso, chincilcoma, pachasalvia i inca muña i les fruites camu camu, tumbo, aguaymanto i kiwi. Per a tal fi s'ha utilitzat un equip desenvolupat en la pròpia Universitat Politècnica de València basat en la voltametria de polsos que utilitza com elèctrodes de treball metalls nobles (Ir, Rh, Pt i Au) i metalls no nobles (Ag, Co, Cu i Ni), aplicant un patró de polsos genèric comprès entre -850 i 900 mV amb una amplitud de pols de 20 ms.

Els resultats obtinguts han estat capaços de generar models matemàtics de predicció de la capacitat antioxidant, expressada com a equivalents trolox, de totes les plantes avaluades. En canvi només han pogut generar models per a la predicció de les fruites camu camu i tumbo expressant aquesta com a equivalents àcid ascòrbic.

Producción científica

La actividad investigadora realizada durante el desarrollo de la presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas y relacionadas con esta:

Artículos en revistas internacionales de investigación

E.O. Baldeón, M Alcañiz, R. Masot, E.M Fuentes, J:M Barat, R.Grau, Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camuecamu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*. 54 (2015) 181-187.

Ponencia

E.O. Baldeón, J.M. Barat, R. Grau. Desarrollo de la técnica lengua electrónica en frutas amazónicas y andinas. I CONGRESO NACIONAL DE INNOVACIONES AGROINDUSTRIALES DE PRODUCTOS ANDINOS Y AMAZÓNICOS. Universidad Nacional Agraria La Molina. 21-22 noviembre 2014. Lima. Perú.

Participación en Congresos

E.M. Fuentes, **E.O. Baldeón**, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. Estudio de la amplitud de los pulso en la respuesta voltamétrica, de una muestra de aliso (*alnus acuminata*), para la determinación de la capacidad antioxidante. III Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria Acofesal 2015. Universitat Politècnica de València. 10-12 junio 2015.

E.M. Fuentes, **E.O. Baldeón**, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. ANTIOXYDANT CAPACITY OF CAMU CAMU (*MYRCIARIA DUBIA*), THROUGH DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY. 1st International Congress of Students of Food Science and Technology. University of Valencia. 5-6 march 2015.

E.O. Baldeón, G. Hernandez, S. Verdú, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALISO (*Alnus Acuminata*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA9. Universitat Politècnica de València. 13-16 enero 2014.

ÍNDICE GENERAL

Página

Resumen

Abstract

Resum

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción	3
1.1. Perú como fuente de alimentos funcionales	8
1.1.1. Aguaymanto (<i>Physalis peruviana</i>)	10
1.1.2. Camu Camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	12
1.1.3. Tumbo (<i>Passiflora mollissima</i> , H.B.K., Bailey)	14
1.1.4. Inca muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>)	16
1.1.5. Aliso (<i>Alnus acuminata</i> Kunth)	18
1.1.6. Chinchilcoma (<i>Mutisia acuminata</i>)	20
1.1.7. Pachasalvia (<i>Lepechinia meyenii</i> (Walp))	21
1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de frutas y plantas	24
1.2.1. Reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno	25
1.2.2. Reacciones de transferencia de electrones simples	27
1.2.3. Otras técnicas para determinar capacidad antioxidante	29
2. Métodos electroquímicos de medidas. Técnicas de lengua electrónica	29
2.1. Tipos de lenguas electrónicas. Lenguas voltamétricas	31
2.1.1. Tipos de potenciales aplicados a las lenguas voltamétricas	31
2.1.2. Corriente resultante tras la aplicación de un potencial	33
2.2. Variables en las medidas electroquímicas	35
2.3. Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV) desarrollada por el IDM-UPV	36
2.3.1. Partes de la lengua electrónica voltamétrica y limpieza	38
2.4. Metodología de trabajo con lengua electrónica voltamétrica	41
2.5. Aplicaciones de la lengua electrónica voltamétrica	43

3.	Procesado de datos	45
3.1.	Análisis de componentes principales (PCA)	48
3.2.	Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)	49
3.2.1.	Modelos de calibración y predicción	50
3.2.2.	El Modelo de calibración	51
3.2.3.	El Modelo de predicción	55
3.3.	Optimización del modelo	57
3.3.1.	Método de selección de variables	57
3.3.2.	Índice de proyección de la importancia de las variables (VIP)	59
3.3.3.	Intervalo de PLS (iPLS)	60
3.4.	Método de la pendiente para evaluar la capacidad antioxidante	61
4.	Bibliografía	63

2. OBJETIVOS

Objetivo general	81
Objetivos específicos	82

3.- RESULTADOS

CAPITULO 1: EFECTO DE VARIABLES SOBRE LA MEDIDA VOLTAMÉTRICA

INTRODUCCIÓN	87
OBJETIVOS	89
MATERIALES Y MÉTODOS	
Preparación de las soluciones	89
Estudio de la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas, para una misma medición	90
Estudio del efecto de la presencia de O ₂ en las soluciones	90
Estudio del efecto del pH de la solución	90
Equipo voltamétrico. Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV)	91
Análisis estadístico	93

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Estudio de la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas, para una misma medición	94
Estudio del efecto de la presencia de O ₂ en las soluciones	95
Estudio del efecto del pH de la solución	100
CONCLUSIÓN	104
BIBLIOGRAFÍA	104

CAPITULO 2: PATRONES ANTIOXIDANTES. MODELOS DE PREDICCIÓN

INTRODUCCIÓN	111
OBJETIVO	113
MATERIALES Y MÉTODOS	
Reactivos utilizados	113
Equipo voltamétrico. Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV)	114
Análisis estadísticos	114
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
Obtención de los modelos de predicción de los patrones a pH básico	118
Obtención de los modelos de predicción de los patrones a pH ácido	127
Ensayo de los modelos. Equivalencias entre patrones	136
CONCLUSIÓN	141
BIBLIOGRAFÍA	142

CAPITULO 3: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTAS PERUANAS

INTRODUCCIÓN	149
OBJETIVO	150
MATERIALES Y MÉTODOS	
Materia prima	150

Caracterización fisicoquímica de los zumos	151
Determinación de la capacidad antioxidante total mediante lengua electrónica voltamétrica	158
Análisis estadístico	159
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Caracterización fisicoquímica	161
Determinación de a_w , pH, ° Brix y rendimiento zumo/pulpa.	161
Acidez total titulable (ATT)	163
Determinación de azúcares	164
Fenoles (Equivalentes de ácido gálico)	166
Ácido ascórbico (Vitamina C).	168
Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS	169
Determinación de la capacidad antioxidante mediante lengua electrónica voltamétrica	171
Cuantificación como equivalentes de ácido ascórbico	172
Cuantificación como equivalentes de ácido gálico	177
CONCLUSIÓN	181
BIBLIOGRAFIA	182

CAPITULO 4: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS ANDINAS

INTRODUCCIÓN	191
OBJETIVO	192
MATERIALES Y MÉTODOS	
Materia Prima	193
Caracterización de la capacidad antioxidante de los extractos de plantas mediante análisis químicos de referencia	194
Determinación de la capacidad antioxidante por el método de referencia	194
Determinación de la capacidad antioxidante total mediante lengua electrónica voltamétrica	195

Análisis estadístico	196
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Caracterización de la capacidad antioxidante de los extractos de plantas mediante el análisis químico de referencia	197
Determinación de la capacidad antioxidante total mediante lengua electrónica voltamétrica	198
Cuantificación como equivalentes de trolox	199
Cuantificación como equivalentes de catequina	204
CONCLUSIÓN	209
BIBLIOGRAFÍA	210
4. CONCLUSIONES	217

INDICE DE FIGURAS

Páginas

INTRODUCCIÓN

Figura 1	Estructura química de los principales flavonoides.	7
Figura 2	Aguaymanto del Perú (<i>Physalis peruviana</i>).	12
Figura 3	Camu Camu Amazónico (<i>Myrciaria dubia</i>).	14
Figura 4	Tumbo (<i>Passiflora regularis</i> H.B.K., Bailey).	15
Figura 5	La planta Inca muña ((<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze).	18
Figura 6	Las hojas de aliso (<i>Alnus acuminata</i> Kunth HBK).	19
Figura 7	La planta chinchilcoma (<i>Mutisia acuminata</i>).	21
Figura 8	La planta pachasalvia (<i>Lepechinia meyenii</i> (Walp)).	22
Figura 9	Voltametría de pulsos de pequeña amplitud, a) tipo escalera, b) onda cuadrada y c) pulso diferencial.	32
Figura 10	Respuesta eléctrica, (---) corriente no farádica, (.....) corriente farádica y (___) corriente total.	33
Figura 11	Doble capa eléctrica formada en la superficie del electrodo como resultado de un potencial aplicado.	35
Figura 12	Variables importantes de control en una lengua electrónica.	36
Figura 13	El conjunto de sistemas de la lengua electrónica voltamétrica.	38
Figura 14	Elementos del equipo lengua electrónica voltamétrica.	40
Figura 15	a) Lengua electrónica, b) Posición de los electrodos de metales nobles.	40
Figura 16	Esquema del proceso de medición mediante lengua electrónica voltamétrica.	43
Figura 17	Gráfica de observaciones (<i>scores</i>) para PCA de datos de patrón ácido gálico.	49

Figura 18	Flujo de operaciones para la obtención de los modelos de calibración y predicción.	51
Figura 19	Grafica RMSECV vs Número de Variable Latente para PLS de los datos patrón trolox.	54
Figura 20	Grafica PLS. Valores observados vs. Valores predichos para PLS de datos de patrón catequina.	55
Figura 21	Grafica de Y predicho versus Y observado para el PLS del patrón trolox.	56
Figura 22	Esquema del procedimiento estadístico del método de Liteanu.	62

CAPITULO 1: EFECTO DE VARIABLES SOBRE LA MEDIDA VOLTAMÉTRICA

Figura 1.1.	A) Tren de pulsos (SAPV) de amplitud aplicado a la LEV; B) Respuesta voltamétrica del electrodo de Au.	92
Figura 1.2.	Análisis de PCA de las respuestas voltamétricas para las soluciones de trolox con (200 rpm) y sin agitación (control).	94
Figura 1.3.	Análisis de PCA de las respuestas voltamétricas de las soluciones de trolox con y sin gas N ₂ .	96
Figura 1.4.	Ajuste de los valores teóricos de trolox frente a los predichos por los modelos generados a partir de la información voltamétrica obtenida con las soluciones sin gas (A) y con gas (B). - - - Línea de ajuste y <u> </u> recta y=x.	97
Figura 1.5.	Curva de desviación estándar de las respuestas voltamétricas de las soluciones de trolox a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.25 mM, sin gas (A) y con gas (B).	98
Figura 1.6.	Respuesta voltamétrica promedio de las soluciones de trolox desde 0.5 hasta 5 mM en solución base fosfato de 0.01 M a pH 7.4 con y sin gas, registradas con los primero cinco pulsos (0 a 900 mV) del electrodo Au.	99

Figura 1.7.	Análisis de PCA para las soluciones de ácido ascórbico desde 0.25 hasta 10 mM en solución base fosfato 0.01 M ajustadas a pH 7.4 y pH 4.8.	100
Figura 1.8.	Ajuste de los valores teóricos de ácido ascórbico frente a los predichos por los modelos generados a partir de la información voltamétrica obtenida con las soluciones a pH 7.4 (A) y 4.8 (B). - - - Línea de ajuste y <u> </u> recta $y=x$.	101
Figura 1.9.	Curva de desviación estándar las respuestas voltamétricas de las soluciones de ácido ascórbico a concentraciones de 0.2, 0.5 y 1.25 mM a pH 7.4 (A) y pH 4.8 (B).	102
Figura 1.10.	Curva potencial redox de las soluciones de ácido ascórbico a concentraciones desde 0.25 hasta 10 mM en solución base buffer fosfato 0.01 M.	103

CAPITULO 2: PATRONES ANTIOXIDANTES. MODELOS DE PREDICCIÓN

Figura 2.1.	Respuesta eléctrica generada mediante la lengua electrónica voltamétrica del patrón trolox a concentraciones de 0.25 hasta 5 mM en solución base buffer fosfato 0.01 M a pH 7. B) Ampliación del pulso a 900 mV para el electrodo de Pt.	117
Figura 2.2	Análisis de los componentes principales (PCA) de los patrones químicos, trolox (Tx), catequina (C), ácido ascórbico (AA) y ácido gálico (AG).	118
Figura 2.3.	Valores teóricos de concentración tanto de trolox (Fig. 4 A) como de catequina (Fig. 4 B) frente a los predichos por sus respectivos modelos expresados en mM equivalentes.	119
Figura 2.4.	Distribución de las variables (electrodos y pulsos) influyentes VIP-PLS en la construcción de los modelos matemáticos de predicción de los patrones básicos A) trolox y B) catequina.	121

Figura 2.5.	Respuesta eléctrica para los pulsos influyentes VIP-PLS del electrodo Au y Ag para el patrón trolox.	122
Figura 2.6	Respuesta eléctrica y pulsos influyentes VIP-PLS del electrodo Au y Ag para el patrón catequina.	123
Figura 2.7.	Valores teóricos de concentración tanto de ácido ascórbico (Fig. 7 A) como de ácido gálico (Fig. 7 B) frente a los predichos por sus respectivos modelos expresados como mM equivalentes.	128
Figura 2.8.	Distribución de las variables (electrodos y pulsos) influyentes VIP-PLS en la construcción de los modelos matemáticos de predicción de los patrones básicos; a) ácido ascórbico y b) ácido gálico.	129
Figura 2.9.	Respuesta eléctrica, tren de pulsos eléctricos y método VIP-PLS para el patrón ácido ascórbico dado por electrodo de Au.	131
Figura 2.10.	Respuesta voltamétrica y VIP-PLS del patrón ácido gálico y la señal de pulsos aplicado al electrodo Cu.	132
Figura 2.11.	Valores teóricos de concentración de ácido ascórbico frente a los predichos (expresados como mM equivalentes) por el modelo generado a partir de la información seleccionada por el método iPLS a partir de las respuestas de los electrodos nobles.	136
Figura 2.12.	Línea de equivalencia entre los patrones trolox y catequina.	137
Figura 2.13.	Línea de equivalencia entre los patrones catequina y trolox. A) modelo catequina con todas las diluciones; B) modelo catequina con las tres primeras diluciones.	138
Figura 2.14.	Línea de equivalencia entre los patrones gálico y ascórbico.	140

CAPITULO 3: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTAS PERUANAS

Figura 3.1.	a) Curva de valoración de los ácidos orgánicos de la pulpa del kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>) y b), la derivada de la curva de valoración.	163
Figura 3.2.	Curva patrón de glucosa, fructosa y sacarosa por el método HPLC.	164
Figura 3.3.	Histograma representativo del azúcar total en los zumos de frutas en estudio (g/100mL de zumo).	166
Figura 3.4.	Histograma representativo del azúcar total de los zumos de frutas en estudio (g/100g de fruta).	166
Figura 3.5.	Curva de calibración de ácido gálico a 765 nm.	167
Figura 3.6.	Curva patrón de ácido ascórbico.	168
Figura 3.7.	Curva patrón de equivalentes de ácido ascórbico.	170
Figura 3.8.	Análisis de componentes principales PCA, de cada una de los zumos analizados.	172
Figura 3.9.	Predicción de la capacidad antioxidante de los zumos de frutas (equivalentes ac. Ascórbico) mediante el modelo de todas las variables.	173
Figura 3.10.	Respuesta eléctrica, en los pulsos influyentes VIP para el electrodo de Ag, en ácido ascórbico (1.25 mM), aguaymanto (1.11 mM), kiwi (1.57 mM), tumbo (1.54 mM) y camu-camu (1.16 mM).	176
Figura 3.11.	Predicción de compuestos fenólicos de los zumos de frutas usando el modelo de todas las variables.	178
Figura 3.12.	Respuesta eléctrica, en los pulsos influyentes VIP para el electrodo de Cu, en ácido gálico (1.25 mM), aguaymanto (1.11 mM), kiwi (1.57 mM), tumbo (1.54 mM) y camu-camu (1.16 mM).	180

CAPITULO 4: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS ANDINAS

Figura 4.1.	Análisis de componentes principales PCA para diluciones de aliso y de inca muña.	199
Figura 4.2.	Predicción de la capacidad antioxidante de los extractos de plantas (equivalentes trolox) mediante el modelo de todas las variables.	200
Figura 4.3.	Predicción de la capacidad antioxidante de los extractos de alisos (equivalentes trolox) mediante los 6 modelos de predicción.	201
Figura 4.4.	Respuesta eléctrica del electrodo de Co en trolox ($ET_{ABTS} = 1.25 \text{ mM}$), Aliso ($ET_{ABTS} = 1.5 \text{ mM}$) e Inca muña ($ET_{ABTS} = 1.25 \text{ mM}$).	204

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
	INTRODUCCIÓN	
Tabla 1	Cantidad de antioxidantes del aguaymanto (<i>Physalis peruviana</i> L.).	11
Tabla 2	Cantidad de antioxidante del camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>).	13
Tabla 3	Cantidad de antioxidante del Tumbo (<i>Passiflora mollisima</i> , H.B.K., Bailey).	15
Tabla 4	Principales componentes antioxidantes y compuestos activos de frutas amazónicas y andinas del Perú.	16
Tabla 5	Principales componentes antioxidantes y compuestos activos de plantas andinas del Perú.	23
Tabla 6	Capacidad antioxidante de plantas andinas del Perú.	24
Tabla 7	Respuesta electroquímica de los principales patrones químicos como antioxidantes de referencia.	42
Tabla 8	Aplicación de la lengua electrónica en la agroindustria de alimentos.	44
Tabla 9	Clasificación de los principales métodos de selección de variables.	59

CAPITULO 1: EFECTO DE VARIABLES SOBRE LA MEDIDA VOLTAMÉTRICA

Tabla 1.1.	Parámetros de regresión PLS para el patrón trolox sin y con gas.	97
Tabla 1.2.	Sumatorio de las desviaciones estándares de las variables (pulso / electrodo) por efecto para las soluciones no burbujeadas y burbujeadas de ácido ascórbico.	98
Tabla 1.3.	Parámetros de regresión PLS para las soluciones ácido ascórbico a pH 7.4 y a pH 4.8.	101

Tabla 1.4.	Sumatorio de las desviaciones estándares de las variables (pulso / electrodo) por efecto del pH de las soluciones de ácido ascórbico.	103
------------	---	-----

CAPITULO 2: PATRONES ANTIOXIDANTES. MODELOS DE PREDICCIÓN

Tabla 2.1.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH básicos a partir de la información generada en todos los electrodos y pulsos.	119
Tabla 2.2.	Electros y pulsos eléctricos identificados mediante la proyección de las variables influyentes (VIP-PLS) para los patrones a pH básicos.	121
Tabla 2.3.	Electrodos y pulsos eléctricos seleccionados mediante el algoritmo iPLS para los patrones trolox y catequina.	124
Tabla 2.4.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH básicos a partir de la información obtenida de las principales variables (electrodo y pulso) seleccionadas por VIP-IPL o por iPLS.	125
Tabla 2.5.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH básicos a partir de la información procedente de los electrodos nobles y de la selección realizada por VIP-PLS e iPLS.	126
Tabla 2.6.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH ácidos a partir de la información procedente de todos los electrodos y pulsos.	128
Tabla 2.7.	Pulsos eléctricos identificados mediante el método VIP-PLS para los patrones a pH ácidos.	130

Tabla 2.8.	Pulsos eléctricos identificados mediante el método iPLS para los patrones ácidos a partir de todas las variables.	133
Tabla 2.9.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH ácidos a partir de la información procedente de todos los electrodos y pulsos.	134
Tabla 2.10.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH ácidos a partir de la información procedente de los electrodos nobles y de la selección realizada por VIP-PLS e iPLS.	135
Tabla 2.11.	Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para predecir catequina a partir de la información procedente de las tres primeras concentraciones de los electrodos nobles y de la selección realizada por VIP-PLS e iPLS.	139
Tabla 2.12.	Equivalencia entre los patrones antioxidantes	140

CAPITULO 3: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTAS PERUANAS

Tabla 3.1.	Factor de dilución de los diferentes zumos de frutas.	157
Tabla 3.2.	Media y desviación estándar de los valores de a_w , °Brix y pH para los zumos de frutas en estudio.	162
Tabla 3.3.	Rendimiento (%) zumo/pulpa para las frutas en estudio.	162
Tabla 3.4.	Acidez total titulable (Equivalentes ácido cítrico = gramos de ácido cítrico por 100 mL de zumo).	164
Tabla 3.5.	Contenido en glucosa, fructosa y sacarosa de los zumos de frutas en estudio (g/100mL de zumo). Relación de los monosacáridos glucosa-fructosa (G/F) y sumatorio de los azúcares (Σ).	165
Tabla 3.6.	Contenido en equivalentes de ácido gálico (EAG) de los zumos de frutas en estudio.	168

Tabla 3.7.	Contenido en ácido ascórbico (AA) de los zumos de frutas en estudio.	169
Tabla 3.8.	Contenido en equivalentes de ácido ascórbico de los zumos de frutas en estudio.	170
Tabla 3.9.	Estimación de los equivalentes de ácido ascórbico en los zumos de camu-camu y tumbo.	174
Tabla 3.10.	Estimación de los equivalentes de ácido ascórbico en los zumos kiwi y aguaymanto.	175
Tabla 3.11.	Equivalencia ácido gálico de los zumos de frutas.	177
Tabla 3.12.	Estimación de los equivalentes de ácido gálico en los zumos de camu camu y tumbo.	179
Tabla 3.13.	Estimación de los equivalentes de ácido gálico en los zumos de kiwi y aguaymanto.	180

CAPITULO 4: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS ANDINAS

Tabla 4.1.	Capacidad antioxidante de las plantas.	198
Tabla 4.2.	Estimación de los equivalentes de trolox de las plantas té verde y aliso.	202
Tabla 4.3.	Estimación de los equivalentes de trolox de las plantas chinchilcoma, pachasalvia e inca muña.	203
Tabla 4.4.	Equivalencia de catequina de las plantas	205
Tabla 4.5.	Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas té verde y aliso.	205
Tabla 4.6.	Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas chinchilcoma, pachasalvia e inca muña.	206
Tabla 4.7.	Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas té verde y aliso, nuevo modelo de tres concentraciones.	208
Tabla 4.8.	Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas chinchilcoma, pachasalvia e inca muña, nuevo modelo de tres concentraciones.	208

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Un amplio sector de la población no solo se preocupa por alimentarse bien, sino en cuidar la buena salud. Este hecho ha dado lugar a que los conceptos de alimentación y salud estén estrechamente relacionados. Muchas de las enfermedades crónicas están relacionadas con la nutrición y muchas podrían prevenirse con una dieta adecuada (Ramos et al., 2008). La dieta tradicional está siendo reemplazada por una dieta óptima, que contempla la posibilidad de que algunos alimentos mejoren la salud de la población y reduzcan el riesgo de desarrollar determinadas enfermedades (Ramos et al., 2008). En este sentido, los alimentos funcionales juegan un papel destacado. La creciente demanda de este tipo de alimentos se explica por el aumento del costo de la asistencia sanitaria, el aumento constante de la esperanza de vida, y la mejora de la calidad de vida de las personas mayores (Siró et al., 2008). Los consumidores cada vez más están interesados en su alimentación, creen que estos contribuyen directamente a su salud, aumentando así la demanda de información sobre los Alimentos Funcionales (Ramos et al., 2008). Un alimento funcional se podría definir como aquel que, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un beneficio adicional para la salud. Así sucede por ejemplo con las frutas y verduras, cuyos flavonoides neutralizan los radicales libres de oxidación (Ramos et al., 2008; Siró et al., 2008).

Los alimentos funcionales representan una de las áreas más interesantes de la investigación y la innovación en la industria alimentaria (Annunziata y Vecchio, 2011; Siró et al., 2008), los cuales incluyen: (1) los alimentos habituales con sustancias bioactivas de origen natural (por ejemplo, la fibra dietaria), (2) los alimentos suplementadas con sustancias bioactivas (por ejemplo, probióticos, antioxidantes) y (3) los ingredientes alimentarios derivados introducidos a los alimentos convencionales (por ejemplo, prebióticos) (Al-Sheraji et al., 2013).

Los antioxidantes se han introducido dentro de los alimentos funcionales, debido a la creciente evidencia de que las dietas ricas en fenoles y polifenoles pueden tener beneficios potenciales para la salud de los consumidores. Es así que la industria de suplementos nutricionales y alimentarios han desarrollado numerosos productos fortificados con compuestos fenólicos (Dziki et al., 2015). Un antioxidante se puede definir como la sustancia que es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato. El tipo de sustratos susceptibles incluyen prácticamente la totalidad de los alimentos y a nivel tisular estructuras como las proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ADN (Murcia et al., 2003).

Los antioxidantes naturales son más potentes, eficaces y seguros que los sintéticos. De acuerdo al sistema de defensa contra el daño oxidativo se clasifican; primero, como antioxidantes preventivos (suprimen la formación de radicales libres), segundo, como antioxidantes captadores de radicales (captan radicales inhibiendo la cadena de iniciación y rompiendo la cadena de propagación) los principales representantes son las vitaminas. También están dentro de este grupo los compuestos polifenólicos. Finalmente el tercer grupo encontramos enzimas de reparación del DNA. Por último existe otro mecanismo de defensa, por el cual, los antioxidantes apropiados en cada situación son producidos y transferidos al lugar correcto, en el momento correcto y en la cantidad correcta. (Pokorny et al., 2001, Smirnoff, 2005, Heim et al., 2002).

Estudios epidemiológicos han mostrado que la ingesta diaria de alimentos ricos en antioxidantes naturales se correlaciona bien con una reducción del riesgo de padecer enfermedades coronarias. En particular se ha observado una correlación negativa entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles y enfermedades cardiovasculares. Esta correlación se explica en parte sobre la base de que los polifenoles interrumpen la peroxidación lipídica inducida por las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS). También, el consumo con la dieta de polifenoles se asocia a un menor riesgo de padecer enfermedades degenerativas. El consumo adecuado de alimentos biológicamente activos ejerce efectos anticancerosos, por

lo que, se recomienda el consumo de cinco porciones de 80 g de frutas y vegetales. También se recomienda consumir legumbres y productos harinosos sometidos a un procesado mínimo (Pokorny et al., 2001). Las células de los animales y las plantas se autoprotegen contra los daños oxidativos provocados por las especies de oxígeno reactivas. Muchos de los sistemas defensivos del cuerpo humano son dependientes de los antioxidantes que se derivan de la dieta. (Pokorny et al., 2001, Rice-Evans et al., 1997). A continuación se describen los principales antioxidantes naturales:

Vitamina C: está presente en las frutas, verduras y algunos tubérculos en forma de ácido L-ascórbico y ácido dehidroascórbico. También, se encuentra en los alimentos procesados a los que se han añadido sustancia antioxidante. El ascorbato es probablemente el antioxidante hidrosoluble más efectivo presente en el plasma que ejerce un papel protector contra el daño oxidativo de los constituyentes celulares y las lipoproteínas circulantes. Las pruebas epidemiológicas son consistentes con un efecto protector de la vitamina C contra el cáncer de estómago, faringe y esófago. La mayor parte del ascorbato de la dieta humana deriva de fuentes naturales y el consumidor que toma cinco raciones, o aproximadamente 400-500 g de frutas y verduras por día, se obtiene hasta 200 mg de ascorbato (Pokorny et al., 2001, Smirnoff, 2005, Du et al., 2012). En esta tesis se ha usado el ácido ascórbico como patrón antioxidante para la predicción de la capacidad antioxidante de frutas mediante la técnica de lengua electrónica voltamétrica.

Vitamina E (α -tocoferol): es el principal antioxidante liposoluble. Aislada en primer lugar del aceite de germen de trigo y obtenida principalmente a partir de frutos secos, aceite de semilla y cereales. Los tocoferoles y los tocotrioles son el grupo de sustancias antioxidantes mejor conocidas y más ampliamente utilizadas. Cada uno de estas dos familias está formada por cuatro isómeros (α - β - γ - y δ -) formando un total de ocho isómeros del tocoferol. El representante principal de este grupo es el α -tocoferol que tiene una capacidad antioxidante más baja en aceites comestibles que el resto de moléculas del grupo. Los tocoferoles actúan como antioxidante donando un

hidrógeno del grupo hidroxilo la radical peroxilo (Pokorny et al., 2001, Smirnoff, 2005, Jiang, 2014). En esta tesis se ha usado el trolox que es un análogo hidrosoluble del α -tocoferol como patrón de referencia para predecir la capacidad antioxidantes de frutas y plantas.

Compuestos fenólicos: existen una enorme variedad de compuestos fenólicos con actividad biológica, que contienen uno o más anillos aromáticos y que son constituyentes naturales de los alimentos vegetales y proporcionan, en gran medida, el flavor, color y textura de estos alimentos. La ingesta diaria de sustancias fenólicas puede llegar a ser de 1 g por día, pero la cantidad de flavonoides de la dieta probablemente no supone más de unas pocas docenas de miligramos por día. Los grupos principales de compuestos fenólicos son los tocoferoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos (Pokorny et al., 2001, Rice-Evans et al., 1997, Heim et al., 2002).

Flavonoides: son un grupo de sustancias fenólicas de origen vegetal que se caracteriza por poseer un esqueleto carbonado del tipo C6-C3-C6. La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres átomos de carbono que, habitualmente, ha sido condensada para formar un pirano, o menos frecuente un furano. Estas sustancias se encuentran en todos los tejidos de las plantas superiores e incluyen las flavonas, los flavonoles, las isoflavonas, las flavononas y las chalconas. Las flavonas y los flavonoles se encuentran en prácticamente cualquier tipo de planta, especialmente en hojas y pétalos, siendo las flavonas las más habituales. Algunos ejemplos de compuestos flavonoides son la epigenina, crisina, luteolina, datiscetina, quercetina, miricetina, morina y kaempferol. En general, hay tres grupos estructurales que determinan la potencia antioxidante y/o absorbidora de radicales libres de los flavonoides: una estructura catecol en el anillo B, los dobles enlaces 2,3 en conjugación con una función 4-oxo de un grupo carbonilo en el anillo C y la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5. La quercetina posee estos tres grupos estructurales y, por tanto, una actividad antioxidante más potente que el kaempferol, que no posee grupo catecol en el anillo B. En la figura 1 representa la

estructura química de los principales flavonoides (Pokorny et al., 2001, Rice-Evans et al., 1997, Heim et al., 2002).

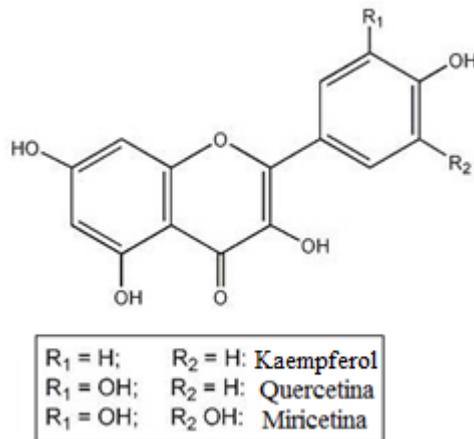


FIGURA 1. Estructura química de los principales flavonoides.

Los ácidos fenólicos: tales como el *p*-hidroxibenzoico, 3,4-dinidroxibenzoico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sináptico, clorogénico y rosmarínico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Habitualmente se encuentran en forma de ésteres de ácidos orgánicos o glucósidos. Los derivados del ácido cinámico son antioxidantes más activos que los derivados del ácido benzoico. La posición de los grupos hidroxilo y el grado de hidroxilación determina en gran medida la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos. Los monofenoles son menos eficientes que los polifenoles. La introducción de un segundo grupo hidroxilo en posición *orto* o *para* incrementa la actividad antioxidante. La combinación de dos ácidos fenólicos incrementa su eficacia. Los monofenoles y los ácidos fenólicos participan en reacciones de donación de hidrógeno y de captación de radicales (Pokorny et al., 2001, Rice-Evans et al., 1997, Heleno et al., 2015).

Dentro de los trihidroxibenzoicos, con tres grupos hidroxilo proporciona una protección añadida, se encuentra el ácido gálico,

también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (Pokorny et al., 2001, Heleno et al., 2015). Es un antioxidante común e importante que ha sido reportado en diversas plantas como la corteza de roble, hojas de té verde, cáscaras de manzana, uvas y se utiliza en formulaciones polihierbal como las nueces de agallas, zumaque y vino. El ácido gálico tiene dos formas: los ácidos gálicos metilados o los conjugados galoil derivados de catequina (Pokorny et al., 2001, Zanwar et al., 2014, Heleno et al., 2015). En esta tesis se ha utilizado el ácido gálico y la catequina como patrones antioxidantes para predecir la capacidad antioxidante.

1.1. Perú como fuente de alimentos funcionales

Los productos naturales han tenido gran aceptación por la población en general por su utilización en la curación y prevención de enfermedades. En este sentido, las plantas medicinales responden en gran medida a esta necesidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 70 y el 80% de la población mundial refiere haber utilizado plantas medicinales. Una explicación podría estar relacionada con la amplia divulgación por diferentes medios de comunicación de las plantas medicinales y a la accesibilidad de tales productos en supermercados y farmacias (Díaz et al., 2008).

La región de América Latina y el Caribe son “ricos” en recursos naturales y una fuente de materias primas beneficiosas para la salud, lo que hace de ella una mina de oro de alimentos funcionales. Albergan un gran número de plantas poco explotadas y en gran medida desconocidas. Perú, país de América del Sur, es reconocido como uno de los 12 países del planeta (Brack, 1999) que pertenece al grupo de naciones que reúnen un 70% de la biodiversidad mundial. La región amazónica es un importante centro de origen y diversificación de especies frutales, que producen excelentes frutas de características únicas en sabor y aroma. Algunos de ellos tienen en la actualidad importancia mundial y se cultivan en casi todas las zonas tropicales del mundo, sin embargo, la mayor parte de estos frutales son

conocidos y consumidos a nivel local, y son prácticamente desconocidos fuera de la región.

La región Andina del Perú posee unas condiciones climatológicas y geográficas únicas (p. ej., altitud de 500 a 5000 msnm, temperaturas medias diurnas de 23 °C y medias nocturnas de -6 °C, una media de precipitaciones de 752 mm/año y zonas con altos índices de radiación solar). Por tanto, un gran número de especies y variedades vegetales son probablemente endémicas y con propiedades funcionales (Brack, 1999). A lo largo de los siglos, la población indígena de la región andina del Perú ha consumido una gran diversidad de raíces, tubérculos, frutas, semillas, granos, hierbas, entre otras tradicionales que al parecer presentaban propiedades medicinales y/o nutricionales (NRC, 1989). Estas propiedades pueden ser directamente vinculadas con el contenido y el tipo de fitoquímicos presentes en estos alimentos. Cabe decir que el uso tradicional de las plantas por la población nativa ha garantizado la conservación de muchas especies.

Mientras que se han publicado una amplia lista de estudios sobre las propiedades antioxidantes y compuestos fenólicos de especias (Shan *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2011), hierbas (Krishnaiah *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2007), frutas (Vasco *et al.*, 2008; Konczak y Roulle, 2011) y hortalizas (Isabelle *et al.*, 2010, Halvorsen y Blomhoff, 2011) de las diferentes regiones del mundo, la región andina de alguna manera no ha recibido tanta atención y los estudios que sí se centraron en la región, son muy limitados. (Chirinos *et al.*, 2013, Baldeón *et al.*, 2015)

Así, parece interesante poder evaluar la capacidad antioxidante de algunos de las principales variedades de frutas y plantas del área amazónica y andina del Perú. Es por ello que en la presente tesis se han estudiado frutas como; aguaymanto (*Physalis peruviana*), camu camu (*Myrciaria dubia*) y tumbo (*Passiflora mollissima*, H.B.K., Bailey), frutas ricas en vitamina C y componentes antioxidantes, y plantas medicinales andinas como inca muña (*Clinopodium bolivianum*), aliso (*Alnus acuminata*), chinchilcoma (*Mutisia acuminata*) y pachasalvia (*Lepechinia meyenii* (Walp)), plantas con compuestos fenólicos que son uno de los responsables de las propiedades medicinales de estas plantas.

1.1.1. Aguaymanto (*Physalis peruviana*)

Physalis peruviana (figura 2) es una planta perenne, que puede alcanzar 45-90 cm de alto, con un tallo erecto poco ramificado, cilíndrico y densamente pubescente. La raíz principal alcanza entre 50 y 80 cm de profundidad. Sus raíces son fibrosas y se desarrollan a una profundidad de 10-15 cm. Tiene el pecíolo de 2-6 cm de largo, la lámina foliar es anchamente obovada, 6-13.5 cm largo y 3.5-10 cm de ancho. Las hojas son alternas, densamente pubescentes, enteras o con pocos dientes inconspicuos, y cortamente apiculadas. El pedúnculo floral es de 10-13 mm de largo; el cáliz es anchamente campanulado, en floración 15-18 mm de largo y pubescente en la cara exterior, en fructificación es acrescente, de color verde a beige, ovoide, con 5-10 nervios sobresalientes y algo rojizos, 8-10 mm de largo y 3 mm de ancho. Las flores se disponen verticalmente erectas o algo inclinadas. La corola es amarilla, con cinco máculas púrpuras, en la garganta de tubo de la corola, 1-1.8 cm de largo y 1.2-2 cm de ancho, con un anillo denso de tricomas debajo de las máculas. Los filamentos y anteras son azul-púrpuras y las anteras de 2.5-3 mm de largo. El ovario es verde con un anillo en la base, estilo púrpura con estigma claviforme. Las bayas maduras son amarillas-anaranjadas, de 1-2 cm de longitud y 1-1.5 cm de diámetro y pesan 4-10 g. Los frutos contienen entre 100-200 semillas amarillas (Dostert et al., 2012).

El aguaymanto (*Physalis peruviana*) contiene entre otros nutrientes compuestos bioactivos como el ácido ascórbico, β -caroteno (provitamina A) compuestos fenólicos, entre otras vitaminas que podría proporcionar un efecto fisiológico en la salud, en el funcionamiento del organismo o en el bienestar, mayor que el proporcionado por los nutrientes sencillos que contiene, dado que se conoce que existe un efecto sinérgico entre los compuestos que presenta un alimento con estas características (Encina et al., 2012). Estudios demuestran que el estado de madurez del aguaymanto, conocido como uchuva, influye directamente en el contenido carotenoides y compuestos fenólicos. La presencia de compuestos bioactivos en mayor cantidad en el fruto produce mayor capacidad antioxidante, por lo cual esta propiedad se incrementa también con la

maduración del fruto (Mier y Cáez, 2011). El aguaymanto tiene características fisicoquímicas de pH de 3.7, sólidos solubles entre 13 a 15 ° brix y acidez un porcentaje entre 1.6 y 2%, y contenido de potasio de 292.65 mg/100 g de pulpa. A medida que madura la fruta disminuye el pH y los grados brix, mientras que el porcentaje de acidez aumenta (Puente et al., 2011).

En la tabla 1 se muestra la cantidad de antioxidante del aguaymanto.

TABLA 1. Cantidad de antioxidantes del aguaymanto (*Physalis peruviana* L.).

Componente	Cantidad
Ácido ascórbico (mg/ 100g)	28.55 ^a
Carotenos totales (mg β-caroteno/100 g)	1.77 ^a
Compuesto fenoles totales (mg Equiv. Ácido gálico/ 100 g)	154 ^b
Capacidad antioxidante hidrofílica por ABTS (ug Equiv. Trolox/g)	288.95 ^a

Referencia: (a) Encina et al., 2012 y (b) Repo y Encina (2008)



FIGURA 2. Aguaymanto del Perú (*Physalis peruviana*).

1.1.2. Camu Camu (*Myrciaria dubia*)

El Camu Camu (*Myrciaria dubia*) (figura 3), es un arbusto hasta de 8 m de altura, bastante ramificado desde la base. Esta, tiene forma cónica alcanzando una profundidad de hasta 50 cm de la superficie, con numerosas raíces. Los tallos tienen diámetros de hasta 15 cm, corteza lisa y color marrón. La estructura de la copa varía desde estrechas o columnares hasta anchas o coposas. Sus hojas son simples, opuestas, ovadas, elíptica o lanceoladas con una lámina de 5.6-11 cm de longitud y 1.8-5 cm de ancho, con ápice acuminado, base redondeada y margen entera a ondulada; la venación es reticulada, con la vena media plana por el haz y poco prominente por el envés y con 8-24 pares de venas secundarias. Las inflorescencias son fascículos, axilares y caulinares, con 3-6 flores por axila. Las flores son subsésiles, hermafroditas, de 1-1.2 cm de diámetro con cuatro pétalos libres y blancos; los estilos de 8-9.2 mm de longitud y aproximadamente 125 estambres. Los frutos son bayas con forma de globo, de superficie lisa, rojas en su maduración llegando incluso a negras, que presentan un diámetro de 2.4-2.6 cm y tienen un promedio de peso de 6,9 g. Las semillas son reniformes, ocurriendo de 1 a 4 semillas, aunque normalmente dos por fruto (Peters y Vásquez, 1986,

Villachica, 1996; Pinedo et al., 2001, Castro, 2009, Dostert et al., 2009).

El camu-camu como la mayoría de las frutas tiene un alto contenido de agua (94.1%) y con características fisicoquímicas de pH 2.44, acidez total de 2.86% y solidos solubles de 6.4 ° brix, y un contenido de potasio de 838.8 mg/kg. Las frutas de camu-camu (*Myrciaria dubia*) son prometedoras fuentes de diversos compuestos bioactivos tales como la vitamina C, compuestos fenólicos y carotenoides. Frutas camu-camu también son buenas fuentes de potasio, hierro, calcio, fósforo y varias clases de aminoácidos, tales como serina, valina y leucina. Por lo tanto, la presencia de diferentes compuestos bioactivos en frutas camu-camu podría ser utilizado para retardar o prevenir diversas enfermedades como las cardiovasculares y el cáncer (Akter et al., 2011). La vitamina C de las frutas del camu-camu depende de los estados de madurez (Chirinos et al., 2010).

En la tabla 2 se muestra la cantidad de antioxidante presentes en el camu-camu.

TABLA 2. Cantidad de antioxidante del camu camu (*Myrciaria dubia*).

Componente	Cantidad
Ácido ascórbico (mg/ 100 g peso fresco)	2010
Compuestos fenoles totales (mg Equiv. Ácido gálico/ 100 g peso fresco)	1320
Capacidad antioxidante por DPPH (μ mol Equiv. Trolox/g peso fresco)	167

Referencia: Chirinos et al. (2010)



FIGURA 3. Camu camu Amazónico (*Myrciaria dubia*).

1.1.3. Tumbo (*Passiflora mollissima*, H.B.K., Bailey)

El tumbo (*Passiflora mollissima*, H.B.K., Bailey) (figura 4) es originario de los valles interandinos y de la zona quechua, y se encuentra en todos los Andes del Perú. Llamado anteriormente poro, poseía un lugar privilegiado entre las frutas de los incas. También, se le puede hallar en otros países de América; aunque es conocido con otras denominaciones, como “curuba” en Colombia, “parcha” en Venezuela, “granadilla cimarrona” en México y “taxo” en Ecuador. El tumbo es una planta de zonas altas y frías; se desarrolla bien entre los 2000 a 3000 msnm, y se adapta al clima monzónico, con temporadas alternantes y secas. Generalmente se consume en estado natural; pero como posee buenas características de agradable aroma y sabor acidulado, las que son algo termosensibles, también se puede consumir en forma de jugos concentrados, jaleas, néctares, mermeladas y diversos postres (Encina y Carpio, 2011).

Compuestos fenólicos y otras vitaminas presentes en el tumbo podrían proporcionar un beneficioso en el funcionamiento del organismo y el bienestar de la salud, mayor que el brindado por otros nutrientes más sencillos que contiene, dado que existe un efecto sinérgico entre los compuestos que presenta un alimento con estas características, pues le confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un

elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Encina y Carpio, 2011).

El tumbo tiene un alto contenido de agua (87.32%) y los parámetros fisicoquímica indican que es una fruta de pH 3.28, sólidos solubles de 12 ° brix y acidez total de 4.1 g de ác. cítrico/100 ml (Encina y Carpio, 2011). En la tabla 3 se muestra la cantidad de antioxidante que tiene el tumbo.

TABLA 3. Cantidad de antioxidante del Tumbo (*Passiflora mollisima*, H.B.K., Bailey)

Componente	Cantidad
Ácido ascórbico (mg/ 100g)	61.8 ^a
Carotenos totales (mg β-caroteno/100 g)	1.83 ^a
Compuestos fenoles totales (mg Equiv. Ácido gálico/ g peso seco)	15.4 ^b
Capacidad antioxidante hidrofílica por ABTS (µg Equiv. Trolox/g)	578.59 ^a
(umol TE/g peso seco)	299.8 ^b

Referencias: (a) Encina y Carpio, 2011 y (b) Chirinos et al., 2013.



FIGURA 4. Tumbo (*Passiflora mollisima*, H.B.K., Bailey).

A modo de resumen en la tabla 4 se presentan los principales componentes antioxidantes y compuestos activos de las frutas: aguaymanto, camu camu y tumbo reportadas por la literatura, siendo el camu camu el que ha sido estudiado con más interés por los diferentes autores.

TABLA 4. Principales componentes antioxidantes y compuestos activos de frutas amazónicas y andinas del Perú.

Fruta	Componente antioxidante y otros	Referencia
Aguaymanto (<i>Physalis peruviana</i>)	Fitoesteroles: Campesterol β-sitosterol Estigmasterol Polifenoles Vitaminas A y C	Puente et al., 2011
Camu camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	Ácido ascórbico Familias de los fenólicos: Flavan-3-oles (catequina y sus derivados) Derivados de ácido elálgico Antocianinas Flavonoles y flavanonas.	Chirinos et al., 2010
Tumbo (<i>Passiflora mollisima</i> , H.B.K., Bailey)	Ácido ascórbico β-caroteno Componentes volátiles: Linalool Acetato de hexilo 1,8 cineol Acetato de butilo	Encina y Carpio (2011) y Conde-Martínez (2014).

1.1.4. Inca muña (*Clinopodium bolivianum*)

Las plantas aromáticas son fuentes de diversos antioxidantes naturales. El uso de especias y hierbas como antioxidantes naturales en alimentos procesados es una alternativa prometedora para prevenir

la formación de productos de oxidación indeseables. En la búsqueda de posibles fuentes de antioxidantes naturales, una de estas plantas es la inca muña (figura 5) que pertenece a la familia Lamiaceae (Chirinos et al., 2011). Existen de diferentes especies de inca muña como *Clinopodium bolivianum* y *Satureja brevicalyx* Epling y es conocido en diferentes nombres vulgares: "inca muña", "urqu muña", "wayra muña", "sacha muña", "salqa muña" "cjunumuña", "cjuña", "konoc", "khoa" y "orégano de los incas" (Carhuapoma, 2007, Chirinos et al., 2011, Arias-Rodríguez et al., 2012 y Hatami et al., 2011)

La inca muña es de porte arbustiva perennifolio, erguido de 1.0-1.5 m de altura, aromática y pubescente. Hojas muy pequeñas, espatuladas, sésiles, verticiladas y opuestas, de margen entero. Flores blancas, solitarias, axilares, tetrámeras, bilabiadas; cáliz gamosépalo; corola gamopétala; androceo con estambres didínamos; gineceo con ovario súpero, estilo apical y estigma simple. Florece en primavera y verano (Carhuapoma, 2007). Esta planta crece en la región central y sur andino del Perú y también en los países andinos de Bolivia y Argentina. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas (Brack, 1999, Hatami et al, 2011 y Carhuapoma, 2007).

La inca muña es usado por mucho tiempo en la medicina tradicional se le atribuye propiedades curativas y de prevención como resolver problemas gastrointestinales. Es digestivo, carminativo, contra la gastritis, flatulencia y antiespasmódica. También es usado como analgésico soasando las hojas en caso de dolores musculares y tortícolis. También es usado en el tratamiento de enfermedades respiratorios y propiedades antimicrobiano (Carhuapoma, 2007, Hatami et al, 2011 Chirinos et al. 2011). Las sustancias químicas identificadas que caracterizan su actividad biológica son principalmente sustancias de naturaleza fenólica; participan en los procesos que forman parte de los mecanismos antioxidantes, lo que podría contribuir a disminuir el desbalance oxidativo y de esa manera disminuir el daño neurológico que se presenta en las diversas situaciones de estrés (Arias-Rodríguez, 2012).

Flores y hojas de Inca muña han sido utilizados como condimentos en carnes, sopas y guisos (Brack, 1999, Hatami et al, 2011). Por su alto contenido de antioxidantes se ha investigado como antioxidante añadido para evitar la oxidación del aceite de soja sin refinar durante la fritura (Chirinos et al. 2011). Además de las propiedades curativas se le atribuye propiedades insecticidas, para ello se utilizan las raíces y hojas (Yapuchura, 2010).



FIGURA 5. La planta Inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) (Yapuchura, 2010).

1.1.5. Aliso (*Alnus acuminata* Kunth)

El *Alnus acuminata* HBK (figura 6) es una especie de crecimiento rápido cuyas dimensiones promedio a los 30 años de edad en condiciones naturales son 30 m de altura y 50 cm de diámetro. El *A. acuminata* es de la familia Betulaceae, es conocido con distintos nombres vulgares: aliso (Perú), ilite (México), palo de lama (Guatemala), jaúl (Costa Rica) y cerezo (Colombia); esta especie se encuentra desde México hasta el norte de Argentina: México, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Perú y Argentina. El *A. acuminata* H.B.K. es una especie heliófita y pionera de crecimiento

rápido, que regenera en zonas abiertas. Tolera un amplio rango de climas y de tipos de suelo, más no suelos salinos. Su principal factor limitante es la humedad, tanto del suelo como del ambiente. Posee adecuadas condiciones de crecimiento a 1200-3000 msnm, con una temperatura media anual de 14-20 ° C y con una precipitación pluvial de 2000-5000 mm al año, teniendo una estación seca de 0-3 meses. Las hojas son simples, alternas, dispuesta en espiral, de 6-15 cm de largo y de borde cerrado. Los adultos pierden algunas o todas las hojas durante la estación seca. Pueden florecer desde los 4-5 años, pero normalmente lo hace a los 8-10 años. Las flores masculinas y femeninas aparecen en amentos diferentes en la misma rama (López, 2006)

Las hojas y corteza aliso (*Alnus acuminata*) son usadas contra la inflamación de las vías urinarias y el reumatismo. Se recomienda tomar de dos o tres tazas al día el extracto de las hojas y corteza junto con la carhuascasa (*Berberis lutea* Ruiz & Pav). La resina de las hojas es usada externamente como cataplasma (De la Cruz et al. 2007, Gonzales et al., 2014).



FIGURA 6: Las hojas de aliso (*Alnus acuminata* Kunth HBK).

1.1.6. Chinchilcoma (*Mutisia acuminata*)

La *Mutisia acuminata* (figura 7) es una planta de 80-120 cm de alto. Las ramas son prismáticas con ángulos de 5-6 y muchos codos, glabras en las partes maduras y apenas pubescentes en las partes jóvenes. Las hojas pinnaticompuestas con zarcillos terminales, raquis lineales, con hojuelas elípticas y lanceoladas, semi opuestas, con bordes enteros, subagudo en el ápice y atenuado en la base, pubescentes en el envés. Las inflorescencias en cabezuelas terminales, con pedúnculos largos, brácteas floreales glabras, siendo el externo gradualmente menos ovalada, subagudo en el ápice y de flores amarillas dimórficos, estas puede ser de color rojas y naranjas. Las partes de la planta usadas son tallos, hojas y flores. La *Mutisia acuminata* es cultivada desde los andes hasta suroeste de Brasil, y de uso tradicional en los países de Perú, Argentina y Chile. Tiene diferentes nombres comunes: *Chinchircoma*, *chinchilcoma*, *chinchilcuma*, *chinchircuma*, *chincumpa*, *checchecta*, *chinchimani*, *chinchimaqui*, *cinchis*, *huarirumo*, *inquilsisaj*, *llumlla*, *mancopaqui*, *tinterma*, *tiltilma* (FDA, 2000).

Las hojas de la *Mutisia acuminata* son usadas en la medicina tradicional contra el proceso inflamatorio, enfermedades respiratorios, patógenos humanos y como antiséptico. Las hojas jóvenes preparadas como ungüentos son usadas en forma externa para la curación de heridas. Se recomienda tomar el zumo de hojas machacadas para desinflamar el hígado y en el tratamiento de úlceras gástricas. También, es usada como pesticida natural (Chirinos et al., 2013, Hammond et al., 1998, Villegas et al., 1997, Catalano et al., 1998, Vignale y Gurni, 1999).



FIGURA 7. La planta chinchilcoma (*Mutisia acuminata*).

1.1.7. Pachasalvia (*Lepechinia meyenii* (Walp))

Lepechinia Willd., (figura 8), es un género diverso en la familia de la menta (Lamiaceae), existen aproximadamente 43 especies que crecen desde el norte de California (al oeste de los Estados Unidos) hasta Argentina central. La *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling (Lamiaceae) es conocido localmente como "pacha salvia" o "puna salvia", es una hierba perenne estolonífero que crece en las zonas altas de Perú, Bolivia y Argentina (Drew y Sytsma, 2013, Vila et al., 2009).

Lepechinia spp., presentan notable floral, morfológico, sistema de clase y hábitat diversa. El tamaño floral (2-40 mm) y la longitud de las hojas (2.5-25 cm) pueden variar por una orden de magnitud, y hay un amplio rango de colores florales, incluyendo azul, rosa, púrpura, rojo y blanco. En asociación con la enorme gama de características florales en el género, *Lepechinia* spp., son visitados por grupos diversos polinizadores. Las especies de América del Sur exhiben raras diversidades de clases como ginodioecia, dioecia y harmafroditismo. En términos de hábitat, *Lepechinia* spp., de América del sur alcanzan desde hierbas perennes hasta pequeños árboles. Muchas especies de *Lepechinia* en América del Sur son encontradas en altitudes que van desde 1500 hasta 4000 m pero dentro de este rango de altitud, los

géneros ocupan un rango bastante amplio de hábitats (Drew y Sytsma, 2013).

Diversos *Lepechinia* spp., son valoradas en el comercio hortícola y por los pueblos indígenas de América del Norte y Sur suelen utilizar *Lepechinia* con fines medicinales y antisépticas. El componente químico que da un olor distintivo a la *Lepechina* puede ser responsable de sus propiedades medicinales y de limpieza. Se recomienda preparar en forma de infusión, 10-20 g de la planta por litro de agua, tomar la mitad de una taza diariamente, además tiene propiedades digestiva y carminativa. En las comunidades andinas del Sur de Perú (Ayacucho), la *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling es usada para tratar enfermedades respiratorias e infecciones bacterianas. También, se utiliza como tintes naturales para el teñido fibra de vicuña y otras fibras. Extractos etanólicos de las partes aéreas de *L. meyenii* han mostrado actividades antimicrobianas y antioxidantes (Drew y Sytsma, 2013, De la Cruz et al., 2007, Vila et al., 2009).



FIGURA 8. La planta pachasalvia (*Lepechinia meyenii* (Walp)).

En la tabla 5 se muestran los principales componentes antioxidantes y compuestos activos de las plantas inca muña, chinchilcoma y pachasalvia encontrados en la literatura, siendo las dos primeras plantas las que más estudios de componentes fenólicos tienen. Además, en las plantas inca muña y pachasalvia se han identificado componentes volátiles responsables del aroma característico de estas plantas.

TABLA 5. Principales componentes antioxidantes y compuestos activos de plantas andinas del Perú.

Planta	Componente antioxidante y otros	Referencia
Inca muña	Compuestos fenólicos: Los derivados de ácidos hidroxicinámicos: Cafeico, ρ -cumárico, Flavanonas (eriodictiol), Flavonoles (rutina), El derivado de eriodictiol. Resinas Azúcares reductores Lactonas Componentes volátiles Eesteroides Soponinas Taninos	Yapuchura, 2010, Chirinos et al., 2011, Lizarraga y Abdala 2004, Carhuapoma, 2007.
Chinchilcoma	Compuestos flavonoides: Quercetina, Quercetina-3-glucurónido, Isorhamnetina-3-glucurónido, Pelargonidina diglucósido Arbutina β -amirina Pseudo taraxasterol Lupeol	Catalano et al., 1998, Juárez y Mendiondo, 2003.
Pachasalvia	Monoterpenos (hidrocarburos y oxigenados): Limoneno, Acetato de trans-pinocarveol, β -pineno Componentes principales volátiles: Sesquiterpenos, Guaiol, Bulnesol Diterpenos abietano: Pisiferol, Rosmanol, Ácido carnósico, Salvicanol Diterpenoides: Isosalvicanol, Derivado de 12-formil-abietano	Vila et al., 2009, Bruno et al., 1991

Las plantas descritas en esta tesis, de gran uso en la medicina tradicional, poseen componentes activos importantes en el tratamiento

de enfermedades, siendo los componentes antioxidantes y fenólicos los principales principios activos de estas plantas. Es el conjunto de los diferentes compuestos antioxidantes presentes en las plantas los que le confieren su carácter antioxidante, el cual es expresado como capacidad antioxidante. En la tabla 6 se muestra la capacidad antioxidante de las plantas mencionadas.

TABLA 6. Capacidad antioxidante de plantas andinas del Perú (Chirinos et al., 2011).

Nombre común	Compuesto fenólico total (mg/GAE g b.s)	Capacidad antioxidante ABTS (μmol TE/g b.s.)
Inca muña	56.8	645.1
Aliso	72.3	1045.3
Chinchilcoma	59.4	656.5
Pachasalvia	61.2	510.8

GAE, equivalentes de ácido gálico. TE, equivalentes trolox. b.s., peso seco

1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de frutas y plantas

Las plantas y frutas son fuentes muy importantes de compuestos antioxidantes tales como polifenoles, flavonoides, isoflavonas, antocianinas y vitaminas. El efecto antioxidante de estos compuestos está relacionado con su estructura química y su capacidad de atrapar electrones.

Existen varios métodos para determinar capacidad antioxidante, sin embargo, no existe un método que proporcione un información completa de la capacidad antioxidante de un solo antioxidante o mezcla de antioxidantes debido a la existencia de muchas variables hacen que mediciones sean diferentes y que un evaluación comparativa de la capacidad antioxidante es difícil de realizar debido a que la actividad depende del sustrato, del medio de reacción, de las

condiciones de oxidación, de los fenómenos interfaciales y otros (Litescu et al., 2010).

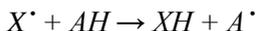
Los métodos son clasificados en dos categorías, dependiendo del tipo de evaluación realizada. La primera categoría es una “evaluación de la capacidad antioxidante en relación a las especies radicales libres”. En esta categoría se incluye diferentes modelos de mecanismo de reacción tales como: reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno, reacciones de transferencia de electrones simples y reacciones que combina las dos anteriores (Litescu et al., 2010).

La segunda categoría es una “evaluación de la capacidad antioxidante usando marcadores biológicos significativos”. Esta categoría se incluye la determinación de la capacidad antioxidante a través de la evolución de los efectos que demandan sobre un sustrato biológico producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) o relacionada a las especies óxido de nitrógeno (RNOS) al reaccionar con lípidos, lipoproteínas, DNA, etc (Litescu et al., 2010).

1.2.1. Reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno

El control de la ruta de reacción, es muy difícil distinguir entre el átomo de hidrógeno y las reacciones de transferencia de electrones. Las dos reacciones pueden tener lugar al mismo tiempo y el mecanismo de la reacción se determina por la estructura de los antioxidantes, la solubilidad, el coeficiente de reparto y la polaridad del disolvente (Litescu et al., 2010).

Las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno también dependen del pH del medio. Estas reacciones son muy rápidas y generalmente ocurren a través de la intermediación de los radicales peroxilo. La reacción de transferencia de átomo de hidrógeno se puede representar como sigue (Litescu et al., 2010):



X^{\bullet} - Radical libre; AH - cualquier supuesto compuesto antioxidante capaz de actuar como donador de átomos de hidrógeno.

Entre los métodos de reacción de transferencia de átomo de hidrógeno tenemos: TRAP, ORAC y el ensayo de blanqueamiento de Crocina.

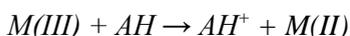
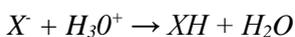
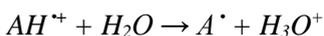
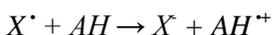
El ensayo “*parámetro antioxidante total de captura de radicales (TRAP)*” es uno de los primeros métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante total del plasma sanguíneo. Las especies involucradas en un ensayo TRAP son los radicales peroxilo generados a partir de la termólisis de 2, 2'-azo-bis (2-amidinopropano) (AAPH) y los materiales peroxidables contenidas en el plasma u otros fluidos biológicos. La AAPH se añade a un plasma en el cual los componentes oxidables se controlan a través del consumo de oxígeno en la superficie de un electrodo de oxígeno. La inhibición de la oxidación por la presencia de especies antioxidante es el principio de medición del método. El intervalo de tiempo de la inducción de reacción (fase de latencia) se compara con el intervalo de tiempo generado por el compuesto de referencia Trolox (Litescu et al., 2010).

El ensayo de “*Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)*” se basa en la evaluación del efecto de presuntos antioxidantes mediante la medición de extinción de la fluorescencia. El ensayo ORAC se basa en la producción de radicales libres peroxilo generados a través de un compuesto azo, 2,2, -azobis (2-metilpropionamidina) (AAPH). El radical peroxilo es capaz de reaccionar con el sustrato oxidable/sonda fluorescente, por lo que dará lugar el cambio de la intensidad de fluorescencia y en general el aumento de la tasa de decaimiento de fluorescencia. En presencia de un compuesto antioxidante (mezcla de antioxidantes) la disminución de la fluorescencia se inhibe. El resultado se obtiene calculando el área bajo la curva de fluorescencia, y se expresa como equivalentes de micromoles de Trolox (Litescu et al., 2014, Prior y Cao, 1999, Haytowitz y Bhagwat, 2010).

El ensayo de “*blanqueamiento de crocina (CBA)*” se basa en las reacciones competitivas, entre crocina y antioxidantes, por los radicales peroxilo, ROO^\cdot , que se derivan de la descomposición térmica del iniciador azo soluble en agua 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) (Bountagkidou et al., 2012, Prior y Cao, 1999).

1.2.2. Reacciones de transferencia de electrones simples

Los ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones simples se utilizan para evaluar la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante específico. Estos ensayos suelen ser lentos requieren un largo período y son procesos de varios pasos que se pueden representar esquemáticamente del siguiente modo (Litescu et al., 2010):



X^\cdot - Radical libre; AH - cualquier supuesto antioxidante capaz de transportar un electrón; M - un 3d metal capaz de iniciar una reacción en cadena.

Entre los métodos de reacción de transferencia de electrones simple tenemos: ABTS, DPPH y FRAP.

Método ABTS

El método ABTS se basa en la monitorización espectrofotométrica de la descomposición del radical catión $\text{ABTS}^{\cdot+}$ producido por la oxidación del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) por un agente oxidante fuerte (por ejemplo, permanganato de potasio o persulfato de potasio). De

hecho, $ABTS^{\bullet+}$ tiene una fuerte absorción a longitudes de onda más largas (con un máximo de absorción a 415, 645, 734 y 815 nm), pero 734 nm es adoptada por la mayoría de los investigadores. El $ABTS^{\bullet+}$ reacciona enérgicamente con moléculas capaces de donar electrones o átomos de hidrógeno, tales como compuestos fenólicos, que conduce a una desaparición del color azul/verde de este radical. Termodinámicamente, un compuesto puede reducir $ABTS^{\bullet+}$ si tiene un potencial redox menor que la de $ABTS$ (680 mV). El método se expresa generalmente como la capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC). El método es rápido y se puede utilizar en un amplio intervalo de valores de pH, así como en disolventes acuosos y orgánicos. Además es un método con una buena repetibilidad, así como fácil de realizar (Cerretani y Bendini, 2010, Awika et al., 2003, Re et al., 1999).

Método DPPH

El método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) desarrollado por Brand-Williams et al (1995) basado en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH \bullet , que se produce por reducción de una antioxidante o por acción con especies radicales.

Método FRAP

El ensayo potencial antioxidante de reducción férrica (FRAP) se basa en la capacidad de una muestra (AH) para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . La reacción FRAP se lleva a cabo a pH ácido 3,6 para mantener la solubilidad del hierro, por lo que la reacción a pH bajo reduce el potencial de ionización que impulsa la transferencia de átomo de hidrógeno y aumenta el potencial redox, que es el mecanismo dominante de la reacción. Cuando la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} se produce en presencia de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), la reacción va acompañada por la formación de un complejo coloreado con Fe^{2+} (absorción a 593 nm) (Cerretani y Bendini, 2010, Litescu et al., 2010).

1.2.3. Otras técnicas para determinar capacidad antioxidante

En la mayoría de los métodos antioxidantes descritos anteriormente se utiliza la técnica de espectrofotometría para evaluar las reacciones producidas, si bien el método ORAC utiliza la técnica de fluorimetría y el método TRAP utiliza un electrodo de oxígeno. Existen otras técnicas que se emplean en la determinación de capacidad antioxidante como la quimioluminiscencia, cromatografía de gases, electroquímicos (voltametría cíclica) y biosensores (Cerretani y Bendini, 2010, Escorza et al., 2009, Flores et al., 2010, Cruz et al., 2015, Fernández-Pachón et al., 2006, Prior y Cao, 1999). Asimismo, surgen nuevas alternativas de determinación de capacidad antioxidante como la técnica instrumental de nanopartículas metálicas (Vilela et al., 2015) y las técnicas de lengua electrónica voltamétrica, en frutas (Baldeón et al., 2015) y vinos (Cetó et al., 2014).

2. Métodos electroquímicos de medidas. Técnicas de lengua electrónica

Una celda electroquímica básica se compone de dos electrodos inmersos en una disolución. Si aplicamos una tensión externa V entre dichos electrodos, bajo determinadas circunstancias, se producirá la circulación de una corriente eléctrica I derivada de los procesos electroquímicos que ocurren en la interfaz electrodo-disolución de cada uno de ellos. El origen de esta corriente puede ser la transferencia de carga debida a reacciones químicas (procesos farádicos) o la reorganización de la carga en la interfaz (procesos no farádicos).

Dentro de los métodos electroquímicos interfaciales se distinguen dos grupos: los estáticos y los dinámicos. En las técnicas electroanalíticas estáticas se trabaja con el sistema en el equilibrio; es decir no hay circulación de corriente. La más conocida de éstas es la potenciometría. Dentro de las dinámicas cabe hacer una nueva separación entre aquéllas para las que el parámetro eléctrico controlado es la corriente y aquéllas para las que el parámetro

controlado es la tensión. Las técnicas electroquímicas interfaciales dinámicas más utilizadas son las controladas por tensión, en las que el control puede ser mediante barridos de potencial o mediante escalones de potencial (Alcañiz, 2011 y Skoog et al., 2008).

En los últimos tiempos han surgido sistemas electrónicos que imitando el funcionamiento del sentido del olfato y del gusto permiten la determinación de parámetros fisicoquímicos en matrices complejas. Se trata de las narices y las lenguas electrónicas.

En el caso de las lenguas electrónicas, su analogía con el gusto biológico no está relacionada con el método de conversión de la información química en señal eléctrica ni con el formato de dicha señal. Sin embargo, en las lenguas electrónicas la señal eléctrica puede ser por ejemplo, el potencial de la interfaz electrodo-muestra (lenguas electrónicas potenciométricas) o la corriente generada como respuesta a la aplicación de un determinado potencial al electrodo (lenguas electrónicas voltamétricas). No obstante, sí que existe una analogía en el funcionamiento de ambos sistemas a nivel global. Cuando se prueba un alimento el cerebro combina la información generada por quimiorreceptores de distinta naturaleza para establecer el sabor de dicho alimento. En las lenguas electrónicas el sistema de procesamiento de datos combina las señales recibidas de varios sensores de distinto tipo para determinar una propiedad de la muestra o cuantificar alguno de sus compuestos (Alcañiz, 2011).

Así las lenguas electrónicas se pueden definir como sistemas basados en múltiples sensores de baja selectividad o sensibilidad cruzada. La respuesta de la matriz de sensores presenta una huella digital electrónica característica de cada especie en la muestra. La suma de todas estas huellas digitales puede llevar al reconocimiento de un patrón. El reconocimiento cualitativo y cuantitativo de estos patrones se puede lograr por medio de herramientas estadísticas multivalentes apropiadas tales como redes neuronales, PCA, PLS y otras (Alcañiz et al., 2012).

Las lenguas electrónicas, que a pesar de que su planteamiento y desarrollo es muy reciente (Leake, 2006), están cobrando una enorme

importancia por especificidad inherente, sencillez, coste relativamente bajo de construcción y almacenamiento, rápida respuesta y por la posibilidad de automatización, lo que permite su aplicación a diferentes tipos de muestras (Mello y Kubota, 2002).

2.1. Tipos de lenguas electrónicas. Lenguas voltamétricas

Dentro de los tipos de lengua electrónica existen las potenciométricas y las voltamétricas. Las lenguas electrónicas potenciométricas basan su funcionamiento en la medida del potencial de equilibrio que se genera cuando se introduce un electrodo en la muestra. En cambio en las lenguas electrónicas voltamétricas se aplican potenciales de diversa naturaleza al electrodo de trabajo midiendo la corriente resultante. Esta corriente está relacionada con los procesos tanto farádicos como no farádicos que ocurren en la interfaz entre el electrodo y la muestra (Alcañiz, 2011).

2.1.1. Tipos de potenciales aplicados a las lenguas voltamétricas

De acuerdo al tipo de potencial que se aplica, las técnicas voltamétrica se clasifican en: voltamétricas de barrido y de pulso. Entre las técnicas de voltametría de barrido están: lineal, redisolución y cíclica. La voltametría cíclica es similar a la voltametría de barrido lineal con la diferencia de que, una vez alcanzado el potencial máximo, se lleva a cabo un nuevo barrido en sentido contrario hasta alcanzar el potencial inicial. Dentro de las técnicas voltamétricas de pulsos pueden agruparse en función de la amplitud de los pulsos (Alcañiz, 2011 y Skoog et al., 2008) (figura 9).

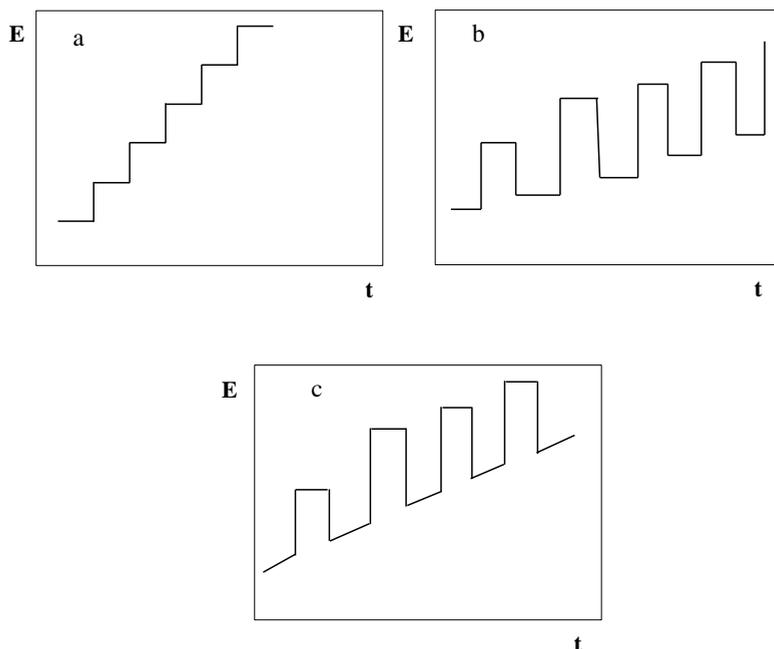


FIGURA 9. Voltametría de pulsos de pequeña amplitud, a) tipo escalera, b) onda cuadrada y c) pulso diferencial (Alcañiz, 2011 y Skoog et al., 2008).

Voltametría de pulsos de pequeña amplitud: dentro de este grupo se integran técnicas en las que se incrementa la tensión aplicada al electrodo en pequeños escalones (voltametría de escalera) o mediante la generación de pequeños pulsos cuyo nivel de continua se va aumentando (voltametría de onda cuadrada y voltametría de pulso diferencial) al tiempo que se mide la corriente resultante.

Voltametría de pulsos de gran amplitud: en este caso la amplitud de los pulsos es mayor. Como ejemplo de este tipo de técnicas se pueden citar la voltametría de pulsos normal y la cronoamperometría (Alcañiz, 2011).

2.1.2. Corriente resultante tras la aplicación de un potencial

La corriente resultante como consecuencia de la aplicación de un potencial puede ser debido a dos tipos de procesos (farádico y no farádico) que tienen lugar en la interfase electrodo-disolución. En uno de ellos hay una transferencia directa de electrones vía una reacción de oxidación-reducción. A los procesos de este tipo se les llama procesos farádicos porque están gobernados por la ley de Faraday, que establece que la extensión de una reacción química que se efectúa en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente, llamada corriente farádica (Skoog et al., 2008).

La corriente no farádica es debida a la reorganización de los cambios en la interfase electrodo-disolución. Esto depende, entre otros, del tipo y tamaño de ion que hay presente en la interfase. La corriente farádica está relacionada con los cambios en la transferencia que ocurren cuando el potencial es aplicado y entre otros, depende del material del electrodo y de las especies que estén presentes en la disolución. Sin embargo, si el potencial aplicado produce una reacción de oxidación-reducción la corriente obtenida será la suma de la corriente no farádica y la corriente farádica resultante de la reacción. Por lo tanto, la corriente total permite obtener información electroquímica de la muestra (Alcañiz, 2011). La figura 10 representa la respuesta eléctrica dada en corriente farádica, no farádica y total.

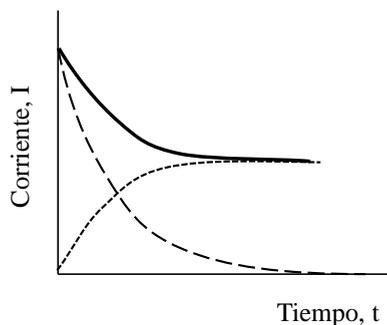


FIGURA 10. Respuesta eléctrica, (---) corriente no farádica, (.....) corriente farádica y (__) corriente total.

Un electrodo sólo puede sondear una capa muy delgada de solución en contacto con su superficie (d_0 a d_1 en la figura 11). Una corriente farádica requiere una transferencia de masa continua de especies reactivas desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo. Esta transferencia de masa se lleva a cabo por medio de tres mecanismos: convección, migración y difusión. La convección es el resultado del movimiento mecánico de la solución como consecuencia de la agitación o del flujo de la solución delante de la superficie del electrodo. La migración es el movimiento de los iones a través de la solución producidos por la atracción electrostática entre los iones y el electrodo de carga opuesta. La difusión es el movimiento de las especies como consecuencia de un gradiente de concentración (Skoog et al., 2008). El mecanismo de transferencia que predomina al aplicar un potencial en la lengua electrónica, utilizada en la tesis, es la de migración.

Es importante darse cuenta de que las mediciones electroquímicas se efectúan en sistemas heterogéneos y que un electrodo sólo puede donar o aceptar electrones de una especie que esté presente en una capa de solución que esté inmediatamente adyacente a él. Por tanto, como resultado de los cambios químicos y físicos que ocurren en la interfase electrodo-disolución, esta capa puede tener una capa muy distinta de la solución considerada en forma total (Skoog et al., 2008).

Los procesos no farádicos, también son debidos a la doble capa creada en la interface electrodo-disolución, es decir, en las cercanías de la interfaz. Además de las especies que reaccionan, pueden encontrarse iones de otras especies para los que no se alcanza el potencial de reacción. Estos iones, aunque no producen transferencia de carga, sí que son atraídos o repelidos por la superficie del electrodo en función del potencial aplicado. Esta estructura que se forma en la interface electrodo-disolución, es la que se denomina doble capa eléctrica (Alcañiz, 2011). Este efecto se ilustra en la figura 11 a. La superficie del electrodo metálico posee un exceso de carga positiva como consecuencia de un voltaje positivo aplicado. La capa de solución cargada consta de dos partes: 1) una capa interior compacta

(d_0 a d_1), en la cual el potencial disminuye linealmente con la distancia desde la superficie del electrodo y 2) una capa difusa (d_1 a d_2), dentro del cual la disminución es casi exponencial (véase la figura 11 b). Esta disposición completa de especies cargadas y dipolos orientados (como las moléculas de agua) en la interfase electrodo-disolución se denomina doble capa eléctrica (Skoog et al., 2008).

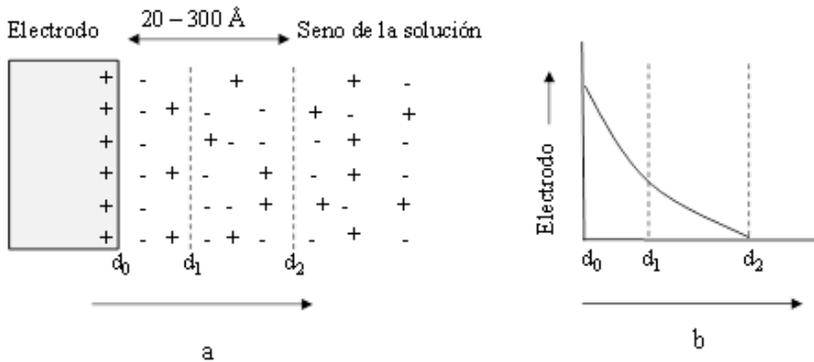


FIGURA 11. Doble capa eléctrica formada en la superficie del electrodo como resultado de un potencial aplicado.

2.2. Variables en las medidas electroquímicas

Las lenguas voltamétricas formadas por celdas electroquímicas, son un sistema complejo en el que ocurren simultáneamente diversos procesos y en el que distintas variables se interrelacionan. En la figura 12 muestra las diferentes variables que intervienen en los procesos electroquímicos. Estas variables han de ser definidas y tabuladas con la finalidad de poder establecer metodologías de medida que permitan su utilización, pero para ello han de ser evaluadas a fin obtener el valor más idóneo de ellas que nos permitan realizar la clasificación y/o cuantificación de la especie a analizar.

En la presente tesis se evaluarán la variable eléctrica potencia, la variable electrodo y las variables disolución; concentración, pH,

desoxigenación, a fin de poder obtener los modelos de predicción de la capacidad antioxidante de diferentes patrones, los cuales sean utilizados para predecir la capacidad antioxidante de diferentes extractos de plantas y zumos de fruta.

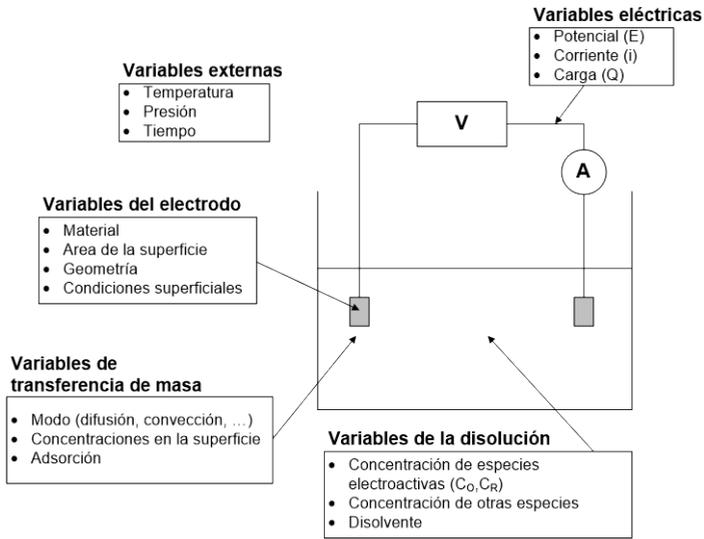


FIGURA 12. Variables importantes de control en una lengua electrónica (Alcañiz, 2011).

2.3. Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV) desarrollada por el IDM-UPV

El Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia ha diseñado un equipo experimental de lengua electrónica voltamétrica. Unas de las características fundamentales de este equipo, y que lo diferencian en gran medida de otros equipos similares, es su flexibilidad en cuanto al modo de trabajo del potenciostato, que le permite configuraciones de hasta 10 electrodos de trabajo de forma automática, si bien otros similares solo son capaces de trabajar con 2, máximo 3 electrodos de trabajo (tabla 8). Pero el uso de gran número de electrodos, los cuales son de baja selectividad y sensibilidad

cruzada, es decir sensores que no están diseñados para detectar una especie en concreto, es que se necesita obtener el patrón electroquímico de respuesta que sea característico de la especie a evaluar.

El equipo diseñado, como se ha comentado anteriormente se fundamenta en la técnica de medida basada en la voltametría, en la que al aplicar un potencial eléctrico, se produce una reacción de óxido-reducción a consecuencia de la transferencia de iones desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo, denominada respuesta electroquímica que es guardada como intensidad de corriente (uA) en un archivo para su posterior procesado. Esta intensidad de corriente puede ser representada, sin ningún pre-tratamiento de datos, en voltagramas con la finalidad de conocer cuál es el comportamiento de la corriente para los diferentes electrodos en función de potencial aplicado. Para el posterior procesado de los datos, mediante herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante, con el fin de establecer una clasificación de las mismas, se realiza un autoescalado a fin de ser normalizados.

La figura 13 muestra la estructura de la lengua electrónica. Se compone de tres elementos: los sensores, el sistema de medida y el sistema de procesado de datos. Como se ha comentado anteriormente, los sensores por lo general tienen una sensibilidad cruzada a los distintos compuestos de la muestra y su número depende de la aplicación y de la técnica empleada. La misión del sistema de medida es captar las señales generadas por dichos sensores, digitalizarlas y transmitir las al sistema de procesado de datos. Éste recibe los datos de las medidas y, basándose en algoritmos de reconocimiento de patrones o en herramientas de análisis multivariante clasificarlas o cuantificarlas en base a alguna de sus características fisicoquímicas. Para poder llevar a cabo esta clasificación o cuantificación debe realizarse un proceso de aprendizaje en el que muestras de características conocidas son procesadas para “entrenar” al sistema, es decir obtener su patrón electroquímico.

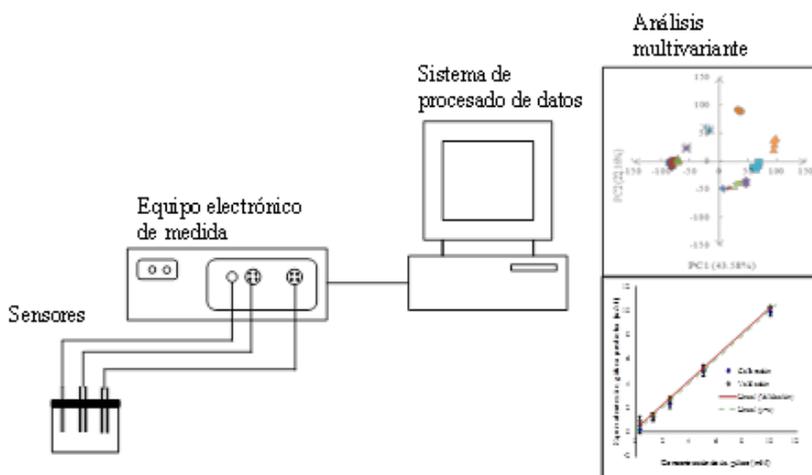


FIGURA 13. El conjunto de sistemas de la lengua electrónica voltamétrica.

2.3.1. Partes de la lengua electrónica voltamétrica y limpieza

El equipo experimental LEV consta de los siguientes elementos (figura 14):

- Aplicación informática, software que permite realizar ensayos y almacenar los datos obtenidos.
- Equipo electrónico que consta entre otros de un potenciostato, que permite a la vez realizar medidas a 8 electrodos de trabajo, y microprocesadores.
- Sensores electroquímicos, integrado por tres electrodos:
 - Electrodo de referencia de calomelanos (RE), que proporciona un potencial estable de manera al electrodo de trabajo. El electrodo de calomelanos (figura 14) que se compone de un tubo interior que contiene una pasta con Hg, Hg_2Cl_2 y KCl saturado. Este tubo se halla dentro de otro tubo en el que hay una disolución de KCl saturada. Un pequeño orificio

conecta ambos tubos. En la punta del tubo exterior se encuentra el puente salino implementado mediante vidrio poroso o fibra de amianto. En la actualidad este tipo de electrodo ha sido remplazado por el electrodo de referencia Ag/AgCl.

- Electrodo de trabajo (WE). El electrodo indicador o de trabajo es el electrodo en el que se producen los procesos electroquímicos de interés. El diseño de la lengua electrónica se basa en un diseño anterior creado por Winquist que consiste en integrar electrodos de trabajo de 4 metales diferentes en una estructura cilíndrica hueca de acero inoxidable. Los electrodos de trabajo son hilos de distintos materiales metálicos de 1,5 cm de longitud. Los 4 hilos metálicos se encapsulan en la estructura cilíndrica mediante un epoxi tal y como se muestra en la figura 15 a. En total consta de 8 metales agrupados en 2 lenguas electrónicas. La primera formada por metales nobles (Ir, Rh, Pt, Au) como se puede apreciar en la figura 15 b, y la segunda por metales no nobles (Ag, Co, Cu, Ni).

- Contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE), El contraelectrodo está constituido por la estructura cilíndrica de acero inoxidable. Las dimensiones del cilindro son: longitud 10 cm, diámetro interno de 16 mm y diámetro exterior de 18 mm. El grado del acero inoxidable utilizado es 316 L. Su misión es conducir la electricidad desde la fuente de la señal, a través de la solución, hasta el electrodo de trabajo.

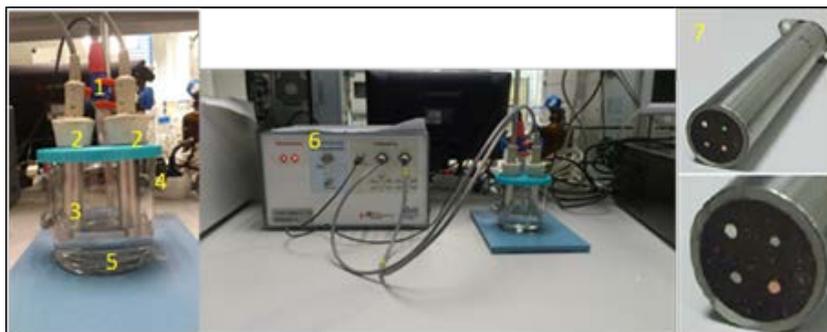


FIGURA 14. Elementos del equipo lengua electrónica voltamétrica; electrodo de referencia (1), electrodo de trabajo (2), contra electrodo (3), celda electroquímica (4), solución electrolítica (5) y fuente de control (6). El punto 7 muestra una vista de la situación de los electrodos en la lengua (Alcañiz et. al (2012) y Campos et al. (2012).

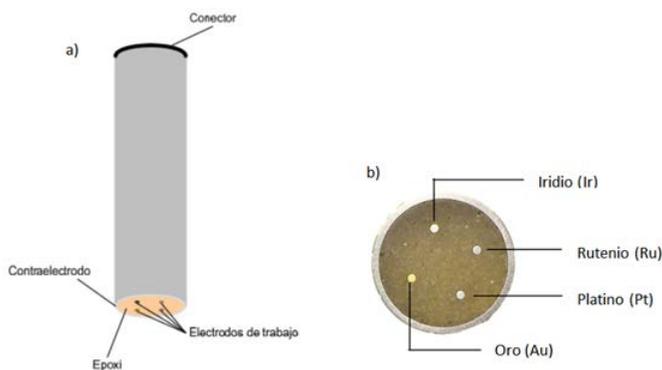


FIGURA 15. a) Lengua electrónica, b) Posición de los electrodos de metales nobles (Alcañiz, 2011).

La superficie de la lengua electrónica después de realizar las medidas queda saturada de cargas iónicas, sobre todo los metales no nobles que por su alta reactividad quedan más saturados. Esto impide que se pueda volver a utilizar en la siguiente medición dado que las señales eléctricas disminuyen, aumentando la desviación media, por lo que se hace necesario hacer una limpieza de las lenguas de forma

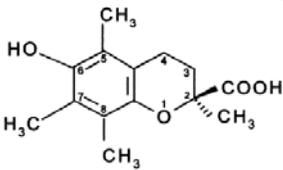
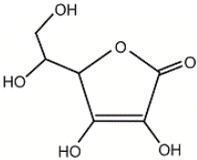
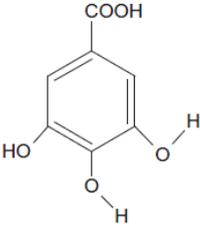
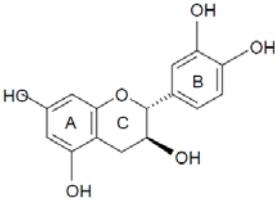
mecánica entre medidas. Para ello la superficie de la lengua (en especial la de metales no nobles) es lijada con una lija fina en medio acuoso, para posteriormente ser pulida con alúmina fina (referencia: 319767-25g, Aldrich) y así obtener una superficie homogénea dado que una superficie irregular supondría un variación de la superficie de exposición y por tanto de la respuesta voltamétrica.

2.4. Metodología de trabajo con lengua electrónica voltamétrica

Como se ha mencionado anteriormente, para la determinación de compuestos mediante la lengua voltamétrica es necesario previamente caracterizar la respuesta a evaluar. Es decir evaluar la respuesta voltamétrica al que se considerará patrón químico, dado que los electrodos no son selectivos, sino que la combinación de todos ellos generarán un mapa voltamétrico característico de cada sustancia o respuesta a evaluar. En la presente tesis, dado que lo que se pretende es caracterizar la capacidad antioxidante total de ciertas plantas y frutas, se utilizaran como patrones aquellos que en muchos métodos químicos vienen utilizándose como tales. Así se utilizará el patrón trolox, ácido ascórbico y catequina. En la tabla 7 se muestra la respuesta eléctrica de estos patrones químicos sometidos a pruebas voltamétricas, en las que se observan uno o dos picos anódicos de oxidación. Estos picos indican que la sustancia analizada ha llegado a alcanzar un potencial máximo de oxidación (E_a), que es de interés conocer para evaluarlo en las muestras a analizar (Panizza y Cerisola, 2009). Pero los picos que se muestran son dependientes del tipo de electrodo usado, características del medio usado y de la escala de potencial aplicado, por lo que se hace necesario obtenerlos para los electrodos y condiciones de trabajo establecidas. En general el número de electrodos usados en los estudios, como los que se muestran en la tabla 7, son uno o lo sumo dos, por lo que no se pueden considerar lenguas electrónicas. En cambio el equipo que se utiliza en la presente tesis doctoral, como se ha comentado, presenta 8 electrodos, cuatro formados por metales no nobles y 4 por metales nobles. De esta forma la caracterización de los patrones se puede realizar más exhaustivamente, por lo que posteriormente la medición sobre las muestras, en las que no solo está la sustancia o respuesta a

evaluar, sino que coexiste con otras más, puede realizarse con una mayor cantidad de información, pudiendo ser reducido el posible sinergismo o antagonismo de las respuestas.

TABLA 7. Respuesta electroquímica de los principales patrones químicos como antioxidantes de referencia.

Patrón	Estructura química	Ea1	Ea2	Referencia
Trolox		0.4V- 0.81V	-	Güney et al., 2010, Malyszko y Karbarz, 2006, Keyrouz et al., 2011.
AA		0.315- 0.68V	-	Habibi et al. (2011), Rivero, 2012 y Wonsawat, 2014
AG		0.21- 0.55	0.83- 0.92	Hua et al., 2013, Mu, 2003), Abdel-Hamid y Newair, 2011.
(+) Catequina		0.16- 0.96	0.58- 1.24	Keyrouz et al., 2011, Șeruga et al., 2011, Janeiro and Oliveira, 2004.

Así las medidas electroquímicas de los patrones o respuesta patrón, medidas por la lengua electrónica voltamétrica, son analizadas por un sistema informático con el fin de interpretar la naturaleza electroquímica de la muestra. Una vez obtenidas, se establecen como modelo mediante una compresión de datos. Este modelo será aplicado sobre la respuesta voltamétrica de las muestras problema a analizar, obteniéndose en su caso, dicha característica presente en la muestra problema. Dado que la cantidad de datos que se generan en cada medición es muy elevada, para la obtención de los modelos y posterior utilización es necesario utilizar herramientas estadísticas de compresión de datos, análisis multivariantes.

En la figura 16 se muestra un esquema del proceso de medición mediante lengua voltamétrica.

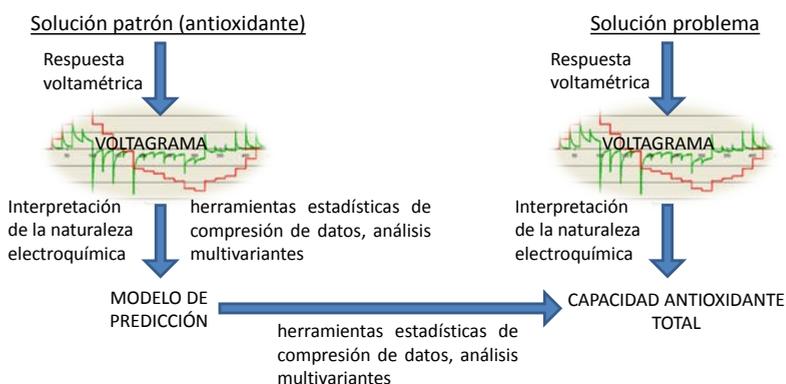


FIGURA 16. Esquema del proceso de medición mediante lengua electrónica voltamétrica.

2.5. Aplicaciones de la lengua electrónica voltamétrica

La LEV se aplica en muchos campos de la ciencia, medicina, química, medio ambiente, alimentación, seguridad y otros. En el campo de la agroalimentación, en los últimos años, el número de investigaciones ha ido en aumento evaluándose desde el control de calidad hasta la determinación de compuestos antioxidantes. En la

tabla 8 se reportan algunas aplicaciones en la agroindustria de alimentos.

TABLA 8. Aplicación de la lengua electrónica en la agroindustria de alimentos

Tipo LEV	Electrodo	Aplicación	Referencia
Voltametría de onda cuadrada	Grafito y Pt.	Discriminación entre distintos procesos de envejecimiento de vino tinto y cuantificar los compuestos fenólicos.	Gay et al., 2010.
Voltametría de pulsos	Ir, Pt y Rh	Discriminación de diversas marcas de té negros y verdes.	Ivarsson et al., 2001.
Voltametría de pulsos de gran amplitud	Au, Pt y Rh	Monitorización on-line del proceso de limpieza de una planta de pasteurización de productos lácteos.	Winqvist et al., 1998.
Voltametría de pulsos	Au, Ir, Pd, Pt y Rh	Evaluación de la calidad y degradación del té.	Banerjee et al. (2012)

La técnica de LEV diseñado en la IDM-UPV ha sido aplicada en diferentes áreas como química, medio ambiente y agroalimentaria (Alcañiz, 2011, Campos, 2013). En esta última área se realizaron diferentes trabajos como la cuantificación del contenido de cloruro de sodio, nitritos y nitratos en carne picada, utilizando como electrodos de trabajo Au, Pt, Ir, Rh, Ag, Cu, Co y Ni (Campos et al., 2010) y en la monitorización de la maduración de la uva y el proceso de fermentación del mosto, utilizando como electrodos de trabajo Rh, Ir, Au, Co, Cu, Ag y Ni (Campos et al., 2013). Por otro parte, Alcañiz (2011) ha estudiado los principales ácidos orgánicos como cítrico, ascórbico y málico (patrones antioxidantes) mediante la LEV, diseñando un sistema que permite cuantificar estos ácidos en mezclas binarias. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre muestras

reales tanto de extractos de plantas como de zumos de frutas, en los están presentes otros compuestos como los azúcares, minerales, etc que pueden afectar la resultante voltamétrica.

Los resultados obtenidos por otros autores utilizando el equipo ha generado el interés de seguir investigando en la línea de evaluar cómo relacionar la respuesta voltamétrica de los patrones antioxidantes con muestras reales, por lo que, en la tesis doctoral se planea desarrollar una metodología basada en la técnica LEV para determinar la capacidad antioxidante de plantas y frutas. Si bien existen técnicas electroquímicas como la voltametría cíclica, que se ha utilizado para determinar la capacidad antioxidante en alimentos, por ejemplo, en aceites de oliva, setas, extractos de plantas, flavonoides y frutas (Cerretani y Bendini, 2010, Barros et al., 2008, Casio et al., 2006, Firuzi et al., 2005, Chevion et al., 2000, Hoyle y Santos, 2010), todos ellos han utilizado solo un electrodo de trabajo (de carbón vítreo), siendo este un electrodo de alta especificidad y por tanto muy afectado por el resto de componentes que pueden estar dentro de una muestra y que pueden modificar el mapa voltamétrico resultante final. Con la aplicación de la técnica de LEV, que utiliza más de un electrodo de trabajo llegando incluso hasta 10 electrodos, se pretende que la suma o combinación de todos ellos generaren un mapa voltamétrico característico de cada sustancia o respuesta a evaluar.

3. Procesado de datos

El objetivo general de la presente tesis doctoral es la obtención de modelos predictivos que permitan determinar parámetros fisicoquímicos (capacidad antioxidante total) de las muestras analizadas a partir de las medidas de voltametría. Para ello, a partir de la generación de modelos estadísticos basados en técnicas multivariante, se establecerán relaciones matemáticas que posteriormente pueden ser utilizadas para predecir las propiedades de nuevas muestras.

Pero los sistemas de medida basados en técnicas voltamétricas, como los basados en espectroscopía y potenciometría tienen como denominador común la cantidad de información que generan, creándose un gran número de variables independientes por cada variable dependiente. En los experimentos realizadas en la tesis, para cada una de las lecturas realizadas se generaron 7920 datos (45 datos por pulso * 22 pulsos * 8 electrodos), las cuales se realizaron repetitivamente para cada muestras, siendo el número de muestras (por ejemplo diluciones) elevado. Es por ello por lo que se hace necesario la utilización de herramientas estadísticas multivariantes.

El procesado de las señales multivariantes tiene su origen en la quimiometría (Mongay, 2005), disciplina química que permite establecer un reconocimiento de patrones mediante el uso de métodos matemáticos y estadísticos. Los métodos de análisis multivariante están basados en las técnicas de extracción de las principales características o parámetros. Su finalidad es reducir la dimensionalidad de los datos. Para ello, mediante el establecimiento de combinaciones lineales de las variables originales, se generan nuevas variables ortogonales (independientes entre sí) que integran la máxima variabilidad de los datos. En función del método, a estas variables se les llama componentes principales, funciones discriminantes o variables latentes.

Existe un gran número de métodos matemático-estadísticos: análisis de componentes principales (*principal component analysis*, PCA); mínimos cuadrados parciales (*partial least squares*, PLS); análisis discriminante (*discriminant analysis*), redes neuronales (artificial neural networks, ANN), etc. Los métodos de reconocimiento de patrones son utilizados para interpretar las señales complejas y predecir parámetros tanto cualitativos como cuantitativos.

Las técnicas de análisis multivariante nacen como herramienta para procesar la cantidad de información captada por los sistemas de medida electrónicos sensoriales. El objetivo principal del análisis multivariante es extraer la información relevante de todo el conjunto, minimizando o eliminando el ruido que pueda existir, para poder

obtener la respuesta deseada. En definitiva es una técnica orientada a la reducción de la dimensión. En este trabajo se han aplicado diferentes técnicas de análisis multivariante, en función de la naturaleza de los ensayos a realizar.

Previo a la utilización de las técnicas de análisis multivariantes es necesario realizar un preprocesado de los datos con la finalidad de utilizar aquellos que no presentes anomalías. Por ello, antes de entrar a tratar los datos, debe hacerse un preprocesado, que puede consistir en:

- Normalización, estandarización o autoescalado. El objetivo es que todas las variables tengan el mismo peso específico independientemente de su valor. La normalización consiste en centrar los datos (a las variables se le resta el valor medio) y dividir por su desviación estándar.
- Selección de variables. En los sistemas sensoriales es habitual tener matrices de datos con un gran número de variables frente al número de medidas. Resulta interesante por tanto utilizar algún criterio de selección de variables que permita reducir la dimensionalidad de los datos sin eliminar información útil y minimizando a la vez las interferencias que aporten las variables ruido. Para ello existen varios métodos (test de Fisher, test de incertidumbre de Martens, etc.) pero uno de los más extendidos es el de selección de variables por covarianza entre variables. Variables que estén fuertemente correlacionadas o anticorrelacionadas aportan información similar, lo que indica que son redundantes.
- Eliminación de “outlier” o medida errónea. Mediante las técnicas multivariantes, como la de Componentes Principales (PCA), es posible identificar variaciones inusuales dentro del modelo, lo cual puede indicar la presencia de un valor o grupo de valores que puedan ser erróneos y nada tengan que ver con la respuesta genérica.

3.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA es utilizado para analizar el conjunto de datos observados mediante la LEV siguiendo un modelo matemático capaz de comprimir los datos para dar una adecuada descripción de los datos, de esta manera resumiendo la información repetida y simplificando la interpretación gráfica de los datos. El PCA se basa en la conversión de los ejes de coordenadas que describen nuestro sistema en un nuevo sistema de coordenadas en el cual todos los nuevos ejes llamados componentes principales (PC) son ortogonales, ordenados todos ellos de manera que el primer componente, PC1, explique la mayor varianza posible, el segundo, PC2, el siguiente que más explique, y así sucesivamente (Martens y Martens, 2001 y Campos, 2013).

La técnica de Análisis en Componentes Principales puede considerarse desde diversas perspectivas, según en qué objetivo ponga su énfasis el investigador. En primer lugar, puede considerarse como una técnica de Análisis Multivariante, con finalidad descriptiva, permite tratar matrices de grandes dimensiones. Podemos obtenerla también como una técnica exploratoria, en el sentido de que, explorar los datos, sin imponer restricción alguna sobre ellos, será el primer paso para entenderlos. Además, esta técnica permitirá analizar y verificar ciertas hipótesis previamente establecidas, aunque los datos no provengan de un diseño, no se utilicen procedimientos de inferencia estadística y no se pretende construir a partir de ellos un modelo estadístico específico (Batista y Martínez, 1989). Además, permite una planificación experimental económica, realiza una clasificación y control de procesos (Martens y Martens, 2001).

Los resultados de PCA se expresan como los parámetros de la observación (*scores*) y los pesos de las variables (*loads*). Para alcanzar la interpretación de los resultados, éstos se expresan gráficamente en dos dimensiones (PC1 y PC2), pero dependiendo de la aplicación o del resultado, algunos autores utilizan un diagrama tridimensional (PC1, PC2, PC3). En el gráfico de scores (figura 17), se pueden observar las diferentes agrupaciones denominadas *clusters*, de modo que los puntos que estén próximos en el plano PC1-PC2 tienen características comunes, y lo contrario si se encuentran alejados. Sin

embargo, una representación gráfica simple podría conducir al engaño por lo que se tiene que recordar qué porcentaje de la información total asume cada uno de los parámetros. En este sentido, el componente PC1 se asocia siempre al porcentaje más alto de la varianza explicada, y entonces las variaciones en el eje PC1 tendrán mucha más relevancia que variaciones en el eje PC2 o el otro parámetro principal (Campos, 2013).

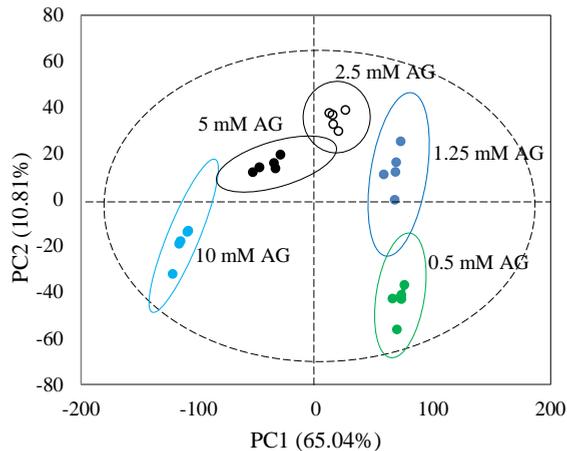


FIGURA 17. Gráfica de observaciones (*scores*) para PCA de datos de patrón ácido gálico.

3.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por PLS es una técnica que generaliza y combina las características del análisis PCA y la regresión múltiple. El objetivo principal de PLS es predecir o analizar un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto de variables independientes u observables. La predicción se alcanza extrayendo de las variables observadas un conjunto de factores ortogonales denominados variables latentes que representan el mejor poder predictivo sobre las variables dependientes. La regresión PLS es particularmente útil cuando se necesita predecir un conjunto de variables dependientes a

partir de un conjunto grande de variables independientes (Campos, 2013).

La principal diferencia con respecto a los métodos de Regresión de Componentes Principales (PCR) es que procura que los componentes principales contengan la mayor información para la matriz de predicción Y . Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (Y), obteniéndose variables latentes que actúan como coeficientes. Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices X e Y se centran o autoescalan como en el caso de PCA. Cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de factores. La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los *scores* de los bloques X e Y (Campos, 2013). Se puede utilizar la regresión de PLS en la inspección preliminar de los datos de entrada sin procesar, en obtener modelos de predicción, en los estudios interdisciplinarios, en la clasificación por análisis discriminante y en análisis de los efectos de los experimentos diseñados. (Martens y Martens, 2001).

El PLS es una técnica muy utilizada en la lengua electrónica con el fin de obtener modelos de calibración y predicción a partir una matriz generadas por las variables independientes (respuestas eléctricas) y variables dependientes (concentraciones), previamente comprimidas y filtradas, y que estos modelos matemáticos de predicción sean capaces de predecir muestras nuevas. En la figura 18 se muestra el flujo a seguir para obtener los modelos de calibración y predicción. En esta tesis el modelo de calibración se ha validado por un conjunto de datos de naturaleza similar a las de la calibración y con ello conseguir el modelo de predicción.

3.2.1. Modelos de calibración y predicción

En la regresión PLS, para obtener el modelo de predicción, se parte del conjunto de datos, de los cuales una parte, que puede ser los dos tercios de los datos, se utiliza para la calibración y el restante tercio para la validación. Con ello se obtiene el modelo de predicción.

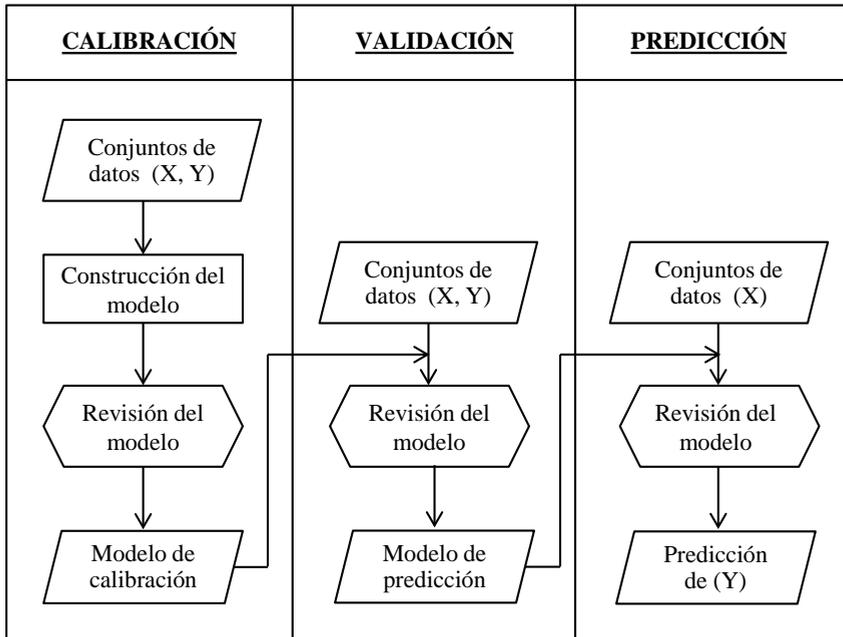


FIGURA 18. Flujo de operaciones para la obtención de los modelos de calibración y predicción.

3.2.2. El Modelo de calibración

Los softwares para el análisis multivariante usan algoritmos sofisticados de PLS que ayudan al procesamiento de los datos (Martens y Martens, 2001). Por ejemplo con la herramienta estadística *Toolbox-PLS* de Matlab (Wise et al., 2006), usada en la realización de esta tesis, se cargan los datos de experimentos X e Y, con la opción de hacer un preprocesamiento de los datos. Con ello se realiza la construcción del modelo de calibración con el número de variables latentes necesarios dadas por el método de validación cruzada. Este modelo se revisa con los parámetros de regresión como son: el coeficiente de determinación de calibración (R^2C), el error cuadrado medio de calibración (RMSEC), el sesgo de calibración (BIAS C), así como la pendiente y la ordenada en el origen (B). Del mismo modo

para la validación cruzada: R^2CV , RMSECV y BIAS CV. Cada uno de estos parámetros aportan el significado siguiente:

- R^2 o coeficiente de determinación: es el cuadrado del coeficiente de determinación de la recta de tendencia. Indica el grado de proximidad de los puntos de la gráfica a la recta de tendencia.
- La pendiente (A) y la ordenada en el origen (B) de la recta de tendencia: indican numéricamente el grado de similitud entre dicha recta de tendencia y la recta 1:1.
- Error cuadrático medio (RMSE): indica cual es en promedio la diferencia entre los valores predichos y los observados (Alcañiz, 2011).
- BIAS es la diferencia media entre el estimado y el valor verdadero. Proporciona información sobre la tendencia del modelo a sobreestimar o subestimar una variable y cuantifica el error sistemático del modelo (Pielke, 1984 y Toolbox-PLS Matlab).

Elección del número óptimo de variables latentes

En la construcción del modelo es importante elegir el número de variables latentes necesario con la que el modelo tendrá la información relevante y suficiente que permitirá obtener parámetros de regresión que indique la bondad del modelo de calibración y predicción. Por un lado, si se eligen pocas variables latentes es posible que parte de la información relevante quede fuera del modelo. Por el contrario, si el número de variables latentes es demasiado alto, además de la información relevante, el modelo contendrá información específica de las muestras utilizadas para construirlo con lo que su capacidad de predicción de nuevas muestras se verá afectada (sobreentrenamiento). Existe una metodología que ayuda a identificar cuál es el número de variables latentes óptimo para cada modelo; se trata de la validación cruzada (Alcañiz, 2011, Martens y Martens, 2001).

Método de validación cruzada

El principal propósito de la validación cruzada son: optimizar un modelo, determina el número óptimo variables latentes para ser usados en el modelo final, conocer si el modelo puede ser usado en la práctica, estimar la capacidad predictiva del modelo final, por ejemplo, ¿Qué tan bueno es el modelo para predecir Y a partir de X en muestras nuevas? (Martens y Martens, 2001). Existen diversas modalidades de validación cruzada en función de cómo se lleve a cabo la elección de las muestras que se utilicen para generar los modelos y para validarlos, estas pueden ser: *Leave-one-out*, *venetian blinds*, aleatorio y bloque continuo (Alcañiz, 2011 y PLS-Toolbox-MATLAB). En esta tesis se ha utilizado el método *Venetian Blinds*, en la que los subconjuntos de muestras que se utilizan para construir los modelos se establecen recorriendo la matriz de experimentos y seleccionando 1 de cada s muestras. El valor s determina el número de subconjuntos que se forman para la validación cruzada. Mediante una gráfica RMSECV versus el número de variable latente se obtendrá el número óptimo de variables latentes, que será aquel que tenga el menor RMSECV que corresponda a un mínimo número de variable.

En la figura 19 representa una gráfica RMSECV versus número de variable latente. A medida que descienda el error aumenta el número de variable latente, llegando hacer constante para un mínimo RMSECV. En este ejemplo, tres variables latentes sería suficiente para explicar la covarianza que existe entre los datos de experimentos y con esto construir el modelo tanto de calibración y predicción.

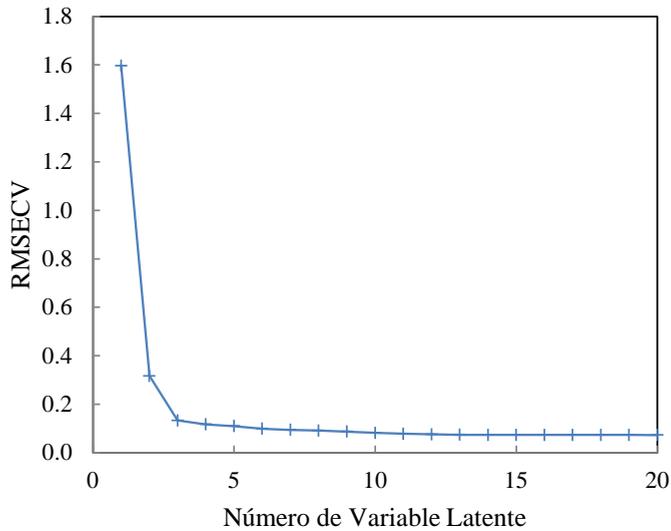


FIGURA 19. Grafica RMSECV vs Número de Variable Latente para PLS de los datos patrón trolox.

Grafica PLS

Una de las formas de expresar los resultados del análisis de PLS es mostrar la relación Y predicho *versus* Y observado, tanto para la calibración como para la predicción. La figura 20 muestra la gráfica de PLS, la cual tiene los puntos de calibración de los valores observados versus los valores predichos, y una línea de tendencia de estos valores.

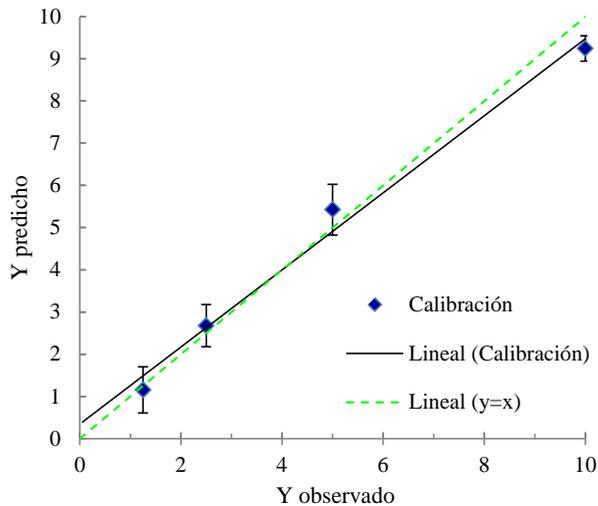


FIGURA 20. Grafica PLS. Valores observados vs. Valores predichos para PLS de datos de patrón catequina.

3.2.3. El Modelo de predicción

La matriz de un conjunto de datos conocidos (X , Y) es introducido al modelo de calibración. Este procedimiento se denomina validación del modelo. De acuerdo a los parámetros de regresión PLS, el modelo será capaz de predecir variables Y a partir de un conjunto de datos nuevos (X).

Validación del modelo

La confiabilidad y relevancia de un modelo es verificado a través de la validación y con ello obtener un modelo más robusto. La validación se lleva a cabo mediante un nuevo conjunto de muestras, denominado set de validación, cuyas características (parámetro que se desea predecir) son conocidas. El set de validación se aplica al modelo construido y con los valores resultantes se representa la gráfica de observado frente a predicho. Del análisis de esta gráfica pueden extraerse conclusiones importantes sobre la robustez del modelo. En la figura 21 se representa una gráfica Y predicho versus Y observado. En

ella se observa los puntos de validación y una línea de tendencia de validación. Los parámetros de regresión como el coeficiente de determinación de predicción (R^2P), el error cuadrado medio de predicción (RMSEP) y el sesgo de predicción (BIAS P) serán los que definirán al modelo predictivo.

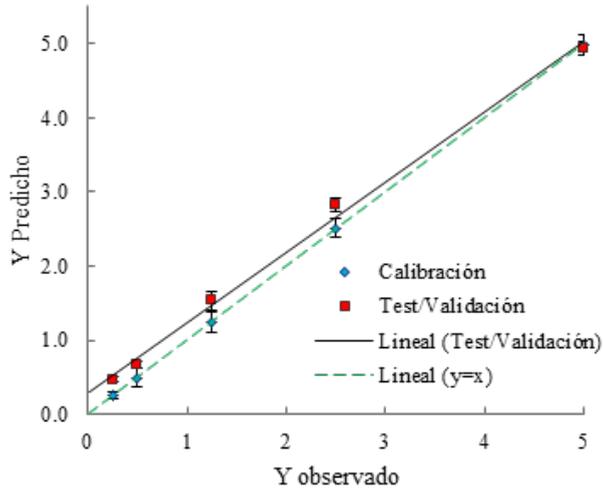


FIGURA 21. Grafica de Y predicho versus Y observado para el PLS del patrón trolox.

Evaluación del modelo

Un modelo perfecto sería aquel en el que los puntos de la gráfica predicho frente observado apareciesen alineados sobre la recta de pendiente 1 y de ordenada en el origen 0 (línea verde); es decir, aquel para el que el valor predicho de cada muestra fuese igual a su valor medido u observado. Para modelos reales lo que se observa es una nube de puntos distribuidos a lo largo de la recta de tendencia o regresión (línea punteada). La calidad del modelo puede evaluarse a nivel visual observando:

- El grado de proximidad de los puntos a la recta de tendencia. Si los puntos están muy separados de la recta de tendencia significa que la predicción es mala.
- El grado de similitud que exista entre la recta de tendencia y la recta 1:1. Si los datos están alineados con la recta de tendencia, pero dicha recta está muy separada de la línea 1:1 (ya sea por la pendiente o por la ordenada en el origen) la predicción también será mala.

Pero también puede hacerse una evaluación numérica del modelo atendiendo a los valores de R^2 , la pendiente (A) y la ordenada en el origen (B) y finalmente (RMSE).

3.3. Optimización del modelo

La respuesta electroquímica de un patrón químico en la LEV dependerá del diseño del tren de pulsos y el número de electrodos de trabajo. Si el diseño aplicado tiene un rango muy amplio de medida se estará incluyendo sub-rangos que no serán necesarios en la medición, con lo que la predicción no será del todo confiable. Debido a que una regresión de PLS no tiene la función de poder diferencias de las variables relevantes de las ruidosas, será necesario incluir junto al PLS un herramienta que sea capaz de seleccionar rangos de variables que sean de utilidad en el modelo predictivo.

3.3.1. Método de selección de variables

La selección de variables engloba a todo un conjunto de técnicas de reducción de la dimensionalidad de los datos a procesar. El objetivo de la selección de variables es encontrar un subconjunto "óptimo" de variables que minimice la pérdida de información y maximice la reducción de ruido. La estrategia para la selección de variables más común consiste en evaluar cada variable individualmente y seleccionar aquellas variables que aportan información de mayor calidad. Desgraciadamente, este acercamiento ignora la redundancia o la sinergia entre variables y raramente

encontrará un subconjunto óptimo. Ante esta situación uno puede tener la tentación de evaluar todos los posibles subconjuntos de variables y seleccionar el óptimo (Gualdrón, 2006).

De acuerdo a como se define la variable de selección en la regresión de PLS se puede clasificar los métodos de selección de variables en tres categorías principales:

Métodos de filtros: Estos métodos utilizan la salida (opcionalmente modificado) del algoritmo de regresión de PLS para identificar puramente un subconjunto de variables importantes. El objetivo es la identificación de la variable. Normalmente, estos métodos son rápidos y fáciles de calcular, pero con respecto a la relevancia de predicción de las variables seleccionadas estos métodos no dan ninguna indicación (Mehmood et al., 2012).

Métodos de envoltura: Las variables identificadas por los métodos de filtro puede ser conducido de nuevo en un reajuste del modelo PLS para producir modelos reducidos, en cuyo caso se tienen métodos de envoltura. Estos métodos se basan principalmente en procedimientos de iteración entre el modelo de ajuste y selección de variables. Los métodos de envoltura se pueden clasificar teniendo como base el algoritmo de búsqueda; determinista o aleatorio. Los algoritmos de búsqueda aleatorios utilizan algún tipo de aleatoriedad en la selección del subconjunto, mientras que no lo hacen los deterministas. Los métodos de envoltura deterministas son relativamente sencillos y requiere menos cálculos, tienen menor riesgo de sobre ajuste y menor número de parámetros son necesarios para sintonizar del métodos de envoltura aleatorios. Todos los métodos de envoltura son computacionalmente más caros que los métodos de filtros (Mehmood et al., 2012).

Métodos integrados: La selección de variables es una parte integrada de un modificado algoritmo PLS. Por lo tanto, estos métodos hacen la selección de variables a nivel de componente (Mehmood et al., 2012). En la tabla 9 muestra los principales métodos de selección de variables.

En esta tesis se han utilizado los métodos de selección índice de proyección de la importancia de las variables (VIP) e intervalos de PLS (iPLS) para la optimización de los modelos predictivos de los patrones químicos para predecir muestras nuevas. El programa computacional de Matlab ha sido de gran ayuda para simplificar todo el trabajo del algoritmo que tienen estos métodos.

TABLA 9. Clasificación de los principales métodos de selección de variables.

Filtros	Envolturas	
	Determinista	Aleatorio
Vectores de ponderación <i>Loading</i> (w_a)	Uninformative Variables Eliminación por PLS (UVE-PLS)	Algoritmo Genético
Coefficientes de regresión de PLS (β)	Análisis de permutación subventana junto con PLS	Monte-Carlo UVE-PLS
Proyección de la importancia de las variables (VIP)	<i>Backward</i> eliminación de variables de PLS Procedimiento de eliminación regularizado iPLS	

3.3.2. Índice de proyección de la importancia de las variables (VIP)

El índice VIP es una herramienta de PLS que sirve como filtro de las variables y selecciona aquellas de mayor relevancia del modelo, como una medida de la importancia de cada variable explicativa o predictora. Por lo tanto, con el fin de seleccionar las variables relevantes del proceso, los ingenieros de procesos deben tener cuidado

al interpretar los parámetros de regresión como RMSE, R^2 y otros (Mehmoed et al., 2012). Un criterio muy utilizado para selección de variables es un índice $VIP > 1$. Indica que de toda la población, existen variables relevantes y que las variables irrelevantes no se consideran en la predicción de esta forma que puede mejorar el modelo de predicción (Chong y Jun, 2005).

La idea detrás de esta medida es acumular la importancia de cada variable j siendo reflejada por w de cada componente. El v_j medida VIP se define como (Mehmoed et al., 2012):

$$v_j = \sqrt{p \sum_{a=1}^A \left[SS_a \left(w_{aj} / \|w_a\|^2 \right) \right] / \sum_{a=1}^A (SS_a)}$$

Donde SS_a es la suma de cuadrados que se explica por el componente a . Por lo tanto, los pesos v_j es una medida de la contribución de cada variable en función de la varianza explicada por cada componente en el PLS $(w_{aj} / \|w_a\|)^2$ que representa la importancia de la variable j th. La varianza explicada por cada componente puede ser calculada por la expresión $q_a^2 t'_a t_a$, el v_j , que puede ser alternativamente expresada como:

$$v_j = \sqrt{p \sum_{a=1}^A \left[(q_a^2 t'_a t_a) \left(w_{aj} / \|w_a\| \right)^2 \right] / \sum_{a=1}^A (q_a^2 t'_a t_a)}$$

Variable j se puede eliminar si $v_j < u$ para algún umbral definido por el usuario $u \in [0, \infty)$. En general se acepta que una variable se debe seleccionar si $v_j > 1$, pero un umbral adecuado entre 0.83 y 1.21 se puede producir más variables relevantes. Además, la importancia de cada variable puede, si se prefiere, se expresa como un porcentaje (Mehmoed et al., 2012).

3.3.3. Intervalo de PLS (iPLS)

El PLS intervalo (IPL) está especialmente diseñado para la selección de variables, donde estas se divide en subintervalos más

pequeños con la misma distancia. A continuación, un regresión PLS se ajusta en cada sub-intervalo. Se selecciona el sub-intervalo que tenga el más pequeño error de predicción. Los sub-intervalos seleccionados también se pueden optimizar incluyendo o eliminando de nuevo variables (Mehmood et al., 2012). Los modelos de regresión se dejan en manos de procedimientos más o menos automáticos. Los procedimientos más usuales son los siguientes métodos: hacia atrás (*Backward*), hacia adelante (*Forward*) y paso a paso (*Stepwise*)

3.4. Método de la pendiente para obtener la capacidad antioxidante

En el desarrollo de la técnica lengua electrónica voltamétrica para determinar la capacidad antioxidante de frutas y plantas se ha empleado el método estadístico de la pendiente de Liteanu et al. (1976). El método de la pendiente consiste en calcular el valor extremo (δ) que es igual a la mitad de la anchura del límite de confianza (figura 22) dentro de la linealidad de la curva de predicción establecida por el modelo matemático de predicción, siguiendo el criterio de la prueba *t-student*. El δ es la diferencia entre el experimental y el calculado.

$$|E_{AAexp} - E_{AAc}| = \delta \quad (1)$$

Donde “ E_{AAexp} ” es el valor experimental y “ E_{AAc} ” es valor calculado.

El valor calculado se obtiene por una regresión de mínimos cuadrados de los valores comprendidos dentro de la linealidad.

$$E_{AAc} = E_{AAo} + b \cdot f_c \quad (2)$$

Donde; “ f_c ” es el factor de concentración promedio dentro de la linealidad, “ b ” es la pendiente y “ E_{AAo} ” es el intercepto.

Por lo tanto, la determinación de la capacidad antioxidante se expresa como: $E_{AAc} \pm \delta$

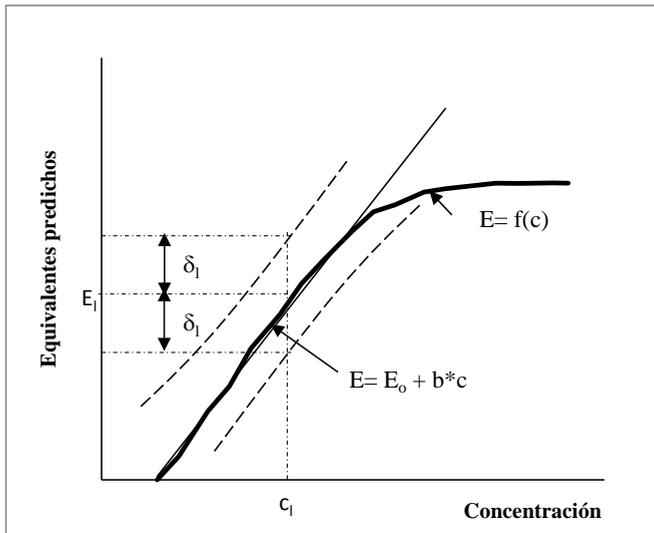


FIGURA 22. Esquema del procedimiento estadístico del método de Liteanu et al., (1976).

Este método ha sido utilizado por autores como Locatelli y Torsi (2001 y 2003) los cuales lo aplicaron para la determinación de metales pesados en el medio ambiente, así como en alimentos. En ambos estudios la técnica utilizada fue la voltamétrica y el método de la pendiente se mostró muy válido para la cuantificación.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Hamid, R. and Newair, E. (2011). Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 657: 107-112.
- Akter, S., Oh, S.; Eun, J.B. and Ahmed, M. (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*myrciaria dubia*) fruit: A review. *Food Research International*. 44: 1728-1732.
- Alcañiz, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el campo agroalimentario. Departamento de electrónica. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Alcañiz, M., Vivancos J., Masot, R., Ibañeza, J., Raga, M., Martínez-Mañez, R. and Soto, J. (2012). Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 111: 122-128.
- Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M. and Hassan, F.A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*. 5(4): 1542-1553.
- Annunziata, A. and Vecchio, R. (2011). Short communications Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*. 3: 223-228.
- Arias-Rodríguez, R.; Toma-Zárate, J.; Aguilar-Felices, E.; Ramirez-Roca, E.; Shimabuku-Azato, R. y Suárez-Cunza, S. (2012). Neuroprotección del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicalyx* 'wayra muña' en un modelo animal de hiperoxia e hipoxia-isquemia. *An. Fac. Med. V. 73 n.3*. Lima. Perú.

- Awika, J.M., Rooney, LL.W., Wu, X., Prior, R.L. and Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6657-6662.
- Baldeón, E.O., Alcañiz, M., Masot, R., Fuentes, E.M., Barat, J.M. Grau, R. (2015). Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control.* 54: 181-187.
- Banerjee, R.; Tudu, B.; Shaw, L.; Jana, A.; Bhattacharyya, N. and Bandyopadhyay, R. (2012). Instrumental testing of tea by combining the responses of electronic nose and tongue. *Journal of Food Engineering.* 110: 356-363.
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M. and Ferreira, I. (2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry.* 111: 61-66.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- Bruno, M., Savona, G., Piozzi, F., De la Torre, M. Rodríguez, B. and Marlier, M. (1991). Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeri* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry.* 30(7): 2339-2343.
- Brack A. (1999). *Diccionario Enciclopédico de las Plantas Útiles del Perú.* CBC. Cuzco, Perú.
- Batista, J.M. y Martínez, M. (1989). *Análisis Multivariante. Análisis en Componentes Principales.* Colección. ESADE. Editorial Hispano Europea, S.A. Barcelona. España.

- Bountagkidou, O., van der Klift, E.J.C., Tsimidou, M.Z., Ordoudi, S.A. and van Beek, T.A. (2012). An on-line high performance liquid chromatography-crocin bleaching assay for detection of antioxidants. *Journal of Chromatography A.*, 1237: 80-85.
- Cosio, M.S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chemistry.* 97: 725-731.
- Campo, I. (2013). Sensores electroquímicos tipo lengua electrónica voltamétrica aplicados al control medioambiental y a la industria alimentaria. Departament de química. Universitat Politècnica de València.
- Campos, I.; Bataller, R.; Armero, R.; Gandia, J.M.; Soto, J.; Martín-Mañez, R. and Gil-Sánchez, L. (2013). Monitoring grape ripeness using a voltammetric electronic tongue. *Food Research International*: 1369-1375.
- Campos, I., Masot, R., Alcañiz, M., Gil L., Soto J., Vivancos J. L., García-Breijo E., Labrador R. H., Barat J. M. and Martínez-Mañez, R. (2010). Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 149: 71-78.
- Campos. I.; Alcañiz, M., Aguado. D., Barat. R., Ferrer, J., Gil, L., Marrakchi, M., Martínez-Mañez, R., Soto, J. and Vivancos, J.L. (2012). A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Reserch.* 46: 2605-2614.
- Carhuapoma, M. (2007). Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña. Universidad nacional mayor de san marcos. Facultad de farmacia y bioquímica. Lima - Perú

- Castro, J.C. (2009). Expresión de genes que codifican enzimas de la vía biosintética Smirnov-Wheeler y su relación con la concentración de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh “camu camu”. Iquitos-Perú. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. PROCYT-CONCYTEC.
- Catalano, S., Cioni, P., Panizzi, L. and Morelli, I. (1998). Antimicrobial activity of extracts of *Mutisia acuminata* var. *acuminata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 59(3): 207-209.
- Cerretani, L. and Bendini, A. (2010). Chapter 67: Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. p. 625-635.
- Cetó, X., Apetrei, C., Del Vallea, M. and Rodríguez-Méndez, M.L. (2014). Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltammetric e-tongue with an optimized sensor array. *Electrochimica Acta*. 120: 180-186.
- Chevion, S., Roberts, M. A. and Chevion, M. (2000). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(6): 860-870.
- Chirinos, R., Huamán, M., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R. and Campos, D. (2011). Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*. 128: 711-716.
- Chirinos, R., Galarza, J., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R. and Campos, D. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*. 120: 1019-1024.

- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y. and Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*. 47: 145-152.
- Chong, I. and Jun, Ch. (2005). Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 78: 103-112
- Conde-Martínez, N., Sinuco, D. and Osorio, C. (2014). Chemical studies on curuba (*Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey). *Food Chemistry*. 157 (15): 356-363.
- Cruz, D., Barroso, M.F., Alves, R.C., González-García, M.B., Ramalhosa, M.J., Duarte, A.J., Oliveira, M.B. and Delerue-Matos, C. (2015). Chapter 106: Assay of Total Antioxidant Capacity of Coffee: Use of a DNA-Based Biosensor. *Coffee in Health and Disease Prevention*. p. 963-970.
- Drew, B. and Sytsma, K. (2013). The South American radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171 (1): 171-190.
- De la Cruz, H., Vilcapoma, G. and Cevallos, P.A. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *J. Ethnopharmacol.* 111, 284-294.
- Díaz, L.E., Duarte de Prato, A. y Marcos, A. (2008). Alimentos nutraceuticos, suplementos dietéticos y plantas medicinales. En: *Alimentos Funcionales. Aproximación a una nueva alimentación*. Editor: Barberá, J.M. Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios. Editorial: Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Madrid. España.
- Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M. y Weigend, M. (2009). Hojas botánicas: Camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh). Lima. Perú.

- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. y Weigend, M. (2012). Hoja botánica: Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.). Lima. Perú.
- Du, J., Cullen, J.J. and Buettner, G.R. (2012). Review Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1826: 443-457.
- Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Pecio, Ł., Różyło, R., Świeca, M., Krzykowski, A. and Rudy, S. (2015). Ground green coffee beans as a functional food supplement - Preliminary study. *LWT - Food Science and Technology*. 63: 691-699.
- Encina, C. y Carpio, L. (2011). Máxima retención de ácido ascórbico, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el néctar de tumbo. Universidad de Lima. Lima. Perú. *Ingeniería Industrial*, núm. 29, pp. 225-245.
- Encina, C.; Ureña, M. y Repo-Carrasco, R. (2012). Determinación de compuestos bioactivos del aguaymanto (*Physalis peruviana*, Linnaeus, 1753) y de su conserva en almíbar maximizando la retención de ácido ascórbico. ECIPERU. Lima. Perú.
- Escorza, Q., Angélica, M., Salinas, C. y Victor, J. (2009). La Capacidad antioxidante total. Base y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. 28(3): 89-101.
- Fernández-Pachón, M^a S., Villaño, D., Troncos, A.M^a y García-Parrilla, M^a C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 56(2): 110-122.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G. and Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1721: 174-184.

- Flores, D.A., Sandoval, J., Valdivia, B. y Aguilar, C.N. (2010). Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos. *Investigación y Ciencia de la Universidad autónoma de Aguascalientes*. 49(20-25): 20-25.
- Food and Drug Administration (FDA). (2000). Department of Health & Human Services. Memorandum. Subject: 75-Day Premarket Notification for Dietary Ingredients.
- Gay, M., Apetrei, C., Nevares, I., Del Alamo, M., Zurro, J., Prieto, N., De Saja, J. and Rodríguez-Mendez, M. (2010). Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. *Electrochimica Acta* 55: 6782-6788.
- Güney, G., Yildiz, G., Capan, A. and Ozturk, T. (2010). Evaluation of the electrochemical properties of 3-hydroxyflavone using voltammetric methods. *Electrochimica Acta*. 55(9): 3295-3300.
- Gualdrón, O. (2006). Desarrollo de diferentes métodos de selección de variables para sistemas multisensoriales. Escola Tècnica Superior D' Enginyeria. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona. España.
- Gonzales, M.; Baldeón, S.; Beltrán, H.; Jullian, V. and Bourdy, G. (2014). Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). *Journal of Ethnopharmacology*. 155(2): 1093-1117.
- Haytowitz, D.B. and Bhagwat, S. (2010). USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of Selected foods, Release 2. Nutrient Data Laboratory, Beltsville 3 Human Nutrition Research Center (BHNRC), Beltsville, MD.

- Habibi, B., Jahanbakhshi, M., Hossein, M. and Pournaghi-Azar, M. (2011). Differential pulse voltammetric simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid using single-walled carbon nanotube-modified carbon-ceramic electrode *Analytical Biochemistry*. 411: 167-175.
- Halvorsen, B.L. and Blomhoff, R. (2011). Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods. *Food Chem.* 127: 761-768.
- Hammond, G., Fernández, I., Villegas, L. and Vaisberg, A. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *Journal of Ethnopharmacology*. 61(1): 17-30.
- Hatami, T.; Rahimi, M.; Veggi, P.; Porillo-Prieto, R. and Meireles, M.A. (2011). Near-critical carbon dioxide extraction of khoa (*Satureja boliviana* Benth Briq) using ethanol as a co-solvent: Experiment and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*. 55 (3): 929-936.
- Hoyle, C.H.V. and Santos, J.H. (2010). Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. *International Food Research Journal*. 17: 937-946.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships Reviews. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572-584.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J. and Ferreira, I. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*. 173: 501-513.
- Hua, J., Lin, B., Bing, N. and Qun, H. (2013). Sensitive detection of gallic acid based on polyethyleneimine-functionalized graphene modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B*. 186: 84- 89.

- Isabelle, M., Lee, B.L., Lim, M.T., Koh, W.P., Huang, D. and Ong Ch, N. (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chem.* 120: 993-1003.
- Ivarsson, P., Holmin, S., Höjer, Krantz-Rülcker, C., Winquist, F. (2001). Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators B.* 76: 449-454.
- Juárez, B. y Mendiondo, M. (2003). Flavonoids from *Mutisia acuminata*. *Pharmaceutical Biology.* 41(4): 291-292.
- Janeiro, P. and Oliveira, A. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta.* 518 (2): 109-115.
- Jiang, Q. (2014). Review Article Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine.* 72: 76-90.
- Keyrouz, R., Abasq, M:L., Bourvellec, C., Blanc, N., Audibert, L., ArGall, E. and Hauchard, D. (2011). Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry.* 126: 831-836.
- Konczak, I. and Roulle, P. (2011). Nutritional properties of commercially grown native Australian fruits: lipophilic antioxidants and minerals. *Food Res. Int.* 44: 2339-2344.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Nithyanandam, R. (2011). A review on the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89: 217-233.
- Leake, L.L. (2006). Electronic noses and tongues. *Food Technology.* 60(6): 96-102.
- Liteanu, C., Popescu, L.C. and Hopârtean, E. (1976). Estimation of the linearity domain limit for the ion-sensitive membrane electrode function. *Analytical Chemistry,* 48 (13).

- Litescu, S.C., Eremia, S. and Radu, G.L. (2010). Chapter 18: Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Advances in Experimental Medicine and Biology*. 698: 241-249.
- Litescu, S.C., Eremia, S.A.V., Tache, A., Vasilescu, I. and Radu, G.L. (2014). Chapter 25: The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. p. 245-251.
- Lizarraga, E. y Abdala, L. (2004). Compuestos fenólicos mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense*. 23(2): 198-200.
- Locatelli, Cl. and Torsi, G. (2003). Analytical procedures for the simultaneous voltammetric determination of heavy metals in meals. *Microchemical Journal*, 75, 233-240.
- Locatelli, Cl. and Torsi, G. (2001). Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 509: 80-89.
- López, J.E. (2006). Propiedades físico-mecánicas del Aliso, *Alnus acuminata* HBK, proveniente de Chalaco-Piura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú.
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M. and Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Res. Int.* 44: 530-536.
- Malyszko, J. and Karbarz, M. (2006). Electrochemical oxidation of trolox and a-tocopherol in acetic acid: A comparative study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 595: 136-144.

- Martens, H. and Martens, M. (2001). *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mehmood, T., Liland, K.; Snipen, L. and Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 118: 62-69.
- Mello, L. D. and Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food chemistry*. 77: 237-256.
- Mier, H. y Cáez, G. (2011). Contenido de polifenoles, carotenos y capacidad antioxidante en frutos de uchuva (*Physalis Peruviana*) en relación a su estado de maduración. Universidad de la Sabana. Bogotá. Colombia.
- Mongay, C. (2005). *Quimiometría*. PUV. Universitat de València. España.
- Mu, S. (2003). The electrocatalytic oxidation of gallic acid on polyaniline film synthesized in the presence of ferrocene phosphonic acid. *Synthetic Metals*. 139: 287-294.
- Murcia, M. A., Vera, A. M., Martínez-Tomé, M. y Frega, N. (2003). Sustancias antioxidantes presentes en los alimentos. Acción, dosis y su eficiencia en la promoción de la salud. En: *Nutrición y salud. Nuevos Alimentos para nuevas necesidades*. Tomo 3. Editor: Pinto, J.A. Instituto de Salud Pública. Madrid. España.
- National Research Council (NRC). (1989). *Lost Crops of the Incas: Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. National Academy Press, Washington D. C.
- Panizza, M. and Cerisola, G. (2009). Electrochemical degradation of gallic acid on a BDD anode. *Chemosphere*. 77: 1060-1064.

- Peters, Ch. y Vásquez, A. (1986). Estudios Ecológicos de Camu camu (*Myrciaria dubia* L.) Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. En: Acta Amazónica. 16 -17 (Número único). Brasil. pp. 161-174.
- Pielke, R. A., (1984). Mesoscale Meteorological modeling. 1st edition Academic Press, New York, N.Y., 612 pp.
- Pinedo, M., Riva, R., Rengifo, E., Delgado, C., Villacrez, J., Gonzales, A., Inga, H., López, A., Farroñay, R., Vega, R. and Linares, C. (2001). Production System for Camu-Camu in Levees). Research Institute of the Peruvian Amazonia. Program Integrated Management of the Fores.
- Pokorny J., Yanishlieva, N. y Godon, M. (2001). Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- Prior, R. and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Biology & Medicine. 27(11/12): 1173-1181.
- Puente, L.; Pinto-Muñoz, C.; Castro, E. and Corés, M. (2011). Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International 44: 1733-1740.
- Ramos, E., Romeo, J., Wärnberg, J. y Marcos, A. (2008). ¿Más que alimentos?. En: Alimentos Funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Editor: Barberá, J.M. Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios. Editorial: Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Madrid. España.
- Re. R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med.. 26. 9/10. 1231-1237.

- Rivero, O. (2012). Sensores electroquímicos de ácido ascórbico basados en electrodos modificados con polianilinas autodopadas. Instituto Universitario de Materiales. Universidad de Alicante. España.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds reviews. *Trends in plant science*. 2(4): 152-159.
- Repo, R. y Encina, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev. Soc Quím Perú*. 74(2):108-124.
- Šeruga, M.; Novak, I. y Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 124 (3): 1208-1216.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H., (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem*. 53: 7749-7759.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F. and Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazon region. *Food Chem*. 101: 1012-1018.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. and Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite* 51: 456-467.
- Skoog; D., Holler; J. y Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. Sexta edición. CENGAGE Learning. México.
- Smirnoff, N. (2005). Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd.

- Vasco, C., Ruales, J. and Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 111: 816–823.
- Villegas, L., Fernández, I., Maldonado, H., Torres, R., Zavaleta, A., Vaisberg, A. and Hammond, G. (1997). Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. *Journal of Ethnopharmacology.* 55(3): 193-200.
- Vignale, N. y Gurni, A. (1999). Estudio Comparativo de la Epidermis Foliar de tres Especies de Mutisia (Asteraceae) de la Puna y Prepuna de Jujuy (Argentina). *Acta. Farm. Bonaerense.* 18(1): 37-40.
- Vila. R., Vercheval, C., Carhuapoma, M., Casanova, J. and Cañigual, S. (2009). Composition of the essential oil from aerial parts of *Lepechinia meyenii*. *Planta Medica.* Vol. 5, No. 9.
- Vilela, D., González, M.C., Escarpa, A. (2015). Nanoparticles as analytical tools for in-vitro antioxidant-capacity assessment and beyond. *Trends in Analytical Chemistry.* 64: 1-16.
- Villachica, H. (1996). Desarrollo de Tecnología para producción sostenible de especies Autóctonas. Programa Regional de Promoción de la Producción sostenible y utilización de frutas y hortalizas Amazónicas. Estrategias y acción. Anexo 1. Documentos técnicos.p.14-18.
- Winqvist, F., Krantz-Rülcker, C., Wide, P. and Lundströma, I. (1998). Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry. *Measurement Science and Technology* 9: 1937-1946.
- Wise, B.; Gallagher, N.; Bro, R.; Shaver, J.; Winding, W. and Koch, R. (2006). *Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo.* Eigenvector Research, Inc. Wenatchee. USA.

- Wonsawat, W. (2014). *International Journal of Biological. Food, Veterinary and Agricultural Engineering*. 8(6): 615-617.
- Yapuchura, R. (2010). Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) e inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze). Escuela de post grado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú.
- Zanwar, A. Badole, S., Shende, P., Hegde, M. and Bodhankar, S. (2014). Chapter 80-Role of Gallic Acid in Cardiovascular Disorders. *Polyphenols in Human Health and Disease. Volume 2: Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer*: 1045-1047.

2. OBJETIVOS

El aumento de la esperanza de vida, y el deseo de gozar de una mejor calidad de vida, han contribuido al incremento del interés de la sociedad en consumir alimentos que nos aporten beneficios para la salud, como por ejemplo la presencia de compuestos antioxidantes, muchos de los cuales están presentes en frutas y plantas.

Perú, país de América del Sur, es reconocido como uno de los 12 países del planeta que pertenece al grupo de naciones que reúnen un 70% de la biodiversidad mundial. Las condiciones climatológicas y geográficas únicas de las zonas andinas de estos países han hecho que se desarrollen un gran número de especies y variedades vegetales endémicas y con propiedades funcionales como las antioxidantes.

Si bien existen diversos métodos que aportan información válida acerca de la capacidad total antioxidante de sustancias, la utilización de la lengua electrónica, basada en la voltimetría de pulsos, podría ser una alternativa a estos métodos. Así dado que la lengua electrónica es una técnica en la que coexisten diferentes electrodos, la interacción entre estos podría describir esta cualidad independientemente de la sustancia que la generase, si bien para ello es necesario desarrollar y obtener modelos de respuesta voltamétrica que poder aplicar a tal fin. Los equipos similares existentes, solo trabajan con 2 a lo máximo 3 electrodos de trabajo, y por tanto están dirigidos a analizar un compuesto en cuestión. Con la utilización de esta lengua electrónica se pretende evaluar los compuestos presentes en las muestras que estén generando la actividad antioxidante y expresarlos en base al comportamiento electrónico de patrones. Para ello es necesario evaluar las variables de medida, tales como la variable eléctrica potencia, la variable electrodo y las variables disolución; concentración, pH, desoxigenación, a fin de obtener los modelos de predicción (patrón electroquímico resultante) de la capacidad antioxidante de diferentes patrones, los cuales sean utilizados para predecir la capacidad antioxidante de diferentes extractos de plantas y zumos de frutas.

Es por ello que en la presente Tesis Doctoral se ha establecido el siguiente objetivo:

OBJETIVO

Desarrollar el método basado en la técnica lengua electrónica voltamétrica para la determinación de la capacidad antioxidante total de extractos de plantas y frutas peruanas

Para tal fin se han establecido cuatro objetivos específicos los cuales conforman la estructura de la tesis y que se detallan a continuación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo 1. Efecto de variables sobre la medida voltamétrica

El objetivo del estudio es cuantificar la posible incidencia de diferentes factores sobre la respuesta voltamétrica. Los factores a evaluar son la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas dentro de una misma medición, la presencia de O₂ en la disolución y del pH de esta.

Capítulo 2. Patrones antioxidantes. Modelos de predicción

El objetivo del estudio es evaluar las respuestas voltamétricas de cuatro de los principales patrones antioxidantes utilizados por los métodos químicos de referencia, dos a pH neutro de 7.4 (trolox y catequina) y dos a pH ácido de 4.8 (ácido ascórbico y ácido gálico), con la finalidad de obtener patrones o modelos matemáticos de predicción que puedan ser aplicados en la determinación de la capacidad antioxidante de extractos de plantas y frutas.

Capítulo 3. Capacidad antioxidante de frutas peruanas

El objetivo del estudio es establecer si la lengua electrónica voltamétrica, a través de los modelos matemáticos de predicción definidos en el capítulo 2 (Patrones antioxidantes. Modelos de predicción), es capaz de determinar la capacidad antioxidante de las frutas peruanas camu-camu, tumbo y aguaymanto, así como del kiwi, con el procesamiento mínimo.

Capítulo 4. Capacidad antioxidante de extractos de plantas andinas

El objetivo del estudio es establecer si la lengua electrónica voltamétrica, a través de los modelos matemáticos de predicción definidos en el capítulo 2 (obtención de los modelos de predicción), es capaz de determinar la capacidad antioxidante de extractos de las plantas andinas inca muña, aliso, chinchilcoma, pachasalvia, así como de té verde, con el procesamiento mínimo.

CAPITULO 1

***EFECTO DE VARIABLES SOBRE LA MEDIDA
VOLTAMÉTRICA***

INTRODUCCIÓN

Una celda electroquímica básica se compone de dos electrodos inmersos en una disolución. Se aplica una tensión externa V entre dichos electrodos, bajo determinadas circunstancias, se producirá la circulación de una corriente eléctrica I derivada de los procesos electroquímicos que ocurren en la interfaz electrodo-disolución de cada uno de ellos. El origen de esta corriente puede ser la transferencia de carga debida a reacciones químicas (procesos farádicos) o la reorganización de la carga en la interfaz (procesos no farádicos). Una celda electroquímica es, por tanto, un sistema complejo en el que ocurren simultáneamente diversos procesos y en el que distintas variables se interrelacionan. El objetivo de las técnicas electroquímicas de medida es la determinación de alguna de estas variables a partir del control y/o la medida de otras. Por ejemplo, en voltametría se aplica un determinado potencial al electrodo de trabajo y se mide la corriente que circula por el mismo con el fin de determinar la concentración de alguna de las especies electroactivas presentes en la disolución (Alcañiz, 2011).

Varios son los factores que pueden hacer que la cuantificación electroquímica de reacciones, como las redox, por voltametría de pulsos sea incorrecta. De entre estos factores se podrían destacar la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas dentro de una misma medición, la presencia de O_2 en la disolución, así como el pH de esta.

Las técnicas de voltametría de barrido pueden ser dinámicas o estacionarias (aquellas en las que la sustancia a medir no fluye ni tampoco se produce el movimiento de los electrodos). En las primeras, la difusión hacia la superficie del electrodo de las especies que deben reaccionar es facilitada por el propio movimiento, minimizándose la existencia de elementos que dificultan la llegada de las especies a la superficie del electrodo como son las moléculas e iones fisisorbidos o los residuos de las reacciones ya producidos durante los primeros estadios de la medición (aunque el tiempo de esta pueda ser pequeño, cercano a los 20 ms). En las estacionarias, estos factores han de ser considerados, además de también ser considerado la necesidad de tener que realizar una limpieza mecánica de la superficie de contacto de los electrodos entre medidas, dado que los residuos depositados en la superficie

de contacto del electrodo con la solución han de ser eliminados para que en la siguiente medición, ésta presente la misma superficie de reacción (Alcañiz, 2011). Pero en cambio las estacionarias presentan una gran ventaja, pueden aplicarse sobre superficies sólidas y dado que el equipo que se está desarrollando también está pensado para poder ser aplicado a sólidos, se descartó el trabajar con sistemas dinámicos.

La presencia de oxígeno en el entorno electrodo y disolución de una celda electroquímica trae consigo un mecanismo de reacción en la superficie del electrodo produciendo su corrosión. Este fenómeno es muy acentuado en electrones de metales no nobles. Es por ello que en una lengua electrónica la presencia del oxígeno soluble en la solución a medir la hace más sensible durante la determinación electroquímica. Además, es un factor importante a controlar en la determinación de capacidad antioxidante de agentes reductores, por lo que se sabe que disminución de una corriente de oxígeno mediante técnicas de burbujeo con nitrógeno y otras técnicas trae consigo un aumento de la capacidad antioxidante (Rodríguez-Mendez et al., 2014, Korotkova et al., 2004)

La velocidad de la reacción electroquímica es dependiente de la concentración de protones por lo que la correspondiente respuesta amperométrica es afectada por el pH de la disolución a evaluar dada la variación en iones H^+ . Así el valor absoluto de la respuesta amperométrica aumenta con el incrementó del pH (Ruffien-Ciszak et al., 2006). En la voltametría es imprescindible que la solución esté muy bien amortiguada, es decir, que no sea alterada el pH de la solución en el proceso de reacción con el electrodo, para obtener respuestas eléctricas reproducibles (Skoog et al., 2008). Este fenómeno ayuda a que pH se pueden evaluar mejor voltaméricamente las reacciones de estudio. Para ello son necesarios estudios a diferentes pH utilizando tampones. Estas soluciones amortiguadoras van a ser las soluciones base, punto importante de control en la técnica lengua electrónica debido a que con ella se preparan las soluciones químicas a evaluar y estas deben ofrecer buena estabilidad durante la medición electroquímica.

OBJETIVOS

Cuantificar la posible incidencia de diferentes factores sobre la respuesta voltamétrica. Los factores a evaluar son la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas dentro de una misma medición, la presencia de O₂ en la disolución y la influencia del pH de esta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las soluciones

Dos de los patrones que se utilizan como referencia en los métodos químicos de determinación de la capacidad antioxidante fueron los que se emplearon en el presente estudio. Estos fueron: Trolox (6 - hidroxil- 2, 5, 7, 8 - tetrametilcromo - 2 - ácido carboxílico) el cual es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol (vitamina E) con un alto poder antioxidante y Ácido ascórbico o vitamina C. Las sales utilizadas para preparar el buffer o solución base fueron di-Potasio hidrogenofosfato trihidrato y Potasio dihidrogenofosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), obteniendo así un buffer fosfato.

Para el estudio de la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas y del efecto de la presencia de O₂ en las soluciones, se prepararon diluciones a concentraciones entre los 0.25 a 5 mM de una solución de trolox en buffer fosfato 0.01 M pH 7.4 (Milardovic et al, 2007; Chevion et al., 2000 y Psotová et al., 2001).

Para el estudio del efecto del pH de la solución a medir, se utilizaron diluciones de ácido ascórbico, en buffer fosfato a 0.01 M, de 0.25 hasta 10 mM ajustadas a pH 7.4 y a 4.8. Para el ajuste del pH se usaron soluciones de HCl y NaOH.

La utilización del buffer fosfato, además de permitir asegurar un pH determinado ayudó a tener una solución electrolítica con la posibilidad que la dilución más diluida pudiese presentar la suficiente carga de electrolitos

que asegurara el paso de corriente (Milardovic et al, 2007; Chevion et al., 2000 y Psotová et al., 2001).

Estudio de la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas, para una misma medición

Para la realización de este estudio se realizaron dos tipos de mediciones, unas en las que las soluciones a medir no estaban en agitación y otras en las que las soluciones estaban en continua agitación. Para ello las soluciones fueron introducidas dentro de un recipiente opaco midiéndose la respuesta voltamétrica de estas mediante la lengua electrónica. Tras la limpieza de los electros las soluciones fueron puestas sobre un agitador (IKA RCT Classic, Alemania) que aplicó una agitación a 200 rpm mientras se medía voltaméricamente. Mediante la agitación se pretende desplazar aquellos productos generados por la reacción que podrían dificultar las sucesivas reacciones que aun pudiesen darse.

Estudio del efecto de la presencia de O₂ en las soluciones

Con la finalidad de evaluar la incidencia del O₂ presente en las soluciones sobre las respuestas voltamétricas, estas fueron medidas voltaméricamente tras su preparación y posteriormente tras un proceso de burbujeado con N₂ por espacio de 2 minutos, que facilita el desplazamiento del O₂ disuelto en las soluciones (Ijeri et al., 2001, Sousa et al., 2004, Abdel-Hamid y Newair, 2013).

Estudio del efecto del pH de la solución

Dado que la capacidad antioxidante de gran cantidad de frutas está ligada a la presencia de ácidos como son el ascórbico, málico, cítrico, etc (Chirinos et al., 2010, Scherer et al., 2012, Hernández et al., 2009, Pande y Akoh, 2010) se planteó el estudio de evaluar la incidencia del pH sobre las respuestas voltamétricas. Para ello se usaron soluciones de ácido ascórbico a dos pH diferentes (7.4 y 4.8) a las que se les midió su potencial redox usando un potenciómetro (pH Meter Basic 20+. CRISON, España) a 21 °C. Posteriormente las soluciones fueron evaluadas voltaméricamente mediante la lengua electrónica.

Equipo voltamétrico. Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV)

El equipo de medida utilizado fue la lengua voltamétrica descrita en la introducción. En este caso el tren de pulsos voltamétricos a utilizar, es decir la aplicación de los pequeños diferenciales de corrientes cuyo nivel va aumentando o disminuyendo en función del patrón de pulsos establecido, fue uno genérico para los 8 electrodos, dado que no se conoce cuál debería ser el mejor potencial a aplicar a cada uno de los electrodos empleados y para cada una de las sustancias en estudio. Será mediante herramientas estadísticas como se obtendrán las respuestas voltamétricas que más información aporten para cada uno de ellos. Así se aplicó el tren de pulsos comprendido entre 900 y -850 mV. El tipo de pulso fue de amplitud corta (SAPV) de 20 ms por pulsos. Este tren tiene en total 22 pulsos, partiendo de un potencial inicial de 0 V (figura 1.1 A), y aumentando de forma progresiva mediante el incremento del potencial hasta llegar al potencial anódico máximo (0, 200, 500, 800 y 900 mV). Cuando alcanza este máximo, se invierte la dirección de barrido, hasta llegar al potencial catódico máximo (500, 300, 0, -50, -400, -450, -500, -600, -650, -800 y -850 mV), y se vuelve a aumentar hasta llegar al potencial inicial (-650, -600, -550, -400, -200 y 0 mV). El tren de pulsos fue aplicado a cada uno de los 8 metales (electrodos) que conforman la lengua. En cada uno de los pulsos el equipo realizó 45 medidas, lo que hizo un total de 990 medidas para cada electrodo, las cuales se realizaron hasta que la desviación media en las muestras a medir, para 5 repeticiones, fuese menor de 2.

Los datos obtenidos como intensidad de corriente (μA), puede ser representadas (sin ningún pre- tratamiento de los datos) en voltagramas con la finalidad de conocer cuál es el comportamiento de la corriente para los diferentes electrodos en función de potencial aplicado. En la figura 1.1 B se muestra como ejemplo un voltagrama de la respuesta voltamétrica promedio obtenida al aplicar la secuencia de pulso SAPV, sobre un electrodo de Au. En ella se observa una reacción de óxido-reducción (corriente farádica) a partir de tercer pulso y la señal de la corriente va aumentando al incrementar el potencial, llegando a un potencial máximo a los 800 mV, correspondiente al cuarto pulso, a partir de este punto la señal de la corriente decae.

Como se ha comentado en la introducción, con este tipo de equipo en el que no hay circulación de la solución a medir ni tampoco movimiento de los electrodos, entre cada una de las medidas, los electrodos tuvieron que ser limpiados mecánicamente con la finalidad de eliminar los residuos, compuestos formados durante la medición. Para ello primero los electrodos son pulidos mediante una lija de grano fino y tras ser lavados con agua destilada vuelven a ser pulidos con alúmina $0.05 \mu\text{m}$, siendo finalmente lavados con agua destilada y secados.

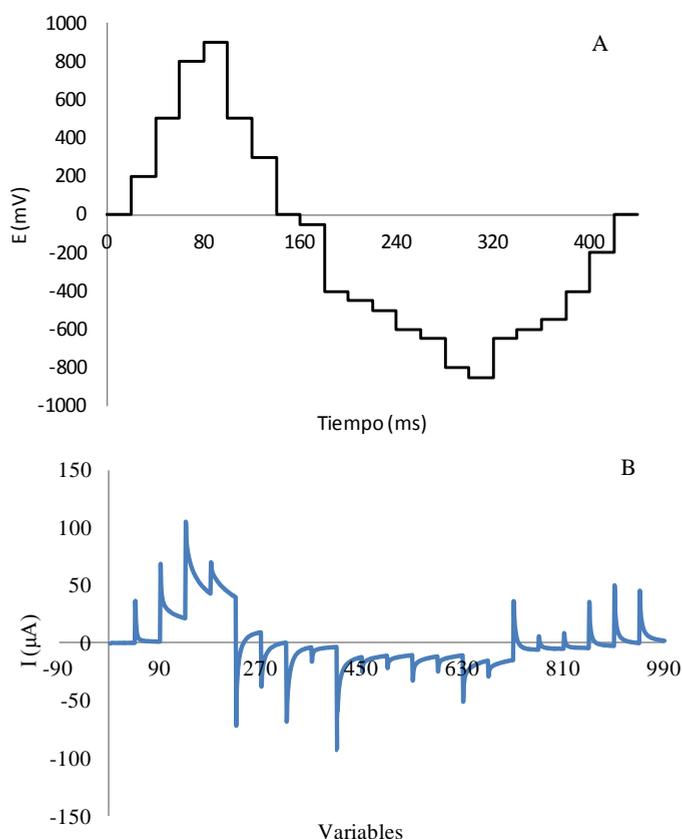


FIGURA 1.1. A) Tren de pulsos (SAPV) de amplitud aplicado a la LEV; B) Respuesta voltamétrica del electrodo de Au.

Análisis estadístico

Mediante la técnica y como consecuencia del tren de pulsos utilizado el volumen de datos que se genera es muy elevado. Si para una medición se obtienen un total de 39600 valores como consecuencia de los 45 valores por pulso * 22 pulsos por electrodo * 8 electrodos * 5 repeticiones por medición, estas han de ser evaluadas entre ellas por lo que hace necesario la utilización de técnicas estadísticas multivariantes, con el fin de establecer una clasificación de las mismas, se realizó un autoescalado a fin de ser normalizados. Así para el estudio se realizaron en primer lugar análisis de los componentes principales (PCA) el cual nos permite visualizar la posible discriminación espontánea de las medidas voltamétricas según el tipo de variable (agitación, gas, pH y dilución), así como la detección de posibles datos anómalos (outliers) cuyo comportamiento difiere del resto. En segundo lugar, con la finalidad de evaluar la incidencia de las variables (agitación, gas y pH) sobre la respuesta voltamétrica obtenida se hicieron análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) que maximizan la correlación entre variables independientes (señal de corriente) y dependientes (concentraciones de las diluciones evaluadas).

En todos los casos, para la generación de los modelos matemáticos de predicción, dos tercios de las muestras fueron utilizadas para la creación y cross-validación (CV) del modelo y el tercio restante para la validación (V) de este. La bondad de los modelos está dada por el error calculado a partir de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE), desviación BIAS y el coeficiente de regresión (R^2) tanto para el modelo, como para la cross-validación y validación (Ferrari et al., 2013 y Serranti et al., 2013). En la introducción se describe la generación de los modelos de calibración y predicción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas, para una misma medición

Las respuestas voltamétricas obtenidas para las diluciones de trolox con agitación (200 rpm) o sin esta (control) fueron analizadas mediante análisis de componentes principales (PCA). En la figura 1.2 se muestra la proyección de las dos primeras componentes. Como se puede apreciar no se generó ninguna discriminación espontánea en función del factor agitación. En cambio la componente 1, con un peso sobre la varianza del 62.95%, mostró una tendencia de las muestras a agruparse en función de la concentración de las diluciones analizadas, situándose las diluciones más concentradas en valores más negativos de la componente, lo que podría estar dando información sobre una posible relación entre la respuesta voltamétrica y la concentración de trolox.

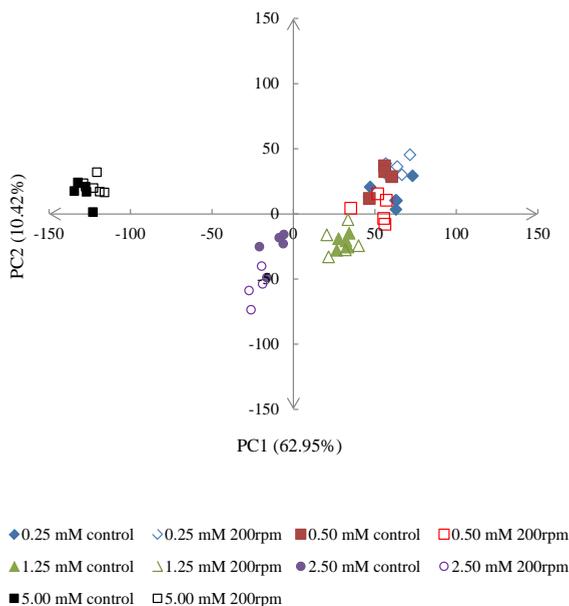


FIGURA 1.2. Análisis de PCA de las respuestas voltamétricas para las soluciones de trolox con (200 rpm) y sin agitación (control).

En base a este resultado de no discriminación, entre muestras con o sin agitación, se estableció que no es necesaria la aplicación de agitación con la finalidad de eliminar la incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas dentro de una misma medición, bien porque la intensidad de estas no es tan alta como para afectar las mediciones realizadas o bien porque la agitación no es capaz de reducirlas.

Estudio del efecto de la presencia de O₂ en las soluciones

La figura 1.3 muestra la proyección de las dos primeras componentes del análisis PCA realizado para las respuestas voltamétricas obtenidas para las soluciones con o sin gas N₂. Como se puede observar, si bien la componente 1 fue la que tuvo un mayor peso sobre la varianza (54.42%), fue la componente 2 (PC2=16.98%) la que discriminó espontáneamente las diluciones en función del gas, siendo las diluciones con gas situadas en los valores positivos de la misma. En cambio la componente 1, independientemente del factor gas mostró una tendencia hacia la agrupación de las muestras en función de la concentración, situándose las más concentradas (al igual que en el estudio anterior) en los valores negativos de la componente 1.

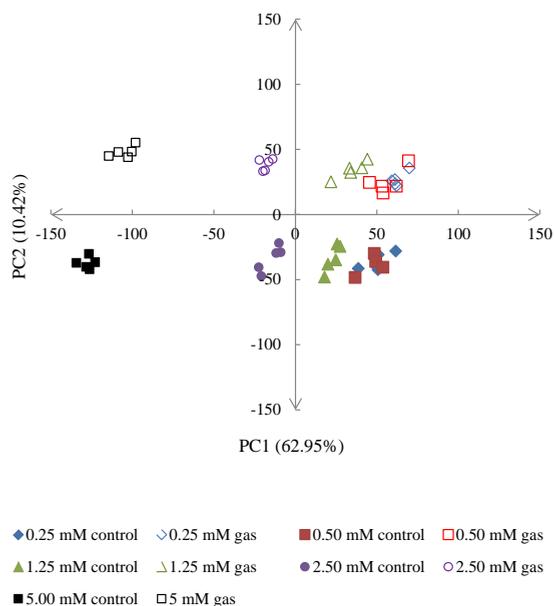


FIGURA 1.3. Análisis de PCA de las respuestas voltamétricas de las soluciones de trolox con y sin gas N_2 .

Con la finalidad de evaluar el efecto del burbujeado con N_2 con la posible relación existente entre la respuesta voltamétrica y la concentración de la disolución evaluada, se procedió en la construcción de un modelo matemático de predicción aplicando el método estadístico de regresión PLS. En la figura 1.4 se presenta el ajuste de los valores teóricos de concentración de trolox frente a los predichos por los modelos generados por las respuesta voltamétricas sin gas (A) y con gas (B) así como la recta $X=Y$. Como se puede observar, utilizando ambos modelos de predicción se obtiene un buen ajuste el cual queda reflejado por la bondad de los datos de estos que se presentan en la tabla 1.1. Para ambos modelos los valores de R^2 de predicción fueron del 99%.

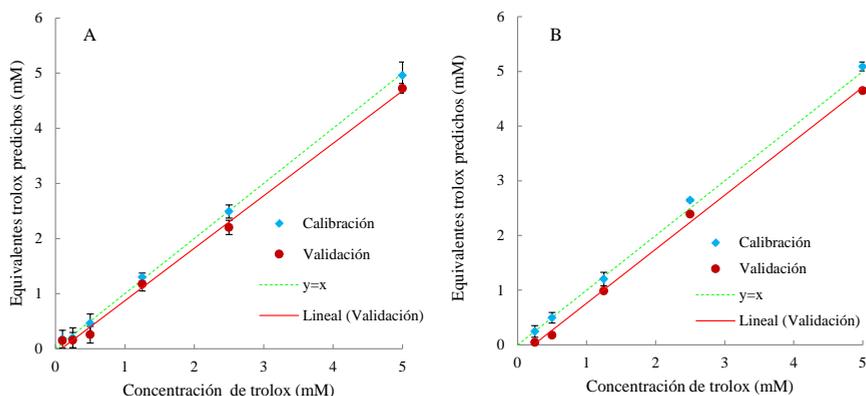


FIGURA 1.4. Ajuste de los valores teóricos de trolox frente a los predichos por los modelos generados a partir de la información voltamétrica obtenida con las soluciones sin gas (A) y con gas (B). - - - Línea de ajuste y — recta $y=x$.

TABLA 1.1. Parámetros de regresión PLS para el patrón trolox sin y con gas

Efecto	Parámetros	Calibración	Cros- validación	Validación
Sin gas	RMSE	0.152	0.191	0.224
	Bias	-0.001	-0.005	-0.154
	R ²	0.991	0.986	0.993
Con gas	RMSE	0.143	0.154	0.229
	Bias	0.001	0.004	0.169
	R ²	0.993	0.992	0.994

Aunque ambos modelos matemáticos generaron buenos ajustes, la variabilidad de la señal voltamétrica fue mayor cuando esta se obtuvo sin gas. Como puede observarse en la figura 1.5, en la que se muestran las desviaciones estándares para cada variables (cada uno de los pulsos de cada electrodo) para las soluciones sin gas (Fig. 1.5 A) y con gas (Fig. 1.5 B), y en la tabla 1.2 en la que se muestra el sumatorio de las desviaciones

estándares para las diluciones 0.25, 0.5 y 1.25 mM tanto para las soluciones sin y con gas, estas fueron mayores para las sin gas.

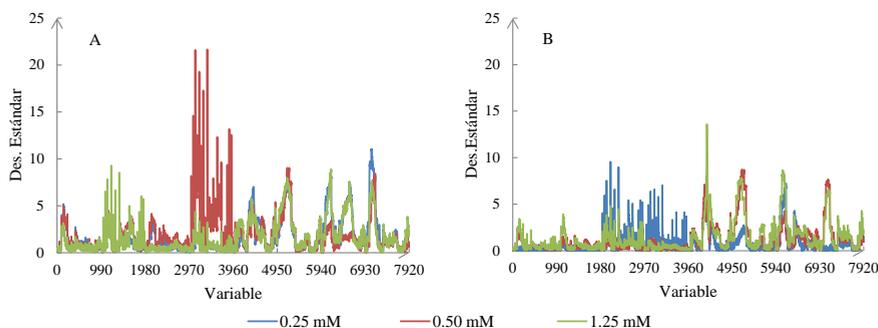


FIGURA 1.5. Curva de desviación estándar de las respuestas voltamétricas de las soluciones de trolox a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.25 mM, sin gas (A) y con gas (B).

TABLA 1.2. Sumatorio de las desviaciones estándares de las variables (pulso / electrodo) por efecto para las soluciones sin gas y con gas de ácido ascórbico.

Concentración	Sin gas	Con gas
0.25	13141.1	5973.8
0.50	14749.4	9071.9
1.25	12678.6	10801.9
Promedio	13523.1 ±1087	8615.9±2446

Estas mayores desviaciones observadas en las mediciones realizadas sobre las disoluciones sin gas estarían ligadas a la presencia de O₂ disuelto el cual estaría oxidando el trolox lo que provocaría la heterogeneidad entre las medidas (Malyszko y Karbarz, 2006; Ensafi et al., 2009; Günay et al, 2010; Abdel-Hamid y Newair, 2011, Šeruga et al., 2011). Experimentos similares

indicaron que la presencia de oxígeno en la interface solución y electrodo hace que una lengua electrónica sea más sensible. En cambio una reducción de la corriente de oxígeno en un electrodo aumenta la capacidad antioxidante (Rodríguez-Mendez et al., 2014, Korotkova et al., 2004). Como se puede observar en la figura 1.6, en la que se presenta la respuesta voltamétrica del trolox sin y con gas registradas en los primeros 5 pulsos (0 a 900 mV) del electrodo de Au, esta fue mayor para las soluciones de trolox con gas, siendo esta diferencia mayor para las muestras más diluidas. La presencia de oxígeno en las soluciones genera la oxidación del trolox lo que con lleva a una menor respuesta voltamétrica a estos pulsos, siendo mayor el efecto a menores concentraciones de trolox dada la incidencia de la oxidación sobre el total de trolox en la solución.

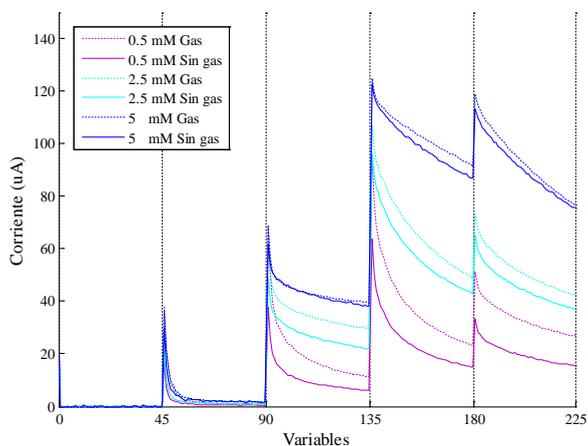


FIGURA 1.6. Respuesta voltamétrica promedio de las soluciones de trolox desde 0.5 hasta 5 mM en solución base fosfato de 0.01 M a pH 7.4 con y sin gas, registradas con los primero cinco pulsos (0 a 900 mV) del electrodo Au.

En base a este resultado es necesario realizar un burbujeado con N_2 de las soluciones a evaluar mediante la voltametría de pulsos dado que reduce la variabilidad de las medidas como consecuencia de la minimización de la oxidación generada por el oxígeno disuelto en las soluciones.

Estudio del efecto del pH de la solución

El estudio del efecto del pH de la solución a evaluar mediante lengua electrónica voltamétrica mostró como este influye sobre la respuesta voltamétrica generada. Como se aprecia en la figura 1.7, en la que se muestra la agrupación espontánea de la respuesta (PCA) de ácido ascórbico a pH 7.4 y a pH 4.8, las dos primeras componentes agruparon las muestras en función del pH, situándose las muestras con el pH de 7.4 en valores mayores de PC1 y menores de PC2. Además ambas componentes (especialmente la componente 1) evidenció la agrupación espontánea de la respuesta en función de la dilución, siendo las de mayor concentración las situadas en los mayores valores de la PC1 y PC2.

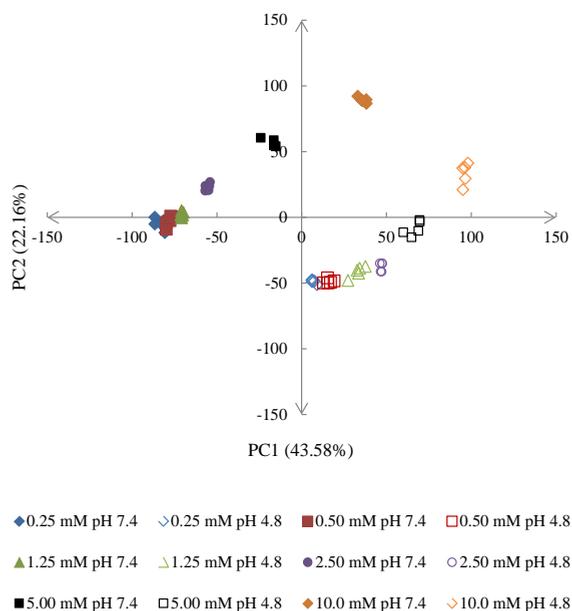


FIGURA 1.7. Análisis de PCA para las soluciones de ácido ascórbico desde 0.25 hasta 10 mM en solución base fosfato 0.01 M ajustadas a pH 7.4 y pH 4.8.

Dada la evolución de la señal observada en función de la concentración de las diluciones ensayadas para ambos pH se procedió, con la finalidad de poder evaluar a cuál de los dos pH se producen lecturas voltamétricas más representativas, a generar modelos de predicción de ácido ascórbico (uno

para cada pH). Para ello dos tercios de los datos fueron usados para la modelización y el tercio restante para su validación. La figura 1.8 muestra el ajuste de los valores teóricos de ácido ascórbico frente a los predichos mediante el modelo generado a partir de las respuestas voltamétricas de las disoluciones a pH 7.4 (A) y 4.8 (B) y como se puede observar en la tabla 1.3 estos presentaron, en ambos casos, valores de validación muy buenos.

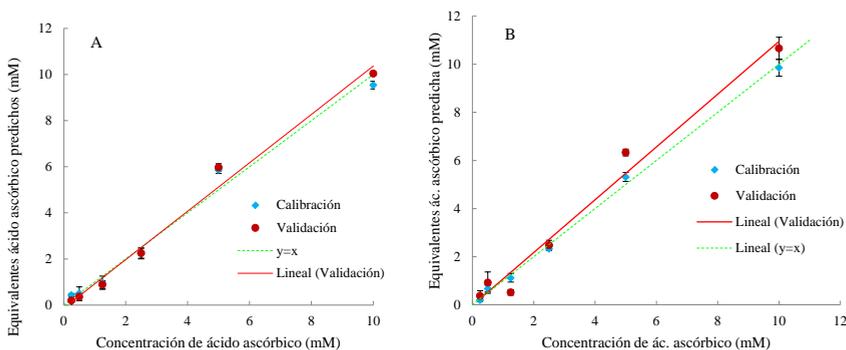


FIGURA 1.8. Ajuste de los valores teóricos de ácido ascórbico frente a los predichos por los modelos generados a partir de la información voltamétrica obtenida con las soluciones a pH 7.4 (A) y 4.8 (B). - - - Línea de ajuste y — recta $y=x$.

TABLA 1.3. Parámetros de regresión PLS para las soluciones ácido ascórbico a pH 7.4 y a pH 4.8

Efecto	Parámetros	Calibración	Cros- validación	Validación
pH 7.4	RMSE	0.476	0.484	0.474
	Bias	0.006	0.006	0.035
	R ²	0.981	0.980	0.985
pH 4.8	RMSE	0.248	0.281	0.749
	Bias	0.002	-0.001	0.297
	R ²	0.995	0.993	0.975

Si bien ambos modelos expresaron la gran linealidad existente entre las repuestas voltamétricas y la concentración en ácido ascórbico, las diferencias en las desviaciones de las lecturas voltamétricas obtenidas para las lecturas de las disoluciones a pH 7.4 fueron mayores (Fig. 1.9). Como puede observarse en la tabla 1.4, para todas las diluciones el sumatorio de las desviaciones de las variables fue mayor cuando las lecturas fueron realizadas a pH 7.4. Esto podría ser debido a la actividad de los electrones en el medio. Así, como puede observarse en la figura 1.10, que muestra la curva del potencial redox para las soluciones a pH 7.4 y a pH 4.8 de las disoluciones de ácido ascórbico, se evidenció como en las diluciones a pH 7.4 el potencial redox cae bruscamente haciendo que la solución sea más reductora provocando la inestabilidad del medio. Lechien et al. (1982) determinaron la influencia del pH sobre el pico de potencial del ácido ascórbico por medio de voltametría diferencial de pulso, encontrando un valor de pK de 4.7. Experimentos similares fueron realizados por otros autores los cuales evidenciaron la dependencia del pH en los procesos de oxidación para diferentes patrones antioxidantes como ácido gálico y catequina (Hua et al., 2013; Abdel-Hamid y Newair, 2011; Ruffien-Ciszak et al., 2006; Janeiro y Oliveira, 2004, Mu, 2003).

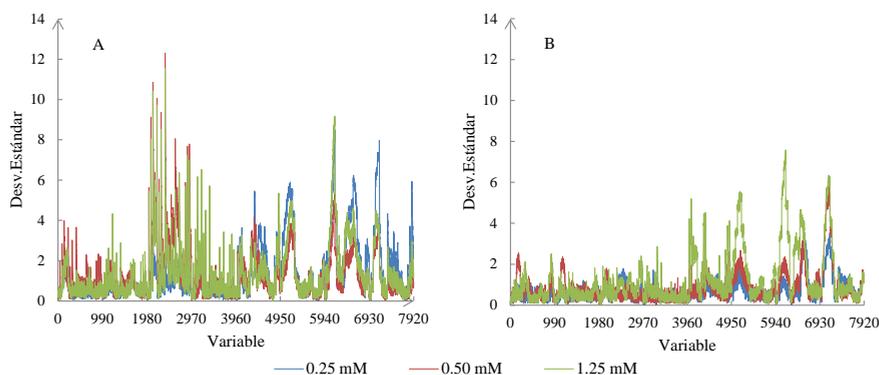


FIGURA 1.9. Curva de desviación estándar las respuestas voltamétricas de las soluciones de ácido ascórbico a concentraciones de 0.2, 0.5 y 1.25 mM a pH 7.4 (A) y pH 4.8 (B).

TABLA 1.4. Sumatorio de las desviaciones estándares de las variables (pulso / electrodo) por efecto del pH de las soluciones de ácido ascórbico.

Concentración	pH 7.4	pH 4.8
0.25	10766.4	5438.1
0.50	9901.2	6647.5
1.25	10645.1	9561.2
Promedio	10437.6± 469	7215.6± 2119

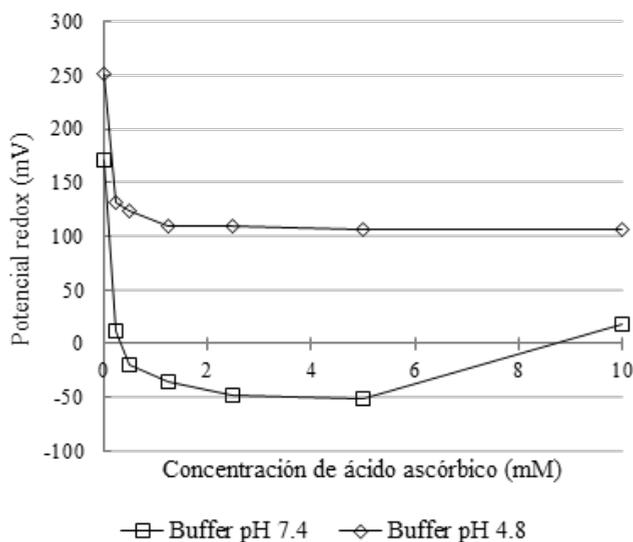


FIGURA 1.10. Curva potencial redox de las soluciones de ácido ascórbico a concentraciones desde 0.25 hasta 10 mM en solución base fosfato 0.01 M.

Por lo tanto, en base a estos resultados, si bien inicialmente el pH parece que no afecte a la correlación existente entre las medidas voltamétricas realizadas sobre diluciones de ácido ascórbico, para cada uno de los dos pH ensayados (7.4 y 4.8), la inestabilidad de la solución a pH 7.4 ha provocado una mayor dispersión en las respuestas voltamétricas, esto

aconseja que la determinación del ácido ascórbico mediante voltametría de pulso se realice a pH 4.8.

CONCLUSIÓN

El estudio de las variables; incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas, para una misma medición, del efecto de la presencia de O₂ en las soluciones y del pH de estas, mostró como solo las dos últimas tienen influencia sobre la respuesta voltamétrica.

Para la obtención de soluciones más estables que puedan ser medidas voltaméricamente con un menor error es necesario que estas estén burbujeadas con un gas como puede ser el N₂, el cual desplaza al O₂ inhibiendo las reacciones de oxidación que este genera. Además en el caso de soluciones ácidas, como puede ser el ácido ascórbico, es necesario que estas estén a un pH de 4.8 dado que a este pH las soluciones son más estables que a pH más básicos como 7.4.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid, R. and Newair, E. (2011). Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 657 (2): 107-112
- Abdel-Hamid, R. and Newair, E. (2013). Adsorptive stripping voltammetric determination of gallic acid using an electrochemical sensor based on polyepinephrine/glassy carbon electrode and its determination in black tea sample. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 704: 32-37.
- Alcañiz, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el campo agroalimentario. Tesis doctoral. UPV

- Chevion, S., Roberts, M. and Chevion, M. (2000) The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology & Medicine* 28 (6): 860-870.
- Chirinos, R., Galarza, J., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R. and Campos, D. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, 120, 1019-1024.
- Ensafi, A., Taei, M., and Khayamian, T. (2009). A differential pulse voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using poly (3-(5-chloro-2-hydroxyphenylazo)-4,5-dihydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid) film modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 633: 212-220.
- Ferrari, C.; Foca, G. and Ulrici, A. (2013). Handling large datasets of hyperspectral images: Reducing data size without loss of useful information. *Analytica Chimica Acta*. 802: 29-39.
- Güney, S.; Yildiz, G.; Capan, A.; Ozturk, T. (2010). Evaluation of the electrochemical properties of 3-hydroxyflavone using voltammetric methods. *Electrochimica Acta*. 55(9): 3295-3300.
- Hernández, Y., Lobo, M.G. and González, M. (2009). Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry*. 114: 734-741.
- Hua, J.; Lin, B.; Li, N. and Luo, H. (2013). Sensitive detection of gallic acid based on polyethyleneimine-functionalized graphene modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 186: 84-89.
- Ijeri, V.S, Jaiswal, P.V. and Srivastava, A.K. (2001). Chemically modified electrodes based on macrocyclic compounds for determination of Vitamin C by electrocatalytic oxidation. *Analytica Chimica Acta*. 439: 291-297.

- Janeiro, P. y Oliveira, A. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*. 518 (2): 109-115.
- Korotkova, E.I., O.A. Avramchik, O.A., Kagiya, T.V., Karbainov, Y.A. and Tcherdyntseva, N.V. (2004). Study of antioxidant properties of a water-soluble Vitamin E derivative—tocopherol monoglucoside (TMG) by differential pulse voltammetry. *Talanta*. 63:729-734.
- Lechien, A., Valenta, P., Nürnberg, H.W. and Patriarcho, G.J. (1982). Determination of Ascorbic Acid by Differential Pulse Voltammetry. *Fresenius Z. Anal Chem*: 311: 105-108.
- Malyszko, E. y Karbarz, M. (2006). Electrochemical oxidation of trolox and α -tocopherol in acetic acid: A comparative study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 595 (2): 136-144
- Milardovic, S., Kereković, I., Derrico, R. and Rumenjak, V. (2007) A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity using enzymatically produced ABTS⁺ and biamprometric detector containing interdigitated electrode. *Talanta* 71: 213-220
- Mu, S. 2003. The electrocatalytic oxidation of gallic acid on polyaniline film synthesized in the presence of ferrocene phosphonic acid *Synthetic Metals*. 139 (2) 287-294.
- Pande, G. and Akoh, C. (2010). Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry*. 120: 1067-1075.
- Psotová, J., Zahálková, J., Hrbáč, J., Šimánek, V. and Bartek, J. (2001) Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomed. Papers* 145(2): 81-83
- Rodríguez-Mendez, M.L., Apetrei, C., Gay, M., Medina-Plaza, C., De Saja, J.A., Vidal, S., Aagaard, O., Ugliano, M., Wirth, J., Cheynier, V. (2014). Evaluation of oxygen exposure levels and polyphenolic content of red wines using an electronic panel formed by an electronic nose and an electronic tongue. *Food Chemistry*. 155: 91-97.

- Ruffien-Ciszak, A.; Gros, P.; Comtat, M.; Schmitt, A.M.; Questel, E.; Casas, Ch. And Rodoules, D. (2006). Exploration of the global antioxidant capacity of the stratum corneum by Cyclic Voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40: 162-167.
- Šeruga, M.; Novak, I. y Jakobek, L. 2011. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 124 (3): 1208-1216.
- Serranti, S.; Cesare, D.; Bonifazi, G. (2013). The development of a hyperspectral imaging method for the detection of Fusarium-damaged, yellow berry and vitreous Italian durum wheat kernels . *Biosystems Engineering*. 115 (1): 20-30.
- Skoog; D., Holler; J. y Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Sexta edición. CENGAGE Learning. México.
- Sousa, W. R., Da Rocha, Cl., Cardoso, C.L., Silva, D.H. and Zanoni, M. V. (2004). Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17: 619-633.
- Scherer, R., Poloni, A.C., Ballus, C., Dillenburg, A., Teixeira, J. and Teixeira, H. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*. 135: 150-154.

CAPITULO 2

***PATRONES ANTIOXIDANTES. MODELOS DE
PREDICCIÓN***

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos de gran interés debido a su participación en importantes procesos biológicos e industriales. Asimismo son componentes químicos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en vegetales y frutas, contribuyendo en los aspectos organolépticos, retardando la degradación oxidativa de los alimentos y teniendo efectos potenciales para la salud como prevenir enfermedades coronarias y algunos tipos de cáncer (Güney et al., 2010; Janeiro y Oliveira, 2004; Flores et al., 2010).

De acuerdo al sistema de defensa contra el daño oxidativo los antioxidantes son clasificados; primero como antioxidantes preventivos (suprimen la formación de radicales libres), segundo como antioxidantes captadores de radicales (captan radicales inhibiendo la cadena de iniciación y rompiendo la cadena de propagación) los principales representantes son las vitamina liposoluble E y la hidrosoluble C, así como los compuestos polifenólicos. Tercero como enzimas de reparación del DNA y por último existe otro mecanismo de defensa por el cual los antioxidantes apropiados en cada situación son producidos y transferidos al lugar correcto, en el momento correcto y en la cantidad correcta. (Pokorny et al., 2001, Smirnoff, 2005, Heim et al., 2002).

Los polifenoles exhiben en su estructura uno o más grupos fenólicos y están representados por ácidos fenólicos simples como el ácido gálico y por flavonoides como la catequina. Los polifenoles son los que confieren la mayor parte de la actividad antioxidante presente en las frutas y hortalizas (Keyrouz, et al., 2011 y Flores et al., 2010). La catequina está presente en muchos productos dietéticos, plantas, té verde, vino tinto, cerveza, licor de cacao, chocolate, cacao y otros. La acción antioxidante de la catequina está bien establecida por diversos métodos *in vitro*, *in vivo* y físicos (Zanwar et al., 2014). El ácido gálico y sus derivados tienen una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo anti-oxidante, anti-inflamatorios, anti-microbiana y actividades contra el cáncer (Abdel-Hamid y Newair, 2011; Panizza y Cerisola, 2009).

El ácido ascórbico es la vitamina más usada en el mundo, considerado como el más importante antioxidante soluble en agua, presente en mayor

cantidad en las frutas, tiene un efecto protector y de reducción de enfermedades del corazón, derrame cerebral y cáncer en individuos sanos (Klimczak et al., 2007).

La capacidad antioxidante de los extractos de plantas está fuertemente ligada al efecto del pH, generalmente aumentando la capacidad antioxidante a pH alcalino (Arabshahi-D et al., 2007, Azizah et al., 1999, Arabshahi-Delovee y Urooj, 2007, Li et al., 2009). Las propiedades ácido-base muestran que los radicales de los flavonoides son neutros en medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7. La repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides (Martínez-Flórez et al., 2002). Por otro lado las frutas como fuente de antioxidante y de vitamina están en el rango de pH ácido, por lo que resulta conveniente mantener el pH de la fruta, en la determinación de la capacidad antioxidante por cualquiera de los métodos, a estos valores de pH (Restrepo et al., 2010). Esto conlleva estudiar varios compuestos o patrones antioxidantes que tenga relación con la naturaleza de la fuente antioxidante, por un lado tenemos extractos de plantas a pH alcalino y por otro las frutas a pH ácido.

Las lenguas electrónicas se pueden definir como sistemas basados en múltiples sensores de baja selectividad o sensibilidad cruzada. La respuesta de la matriz de sensores presenta una huella digital electrónica característica de cada especie en la muestra. La suma de todas estas huellas digitales puede llevar al reconocimiento de un patrón de comportamiento. El reconocimiento cualitativo y cuantitativo de estos patrones o modelos se puede lograr por medio de herramienta estadística multivalentes apropiadas tales como redes neuronales, PCA, PLS, lógica difusa, etc. (Alcañiz et al., 2012).

Los métodos multivariantes como el PCA y el PLS son métodos que analizan una gran población de datos y que ayudan a entender la alta variabilidad de las variables respuesta frente a las variables predictoras a través del desarrollo de patrones o modelos matemáticos de predicción. La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) es un método que explica la linealidad de las variables en la predicción del problema pero que no evalúa la variable en sí. Para conocer que variables son las relevantes en los modelos establecidos por la herramienta PLS se han propuestos métodos de selección como son el índice de proyección de la importancia de las

variables (VIP-PLS) e intervalo iPLS (Afanador et al., 2013, Borin y Poppin, 2005, Chong y Jun, 2005).

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es evaluar las respuestas voltamétricas de cuatro de los principales patrones antioxidantes utilizados por los métodos químicos de referencia, dos a pH neutro de 7.4 (trolox y catequina) y dos a pH ácido de 4.8 (ácido ascórbico y ácido gálico), con la finalidad de obtener patrones o modelos matemáticos de predicción que puedan ser aplicados en la determinación de la capacidad antioxidante de extractos de plantas y frutas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados como patrones en el estudio son los utilizados por los métodos químicos de referencia; Trolox (6 - hidroxil- 2, 5, 7, 8 - tetrametilcromo - 2 - ácido carboxílico) el cual es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol (vitamina E) con un alto poder antioxidante, Catequina la cual es un antioxidante polifenólico, más concretamente un flavonoide, Ácido ascórbico o vitamina C y finalmente Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico).

Los reactivos trolox y catequina fueron preparados en diferentes concentraciones (0,25; 0,5; 1,25; 2,5 y 5 mM) utilizando una solución electrolítica formada por fosfato de potasio y dihidrógeno fosfato de potasio 0.01 M, ajustada a pH 7.4. Por otra parte, los reactivos ácido ascórbico y ácido gálico se prepararon concentraciones desde 0,25 hasta 10 mM en buffer fosfato de potasio a pH 4.8. La utilización de la solución electrolítica se basó en permitir que la dilución más diluida pudiese presentar la suficiente carga de electrolitos que asegurara el paso de corriente (Milardovic et al, 2007; Chevion et al., 2000 y Psotová et al., 2001).

Todos los reactivos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

Equipo voltamétrico. Lengua Electrónica Voltamétrica (LEV)

El equipo utilizado fue el diseñado por el grupo de Microelectrónica Híbrida del Instituto de Química Molecular Aplicada de la UPV, descrito en la introducción y en el capítulo anterior, el cual está formado básicamente por un electrodo de referencia (calomelanos) y dos electrodos de trabajo compuestos cada uno por 4 electrodos metálicos, uno con metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y el otro con metales no nobles (Ag, Cu Co y Ni). El tren de pulsos utilizados fue de corta amplitud como se describe en el capítulo 1.

Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó por un lado para los patrones medidos a pH de 7.4 (trolox y catequina) y por otro para los medidos a pH ácido de 4.8 (ácido ascórbico y ácido gálico).

Para evaluar la capacidad de las lenguas electrónicas como método para cuantificar la capacidad antioxidante de alimentos se llevaron a cabo varios análisis multivariantes mediante el programa Matlab (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) y su aplicación estadística PLS Toolbox (Eigenvector Reserach Inc., Wenatchee, Washington, USA).

En primer lugar se realizaron análisis de los componentes principales (PCA) el cual permite visualizar la posible discriminación espontánea de las medidas voltamétricas según el tipo de reactivo patrón y/o concentración de esta.

En segundo lugar para obtener los modelos de predicción de la capacidad antioxidante, en base a los patrones evaluados, se hicieron análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) que maximizan la correlación entre variables independientes (señal de corriente) y dependientes (concentración del patrón que expresará la capacidad antioxidante en equivalentes de dicho patrón).

Con la finalidad de mejorar el rendimiento de los modelos de predicción generados se desarrollaron nuevos empleando dos sistemas estadísticos de

filtrado de datos descritos en la introducción. El primero fue basado en la utilización solo de las variables (electrodo y pulso aplicado) obtenidas mediante el análisis VIP y el segundo basado en la selección de los intervalos más influyentes mediante el algoritmo matemático genérico iPLS, operando en el modo “hacia adelante”. Mediante la Proyección de las variables importantes (VIP-PLS) se determinaron que variables (electrodo y pulso aplicado) fueron las más influyentes en la generación de los modelos. La puntuación VIP mayor que uno, se utilizó como un criterio para la selección de variables.

En todos los casos, para la generación de los modelos matemáticos de predicción dos tercios de las muestras fueron utilizadas para la creación y cross-validación (CV) del modelo y el tercio restante para la validación (V) de este. La bondad de los modelos fue dada por el error calculado a partir de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE), desviación BIAS y el coeficiente de determinación (R^2) tanto para el modelo, como para la cross-validación y validación como se ha comentado en la introducción.

Finalmente para evaluar si los modelos obtenidos pueden ser capaces de predecir la capacidad antioxidante, en equivalentes del patrón utilizado, de otras sustancias se aplicó el método de Liteanu et al. (1976) descrito en la introducción. Para ello uno de los modelos obtenidos mediante el patrón trolox se utilizó para predecir la capacidad antioxidante de la catequina, expresándola en equivalentes trolox. Posteriormente se realizó la operación inversa, utilizando el modelo catequina para predecir la capacidad antioxidante del trolox como equivalentes catequina. En el caso de los patrones ácido ascórbico y gálico se procedió del mismo modo, expresando la capacidad del ácido gálico como equivalentes ascórbico y viceversa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las respuestas eléctricas obtenidas por la lengua electrónica voltamétrica basada en la voltametría de pulsos describen el perfil electroquímico de los patrones antioxidantes. A modo de ejemplo se presenta en la figura 2.1 la respuesta electrónica del patrón trolox, cuyas variables representan a los electrodos de trabajo y los pulsos aplicados. Como se puede apreciar, si bien los electrodos de Co y el de Ag fueron los que presentaron una mayor corriente, para la mayoría de los electrodos se observaron pulsos en los que se pudo apreciar una respuesta dependiente de la concentración de las disoluciones. En la figura 2.1 B a modo de ejemplo que ha representado el pulso 900 mV para el Pt y como se puede observar a mayor concentración se produjo una mayor intensidad de la corriente.

Una vez obtenidas las respuestas voltamétricas de las diferentes soluciones de los patrones ensayados, estas fueron evaluadas mediante un análisis PCA (Fig. 2.2). La primera componente del PCA (46,83%) muestra la formación de dos grupos, por un lado el generado por los patrones trolox y catequina y por el otro por los patrones ácido ascórbico y ácido gálico. De acuerdo a lo indicado en el capítulo 1, el agrupamiento fue debido al pH de las soluciones dado que en el caso de los primeros fue de 7,4 mientras que para los segundos fue de 4,8. Las plantas como fuente de componentes fenólicos para su determinación están dadas a pH alcalino (Janeiro y Oliveira, 2004, Chirinos et al., 2011) y en el caso de las frutas como fuente de vitamina C su determinación está dada a pH ácidos (Hoyle y Santos, 2010). Por otro lado la componente 2 (17,52%), para cada uno de los patrones, dispuso las soluciones en función de la concentración de estas, siendo proyectadas las más diluidas hacia valores negativos del PC2 y las más concentradas hacia valores más positivos. Este resultado podría estar mostrando como las respuestas voltamétricas están dependiendo de la concentración del medio evaluado y por tanto podría expresar la capacidad antioxidante en función de estos y es posible obtener un modelo de predicción.

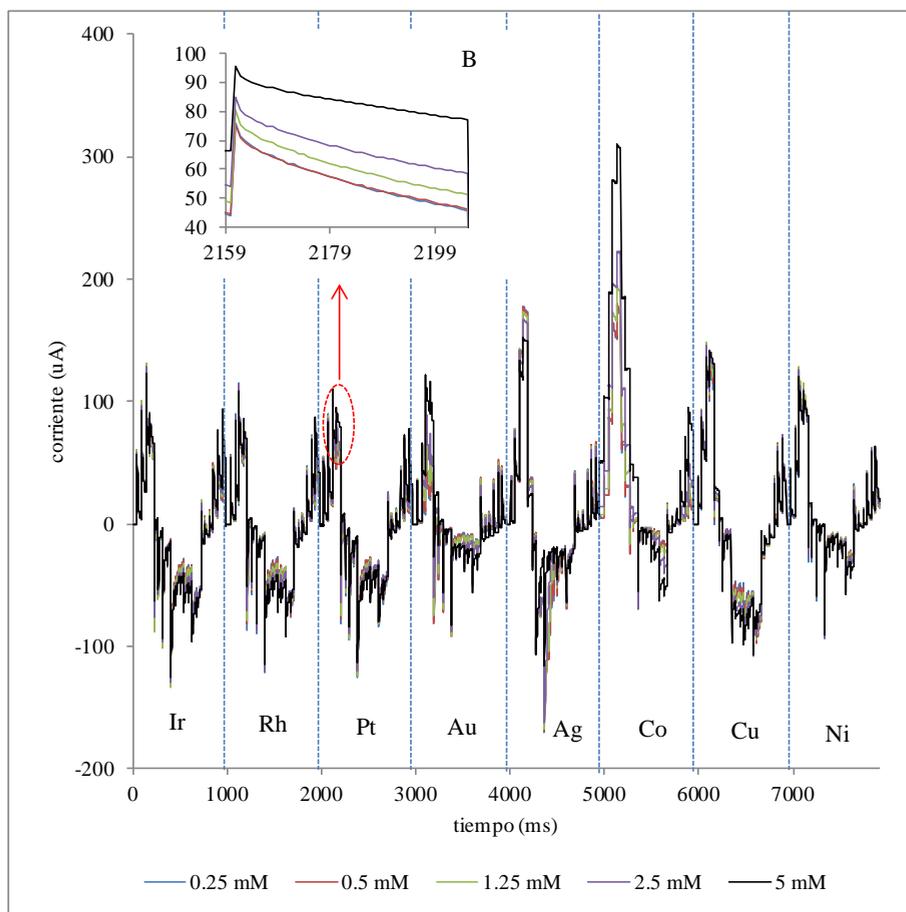


FIGURA 2.1. Respuesta eléctrica generada mediante la lengua electrónica voltamétrica del patrón trolox a concentraciones de 0.25 hasta 5 mM en buffer fosfato 0.01 M a pH 7. B) Ampliación del pulso a 900 mV para el electrodo de Pt.

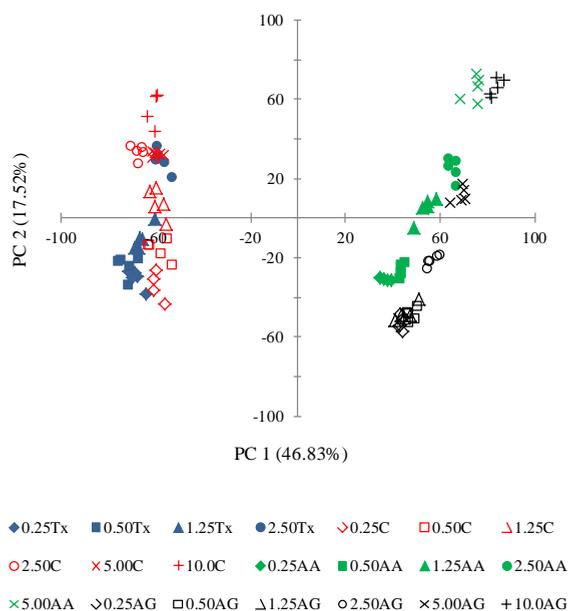


FIGURA 2.2. Análisis de los componentes principales (PCA) de los patrones químicos, trolox (Tx), catequina (C), ácido ascórbico (AA) y ácido gálico (AG).

En base a estos resultados obtenidos para la obtención de los modelos de predicción de la capacidad antioxidante se procedió a realizar el estudio por separado, por un lado el análisis y obtención de los modelos de predicción de los patrones a pH básico y por otro los de pH ácido.

Obtención de los modelos de predicción de los patrones a pH básico

Una vez analizadas las respuestas eléctricas de los patrones químicos se procedió a la construcción de los modelos matemáticos de predicción mediante el análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Para ello dos tercios de los datos fueron utilizados para la calibración y cross-validación (CV) y un tercio para la validación de los mismos. Los valores de la bondad de los modelos obtenidos, tanto para el trolox ($R^2=0.996$, Bias = 0.023 y RMSE = 0.145) como para la catequina ($R^2=0.941$, Bias = -0.361 y RMSE = 1.123) (tabla 2.1), mostraron la validez de estos dado que para ambos los valores de las validaciones fueron óptimos.

Como se puede observar en la figura 2.3, en la que representan los valores teóricos de concentración tanto de trolox (Fig. 2.3 A) como de catequina (Fig. 2.3 B) frente a los predichos obtenidos por sus respectivos modelos, se produce un ajuste a la recta X=Y si bien en el caso de la catequina este es ligeramente inferior.

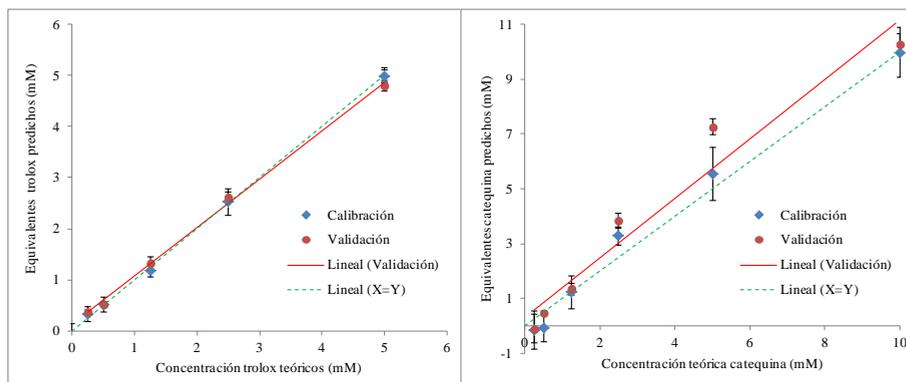


FIGURA 2.3. Valores teóricos de concentración tanto de trolox (Fig. 4 A) como de catequina (Fig. 4 B) frente a los predichos por sus respectivos modelos expresados en mM equivalentes.

TABLA 2.1. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH básicos a partir de la información generada en todos los electrodos y pulsos.

Patrón	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Trolox	RMSE	0.169	0.179	0.145
	Bias	0.002	0.003	0.023
	R ²	0.991	0.989	0.996
Catequina	RMSE	0.615	0.742	1.173
	Bias	0.001	-0.042	-0.361
	R ²	0.967	0.953	0.941

Mediante la proyección de las variables importantes (VIP-PLS) se evaluaron cuáles de estas (electrodos y pulsos) fueron más influyentes en la construcción de los modelos. En la figura 2.4 se presenta la distribución de las variables para los patrones a pH básicos según su influencia en el modelo. Se considera influyente aquellos pulsos y electrodos cuyos valores fueron superiores a 1 (Chong y Jun, 2005). Como se puede observar, el electrodo de Ag fue el que alcanzó valores de VIP más altos en ambos patrones para un potencial de 500 a 900 mV (tabla 2.2), si bien en el caso del patrón trolox, el Co, a un potencial -800 a -850 mV, los igualó (fig. 2.4A). El tercer electrodo, que presentó una gran influencia para ambos modelos, fue el de Au para un potencial aplicado comprendido entre los 500 y 900 mV. Es importante tenerlo en consideración dado que el uso de los electrodos formados por metales nobles es muy interesante pues generan reacciones más estables y por tanto más fáciles de cuantificar. En cambio las que se generan en los metales no nobles, en los que si bien puede haber una gran reacción, dada su inestabilidad esta puede ser muy difícil de cuantificar. Según Alcañiz y colaboradores (2012) los electrodos no nobles como Ag y Co son muy reactivos a la oxidación del medio lo que genera una respuesta muy alta producida por la reacción redox.

En base a estos resultados se podría decir que en general para los electrodos nobles, los pulsos positivos, fundamentalmente entre los 500 y 900 mV, fueron los más influyentes, si bien para el Pt también lo fue el pulso a -400 mV. En cambio la presencia de pulsos negativos fue más influyente en los electrodos no nobles, si bien también lo fueron los pulsos entre los 800 y 900 mV. Experimentos realizados para el patrón trolox con voltametría cíclica, empleando electrodo de carbón vítreo, encontraron rangos de potenciales positivos de 800 a 1020 mV en los que se generaba una correlación con la concentración (Keyrouz et al., 2011; Zielinska et al., 2007, Malyszko y Karbarz, 2006). Para el patrón catequina, experimentos voltamétricos realizados usando también como electrodo de trabajo carbón vítreo encontraron dos rangos potenciales desde 440 hasta 475 mV y un segundo a potencial de 750 V (Janeiro y Oliveira; 2004 y Šeruga et al., 2011).

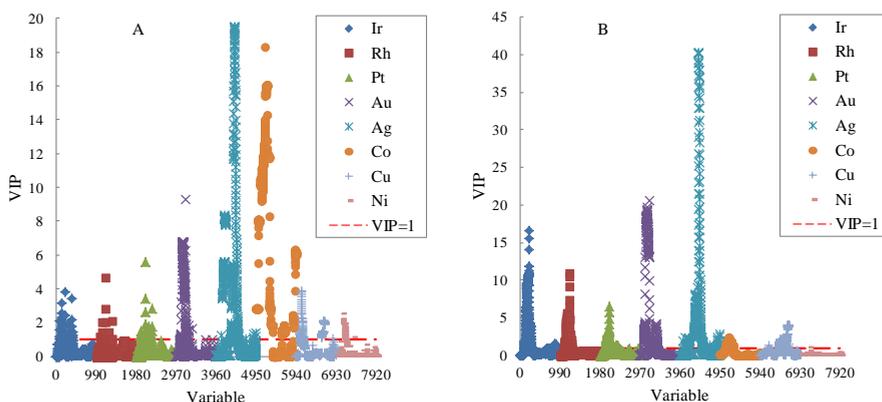


FIGURA 2.4. Distribución de las variables (electrodos y pulsos) influyentes VIP-PLS en la construcción de los modelos matemáticos de predicción de los patrones básicos A) trolox y B) catequina.

TABLA 2.2. Electros y pulsos eléctricos identificados mediante la proyección de las variables influyentes (VIP-PLS) para los patrones a pH básicos.

Trolox	
Electrodos	Potencial eléctrico (mV)
Ir	500 a 800
Rh	500 a 800
Pt	250 a 500, 0 a -400
Au	0 a 900
Ag	500 a 800 y 0 a -500
Co	0 a 900, -800 a -850 y -200 a 0
Cu	500 a 800 y -800 a -850
Ni	800 a 900
Catequina	
Ir	0 a 900
Rh	250 a 900
Pt	500 a 900, 900 a -400

Au	500 a 900
Ag	0 a -500
Co	-400 a -500 y -600 a - 800
Cu	760 a 900
Ni	250 a 500

En las figuras 2.5 y 2.6 se muestra la respuesta eléctrica en los electrodos de oro y plata en función del pulso eléctrico aplicado al patrón trolox y patrón catequina respectivamente. De acuerdo a la proyección VIP-PLS (tabla 2.2) para el Au la respuesta entre 500 y 900 mV fue la más influyente y como se vio en las figuras (área comprendida bajo la línea discontinua roja) se generó una discriminación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta, siendo esta última mayor a mayor concentración. En cambio la respuesta electrónica de la Ag entre los 0 y -600 mV (pulsos influyentes VIP-PLS) para ambos patrones no mostró reacciones estables (más característico entre los -400 a-600 mV). Es decir, si bien existió una ordenación de las respuestas según la concentración, fueron las más cercanas o aquellas con mayor concentración del patrón. Este comportamiento inverso podría ser debido a la necesidad de un mayor tiempo de reorganización de las moléculas sobre la superficie de los electrodos, al pasar de potenciales positivos a negativos (Alcañiz, 2011).

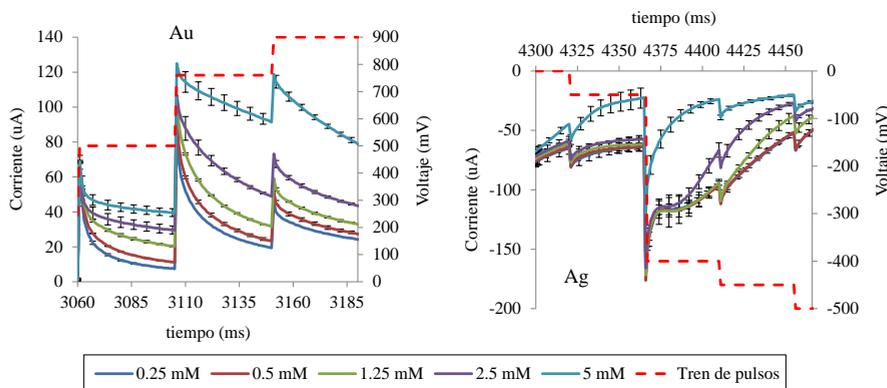


FIGURA 2.5. Respuesta eléctrica para los pulsos influyentes VIP-PLS del electrodo Au y Ag para el patrón trolox.

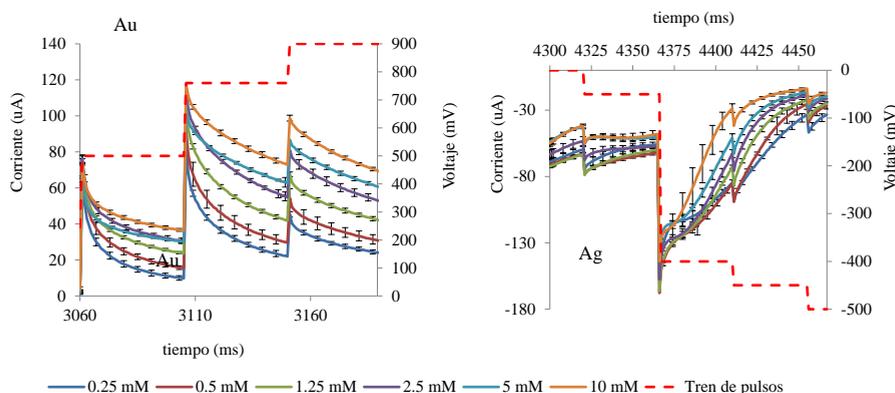


FIGURA 2.6. Respuesta eléctrica y pulsos influyentes VIP-PLS del electrodo Au y Ag para el patrón catequina.

Con la finalidad de reducir el número de electrodos y pulsos a utilizar, es decir el número de variables en los modelos matemáticos de predicción, a fin de poder obtener un dispositivo electrónico que pueda desarrollar su función con la menor cantidad de datos y así ser más ágil, se procedió al estudio de nuevos modelos de predicción. Para ello se generaron dos nuevos modelos, tanto para el patrón trolox como para la catequina. Por un lado los modelos fueron generados utilizando solo las variables seleccionadas por la proyección de las variables más influyentes VIP-PLS (tabla 2.2) y por otro utilizando las variables seleccionadas por el algoritmo genérico iPLS (tabla 2.3).

Como puede observarse en la tabla 2.3, cuando la selección fue realizada por el algoritmo iPLS, el número de variables se redujo muchísimo, siendo solo 4 los electrodos seleccionados tanto para el modelo trolox (Rh, Au, Cu y Ni) como para el de catequina (Rh, Pt, Au y Co). En ninguno de los dos casos la Ag estuvo presente y, además, para los electrodos no nobles, a los potenciales negativos a los que fueron influyentes (tabla 2.2), en ningún caso mostraron el efecto observado por la plata para los pulsos entre los 0 y -600 mV.

TABLA 2.3. Electrodo y pulsos eléctricos seleccionados mediante el algoritmo iPLS para los patrones trolox y catequina.

Trolox	
Electrodos	Potencial eléctrico (mV)
Rh	-650 a -600
Au	200 a 500, -650
Cu	400 a 500 y -650 a -850
Ni	-200 a -400
Catequina	
Rh	-400 a -800
Pt	600 a 800 y -400 a -200
Au	250 a 500 y 0 a -200
Co	-400 a -550

La validación de los modelos generados tanto para la selección VIP-PLS como para la selección iPLS (tabla 2.4) mostró como ambos modelos, para cada uno de los patrones, presentaron valores muy buenos, lo cual expresó la bondad de los nuevos modelos generados y que representa la utilización aproximada de 17,2% las variables cuando se utilizan solo las variables seleccionadas por VIP-PLS y del 5,4 % cuando son seleccionadas por iPLS, en comparación a los modelos iniciales generados utilizando toda la información inicial.

En base a estos resultados, los modelos generados mediante el algoritmo iPLS serían los a priori mejores a aplicar en la determinación de la capacidad antioxidante de productos con pH básico a fin de expresarla como equivalentes trolox o catequina. Si bien, pruebas con muestras son necesarias con la finalidad de ver cuál de los tres (todas las variables, selección VIP-PLS y selección iPLS) puede ser más eficaz y así poder establecer los electrodos a utilizar y el tren de pulsos para cada uno de ellos.

TABLA 2.4. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH básicos a partir de la información obtenida de las principales variables (electrodo y pulso) seleccionadas por VIP-PLS o por iPLS.

Patrón	Selección de variables	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Trolox	VIP-PLS	RMSE	0.155	0.164	0.240
		Bias	0.001	0.002	0.185
		R ²	0.992	0.991	0.994
	iPLS	RMSE	0.203	0.205	0.228
		Bias	-0.001	-0.001	0.137
		R ²	0.986	0.986	0.990
Catequina	VIP-PLS	RMSE	0.302	0.472	1.161
		Bias	0.0001	-0.026	-0.335
		R ²	0.992	0.981	0.903
	iPLS	RMSE	0.331	0.471	1.328
		Bias	-0.002	-0.032	0.913
		R ²	0.991	0.981	0.966

Dada la singularidad de la utilización de los electrodos no nobles, es decir su gran capacidad reactiva pero su difícil cuantificación, asociada a la dificultad que presentan estos electrodos para su limpieza, dado que entre medidas la capa depositada sobre ellos, como consecuencia de las reacciones que allí se han dado, es elevada, hizo que en el presente estudio se plantease la posibilidad de poder obtener modelos de predicción utilizando solo la información procedente de los electrodos nobles. Así se procedió al desarrollo de los modelos a partir de la totalidad de la información generada por estas y a partir de la selección de electrodos (de entre los nobles) y pulsos más influyentes evaluados por el VIP-PLS y por el algoritmo iPLS. En la tabla 2.5 se muestran los valores de los parámetros de regresión PLS. Como se aprecia en todos los casos los valores de bondad del ajuste fueron muy buenos, siendo el menor de los valores de R² de predicción igual a 0.956. Esto supone una reducción del volumen de información a utilizar muy

importante, del 13.6% para el trolox y del 23% para la catequina cuando se utilizan los datos seleccionados por VIP-PLS y del 9.1%, en ambos casos, cuando se utilizan los precedentes del iPLS.

TABLA 2.5. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH básicos a partir de la información procedente de los electrodos nobles y de la selección realizada por VIP-PLS e iPLS.

Patrón	Selección de variables	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Trolox	Todos los electrodos y pulsos	RMSE	0.137	0.139	0.181
		Bias	0.003	0.003	0.141
		R ²	0.994	0.994	0.996
	VIP-PLS	RMSE	0.122	0.126	0.169
		Bias	0.002	0.003	0.111
		R ²	0.995	0.995	0.995
	iPLS	RMSE	0.192	0.201	0.272
		Bias	0.004	0.003	0.066
		R ²	0.988	0.987	0.978
Catequina	Todos los electrodos y pulsos	RMSE	0.204	0.274	0.732
		Bias	-0.001	0.01	-0.082
		R ²	0.996	0.994	0.958
	VIP-PLS	RMSE	0.301	0.397	0.755
		Bias	0.001	-0.011	-0.032
		R ²	0.992	0.987	0.956
	iPLS	RMSE	0.331	0.47	1.331
		Bias	-0.002	-0.032	0.918
		R ²	0.991	0.981	0.966

Así pues, si bien los modelos obtenidos utilizando la información de todos los electrodos, en su totalidad o filtrados por las selecciones VIP-PLS o iPLS se presentaban como aptos para la predicción de la capacidad antioxidante en base a los equivalentes trolox o catequina, los procedentes de los electrodos nobles podrían presentar además la ventaja de una mayor estabilidad en la cuantificación de esta y un mejor manejo del equipo al facilitarse la limpieza de los electrodos.

Obtención de los modelos de predicción de los patrones a pH ácido

Al igual que para las respuestas voltamétricas obtenidas para los patrones a pH básico, se procedió para los patrones a pH ácido (ácido ascórbico y ácido gálico). A partir de toda la información obtenida se generaron los modelos matemáticos de predicción mediante el análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), los cuales fueron posteriormente validados. Los resultados de la bondad de los modelos y de la validación (figura 2.7 y tabla 2.6), tanto para el patrón ácido ascórbico ($R^2=0.975$, Bias =0.297 y RMSE =0.749) como gálico ($R^2=0.986$, Bias =0.273 y RMSE = 0.495) mostraron como estos pueden utilizarse en la predicción de los equivalentes de ambos pues como se observa en la figura 2.7, existió una muy buena linealidad.

La proyección de las variables importantes VIP-PLS (figura 2.8) mostró como para ambos patrones todos los electrodos fueron influyentes en mayor o menor medida, si bien en ambos casos el electrodo de oro fue el más influyente (tabla 2.7). Para ambos patrones los pulsos entre los 800 y 900 mV aplicados sobre los electrodos nobles fueron los influyentes. En cambio para los electrodos no nobles, los pulsos más influyentes fueron los generados a potenciales negativos (-800 a -850 mV).

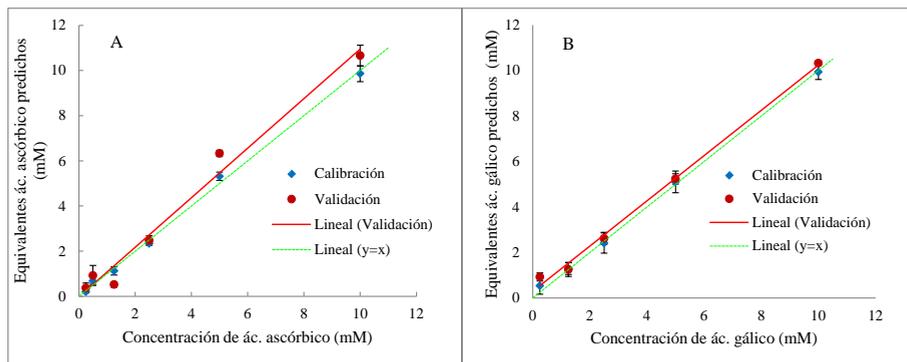


FIGURA 2.7. Valores teóricos de concentración tanto de ácido ascórbico (Fig. 7 A) como de ácido gálico (Fig. 7 B) frente a los predichos por sus respectivos modelos expresados como mM equivalentes.

TABLA 2.6. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH ácidos a partir de la información procedente de todos los electrodos y pulsos.

Patrón	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Ácido ascórbico	RMSE	0.248	0.281	0.749
	Bias	0.002	-0.001	0.297
	R ²	0.995	0.993	0.975
Ácido gálico	RMSE	0.263	0.358	0.495
	Bias	0.002	-0.023	0.273
	R ²	0.994	0.990	0.986

Experimentos voltamétricos usando como electrodo de trabajo carbón vítreo encontraron un rango de potencial de 350 a 580 mV para el patrón ácido ascórbico (Khopde et al., 2001; Okiei, et al., 2009) y usando electrodos modificados de Au una buena respuesta eléctrica en potenciales de 570 mV (Vulcu et al., 2013). Un experimento similar fue desarrollado por voltimetría

diferencial de pulso usando electrodo de Pt encontrando el pico de oxidación del ácido ascórbico alrededor de 530 - 550 mV (Mu, 2003; Pisoschi et al., 2011). Para el patrón ácido gálico experimentos voltamétricos realizados usando como electrodo carbón vítreo, por la naturaleza del patrón, encontraron dos picos de oxidación a 550 mV y a 950 mV (Abdel-Hamid y Newair, 2011), mientras que usando un electrodo de diamante dopado con boro observaron la oxidación electroquímica entre potenciales de 1150 y 1670 mV (Panizza y Cerisola, 2009).

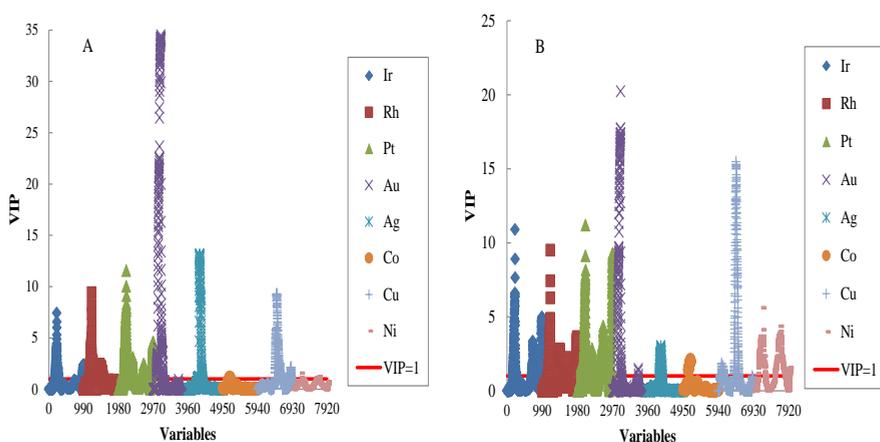


FIGURA 2.8. Distribución de las variables (electrodos y pulsos) influyentes VIP-PLS en la construcción de los modelos matemáticos de predicción de los patrones básicos; a) ácido ascórbico y b) ácido gálico.

TABLA 2.7. Pulsos eléctricos identificados mediante el método VIP-PLS para los patrones a pH ácidos.

Ácido ascórbico	
Electrodos	Potencial eléctrico (mV)
Ir	0 a 900
Rh	300 a 900 y -400 a -600
Pt	800 a 900, 500 a -850
Au	300 a 900
Ag	300 a -440
Co	800 a 900
Cu	0 a -850
Ni	-800 a -850
Ácido gálico	
Ir	800 a 900 y -200 a 0
Rh	800 a 900 y -650 y 0
Pt	800 a 900, 0 a -850
Au	800 a 900
Ag	0 a -400
Cu	500 a 300, -400 a -850
Ni	500 a 800, -650 a -850

En la figura 2.9 se representa la respuesta eléctrica, el tren de pulsos y aquellos más influyentes según el método VIP-PLS (línea roja discontinua) del electrodo de Au en la solución de ácido ascórbico. En ella se observa como entre los pulsos eléctricos a potenciales de 500 hasta 900 mV se produce una clara discriminación de la respuesta en base a la concentración de la solución evaluada, siendo mayor la respuesta cuanto mayor fue esta concentración.

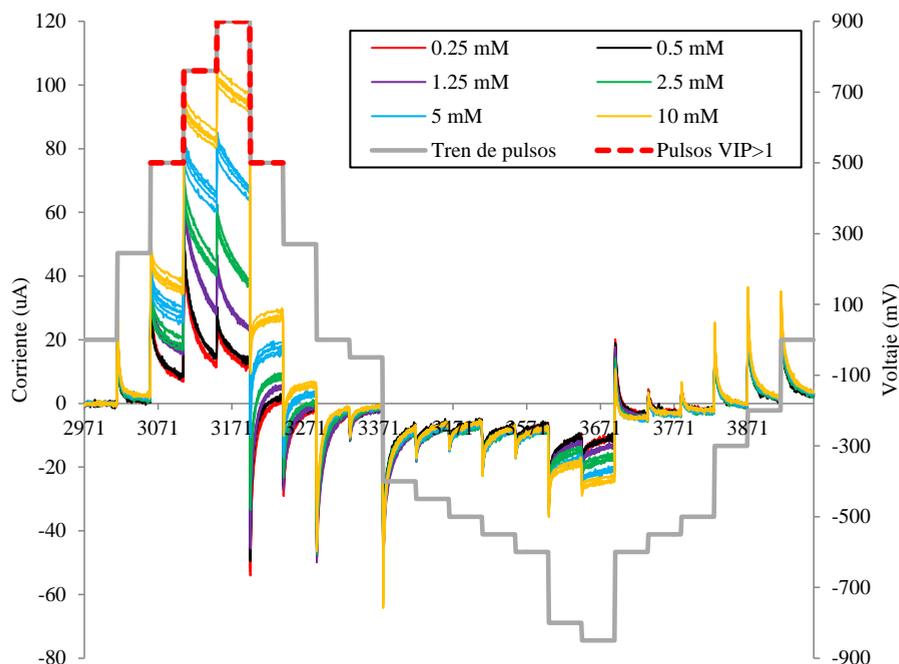


FIGURA 2.9. Respuesta eléctrica, tren de pulsos eléctricos y método VIP-PLS para el patrón ácido ascórbico dado por electrodo de Au.

En el caso del patrón ácido gálico, el electrodo de Cu fue después del electrodo de Au el de mayor proyección de las variables (figura 2.8 B). Como se observa en la figura 2.10, en la que se muestra la respuesta eléctrica, el tren de pulsos y aquellos más influyentes según el método VIP-PLS (línea roja discontinua), estos últimos presentaron una respuesta lógica a los potenciales negativos de -660 hasta -400 mV. En este caso no se observó el comportamiento anómalo, como en el caso de la plata para el patrón catequina, (fig. 2.6) siendo los valores de mayor respuesta eléctrica, en valor absoluto, los obtenidos por las concentraciones mayores de gálico y no como ocurría con el electrodo de plata para la catequina que eran obtenidos por los de menor concentración.

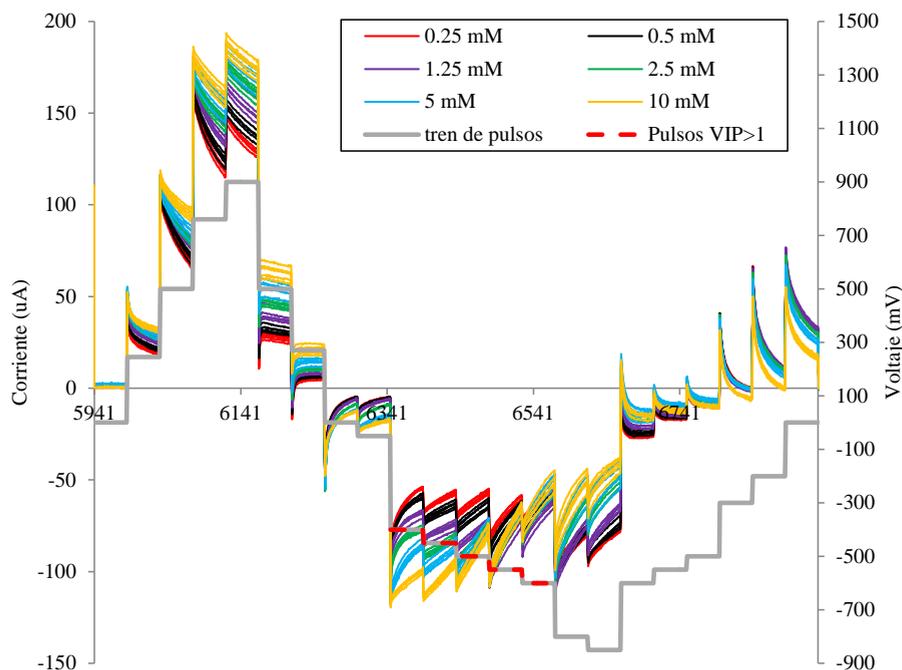


FIGURA 2.10. Respuesta voltamétrica y VIP-PLS del patrón ácido gálico y la señal de pulsos aplicado al electrodo Cu.

Evaluada la capacidad de las respuestas voltamétricas para cuantificar la capacidad antioxidante, en base a equivalentes ascórbico y gálico, a través de los modelos matemáticos de predicción, se procedió a su posible mejora estudiando la posibilidad de reducir la cantidad de variables presentes en ellos. Para ello, y al igual que en caso de los patrones a pH básico, se procedió a generar dos nuevos modelos para cada patrón en base a la proyección de las variables importantes VIP-PLS y a la selección de variables mediante el algoritmo genérico iPLS. En la tabla 2.8 se muestran los electrodos y pulsos eléctricos identificados por el método iPLS. En ambos casos existió la presencia de electrodos nobles y no nobles, si bien el número de estos, así como de pulsos fue menor.

TABLA 2.8. Pulsos eléctricos identificados mediante el método iPLS para los patrones ácidos a partir de todas las variables.

Ácido ascórbico	
Electrodos	Potencial eléctrico (mV)
Ir	-650 a -850
Pt	800 a 900
Au	0 a 500
Ag	250 a 500
Ni	-450 a -550
Ácido gálico	
Ir	0 a -200
Rh	0 a 250, -600 a -800
Au	-650 a -850
Ag	-500 a -550
Co	-650 a -600
Ni	-800 a -850

Los modelos obtenidos, al igual que ocurría con los patrones a pH básico fueron muy buenos (tabla 2.9), siendo el menor de los valores de R^2 igual a 0.96. Además, mediante el empleo de estos nuevos modelos se ha podido reducir la cantidad de variables (electrodos y pulsos) a utilizar, siendo reducida mediante la selección $VIP > 1$ a un 19.5% para el modelo ascórbico y a un 21.8% para el gálico. Mediante la selección iPLS, aún pudo ser reducida más, siendo esta reducción hasta el 3.4% y 5.7% respectivamente.

TABLA 2.9. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH ácidos a partir de la información procedente de todos los electrodos y pulsos.

Patrón	Selección de variables	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Ácido ascórbico	VIP-PLS	RMSE	0.255	0.290	0.805
		Bias	0.002	-0.001	0.499
		R ²	0.994	0.993	0.970
	iPLS	RMSE	0.434	0.456	0.919
		Bias	0.017	0.016	0.515
		R ²	0.984	0.982	0.971
Ácido gálico	VIP-PLS	RMSE	0.249	0.334	0.510
		Bias	0.002	-0.006	0.302
		R ²	0.995	0.991	0.986
	iPLS	RMSE	0.631	0.688	0.678
		Bias	0.010	0.037	0.026
		R ²	0.967	0.961	0.964

Al igual que en el caso de los patrones a pH básico, en este caso también se procedió a la obtención de nuevos modelos utilizando solo la información procedente de los electrones nobles, así como la obtenida por la selección VIP-PLS e iPLS (tabla 2.10) sobre estos electrodos. Los valores de la bondad de los modelos así obtenidos mostraron como estos fueron incluso ligeramente superiores a los obtenidos cuando se utilizó la información procedente de todos los electrodos, siendo el peor de los valores de R² de predicción obtenidos del 0.98. Así estos modelos serían los mejores para ser utilizados en la predicción de la capacidad antioxidante expresada en equivalentes de ácido ascórbico o gálico, dado que supone una reducción, sobre el 50% de la información (solo metales nobles) del 22.5 y 27%, respectivamente, utilizando la selección VIP-PLS y del 6.8 y 21.6%, respectivamente, para la selección iPLS. En la figura 2.11, a modo de ejemplo, se muestra el ajuste entre los valores teóricos de la concentración de ácido ascórbico y los predichos por el modelo utilizando la selección de las variables iPLS aplicada sobre la información procedente de los metales nobles.

TABLA 2.10. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para los patrones a pH ácidos a partir de la información procedente de los electrodos nobles y de la selección realizada por VIP-PLS e iPLS.

Patrón	Selección de variables	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Ácido ascórbico	Todos los electrodos y pulsos	RMSE	0.201	0.217	1.08
		Bias	0.001	0.002	0.95
		R ²	0.997	0.996	0.987
	VIP-PLS	RMSE	0.244	0.26	1.028
		Bias	0	-0.002	0.843
		R ²	0.995	0.994	0.983
	iPLS	RMSE	0.381	0.414	0.888
		Bias	0.011	0.01	0.624
		R ²	0.988	0.985	0.98
Ácido gálico	Todos los electrodos y pulsos	RMSE	0.247	0.289	0.442
		Bias	0.001	0.015	0.247
		R ²	0.995	0.993	0.995
	VIP-PLS	RMSE	0.265	0.295	0.456
		Bias	0.001	0.019	0.342
		R ²	0.994	0.993	0.994
	iPLS	RMSE	0.163	0.265	0.73
		Bias	0.002	0.069	-0.108
		R ²	0.998	0.995	0.991

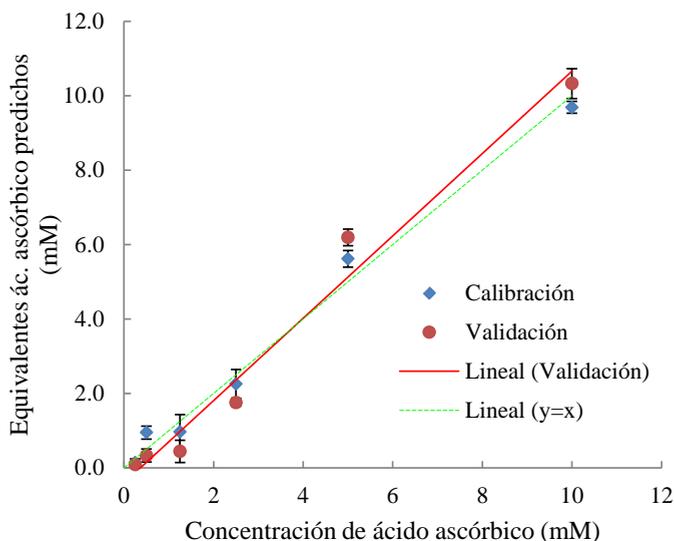


FIGURA 2.11 Valores teóricos de concentración de ácido ascórbico frente a los predichos (expresados como mM equivalentes) por el modelo generado a partir de la información seleccionada por el método iPLS a partir de las respuestas de los electrodos nobles.

Ensayo de los modelos. Equivalencias entre patrones

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los modelos obtenidos, en este caso solo los generados a partir de toda la información electroquímica, para predecir la capacidad antioxidante de otras sustancias, se procedió a ensayar mediante el modelo trolox la capacidad antioxidante de la catequina, expresándola como equivalentes de trolox. Posteriormente se realizó la operación inversa, utilizando el modelo catequina para predecir la capacidad antioxidante del trolox como equivalentes de catequina. En el caso de los patrones ácido ascórbico y gálico se procedió del mismo modo, expresando la capacidad del ácido gálico como equivalentes de ascórbico y viceversa.

Cuando el modelo trolox fue aplicado a la respuesta voltamétrica de la catequina para expresar la capacidad antioxidante de la catequina (figura 2.12) como equivalentes de trolox, no se obtuvo un ajuste lineal al representar los valores teóricos de concentración trolox (mM) frente a los

predichos en la catequina. Esto pudo ser debido a la mayor actividad antioxidante de la catequina (1mM catequina = 2.4 mM de trolox) (Meyer et al., 1998) la cual saturaría los electrodos, a las concentraciones probadas, no produciéndose todas las reacciones redox que deberían darse (Ghita y Arrigan, 2004). Esto explicaría porque al aplicar el método de Liteanu et al. (1976) solo a los tres primeros valores de la predicción (los cuales son linealizables, figura 2.12) el valor obtenido para la capacidad antioxidante de la catequina expresada como equivalentes trolox fuese de 2.32 ± 0.33 mM, similar a los 2.4 mM de la bibliografía, es decir que para estas primeras tres las reacciones redox si se habrían dado y podrían ser cuantificadas por el modelo trolox.

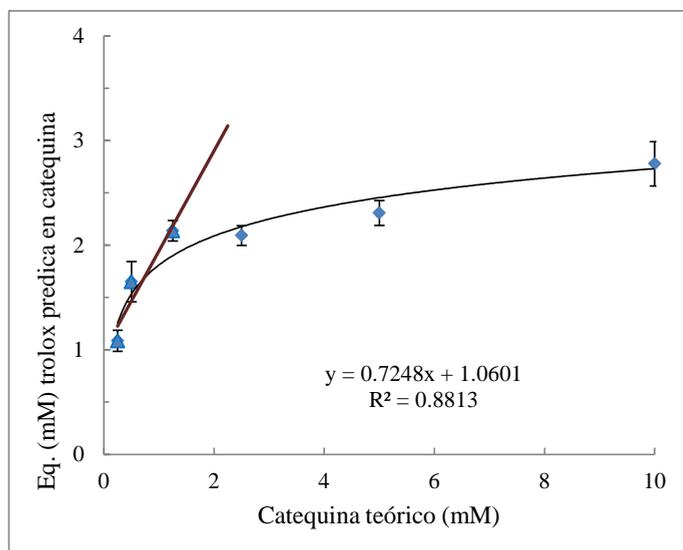


FIGURA 2.12. Línea de equivalencia entre los patrones trolox y catequina.

Al aplicar el modelo catequina para expresar la capacidad antioxidante del trolox en equivalentes de catequina ninguna predicción fue posible (figura 2.13 A). Pero cuando el modelo catequina fue recalculado empleando solo las tres primeras diluciones para desarrollarlo, el resultado obtenido fue similar al esperado (figura 2.13 B), obteniéndose un valor de capacidad

antioxidante del trolox expresada como equivalentes de 0.38 ± 0.09 mM, similar a la bibliografía (valor teórico = $1/2.4 = 0.41$ mM).

En base a estos resultados, en el caso de los 6 modelos trolox desarrollados (uno generado a partir de la información obtenida por la totalidad de los electrodos y los pulsos, otro solo empleando la información procedente de los metales nobles, 2 más obtenidos al aplicar los métodos de selección de variables VIP-PLS e iPLS al conjunto de todos los datos y finalmente 2 últimos al aplicar estos mismos métodos de selección a los datos procedentes de los electrodos nobles) estos podrían ser aplicados directamente para ensayar la capacidad antioxidante de ciertas sustancias. En cambio en el caso de la catequina, a parte de los desarrollados, también habría que ensayar los nuevos 6 obtenidos a partir de la utilización solo de la información voltamétrica generada por las tres primeras diluciones ensayadas cuyos valores de R^2 , Bias y RMSE se muestran en la tabla 2.11.

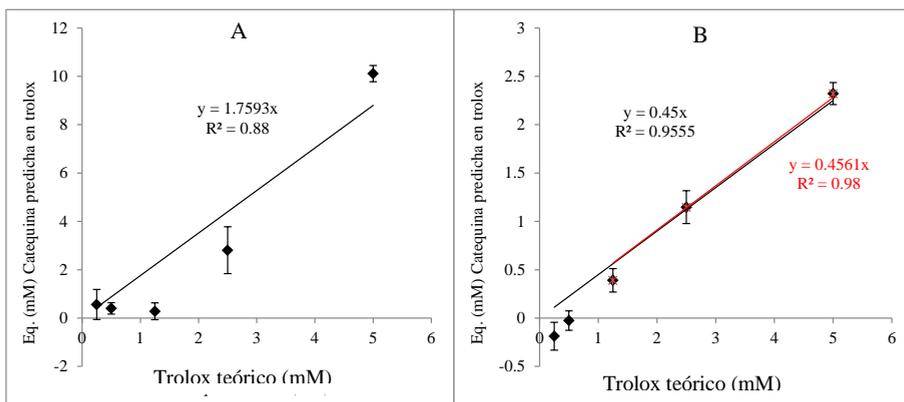


FIGURA 2.13. Línea de equivalencia entre los patrones catequina y trolox. A) modelo catequina con todas las diluciones; B) modelo catequina con las tres primeras diluciones.

TABLA 2.11. Parámetros de regresión PLS en el desarrollo de los modelos de equivalencia para predecir catequina a partir de la información procedente de las tres primeras concentraciones de los electrodos nobles y de la selección realizada por VIP-PLS e iPLS.

Selección de variables	Parámetros	Calibración	Cros-validación	Validación
Todos los electrodos	RMSE	0.231	0.283	0.366
	Bias	0.001	0.015	0.269
	R ²	0.937	0.908	0.939
VIP-PLS	RMSE	0.223	0.269	0.293
	Bias	0.001	0.014	0.183
	R ²	0.941	0.916	0.951
iPLS	RMSE	0.186	0.192	0.199
	Bias	-0.003	-0.004	0.081
	R ²	0.959	0.957	0.979
Electrodos nobles	RMSE	0.131	0.189	0.563
	Bias	0.001	-0.018	-0.533
	R ²	0.979	0.958	0.978
Nobles-VIP-PLS	RMSE	0.233	0.254	0.427
	Bias	-0.002	-0.003	-0.374
	R ²	0.936	0.924	0.950
Nobles-iPLS	RMSE	0.179	0.183	0.226
	Bias	-0.003	-0.004	0.126
	R ²	0.962	0.961	0.978

En el caso de los patrones a pH ácido, tanto el modelo ascórbico como el modelo gálico, cuando fueron utilizados para predecirse el uno al otro, generaron predicciones correctas. En la figura 2.14, a modo de ejemplo, se

muestra la recta de observados vs predichos cuando se expresó la capacidad antioxidante del ácido ascórbico como equivalentes de ácido gálico. Los valores obtenidos para las capacidades antioxidantes fueron de 0.74 ± 0.04 mM cuando el ácido gálico fue expresado como equivalentes de ácido ascórbico y de 1.26 ± 0.43 mM cuando el ascórbico fue expresado como equivalentes de gálico. Como se puede observar en la tabla 2.12 en la que se muestran las ecuaciones de equivalencia entre los patrones, los valores de R^2 obtenidos fueron elevados.

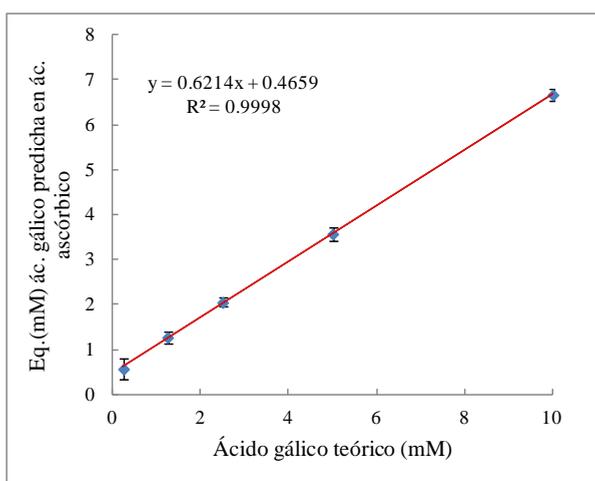


FIGURA 2.14. Línea de equivalencia entre los patrones gálico y ascórbico.

TABLA 2.12. Equivalencia entre los patrones antioxidantes.

Patrones antioxidantes	Ecuación de regresión	Linealidad (R^2)
Básico		
Catequina \equiv Trolox	$y=0.725x + 1.060$	0.881
Trolox \equiv Catequina	$y=0.4561x$	0.98
Ácido		
Á.Gálico \equiv Á. Ascórbico	$y=0.621x + 0.466$	0.999

Á. Ascórbico \equiv Á. Gálico	$y=1.259x + 0.324$	0.989
---------------------------------	--------------------	-------

CONCLUSIÓN

Las respuestas eléctricas de los patrones antioxidantes fueron evaluadas mediante la estadística multivariante PCA y PLS determinándose dos grupos de patrones, los llamados patrones a pH básicos trolox y catequina, que fueron ajustados a pH 7.4 y los llamados patrones a pH ácidos: ácido ascórbico y ácido gálico, que fueron ajustados a pH 4.8.

Para cada patrón se han obtenido 6 modelos matemáticos de predicción de la capacidad antioxidante expresada como mM equivalentes a cada patrón. Uno generado a partir de la información obtenida por la totalidad de los electrodos y los pulsos. Los otros 5 se obtuvieron con la finalidad de reducir la cantidad de información generada por el equipo al utilizar un tren de pulsos genérico y por tanto con pulsos no influyentes. Así se ha obtenido otro modelo a partir de la información procedente solo de los electrodos formados por los metales nobles, 2 más obtenidos al aplicar los métodos de selección de variables VIP-PLS e iPLS al conjunto de todos los datos y finalmente 2 últimos al aplicar estos mismos métodos de selección a los datos procedentes de los electrodos nobles.

De los 6 modelos de predicción obtenidos, los generados por iPLS sobre los electrodos nobles son los que a priori pueden ser más interesantes dado que con ello se reduce en gran medida la cantidad de información que el futuro equipo de medida tendría que procesar. Además, a la vez que se reduce por un lado la gran reactividad de los electrodos no nobles y la dificultad de la cuantificación de dicha respuesta también se reduce la dificultad que estos electrodos presentan en su limpieza tras una medida como consecuencia de la deposición en ellos de las sustancias generadas por la reacción.

Así y todo, si bien todo los modelos matemáticos encontrados fueron calificados de buenos por los resultados estadísticos, estos tendrán que ser reafirmados cuando sean aplicados a la cuantificación de la capacidad antioxidante de extractos de plantas y zumos de frutas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid, R. and Newair, E. (2011). Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 657(2): 107-112.
- Afanador, N.L.; Tran, T. N. and Buydens, L.M.C. (2013). Use of the bootstrap and permutation methods for a more robust variable importance in the projection metric for partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta*. 768: 49-56.
- Alcañiz, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ambiente agroalimentario. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Alcañiz, M.; Vivancos, J.; Masot, R.; Ibañez, J. Raga, M. Soto, J. and Martínez-Mañez, R. (2012). Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 111(1): 122-128.
- Arabshahi-D, S., Devi, D.V. and Urooj, A. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food chemistry*. 100: 1100-1105.
- Arabshahi-Delovee, S. and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry* 102: 1233-1240.
- Azizah, A.H., Roslawati, N.N. and Tee, T.S. (1999). Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food chemistry*. 64: 199-202.
- Borin, A. and Poppi, R. J. (2005). Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. *Vibrational Spectroscopy*. 37: 27-32.

- Chevion, S., Roberts, M. and Chevion, M. (2000) The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(6): 860-870.
- Chong, I. and Jun, Ch. (2005) Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 78: 103-112.
- Chirinos. R.; Huamán. M.; Betalleluz-Pallardel. I.; Pedreschi. R. and Campos. D. (2011). Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*. 128: 711-716.
- Flores, D.; Sandoval, J.; Valdivia, B. and Aguilar, C. (2010). Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. México. 18(49): 20-25.
- Ghita, M. and Arrigan D.W.M. (2004). Dopamine voltammetry at overoxidised polyindole electrodes. *Electrochimica Acta*, 49, 4743-4751.
- Güney, S.; Yildiz, G.; Capan, A.; Ozturk, T. (2010). Evaluation of the electrochemical properties of 3-hydroxyflavone using voltammetric methods. *Electrochimica Acta*. 55(9): 3295-3300.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships Reviews. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572-584.
- Hoyle, C. and Santos, J. (2010). Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. *International Food Research Journal*. 17: 937-946.
- Janeiro, P. and Oliveira, A. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*. 518(2): 109-115.

- Keyrouz, R.; Abasq, M.; Le, C.; Blanc, N.; Audibert, L.; Argall, E. and Hauchard, D. (2011). Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry*. 126 (3): 831-836.
- Khopde, S.; Priyadarsini, K.; Mohan, H.; Gawandi, V.; Satav, J.; Yakhmi, J., Banavaliker, M.; Biyani, M. and Mittal, J. (2001). Characterizing the antioxidant activity of amla (*Phyllanthus emblica*) extract. *Current Science*. 81(2): 185-190.
- Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M. and Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 313-322.
- Li, Y., Du, Y. and Zou, Ch. (2009). Effects of pH on antioxidant and antimicrobial properties of tea saponins. *Eur. Food Res. Techno*. 228: 1023-1028.
- Liteanu, C., Popescu, L.C. and Hopârtean, E. (1976). Estimation of the linearity domain limit for the ion-sensitive membrane electrode function. *Analitical Chemistry*, 48 (13): 2010-2013.
- Malyszko, J. and Karbarz, M. (2006). Electrochemical oxidation of trolox and a-tocopherol in acetic acid: A comparative study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 595: 136-144.
- Martínez-Flórez, S., González-Gllego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, J. (2002). Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII(6): 271-278.
- Meyer A. S., Heinonen M., Frankel E.N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, yanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61, 71-75.
- Milardovic, S., Kerekovi'c, I., Derrico, R. and Rumenjak, V. (2007). A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity using enzymatically produced ABTS⁺ and biamperometric detector containing interdigitated electrode. *Talanta*. 71: 213-220

- Mu, S. (2003). The electrocatalytic oxidation of gallic acid on polyaniline film synthesized in the presence of ferrocene phosphonic acid. *Synthetic Metals*. 139(2): 287-294.
- Okiei, W.; Ogunlesi, M.; Azeez, L.; Obakachi, V.; Osunsanmi, M. and Nkenchor, G. (2009). The Voltammetric and Titrimetric Determination of Ascorbic Acid Levels in Tropical Fruit Samples. *Int. J. Electrochem. Sci.* 4: 276-287.
- Panizza, M. y Cerisola, G. (2009). Electrochemical degradation of gallic acid on a BDD anode. *Chemosphere*. 77(8): 1060-1064.
- Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Serban, A. and Fafaneata, C. (2014). Electrochemical methods for ascorbic acid determination Review article. *Electrochimica Acta*. 121: 443-460.
- Pokorny J., Yanishlieva, N. y Godon, M. (2001). Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- Psotová, J., Zahálková, J., Hrbáč, J., Šimánek, V. and Bartek, J. (2001). Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomed. Papers*. 145(2): 81-83
- Restrepo, A.M., Cortés, M. y Rojano, B.A. (2010). Potenciación de la capacidad antioxidante de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) por incorporación de vitamina E utilizando la técnica de impregnación a vacío. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 17(2): 135-140.
- Šeruga, M.; Novak, I. y Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 124(3): 1208-1216.
- Smirnoff, N. (2005). Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd.

- Vulcu, A.; Grosan, C.; Muresan, L. M.; Pruneanu, S. and Olenic, L. (2013). Modified gold electrodes based on thiocytosine/guanine-gold nanoparticles for uric and ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*. 88: 839-846.
- Zanwar, A.; Badole, S.; Shende, P.; Hegde, M. and Bodhankar, S. (2014). Chapter 21 – Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease. *Polyphenols in Human Health and Disease. Volume 1: Polyphenols in Chronic Diseases and their Mechanisms of Action*. Pages 267-271.
- Zielinska, D.; Szawara-Nowak, D.; Ornatowska, A. and Wiczowski, W. (2007). Use of Cyclic Voltammetry, Photochemiluminescence, and Spectrophotometric Methods for the Measurement of the Antioxidant Capacity of Buckwheat Sprouts. *J. Agric. Food Chem.* 55(24): 9891-9898.

CAPITULO 3

***CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTAS
PERUANAS***

INTRODUCCIÓN

Perú cuenta con una gran biodiversidad en flora y fauna. Su compleja área geográfica debido a la cordillera de los Andes y al Océano Pacífico, hacen que posea diversos climas que favorecen el desarrollo de especies frutales diferentes de una región a otra. En las regiones andina y amazónica crecen frutas con características organolépticas especiales, fuente de alimentación de las comunidades que habitan en estas regiones y con propiedades funcionales para el cuidado de la salud de los mismos (De la Cruz et al., 2007, Chirinos et al., 2013, Brack, 1999). De entre estas frutas, cabe destacar la amazónica camu camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaug), pero también las provenientes de los valles interandinos como son el tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey) (Contreras-Calderón et al., 2011, Simirgiotis et al., 2013) y el aguaymanto (*Physalis peruviana* L.). Todas estas frutas son ricas en vitamina C y con alta actividad antioxidantes (Chirinos et al., 2010; Contreras-Calderón et al., 2011, Puente et al., 2011; Valdenegro et al., 2012; Simirgiotis et al., 2013), si bien no toda la capacidad antioxidantes de estas está relacionada con su contenido de vitamina C sino también con los compuestos fenólicos presentes en ellas. Es esta capacidad antioxidante la que ha hecho que este tipo de frutas, que en su momento servían solo para la alimentación regional, haya incrementado su demanda en el mercado mundial.

Existen diferentes métodos para la determinación de la capacidad antioxidante de frutas (Kuskoski et al., 2005, Litescu et al., 2010). Entre los métodos más empleados está el ABTS. Esta técnica fue desarrollada por Re et al. (1999). El método se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la reducción de un radical estable preformado, el 2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}), y es el método de referencia utilizada en esta tesis doctoral. Pero si bien está la existencia de estos métodos que aportan información válida acerca de la capacidad total antioxidante de sustancias, la utilización de la lengua electrónica, basada en la voltametría de pulsos, podría ser una alternativa a estos métodos. Así dado que la lengua electrónica es una técnica en la que coexisten diferentes electrodos, la interacción entre estos podría describir esta cualidad independientemente de la sustancia que la generase. Las lenguas electrónicas han emergido como herramientas rápidas y fáciles de usar, muy

prometedores para la evaluación de calidad de los alimentos (Escuder-Gilabert y Peris, 2010). La lengua electrónica voltamétrica surge como una alternativa en el análisis de la calidad de las frutas (Wei y Wang, 2013, Winquist et al., 2012, Haddi et al., 2014, Tian et al., 2013, Kantor et al., 2008) y en la determinación de la capacidad antioxidante (Baldeón et al., 2015).

OBJETIVO

El objetivo del estudio es establecer si la lengua electrónica voltamétrica, a través de los modelos matemáticos de predicción definidos en el capítulo 2 (Patrones antioxidantes. Modelos de predicción), es capaz de determinar la capacidad antioxidante de las frutas peruanas camu-camu, tumbo, aguaymanto y kiwi, con el mínimo procesamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima.

Las frutas utilizadas en el presente estudio son camu camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaug), tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey) y aguaymanto (*Physalis peruviana* L.), todas ellas procedentes de la zona andina del Perú. Además también se evaluó el kiwi (*Actinidia deliciosa*) adquirido en supermercado de Valencia, España. La utilización del kiwi se basó en la necesidad de emplear una fruta similar a las del estudio, por su característica antioxidante (Bursal y Gülçin, 2011, Du et al., 2009, D'Evoli et al., 2015).

Las frutas peruanas una vez recolectadas fueron lavadas y desinfectadas y tras un ligero calentamiento para ablandarlas fueron licuadas para finalmente tamizarlas a fin de separar las cáscaras y semillas. Con el propósito de transportar los zumos de frutas del lugar de origen hasta el centro de investigación estos fueron concentrados al vacío y posteriormente pasteurizadas a 70°C por 5 minutos, envasándose y conservándose en congelación. Para su posterior utilización, los zumos fueron reconstruidos a su concentración de sólidos solubles iniciales (° Brix). En el caso del kiwi, este se peló y trituró mediante un Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) hasta que quedó un puré, conservándose también en congelación. Todos los zumos de frutas se llevaron a centrifugar a unas

condiciones de 10000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C, separando las posibles partículas sólidas presentes en la muestra.

Hay que remarcar que para la determinación de la capacidad antioxidante mediante voltametría no hubiera sido necesaria tanta manipulación de la fruta, solo se tendría que haber obtenido el zumo, el cual se habría filtrado y diluido con la disolución base. Pero dado el transporte desde el lugar de origen se tuvieron que realizar el protocolo descrito.

Caracterización fisicoquímica de los zumos

Con la finalidad de caracterizar los zumos a fin de poder posteriormente interpretar los datos obtenidos por voltametría, a estos se les realizó diferentes análisis fisicoquímicos; rendimiento zumo/fruta, determinación de la actividad de agua (aw), pH, sólidos solubles (° Brix), acidez total, contenido en azúcares, fenoles totales, ácido ascórbico y finalmente la capacidad antioxidante total. Cada análisis fisicoquímico fue realizado por triplicado.

Determinación de la actividad de agua (aw).

Para la determinación de la actividad de agua se utilizó el higrómetro Aqualab GB-X model Fast-Lab (GBX, Romans-sur-Isère, France), basado en el fenómeno del punto de rocío, previa calibración con una disolución saturada de sulfato de potasio, trabajando a una temperatura de 25 °C. Las muestras previamente homogeneizadas se colocaron en una porta muestras, extendido en la base con 2 mm de espesor, aproximadamente. Se tomó la lectura directa de la actividad de agua, hasta que se obtuvieron 2 lecturas consecutivas idénticas. La sensibilidad del aparato es de 0,001.

Determinación de pH.

El pH se midió con un el método potenciométrico, con electrodo de vidrio, directamente sobre las muestras ya preparadas, según el método A.O.A.C 981,12 (A.O.A.C 1980). El pH-metro que se utilizó fue pH-meter BASIC 20+, CRISON.

Para proceder a la medición, inicialmente se realizó la calibración del aparato, introduciendo el electrodo en cada una de las 3 disoluciones tampón de pH 7, 4 y 9 (amortiguadores). Una vez calibrado y listo para medir, se

tomaron 3 medidas de cada una de las muestras de los zumos en estudio. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

Determinación de sólidos solubles, ° Brix.

El valor de ° brix corresponde a la cantidad de sólidos solubles presentes en un zumo o pulpa. Los sólidos solubles se midieron con un refractómetro de mesa, siguiendo el método AOAC 932,12 (A.O.A.C, 1980). Para ello una vez atemperado el equipo a 20 °C fue calibrado, ajustando a cero con agua destilada. Las medidas posteriores se realizaron directamente, limpiando siempre con agua destilada entre muestras.

Determinación de la acidez total titulable (ATT).

En el procedimiento usual para determinar la concentración total de ácidos, una alícuota de la solución que contiene el ácido se titula con una solución estándar de álcali hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base ha sido añadida. Este punto final puede detectarse mediante indicadores (cambio de color), electrométricamente (pH-metro), etc. En este caso la acidez total se halló por el método de titulación Electrométrica (Curva de neutralización).

Gran (1950) indicó que en una titulación potenciométrica el punto final se encuentra, generalmente, trazando un gráfico de E (o pH) como una función de V (volumen añadido). Algunas veces, sin embargo, el punto de máxima pendiente no muestra el punto final exacto de la titulación por lo que mediante la representación de $\Delta V / \Delta \text{pH}$ versus V se busca el punto de inflexión más bien definido.

Para la determinación de la ATT, se pipetearon 10 ml de zumo de fruta en un vaso de precipitado de 250 ml que contenía 50 ml de agua libre de CO₂. Tras esto se determinó el pH con el pH-metro BASIC 20+ CRISON (Figura 9). Se agregó 1 ml de la solución estándar de NaOH 0.1 N y se repitió la lectura del pH. Se continuó agregando volúmenes de 1 ml de base y determinando el pH después de cada adición. Cuando el pH se fue aproximando a 5, se fueron agregando 0.5 ml de la solución de NaOH en lugar de 1 ml. Y se continuaron tomando medidas de pH hasta que estas fueron aproximadamente constantes.

Por último, la recopilación y procesamiento de datos se realizó con el programa informático Microsoft Excel 2010, con el que se trazaron las curvas de neutralización de pH vs. mL de NaOH 0.1N añadidos y $\Delta V/\Delta pH$ vs. mL de NaOH 0.1 N añadidos. De la curva se obtiene el volumen necesario para neutralizar la muestra y calcular el porcentaje de acidez como equivalentes de ácido cítrico.

Determinación de azúcares por el método HPLC

El método HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) o Cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes de una muestra que se fraccionan entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida compuesta por partículas muy finas contenidas en una columna, y donde se utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente a través de ella, consiguiendo así separaciones de gran resolución, permitiendo su identificación y cuantificación. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil bombeada con alta presión a una columna que contiene la fase estacionaria y allí el analito se retarda separándose por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil.

HPLC, permite muy buenas separaciones e identificaciones de sustancias o grupos de sustancias en un tiempo corto, tanto cualitativa como cuantitativamente. Como condición, es imprescindible que la muestra sea soluble en un disolvente al ser la fase móvil un líquido. La cromatografía líquida de alta resolución tiene ventajas en el análisis de los azúcares debido a su gran solubilidad en agua y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (Chicharro et al., 2007).

La separación y cuantificación de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa en los zumos de frutas en estudio, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un detector amperimétrico (HPAEC-PAD) (Menezes et al., 2009).

Para ello, los materiales y aparatos utilizados fueron una columna Metrosep Carb 1 250/4,6 con un tamaño de columna de 250 mm x 4.6mm ID. Se utilizó un detector amperimétrico de Au y el equipo Metrohm con módulo de inyección. Por lo que respecta a la recopilación y el procesamiento de los datos, se realizaron con el Programa informático Icnnet 2.3. (Metrohm Ltd. CH-9101, Herisau, Switzerland).

Para la determinación, se establecieron unas condiciones de trabajo en las que se seleccionó la fase móvil de NaOH de 100 mM, con un flujo de trabajo de 1 mL/min, una temperatura de 32 °C y presión de 8.5 MPa, y un volumen de inyección de 20 µL.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- D (-) Fructosa, pureza 99%. SIGMA
- D (+) Glucosa, pureza 99.5%. SIGMA
- Sacarosa, pureza 99.5%. SIGMA
- Todas las soluciones patrón se prepararon con agua desionizada MiliQ.

Para la preparación de las muestras, se tomó 1 ml de zumo y se realizaron las diluciones necesarias para cada fruta a medir.

Las diluciones fueron las siguientes: para kiwi y tumbo tan solo se hizo una dilución de 1/100 y para camu-camu y aguaymanto se hicieron dos, de 1/50 y de 1/100. Se preparó un blanco y de cada una de los zumos se prepararon tres viales de 15 mL (ej. tumbo, T1, T2, T3). El equipo Metrohm, tardó 30 minutos para medir cada una de ellas, es decir 1.5 h por fruta.

Para la preparación de los patrones de azúcar (fructuosa, glucosa y sacarosa) se preparó una solución madre en agua Mili Q 5000 µg/mL y a continuación, se tomaron las alícuotas necesarias para preparar las disoluciones de 5, 15, 30, 45 y 75 µg/mL y trazar así la curva patrón de los azúcares.

Determinación de Fenoles por el método Folin-Ciocalteu (FC)

Los fenoles totales en las muestras se determinaron por el método del reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), usando ácido gálico como estándar. El método de Folin-Ciocalteu es uno de los métodos más

comunes usados para el cálculo de fenoles en frutas y plantas. Se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. En el reactivo fenol Folin and Ciocalteu, el constituyente activo es la mezcla ácida de fosfomolibdico-túngstico (molibdato sódico y tungstato de sodio, 2,5% y 10%, respectivamente). Este reactivo, como otros, no es específico para ninguno de los fenólicos y el color arrojado (la transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23})) depende de grupos hidroxilo y su lugar en las moléculas, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Peterson, 1979, Julkunen-Tiitto, 1985)

Los reactivos utilizados para la determinación de fenoles fueron:

- Carbonato de Sodio, ACS, ISO. Scharlau.
- Ácido Gálico monohidratado extra puro. Scharlau.
- Reactivo Folin Ciocalteu 1N.
- Di-potasico hidrogenofosfato trihidrato para HPLC. Scharlau.
- Potasio dihidrogenofosfato. Scharlau.

Tuvo que realizarse una preparación previa de los reactivos para desarrollar el análisis. El reactivo FC concentrado, que es comercialmente disponible, fue diluido a 1/10 de concentración con agua Milli-Q, y se protegió de la luz cubriendo el aforado en el que se mantenía, con papel de aluminio. También se tuvo que preparar una solución de carbonato de sodio para la que se pesaron 3.5 g que se disolvieron completamente, mediante agitación, en medio litro de agua Milli-Q.

Para la estandarización de ácido gálico se preparó una solución patrón de 100 mg/L de concentración. La solución Stock fue preparada disolviendo 0.05 gramos de ácido gálico en medio litro de agua Milli-Q.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en frascos protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua Milli-Q y posteriormente con buffer de fosfato de potasio, para obtener concentraciones de 0, 8, 12, 16, 26 y 30 mg/L para la preparación de la curva de calibración.

El buffer utilizado para la calibración de la curva, y como base en las diluciones, fue preparado a pH 4.8 y 0.01 M, utilizando una solución A de fosfato monosódico y otra B de fosfato bipotásico trihidratado.

Esto se realizó tomando respectivamente 400, 600, 800, 1300 y 1500 μL de la disolución patrón de ácido gálico de 100 mg/L en frascos ámbar de 5 mL. Luego se adicionó a cada frasco 500 μL de reactivo de Folin Ciocalteu 1N. Se agitó durante 5 minutos y posteriormente se adicionaron 2500 μL de la disolución de carbonato de sodio a cada frasco, llevándose a un volumen final de 5 ml con agua Milli-Q o con el buffer. Se dejó reposar por 1h y finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm en el espectrómetro. Se llevaron a cabo 3 repeticiones de cada fruta, así como para la obtención de la curva de calibración. Los datos se registraron y se graficó la curva estándar.

Finalmente para la determinación del contenido de fenoles en los zumos de frutas, las muestras fueron diluidas con diferentes grados de dilución, representadas en la tabla 3.1. Estos factores de dilución se escogieron tras diferentes ensayos realizados.

$$y = 45.94x - 0.392 \quad (R^2 = 0.998) \quad (1)$$

Donde y es mg/mL y x es diferencia de Abs.

De cada dilución de las muestras, se tomó 1 mL, que se introdujo en un frasco opaco protegido por la luz. Seguidamente se añadieron 500 μL de Folin Ciocalteu 1 N. Se agitó un poco y se dejó en reposo durante 5 min. Tras esto, se le adicionó 2500 μL de carbonato de sodio y llevando a 5000 μL se dejó en reposo durante 60 min. Finalmente se llevaron los frascos al espectrofotómetro.

TABLA 3.1. Factor de dilución de los diferentes zumos de frutas.

Muestra	Factor de dilución
Tumbo	400
Aguaymanto	25
Camu-camu	1333.3
Kiwi	50

Determinación de ácido ascórbico (Vitamina C) mediante HPLC

El ácido L-ascórbico se encuentra en todos los tejidos vivos como un importante compuesto redox del metabolismo celular. Fuentes importantes de la vitamina C son las frutas frescas y vegetales. El ácido ascórbico (AA) es fácilmente oxidado a ácido dehidroascórbico (ADA) y por lo tanto, es necesario seleccionar las condiciones de extracción en forma cuidadosa con el fin de minimizar las posibles pérdidas debido a las etapas de preparación de las muestras.

El método seleccionado para la separación, identificación y cuantificación del ácido ascórbico (Vitamina C) ha sido el método basado en técnicas por HPLC y descrito por Igual *et al.*, 2010. Para su determinación fue importante escoger primeramente las condiciones de trabajo, para reducir las posibles pérdidas durante la preparación de las muestras.

Se realizó una extracción de 1 mL de la muestra con 9 mL de ácido oxálico 0.1% durante 3 min filtrándose inmediatamente antes de la inyección. El método y la instrumentación de HPLC fue: columna Ultrabase-C18, fase móvil 0.1% de ácido oxálico, volumen de inyección de 20 μ L, velocidad de flujo de 1 mL/min, detección a 243 nm y a 25 °C. Con la finalidad de cuantificar la concentración de ácido ascórbico en las muestras se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de ácido ascórbico.

Determinación de la capacidad antioxidante total por el método de ABTS

El método químico ABTS, técnica que fue desarrollada por Re *et al.*, (1999) y descrita por Kuskoski *et al.*, (2005), mide la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (6 - hidroxil- 2, 5, 7, 8 - tetrametilcromo - 2 - ácido

carboxílico) el cual es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol (vitamina E) con un alto poder antioxidante o también en equivalentes de ácido ascórbico, en nuestro caso. El método se basa en la cuantificación espectrofotométrica del radical 2.29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+) que no ha reaccionado con el compuesto antioxidante (ácido ascórbico como patrón o sustancias presentes en disoluciones a evaluar).

Para la determinación analítica en primer lugar se preparó la solución madre de trabajo, el radical (ABTS•+), de color azul-verde intenso. Para ello se mezclaron dos reactivos a partes iguales ABTS (15 mM) y persulfato de potasio (4.8 mM) incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16 horas. Pasado el tiempo y una vez formado el radical (ABTS•+) este se diluye con base fosfato de potasio de 0.01 M a pH 4.8, y se ajusta hasta obtener una lectura con valor de absorbancia (Abs) comprendido entre 1.1 ± 0.02 a la longitud de onda de 734 nm.

La cuantificación de la capacidad antioxidante de las disoluciones se realiza mezclando 150 μ L de cada disolución a ensayar con 2850 μ L del radical, dejando reaccionar durante 30 minutos en agitación a 20 °C. Transcurrido el tiempo, las diluciones se miden a 734 nm, utilizándose como blanco la base fosfato. Todas las disoluciones ensayadas tuvieron que ser diluidas hasta un valor en el que el resultado de absorbancia final estuviese entre valores comprendidos entre 0 y 1.

Para cuantificar la capacidad antioxidante de los extractos se elaboró una curva estándar de equivalentes de ácido ascórbico como antioxidante de referencia. Para ello se prepararon diluciones a concentraciones desde 100 hasta 625 μ M en base fosfato de potasio.

Determinación de la capacidad antioxidante total mediante lengua electrónica voltamétrica

En la determinación de la capacidad antioxidante total mediante la lengua electrónica voltamétrica se utilizó el equipo y tren de pulsos descritos en los capítulos anteriores y en la introducción. Para ello se prepararon diluciones de los zumos de frutas empleando buffer fosfato (0.01 M) ajustado a pH 4.8. La utilización de este buffer además asegura que la

cantidad de analito en las mayores diluciones sea el suficiente como para permitir el paso de corriente. Las diluciones preparadas fueron en todos los casos del 1 al 4%, si bien en el caso del camu-camu también se preparó una al 0.5% dado su mayor capacidad antioxidante según observado en bibliografía.

Una vez preparadas las diluciones estas fueron medidas por la lengua electrónica voltamétrica obteniendo así la respuesta eléctrica de cada una de ellas; estas respuestas fueron introducidos en los modelos de predicción obtenidos para los patrones ascórbico y gálico, los cuales están expresados a pH 4.8 y que se definieron para tal fin. Así la capacidad antioxidante queda expresada como equivalentes ascórbico (EAA) o gálico (EAG).

Los modelos utilizados, como se ha descrito en el capítulo 2, fueron 6; uno generado a partir de la información obtenida de los voltagramas generados por la totalidad de los electrodos y los pulsos, otro a partir de la información procedente solo de los electrodos formados por los metales nobles, 2 más obtenidos al aplicar los métodos de selección de variables VIP-PLS e iPLS al conjunto de todos los datos y finalmente 2 últimos al aplicar estos mismos métodos de selección a los datos procedentes de los electrodos nobles.

Análisis estadístico

El estudio estadístico realizado sobre los valores obtenidos en la caracterización fisicoquímica de los zumos de frutas fue realizado utilizando el programa Statgraphics Centurion XV (Manugistics, Rockville, MD, USA). Un análisis de la varianza ANOVA fue realizado con un nivel de significancia del 0.05. En aquellos casos en los que las diferencias fueron significativas, las medias fueron evaluadas mediante el test de Fisher.

Las respuestas voltamétricas obtenidas para cada una de las diluciones de los zumos analizados fueron inicialmente estudiadas mediante el análisis de componentes principales (PCA) con la finalidad de visualizar posibles datos anómalos, así como posibles tendencias espontáneas de agrupación.

Para la predicción de la capacidad antioxidante total de los zumos mediante la técnica voltamétrica se utilizó la herramienta estadística de análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), cuya bondad fue evaluada a partir de los valores del coeficiente de determinación (R^2), desviación BIAS y el error por el cálculo de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE) de la

predicción (P). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con PLS Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, EE.UU.), una extensión de la caja de herramientas en el entorno computacional Matlab 7.6 (The Mathworks, Natick, Massachusetts, EE.UU.).

Una vez obtenidos los valores predichos para cada una de las diluciones obtenidas y dado que el comportamiento no fue lineal se aplicó *el método de la pendiente* de Liteanu et al. 1976; Locatelli et al., 2003, utilizando el criterio de la prueba *t de student*. En ella, los valores de capacidad antioxidante obtenidos empleando el método matemático se graficó, en la mayoría de los casos se observó hasta la mitad de la gráfica una tendencia lineal y la otra parte una tendencia exponencial. La primera parte se ajustó a una ecuación lineal (ecuación 2) de acuerdo con el método de mínimos cuadrados. Luego se calcula el límite de confianza (δ) que es la diferencia absoluta entre los valores experimental y calculado, según el criterio *t-student* en el 95% de significación.

$$E_{AAc} = E_{AAo} + b \cdot f_c \quad (2)$$

Donde; “ E_{AAc} ” es Equivalentes ácido ascórbico calculado, “ f_c ” es el factor de concentración, “ b ”, la pendiente y el intercepto E_{AAo}

Calculo del valor extremo (δ) que es igual a la mitad de la anchura del límite de confianza (ecuación 4):

$$|E_{AAexp} - E_{AAc}| = \delta \quad (3)$$

Dónde: “ E_{AAexp} ” es el valor experimental.

La determinación de la capacidad antioxidante fue expresada como $E_{AAc} \pm \delta$

Finalmente los valores obtenidos fueron comparados con los obtenidos por el método de referencia ABTS a fin de evaluar la predicción. Para ello se utilizó el análisis de la varianza ANOVA, con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Con la finalidad de caracterizar los zumos de frutas que se han utilizado en el presente trabajo, a continuación se muestran los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos realizados. Los resultados se dan en varias expresiones, dado que con la finalidad de poder comparar los resultados con los obtenidos por otros autores se ha tenido que ir recalculando el valor a fin de expresarlo teniendo en cuenta toda la fruta o sólo el zumo de ésta. En muchos de los casos las comparaciones han sido orientativas pues muchos de los artículos que expresan los resultados en base fruta no reflejan el rendimiento en zumo de ésta (o viceversa) por lo que los valores expresados son dispares.

Determinación de a_w , pH, ° Brix y rendimiento zumo/pulpa.

La tabla 3.2 muestra los valores promedios, la desviación estándar y las diferencias significativas ($P\text{-value}<0.05$), expresadas con diferentes letras para una misma columna, de los valores de a_w , grados brix y pH de los zumos de frutas en estudio. Como se puede observar los valores de a_w , para todos los zumos, fueron superiores a 0.980. Si bien no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos, los zumos de frutas que presentaron relativa mayor actividad de agua fueron el kiwi y el camu-camu (0.988 ± 0.001^a), siendo los valores para el tumbo y el aguaymanto de 0.981 ± 0.001^a y 0.981 ± 0.066^a respectivamente. En cuanto a la concentración en sólidos solubles (° brix) los zumos de frutas que presentaron una mayor concentración fueron el tumbo ($11 \pm 0.1^\circ$) y el aguaymanto ($13.50\pm 0.06^\circ$), siendo estadísticamente menores los valores para el camu-camu (7.30 ± 0.06^b) y más aún para el kiwi (12.4 ± 0.9^a). Como se aprecia en la tabla 3.2, y como inicialmente cabría esperar, existió un comportamiento inverso en cuanto a los valores de a_w y ° brix dado que los zumos de frutas que tuvieron mayores valores de a_w presentaron menores en ° brix.

TABLA 3.2. Media y desviación estándar de los valores de a_w , °Brix y pH para los zumos de frutas en estudio.

Muestra	a_w	° Brix	pH
Kiwi	0.988 ±0.001 ^a	12.4 ±0.9 ^a	3.4 ±0.2 ^a
Camu-Camu	0.988 ±0.001 ^a	7.3 ±0.1 ^b	2.4 ±0.1 ^b
Tumbo	0.981 ±0.001 ^a	11.0 ±0.1 ^c	3.1 ±0.1 ^c
Aguaymanto	0.981 ±0.066 ^a	13.5 ±0.1 ^c	3.5 ±0.1 ^a

* Diferentes letras en una misma columna; diferencias significativas p-value<0.05

Los zumos de frutas que presentaron valores estadísticamente superiores de pH fueron el aguaymanto (3.5 ± 0.1^a) y el kiwi (3.4 ± 0.2^a), siendo el tumbo (3.1 ± 0.1^c) y sobre todos el camu-camu (2.4 ± 0.1^b) los frutos más ácidos.

Dado que muchas de las frutas se suelen consumir en zumo es importante caracterizar el rendimiento de zumo existente en una fruta, más aun cuando se describen propiedades beneficiosas para el organismo presentes en estas que se ingieren mediante este zumo. Así para poder interpretar los resultados de ascórbico, fenoles, capacidad antioxidante, etc., que puedan presentar estas frutas es importante pues conocer el rendimiento zumo/ pulpa de las frutas en estudio. La fruta que presentó un mayor rendimiento fue el kiwi (83.65%), siendo el tumbo la que presentó un menor valor (29.87%). Valores similares han sido encontrado por otros autores para el camu-camu, con un rendimiento del 50% (Villachica, 1996) o el tumbo, con un rendimiento del 27.5% (Goykovic, 1993).

TABLA 3.3. Rendimiento (%) zumo/pulpa para las frutas en estudio.

Muestra	Rdto. zumo/pulpa
Kiwi	83.65
Camu-Camu	41.33
Aguaymanto	52.00
Tumbo	29.87

Acidez total titulable (ATT)

En la figura 3.1, a modo de ejemplo, se presenta una de las curvas de neutralización de los ácidos orgánicos presentes en el zumo de kiwi (*actinidia deliciosa*) con una solución de NaOH 0.1 N. La curva es característica de la titulación de una solución de ácido débil con una base fuerte y es lo esperado en los alimentos ácidos. Su comportamiento es propio de los sistemas tampones o reguladores de pH. La pendiente máxima de la curva de neutralización (figura 3.1) ($\Delta V/\Delta pH$) fue obtenida para un volumen de NaOH 0.01 N de 18.5 mL lo que representó una equivalencia en ácido cítrico de 1.2 g de ácido cítrico/100 g de pulpa, valor similar al obtenido por otros autores de 1.62 g de ácido cítrico/100 g de pulpa (Schwartz et al., 1999).

Como se puede observar en la tabla 3.4, los zumos de frutas que presentaron mayores valores en equivalentes ácido cítrico fueron el camucamu (4.459 ± 0.158 g de Ac. cítrico /100 mL de zumo) y el tumbo (2.912 ± 0.407 g de Ac. cítrico /100 mL de zumo). Estos valores están en concordancia con los menores valores de pH observados para estas dos frutas (tabla 3.2). Los valores obtenidos para el kiwi y el aguaymanto fueron respectivamente de 1.195 ± 0.018 g de Ac. cítrico /100 mL de zumo y 2.912 ± 0.407 g de Ac. cítrico /100 mL de zumo.

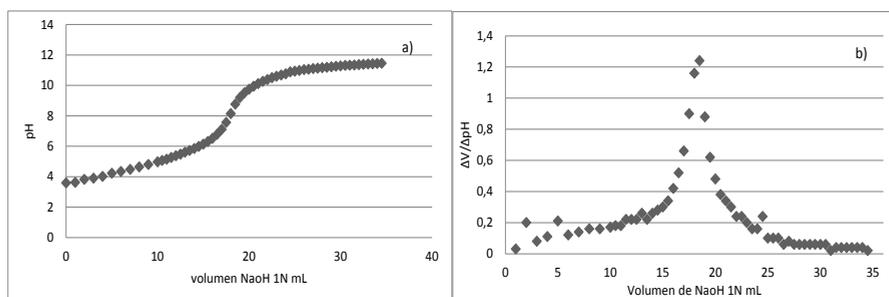


FIGURA 3.1. a) Curva de valoración de los ácidos orgánicos de la pulpa de kiwi (*Actinidia deliciosa*) y b), la derivada de la curva de valoración.

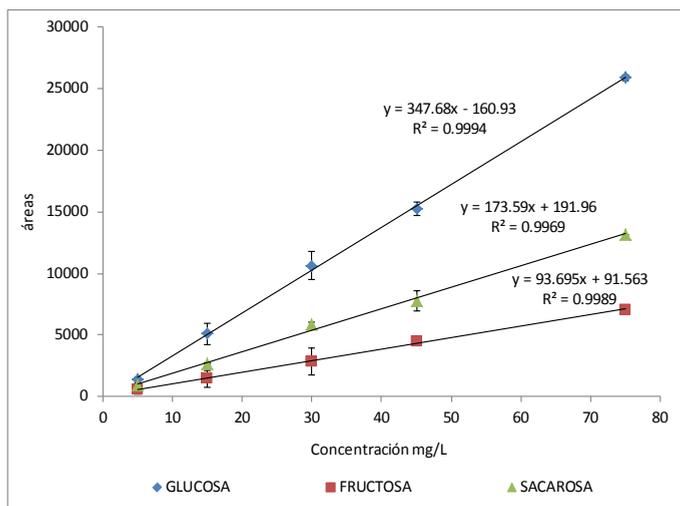
TABLA 3.4. Acidez total titulable (Equivalentes ácido cítrico = gramos de ácido cítrico por 100 mL de zumo).

Muestra	ATT (g de Ac. Cítrico / 100 mL)
Kiwi	1.182 ±0.018 ^a
Camu-Camu	4.459 ±0.158 ^b
Tumbo	2.912 ±0.407 ^c
Aguaymanto	1.196 ±0.161 ^d

* Diferentes letras en una misma columna; diferencias significativas p-value<0.05

Determinación de azúcares

Para la determinación de azúcares, siguiendo la metodología descrita para la cuantificación e identificación de glucosa, fructosa y sacarosa en los zumos de frutas a estudio por HPLC descrita en materiales y métodos, primero se tuvo que calcular la curva de calibración para cada uno de los azúcares (Figura 3.2).

**FIGURA 3.2.** Curva patrón de glucosa, fructosa y sacarosa por el método HPLC.

Una vez obtenidas las curvas de calibrado se procedió a la medida de los zumos de las frutas una vez efectuadas las pertinentes diluciones de estos. Mediante el equipo informático ICE net 2.3., se obtuvieron los cromatogramas que presentan los porcentajes de áreas y alturas con su

correspondiente tiempo de retención que se relacionaron con las áreas de los estándares de calibración externos obtenidos (curvas patrón) de sacarosa, glucosa y fructosa.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.5. El kiwi fue el que presentó mayor contenido en azúcares, especialmente fructosa (3.0 ± 0.7^a g/100 mL). En cambio el que menos azúcares presentó fue el camu-camu con un contenido en fructosa del 0.65 ± 0.11 g/100 mL. El tumbo y aguaymanto presentaron valores similares entre ellos e intermedios entre las dos frutas anteriores (1.43 ± 0.38 y 1.469 ± 0.117 g/100 mL respectivamente)

TABLA 3.5. Contenido en glucosa, fructosa y sacarosa de los zumos de frutas en estudio (g/100mL de zumo). Relación de los monosacáridos glucosa-fructosa (G/F) y sumatorio de los azúcares (Σ).

Muestra	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	G/F	Σ
Kiwi	2.36 ± 0.46^a	3.0 ± 0.7^a	0.27 ± 0.04^a	0.78	5.67
Camu camu	0.37 ± 0.05^b	0.65 ± 0.11^b	-	0.57	1.02
Tumbo	0.97 ± 0.37^c	1.43 ± 0.38^c	-	0.68	2.4
Aguaymanto	1.34 ± 0.09^c	1.47 ± 0.12^c	1.74 ± 0.12^b	0.92	4.55

* Diferentes letras en una misma columna; diferencias significativas p-value < 0.05

En la figura 3.3 se muestra cual fue el sumatorio total de los azúcares presentes en los zumos, así como la proporción de estos. Como se puede observar tanto el tumbo como el camu-camu no presentaron valores detectables de sacarosa. En cambio en el caso del aguaymanto los valores de ésta fueron incluso superiores a los obtenidos para la fructosa. Cabe destacar los bajos valores de azúcares que presentó el camu-camu, valores que cuando se expresaron no como zumo sino como 100 g de fruta (teniendo en cuenta el rendimiento zumo/fruta) fueron aún menores comparados con los obtenidos para el kiwi (Figura 3.4).

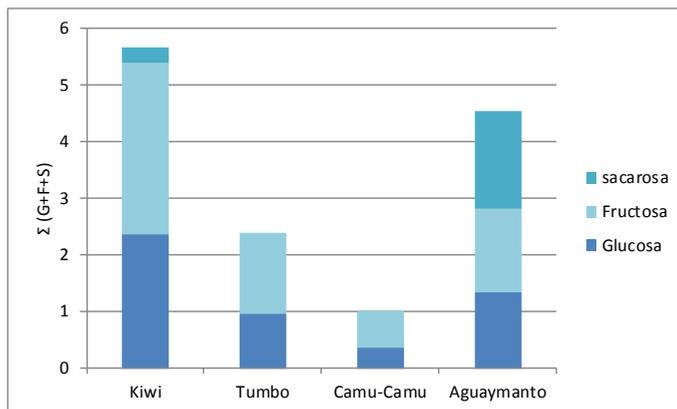


FIGURA 3.3. Histograma representativo del azúcar total en los zumos de frutas en estudio (g/100mL de zumo).

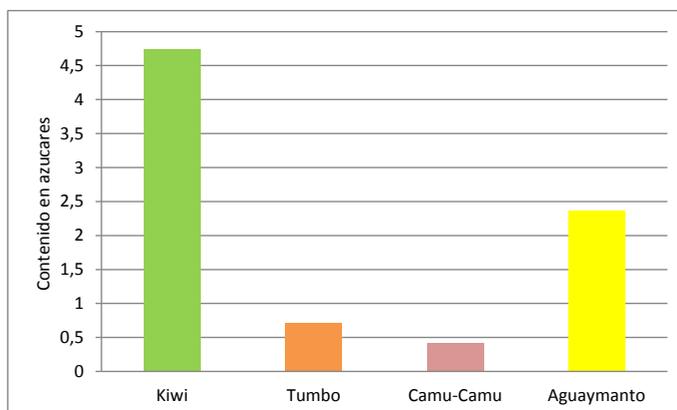


FIGURA 3.4. Histograma representativo del azúcar total de los zumos de frutas en estudio (g/100g de fruta).

Fenoles (Equivalentes de ácido gálico)

Los compuestos fenólicos son muy importantes como constituyentes de las plantas debido a su habilidad para secuestrar radicales libres, que está relacionada con la presencia del grupo hidroxilo (Gulcin et al., 2003). Existe una fuerte correlación entre la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos totales (Morillas-Ruiz y Delgado-Alarcón, 2012), indicando que estos fenoles contribuyen a la actividad antioxidante de manera determinante, de aquí la importancia de su determinación en este TFC.

Para su determinación, en primer lugar se determinó la curva de calibración de ácido gálico, que se muestra en la figura 3.5. Para la determinación de la misma se preparó una disolución *stock* de la cual se hicieron las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 0, 8, 12, 16, 26 y 30 mg/L.

Para la determinación de los equivalentes ácido gálico de los zumos de frutas en estudio se realizaron las diluciones necesarias y se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos. En la tabla 3.6 se muestra la concentración de compuestos fenólicos totales de las frutas analizadas, expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de fruta, y mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mL de fruta. De todas las frutas el camu-camu fue la que presentó valores mayores que al resto de frutas (135.63 ± 18.18 mg/L), siendo el tumbo la otra fruta que presentó valores elevados (39.74 ± 5.51 mg/L). Valores similares fueron encontrados por otros autores (Muñoz et al., 2007; Chirinos et al., 2010). Los valores obtenidos para el kiwi así como para el aguaymanto fueron muy bajos (6.61 ± 0.62 mg/L y 3.03 ± 0.34 mg/L) y similares a los reportados por otros autores (Du et al., 2009).

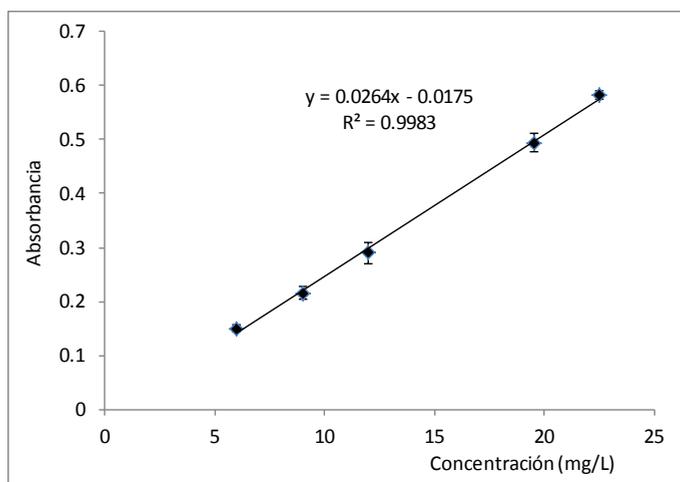


FIGURA 3.5. Curva de calibración de ácido gálico a 760 nm.

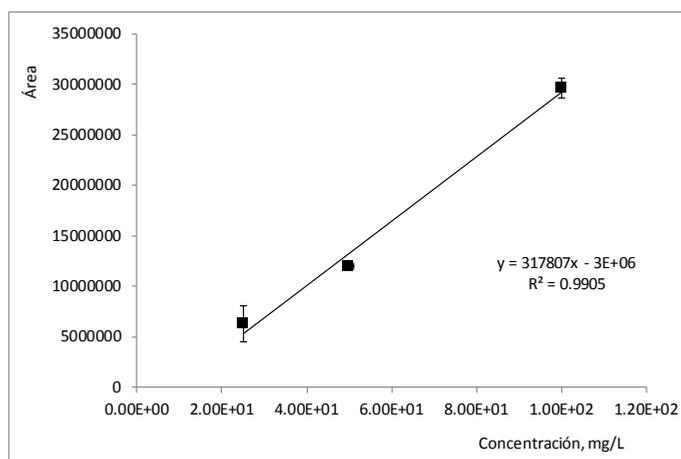
TABLA 3.6. Contenido en equivalentes de ácido gálico (EAG) de los zumos de frutas en estudio.

Muestra	EAG (mM)	EAG (mg /L)	EAG (mg /100g fruta)	EAG (mg /100 mL fruta)
Kiwi	6.61±0.62 ^a	1242.79	103.96	124.28
Camu-Camu	135.63±18.18 ^b	25518.21	1054.67	2551.82
Tumbo	39.74±5.51 ^c	7476.93	223.34	747.69
Aguaymanto	3.03±0.34 ^d	569.35	29.61	56.94

* Diferentes letras en una misma columna; diferencias significativas p-value<0.05

Ácido ascórbico (Vitamina C)

La cuantificación del ácido ascórbico (AA) presente en las muestras se realizó comparando las áreas obtenidas para las muestras analizadas con las obtenidas a partir de la recta patrón (figura 3.6) según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. La recta de calibrado se preparó a partir de una disolución madre de ácido ascórbico.

**FIGURA 3.6.** Curva patrón de ácido ascórbico.

El camu-camu fue la fruta que mayor contenido en AA presentó (tabla 3.7), con un contenido de 1092.85 mg/100 g de pulpa, si bien otros autores encontraron valores superiores (2010 mg/100g de pulpa; Chirinos et al., 2010). En el caso del kiwi el valor obtenido fue de 74.88 mg/100 g de pulpa siendo también el encontrado por otros autores ligeramente superior (ente

92.7 y 94.0 mg/100g de fruta; Nunes, 2007). Los menores valores en AA obtenidos fueron para el tumbo y el aguaymanto (6.56 y 2.42 mg/100g de fruta respectivamente). En el caso del tumbo la bibliografía encontrada también describe valores superiores al observado (18.56 mg/100g de pulpa; Goykovic 1993). Los menores valores observados por el análisis realizado, en comparación con los de otros autores, podría ser debido al procesado en origen (Perú) que tuvieron las frutas, si bien es verdad que en el caso del kiwi este fue procesado en el laboratorio por lo que también el grado de maduración de estas frutas podría ser la causa de estas diferencias.

TABLA 3.7. Contenido en ácido ascórbico (AA) de los zumos de frutas en estudio.

Muestra	Ácido Ascórbico (mg/L)	Ácido Ascórbico (mg/100 g de pulpa)
Kiwi	896.40 ^a	74.98
Camu	26442 ^d	1092.85
Tumbo	219.60 ^b	6.56
Aguaymanto	46.61 ^c	2.42

* Diferentes letras en una misma columna; diferencias significativas p-value<0.05

Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

En la figura 3.7 se muestra la curva de calibración obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante en base a la reacción generada entre las diluciones de ácido ascórbico (patrón) con el radical 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}).

Una vez obtenida la recta de calibrado en base a equivalentes de ácido ascórbico, se realizaron las medidas sobre las diluciones de los zumos de frutas en estudio. Obtenidos los valores de absorbancia para ambos, estos fueron introducidos en la ecuación y tras tener en cuenta el factor dilución se obtuvo la capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico. De todas las muestras ensayadas, los valores encontrados variaron entre máximos y mínimos de 2065.22 mg/100g de pulpa (camu-camu) y 38.48

mg/100g de pulpa (aguaymanto), siendo los valores para el tumbo y el kiwi de 553.95 y 118.21 mg/100g de pulpa respectivamente (tabla 3.8).

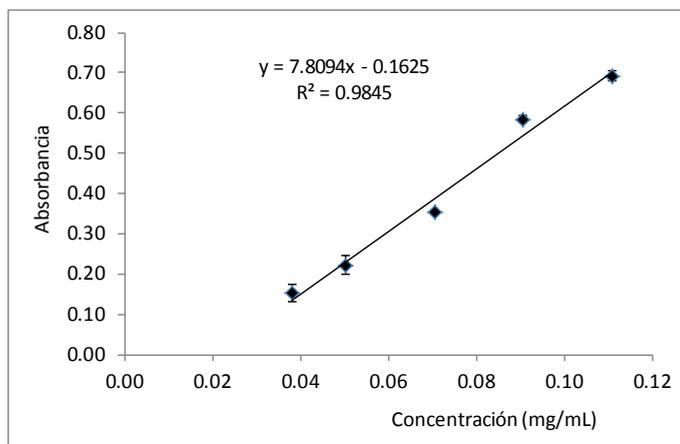


FIGURA 3.7. Curva patrón de equivalentes de ácido ascórbico.

TABLA 3.8. Contenido en equivalentes de ácido ascórbico de los zumos de frutas en estudio.

Muestra	mM EAA	mMol EAA/100g	
		de pulpa	mg EAA/100 g de pulpa
Kiwi	8.02 ± 0.44 ^a	0.67	118.21
Camu	283.70 ± 36.80 ^b	11.73	2065.22
Tumbo	105.29 ± 5.05 ^c	3.15	553.95
Aguaymanto	4.20 ± 0.43 ^d	0.22	38.48

*Diferentes letras en una misma columna; diferencias significativas p-value<0.05

Muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales (Frankel *et al.*, 1995; Imeh *et al.*, 2002; Ursini *et al.*, 1996) y/o equivalentes ácido ascórbico (Chirinos *et al.*, 2010, 2011). Así en el caso del camu-camu, que presenta la mayor capacidad antioxidante, esta estaría ligada al mayor contenido en ácido ascórbico (AA) (tabla 3.7) y a la mayor en equivalentes ácido gálico (tabla 3.6). En el caso del tumbo esta capacidad antioxidante estaría más ligada a la presencia de compuestos fenólicos (tabla 3.6) que a la de AA dado sus bajos valores en estos últimos equivalentes. En

cambio en el caso del kiwi dada su mayor concentración con AA que el tumbo y a la menor en ácido gálico la actividad antioxidante vendría dada por la presencia de AA. En el caso del aguaymanto, con los menores valores de AA y de Eq. ácido gálico, fue el que presentó menor actividad antioxidante.

Determinación de la capacidad antioxidante mediante lengua electrónica voltamétrica

Una vez obtenidos los voltagramas para cada una de las diluciones de los diferentes zumos, estos fueron visualizados y analizados mediante el análisis de componentes principales (PCA). Como puede observarse en la figura 3.8, en la que se muestra a modo de ejemplo una de los experimentos realizados para el camu-camu y para el tumbo, existió una agrupación espontánea de las respuestas en función de la dilución medida. Este resultado mostraría como existe una respuesta voltamétrica ligada a algún componente presente en las disoluciones el cual podría estar asociado a la capacidad antioxidante. En base a estos resultados, se procedió a la determinación de la capacidad antioxidante empleando los modelos basados en el patrón ascórbico y gálico.

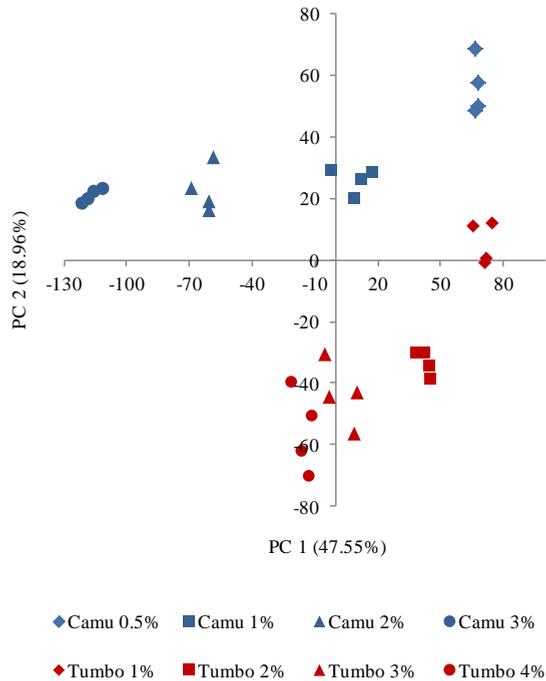


FIGURA 3.8. Análisis de componentes principales PCA, de cada una de los zumos analizados.

Cuantificación como equivalentes de ácido ascórbico

Para obtener la capacidad antioxidante, la respuesta voltamétrica de cada una de las diluciones de los zumos de frutas fue introducida en los seis modelos matemáticos de predicción, obteniéndose así la capacidad antioxidante de cada dilución expresada como equivalentes de ácido ascórbico (EAA) en milimoles (mM). En la figura 3.9 se muestra a modo de ejemplo la relación entre los valores de capacidad antioxidante obtenidos por el modelo de predicción generado por la información de todos los electrodos frente al factor de dilución. Como se observa para todos los zumos existió una linealidad entre ambos valores y teniendo en cuenta la pendiente de las rectas mostradas, el camu-camu sería la fruta que presentaría una mayor capacidad antioxidante, mientras que el kiwi sería la de menor, si bien los

resultados de los análisis por ABTS (análisis de referencia) mostraron el aguaymanto como el de menor capacidad. Estos resultados fueron similares para los otros modelos, si bien no en todos los casos se obtuvo tanta linealidad, por lo que se procedió a aplicar el método de la pendiente utilizando el criterio de la prueba *t* de *student*, a la relación entre el factor de dilución y su capacidad antioxidante predicha por cada uno de los modelos.

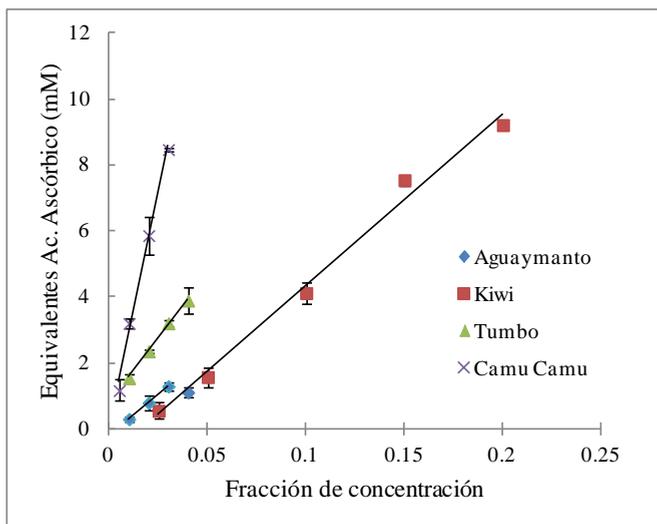


FIGURA 3.9. Predicción de la capacidad antioxidante de los zumos de frutas (equivalentes de ác. Ascórbico) mediante el modelo de todas las variables.

Si bien la mayoría de los modelos matemáticos establecidos para la determinación de la capacidad antioxidante mostraron buenos ajustes lineales, cuando se aplicó el método de la pendiente se encontró que no todos ellos llegaron a predecir la capacidad antioxidante de las frutas. En las tablas 3.9 y 3.10 se muestran los equivalentes ácido ascórbico de las frutas usando todos los modelos matemáticos. Los valores que no presentaron diferencias estadísticas (p -values < 0.05) se muestran resaltados en negrita. Las frutas camu-camu y tumbo fueron las únicas a las que se les pudo caracterizar su capacidad antioxidante (tabla 3.9). En el caso del camu-camu la capacidad antioxidante expresada como equivalentes ácido ascórbico fue similar a la obtenida por el método de referencia ABTS ($EAA = 283.70 \pm 36.80$ mM) cuando fue obtenida empleando los modelos de predicción

obtenidos a partir de todos los electrodos ($EAA = 287.45 \pm 0.39$ mM) o con la selección VIP o iPLS de estos ($EAA = 267.29 \pm 0.16$ mM; $EAA = 293.29 \pm 0.64$ mM, respectivamente). Los modelos obtenidos usando la información procedente de los metales nobles, solo en el caso del modelo generado por la selección VIP se pudo predecir la capacidad antioxidante ($EAA = 261.16 \pm 0.39$ mM), si bien el valor obtenido aun sin diferencias estadísticas fue el que más se distanció del valor promedio obtenido por ABTS. Los otros dos modelos no generaron un valor sin diferencias estadísticas con el de referencia. En el caso de la predicción del tumbo, solo el modelo generado por todos los electrodos ($EAA = 109.78 \pm 0.06$ mM) y el generado con la selección iPLS de estos ($EAA = 106.02 \pm 0.33$ mM), pudo obtener el valor de capacidad antioxidante similar a la de referencia ($EAA = 105.29 \pm 5.05$ mM). Los tres modelos desarrollados usando la información procedente de los metales nobles fueron incapaces de predecir la capacidad antioxidante.

TABLA 3.9. Estimación de los equivalentes de ácido ascórbico en los zumos de camu-camu y tumbo.

Modelo	Camu-camu ($EAA = 283.70 \pm 36.80$ mM)		
	Ecuación	R ²	EAA $\pm \delta$
Todo	$y = 285.8x + 0.0269$	0.993	287.45 \pm 0.39
Todo-VIP	$y = 294.03x - 0.4344$	0.999	267.29 \pm 0.16
Todo-iPLS	$y = 290.6x + 0.0438$	0.981	293.29 \pm 0.64
Nobles	$y = 278.92x - 0.7484$	0.996	232.87 \pm 0.27
Nobles-VIP	$y = 283.03x - 0.3554$	0.993	261.16 \pm 0.39
Nobles-iPLS	$y = 231.61x - 0.602$	0.996	194.57 \pm 0.24
Tumbo ($EAA = 105.29 \pm 5.05$ mM)			
Todo	$y = 79.142x + 0.7658$	0.998	109.78 \pm 0.06
Todo-VIP	$y = 77.111x - 0.0535$	0.986	74.97 \pm 0.17
Todo-iPLS	$y = 69.387x + 0.662$	0.927	106.02 \pm 0.33
Nobles	$y = 71.266x - 0.4752$	0.989	52.26 \pm 0.14
Nobles-VIP	$y = 50.661x - 0.3241$	0.894	83.39 \pm 0.07
Nobles-iPLS	$y = 43.136x + 0.2025$	0.958	51.24 \pm 0.17

* Valores en negrita: sin diferencia estadística (p -value < 0.05) con el método de referencia ABTS.

Cuando los modelos fueron aplicados a la información voltamétrica obtenida para el kiwi y para el aguaymanto ninguna predicción se pudo obtener (tabla 3.10), siendo los valores en todos los modelos superiores a los de referencia.

TABLA 3.10. Estimación de los equivalentes de ácido ascórbico en los zumos de kiwi y aguaymanto.

Modelo	Kiwi (EAA = 8.02 ± 0.44 mM)		
	Ecuación	R ²	EAA $\pm \delta$
Todo	$y = 51.864x - 0.8483$	0.99	43.79 ± 0.41
Todo-VIP	$y = 60.187x - 0.9666$	0.98	50.98 ± 0.68
Todo-iPLS	$y = 20.562x + 2.0344$	0.897	39.94 ± 0.55
Nobles	$y = 35.829x - 0.487$	0.986	31.19 ± 0.34
Nobles-VIP	$y = 39.548x - 0.4499$	0.976	35.26 ± 0.49
Nobles-iPLS	$y = 20.538x - 0.5914$	0.959	14.91 ± 0.33
Aguaymanto (EAA = 4.20 ± 0.43 mM)			
Todo	$y = 49.627x - 0.2005$	0.999	39.6 ± 0.01
Todo-VIP	$y = 34.006x + 0.1278$	0.924	39.12 ± 0.18
Todo-iPLS	$y = 59.059x - 0.0107$	0.994	58.63 ± 0.09
Nobles	$y = 14.171x - 0.125$	0.903	9.42 ± 0.06
Nobles-VIP	$y = 25.542x + 0.3644$	0.839	40.12 ± 0.21
Nobles-iPLS	-	-	-

La mayor capacidad de predicción de los modelos generados a partir de la información recibida por todos los electrodos y pulsos, y por los generados a partir de la selección VIP e iPLS de esta información, así como la prácticamente nula capacidad de predicción de los modelos obtenidos a partir de la información de los metales nobles, podría estar ligada a la gran influencia del electrodo de Ag. Como se vio en el capítulo 2: “Patrones antioxidantes. Modelos de predicción” este electrodo es uno de los tres más influyentes y por tanto de gran peso dentro de los modelos, lo que explica que aquellos modelos en los que no está presente (modelos con electrodos nobles) la predicción es errónea. Además si se observa la figura 3.10, en la

que se representa los voltagramas, para los pulsos influyentes (300 a -50 mV), generados en el electrodo de Ag, para el ácido ascórbico y los zumos, todos ellos a la concentración (expresada en equivalentes de AA obtenidos a partir del método ABTS) más similar ensayada, se puede observar como las respuestas para el kiwi y aguaymanto muy diferente a la observada para el resto de soluciones. Esto podría explicar porque ninguno de los modelos ha sido capaz de predecir la capacidad antioxidante de estas frutas, dado que los que la podrían predecir, por tener presente el electrodo de Ag, no la pueden predecir debido a que la respuesta es muy diferentes, y los que no lo tienen en el modelo tampoco la pueden predecir dado que el modelo necesita de esta respuesta para poder realizar la predicción.

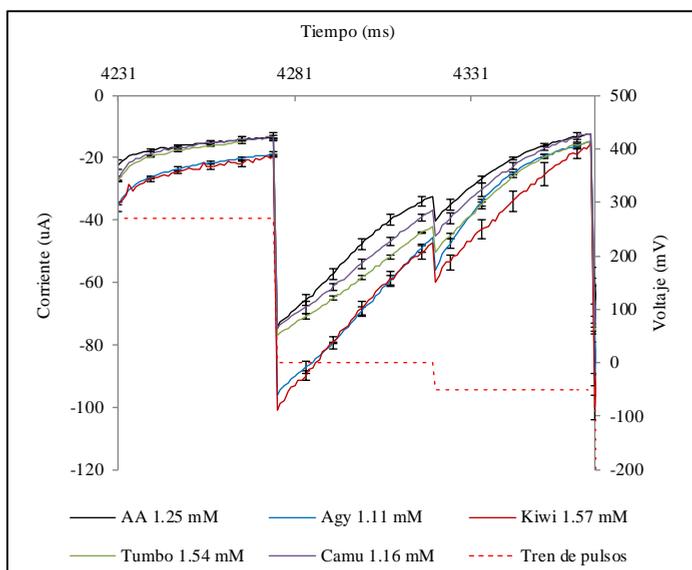


FIGURA 3.10 Respuesta eléctrica, en los pulsos influyentes VIP para el electrodo de Ag, en ácido ascórbico (1.25 mM), aguaymanto (1.11 mM), kiwi (1.57 mM), tumbo (1.54 mM) y camu-camu (1.16 mM).

En base a estos resultados se podría concluir que en el caso del camu-camu y del tumbo, la utilización del modelo generado por toda la respuesta eléctrica y sobre todo el generado por la selección iPLS de esta, serían los modelos aptos para la predicción de su capacidad antioxidante. En cambio ninguno de los modelos desarrollados serían buenos para la predicción del aguaymanto y del kiwi. Es por ello que para estas dos frutas sería necesario buscar un nuevo patrón cuyo perfil voltamétrico se pudiese utilizar para tal fin.

Cuantificación como equivalentes de ácido gálico

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las frutas utilizando como patrón el ácido gálico, primero estas tuvieron que ser expresadas teóricamente en base a una equivalencia. Para ello y teniendo en cuenta la relación obtenida en el capítulo 2, “Patrones antioxidantes. Modelos de predicción” entre el ácido gálico y el ácido ascórbico, la cual fue de 1 mM de ácido gálico es igual a 0.74 mM de ácido ascórbico, se calculó la capacidad antioxidante expresada como equivalentes teóricos de ácido gálico para cada una de las frutas (tabla 3.11).

TABLA 3.11. Equivalencia ácido gálico de los zumos de frutas.

Muestra	mM EAA	mM EAG*
Kiwi	8.02 ± 0.44 ^a	10.84 ± 0.59
Camu camu	283.70 ± 36.80 ^b	383.38 ± 49.73
Tumbo	105.29 ± 5.05 ^c	142.28 ± 6.82
Aguaymanto	4.20 ± 0.43 ^d	5.68 ± 0.58

* Obtenida en el capítulo 2, donde 1 mM EAG es igual a 0.74 mM EAA

Para la obtención de la capacidad antioxidante, expresada como ácido gálico, los voltagramas obtenidos para cada una de las diluciones de los zumos de fruta fueron introducidos en los 6 modelos generados a partir de los voltagramas obtenidos para las lecturas del patrón ácido gálico.

En la figura 3.11, a modo de ejemplo, se muestra la predicción de las frutas aplicando el modelo con toda información del patrón ácido gálico. Como se puede observar existió en todos los casos un buen ajuste lineal. En base a la pendiente de los ajustes el camu camu sería la que presentaría mayores equivalentes de ácido gálicos, seguido de tumbo, del kiwi y finalmente del aguaymanto, resultados que estarían en concordancia con los establecidos en la tabla 3.11. Pero este ajuste no fue lineal para todos los modelos, por lo que se tuvo que aplicar el método de la pendiente utilizando el criterio de la prueba *t de student*, como se había realizado cuando la capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de ácido ascórbico.

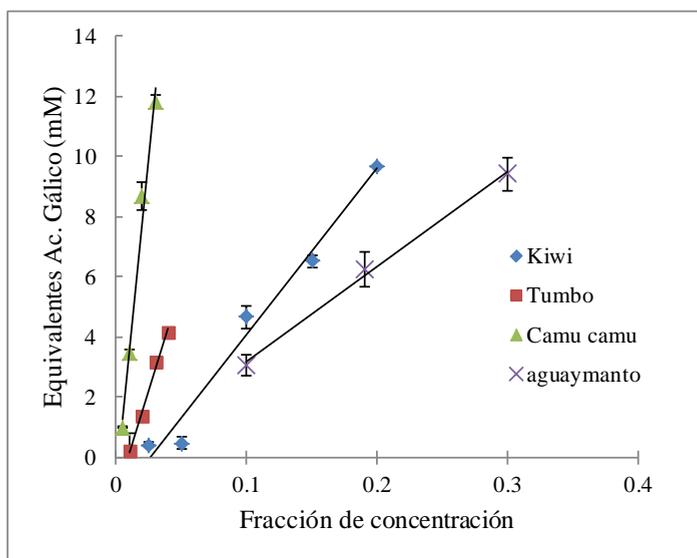


FIGURA 3.11. Predicción de compuestos fenólicos de los zumos de frutas usando el modelo de todas las variables.

En la tabla 3.12 se presentan los equivalentes de ácido gálico predichos para los zumos de camu camu y tumbo y en tabla 3.13 para las frutas kiwi y aguaymanto. Los valores que no presentaron diferencias estadísticas (p -values < 0.05) se muestran resaltados en negrita. Como puede observarse solo en el caso del camu camu se pudo determinar la capacidad antioxidante. Para el resto de frutas, si bien en casi todos los casos, a excepción del

aguaymanto, se obtuvieron ecuaciones con buenos ajustes, los valores predichos estuvieron muy lejos de los valores teóricos. En el caso del tumbo las diferencias, para los modelos generados con toda la información y mediante la selección VIP de estos, no fueron tan acentuadas como en el caso del kiwi y aguaymanto. Este resultado podría ser debido a la influencia que genera el electrodo de Cu sobre las respuestas voltamétricas. Como se observa en la figura 3.12, los valores para los zumos de kiwi y aguaymanto fueron muy superiores a los esperados, es por ello que la predicción genera valores de EAG superiores a los teóricos. En el caso del tumbo, el comportamiento es inverso, siendo la señal de corriente inferior a la esperada, sobre todo a -500 mV, de ahí el menor valor de predicción obtenido.

TABLA 3.12. Estimación de los equivalentes de ácido gálico en los zumos camu camu y tumbo.

Modelos	Camu camu ($EAG_{teórico} = 383.38 \pm 49.73$ mM)			
	Ecuación	R ²	EAG	±δ
Todo	$y=440.66x - 0.9202$	0.987	384.04	±0.81
Todo-VIP	$y=429.71x - 0.7832$	0.991	381.52	±0.65
Todo-iPLS	$y=439.15x - 1.6472$	0.999	337.78	±0.23
Nobles	$y=460.7x - 1.4173$	0.996	373.48	±0.47
Nobles-VIP	$y=442.3x - 1.3312$	0.995	360.37	±0.51
Nobles-iPLS	$y=456.34x - 3.0978$	0.9986	265.71	±0.27
Tumbo ($EAG_{teórico} = 142.28 \pm 6.82$ mM)				
Todo	$y=136.37x - 1.1726$	0.988	89.47	±0.29
Todo-VIP	$y=122.37x - 0.3726$	0.9728	107.46	±0.38
Todo-iPLS	$y=116.74x - 1.5702$	0.993	53.93	±0.18
Nobles	$y=132.01x - 1.2419$	0.994	82.33	±0.2
Nobles-VIP	$y=129.43x - 1.2067$	0.996	81.16	±0.16
Nobles-iPLS	-	-	-	-

* Valores en negrita: sin diferencia estadística (p-value<0.05) con el método de referencia ABTS.

TABLA 3.13. Estimación de los equivalentes de ácido gálico en los zumos kiwi y aguaymanto.

Modelos	Kiwi ($EAG_{teórico} = 10.84 \pm 0.59 \text{ mM}$)			
	Ecuación	R ²	EAG	±δ
Todo	$y=55.113x - 1.3424$	0.978	41.47	±0.65
Todo-VIP	$y=69.506x - 1.1322$	0.998	59.97	±0.37
Todo-iPLS	$y=39.537x - 0.6041$	0.992	34.45	±0.38
Nobles	$y=58.233x - 0.7934$	0.993	50.68	±0.4
Nobles-VIP	$y=47.394x - 0.5159$	0.995	42.48	±0.27
Nobles-iPLS	-	-	-	-
Aguaymanto ($EAG_{teórico} = 5.68 \pm 0.58 \text{ mM}$)				
Todo	$y=13.797x - 3.6209$	0.998	28.58	±0.37
Todo-VIP	-	-	-	-
Todo-iPLS	$y=65.63x - 0.82241$	0.989	62.27	±0.67
Nobles	$y=40.23x - 3.3.0265$	0.988	40.23	±0.24
Nobles-VIP	-	-	-	-
Nobles-iPLS	-	-	-	-

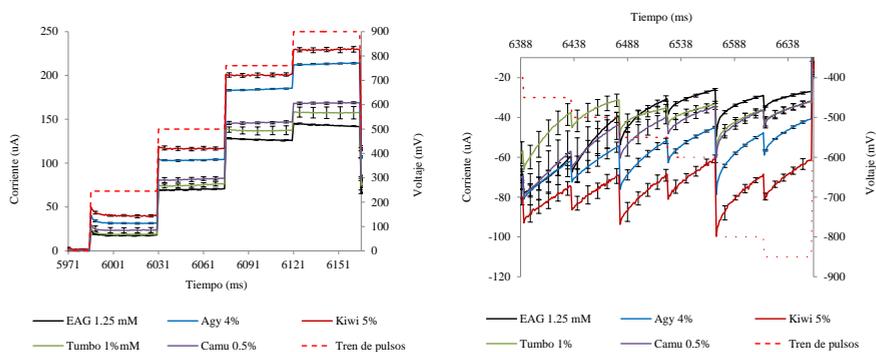


FIGURA 3.12. Respuesta eléctrica, en los pulsos influyentes VIP para el electrodo de Cu, en ácido gálico (1.25 mM), aguaymanto (1.11 mM), kiwi (1.57 mM), tumbo (1.54 mM) y camu-camu (1.16 mM).

En base a los resultados obtenidos, para ambos patrones de equivalencia parece que la capacidad antioxidante de las frutas ha sido mejor predicha cuanto mayor ha sido su capacidad antioxidante, si bien podría la presencia de los compuestos azucarados influir en gran medida sobre la respuesta voltamétrica. Esto explicaría por qué el kiwi y el aguaymanto, con mayor concentración en azúcares, presentaron unos voltagramas con grandes diferencias sobre los patrones ácidos, diferencia que en el caso del camu camu y tumbo (menor concentración en azúcares) fueron más pequeñas.

CONCLUSIÓN

La técnica de la lengua electrónica voltamétrica se ha mostrado como una técnica capaz de determinar capacidad antioxidante de las frutas camu camu y tumbo, no en cambio la del aguaymanto y kiwi.

El modelo generado utilizando el patrón ácido ascórbico, empleando la información procedente de todos los electrodos y el generado a partir de la selección iPLS de esta, serían los que mejor predicen la capacidad antioxidante de ambas frutas, si bien en el caso del camu camu también lo serían los modelos obtenidos a partir de la selección VIP de la información de todos los electrodos o el generado a partir de la selección VIP de la información procedente de los electrodos nobles. La gran influencia del electrodo de plata sobre el patrón ácido ascórbico, y la respuesta en este de las frutas evaluadas, podría ser la causa de la capacidad para su predicción.

En el caso de los modelos obtenidos a partir del patrón ácido gálico, solo los obtenidos a partir de la información procedente de todos los electrodos y de la selección VIP de esta, son capaces de predecir la capacidad antioxidante de camu camu. Para el resto de frutas ninguno de los modelos desarrollados es capaz de evaluar su capacidad antioxidante. En este caso la gran influencia del electrodo de cobre sobre el patrón ácido gálico, y la respuesta en este de las frutas evaluadas, podría ser la causa de la capacidad para su predicción.

La presencia de compuestos azucarados en los zumos podría influir en gran medida sobre la respuesta voltamétrica obtenida. Esto explicaría por qué el kiwi y el aguaymanto, con mayor concentración en azúcares,

presentan voltagramas con grandes diferencias sobre los patrones ácidos, diferencia que en el caso del camu y tumbo, con menor concentración en azúcares, fueron más pequeñas.

BIBLIOGRAFIA

- Baldeón, E.O., Alcañiz, M., Masot, R., Fuentes, E.M., Barat, J.M. Grau, R. (2015). Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*. 54: 181-187.
- Brack A. (1999). *Diccionario Enciclopédico de las Plantas Útiles del Perú*. CBC. Cuzco, Perú.
- Bursal, E. and Gülçin, I. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*. 44: 1482-1489.
- Chicharro, M., Sánchez, A., Bermejo, E. and Zapardiel, A. (2007). Application of matrix solid phase dispersion to the protham and maleic hydrazide determination in potatoes by differential pulse voltammetry and HPLC. *Talanta*. 71: 430-436.
- Chirinos, R., Galarza, J., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R., Campos, D. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, 120, 1019-1024.
- Chirinos. R., Huamán. M., Betalleluz-Pallardel. I., Pedreschi. R. and Campos. D. (2011). Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*. 128: 711-716.

- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y. and Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*. 47: 145-152.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*. 44: 2047-2053.
- De la Cruz, H., Vilcapoma, G. and Cevallos, P.A. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *J. Ethnopharmacol.* 111, 284-294.
- D'Evoli, L., Moscatello, S., Lucarini, M., Aguzzi, A., Gabrielli, P., Proietti, S., Battistelli, A., Famiani, F., Böhm, V. and Lombardi-Boccia, G. (2015). Nutritional traits and antioxidant capacity of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Planch., cv. Hayward) grown in Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 37: 25-29.
- Du, G., Li, M., Ma, F. and Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry* 113: 557-562.
- Escuder-Gilabert, L. and Peris, M. (2010). Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. *Analytica Chimica Acta*. 665: 15-25.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Teissedre, P.L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-894.
- Gulcin, Y., Oktay, M., Kiercci, E. and Kufreviolu, O.Y. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 83: 371-382.
- Goykovic, C. (1993). Parámetros de rendimiento en jugo del fruto de tumbo (*Passiflora mollissima bailey*). *IDESIA (Chile)*, VOL.12: 57-52.

- Gran, G. (1950): Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. *Acta Chemica Scandinavica*. 4: 559-577.
- Haddi, Z., Mabrouk, S., Bougrini, M., Tahri, K., Sghaier, K., Barhoumi, H., El Bari, N., Maaref, A., Jaffrezic-Renault, N. and Bouchikhi, B. (2014). E-Nose and e-Tongue combination for improved recognition of fruit juice samples. *Food Chemistry*. 150: 246-253.
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*. 118: 291-299.
- Imeh, U. and Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6301- 6306.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213-217.
- Kantor, D., Hitka, G., Fekete, A. and Balla, C. (2008). Electronic tongue for sensing taste changes with apricots during storage. *Sensors and Actuators B: Químicas*. 131(1): 43-47.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 25(4): 726-732.
- Liteanu, C., Popescu, L. C. and Hopârtean, E. (1975). Estimation of the linearity domain limit for the ion-sensitive membrane electrode function. *Analytical Chemistry*. 48 (13): 2010-2013.
- Litescu, S.C., Eremia, S. and Radu, G.L. (2010). Chapter 18: Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Advances in Experimental Medicine and Biology*. 698: 241-249.

- Locatelli, Cl. and Torsi, G. (2003). Analytical procedures for the simultaneous voltammetric determination of heavy metals in meals. *Microchemical Journal*. 75: 233-240.
- Menezes, E.W., Giuntini, E.B., Dan, M.C.T. and Lajolo, F.M. (2009). New information on carbohydrates in the brazilian food composition database. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 446-452
- Morillas-Ruiz, J.M. y Delgado-Alarcón, J.M. (2012). Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutr. Clín. Diet. Hosp.* 32(2): 8-20.
- Muñoz A.M., Ramos-Escudero F., Alvarado-Ortiz C. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú*, 73 (3): 142-149.
- Nunes, M. (2007). Caracterización y procesado de kiwi y fresa cultivados por diferentes sistemas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela departamento de química analítica, nutrición y bromatología.
- Puente, L. Pinto-Muñoz, C. Castro, E. y Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International* 44: 1733-1740.
- Peterson, G. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*. 100: 201-220.
- Re, R.; Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9/10):1231-1237.
- Schwartz, M., Núñez, H. y Muñoz, A.M. (1999). Efecto de la temperatura de concentración de pulpa de kiwi sobre el color, clorofila y ácido ascórbico. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 49(1): 44-48.

- Simirgiotis, M. J., Schmeda-Hirschmann, G., Bórquez, J. and Kennelly, E. J. (2013). The *Passiflora tripartite* (*Banana Passion*) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Molecules*. 18: 1672-1692.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158.
- Tian, X., Wang, J. and Zhang, X. (2013). Discrimination of preserved licorice apricot using electronic tongue. *Mathematical and Computer Modelling*. 58(3-4): 743-751
- Ursini, F., Tubaro, F., Rapuzzi, P., Zamburlini, A. and Maiorino, M. (1996). Wine antioxidants: Effects in vitro and in vivo. *Wine and Human Health*. Udine 9-11.
- Valdenegro, M., Fuentes, L., Herrera, R. and Moya-León, M.A. (2012). Changes in antioxidant capacity during development and ripening of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 67: 110-117.
- Villachica, H. (1996). Desarrollo de Tecnología para producción sostenible de especies Autoctonas. Programa Regional de Promoción de la Producción sostenible y utilización de frutas y hortalizas Amazónicas. Estrategias y acción. Anexo 1. Documentos técnicos.p.14-18.
- Wang, Y., Rui, Y., Li, F., Li, M. (2014). Electrodeposition of nickel hexacyanoferrate / layered doublehydroxide hybrid film on the gold electrode and its application in the electroanalysis of ascorbic acid. *Electrochimica Acta*. 117: 398-404.
- Wei, Z. and Wang, J. (2013). The evaluation of sugar content and firmness of non-climacteric pears based on voltammetric electronic tongue. *Journal of Food Engineering*. 117: 158-164.

Winqvist, F., Rydberg, E., Holmin, S., Rülcker, C.K. and Lundström, Y. (2002). Flow injection analysis applied to a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta.* 471(2): 159-172.

CAPITULO 4

***CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE
PLANTAS ANDINAS***

INTRODUCCIÓN

El hombre siempre está buscando nuevas fuentes antioxidantes naturales que ayuden a los problemas de la salud de la población. En el mundo hay un despertar en el estudio de miles de especies de plantas con fines medicinales, en la mayoría de los casos sabiendo que estas plantas contienen una variedad de componentes antioxidantes por ejemplo taninos, lignanos, cumarinas, quinonas, estilbenos, xantonas, ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas que podrían retrasar o inhibir el inicio de enfermedades degenerativas y aumentar la esperanza de vida (Ashraf et al., 2015, Salaverry y Cabrera, 2014, Rojas et al., 2003, Gálvez et al., 2010)

Perú es uno de los países con gran diversidad biológica en el mundo por el número de especies existentes, recursos genéticos y variedad de ecosistemas. Por su micro climas que posee a lo largo de su territorio hace que existan muchas especies de plantas con propiedades medicinales importantes. Asimismo, tienen grandes áreas reservadas y jardines botánicos donde se estudian e investigan las bondades de las plantas como uso medicinal. Las investigaciones han aumentado pero aún falta mucho para identificar otras especies (Pamo-Reyna, 2009, Salaverry y Cabrera, 2014, Brack, 1999, Rojas et al., 2003 Carraz et al., 2015, Gálvez et al., 2010, Doroteo et al., 2013)

En la actualidad el consumo de antioxidantes va en aumento sobre todo de plantas, especias y hierbas. En el Perú existen diversas plantas utilizadas como medicina natural por sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Entre las plantas que destacan por estas propiedades están las de la familia Lamiaceae: la inca muña (*Minthostachys mollis*), el aliso (*Alnus acuminata*), la Chinchilcoma (*Mutisia acuminata*) y la pachasalvia (*Lepechinia meyenii* (Walp)), consideradas como antioxidantes naturales. Asimismo se han investigado la presencia de metabolitos secundarios en la familia *Lamiaceae*, tales como los terpenoides, flavonoides y ácidos hidroxibenzoico y hidroxicinámico como contribuyentes fisiológicos con gran capacidad antioxidante (Chirinos et al., 2013, Chirinos et al., 2011).

Las plantas como uso medicinal son preparadas como infusión o extracción en solventes acuosos y de esa forma son consumidos, pero muchos de los métodos de determinación de capacidad antioxidante, los compuestos antioxidantes son extraídos utilizando solventes orgánicos (Chirinos et al., 2013, Doroteo et al., 2013, Ashraf et al., 2015, Gálvez et al., 2010). En el desarrollo de la técnica de lengua electrónica que se presenta en este capítulo, se ha considerado la extracción de los componentes antioxidantes tal como son consumidos, es decir mediante su extracción por infusión acuosa.

Existen diversos métodos para determinar componentes antioxidantes y compuesto fenólicos, siendo los más comunes las técnicas cromatográficas o espectrofotométricas, así como otras. Sin embargo, estas técnicas emplean tratamientos costosos con procedimientos complejos, personal calificado y normalmente no son adecuados para análisis *in situ*. En estos últimos tiempos se ha propuesto el desarrollo de sensores llamadas lengua electrónica como una herramienta para determinar capacidad antioxidante de plantas por su fácil manejo, bajo costo y rápido, como una alternativa a la técnicas tradicionales, que según la unión internacional de química pura y aplicada se define como un sistema multisensorial que consta de una serie de sensores de baja selectividad y utiliza procedimientos matemáticos avanzados para el procesamiento de señales basado en el reconocimiento de patrones y/o análisis de datos multivariados (Cetó et al., 2014, Ghosh et al., 2012, Ha et al., 2015 y Alcañiz et al., 2012).

OBJETIVO

El objetivo del estudio es establecer si la lengua electrónica voltamétrica, a través de los modelos matemáticos de predicción definidos en el capítulo 2 (obtención de los modelos de predicción), es capaz de determinar la capacidad antioxidante de infusiones de las plantas andinas inca muña, aliso, chinchilcoma, pachasalvia, así como de té verde, con el mínimo procesamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

En el presente trabajo se ha evaluado la capacidad antioxidante de las plantas de origen peruano; inca muña (*Clinopodium bolivianum*), aliso (*Alnus acuminata*), chinchilcoma (*Mutisia acuminata*) y pachasalvia (*Lepechinia meyenii* (Walp)) adquiridas en un mercado local de Huancayo (Junín, Perú) y como planta de referencia té verde enrollado y deshidratado (Té de Vietnam: Che Tuyet) adquirido en supermercado de Valencia, España. La utilización de té verde como planta de referencia se basó en la necesidad de emplear una planta de uso similar a las del estudio pero que hubiese sido estudiada en mayor profundidad, mediante diferentes técnicas de análisis, por su característica antioxidante (Almajano et al., 2008, Chan et al. 2010, Novak et al., 2010, Samaniego-Sánchez et al., 2011, Bhattacharyya et al., 2012, Masek et al., 2012).

Preparación de la muestra

Las hojas de las plantas fueron lavadas y secadas por aire caliente a 60 °C por espacio de tres horas hasta peso constante. Para su conservación, las hojas fueron empacquetadas y envasadas a vacío.

Dado que lo que se pretende con el estudio es evaluar, con el mínimo de manipulación de las muestras, su capacidad antioxidante y dado que las plantas son consumidas en infusión, estas fueron preparadas simulando la preparación de un té empleando “teabags”. Para ello tres gramos de muestra se sometieron a extracción en 300 ml de agua doblemente destilada a 85°C por 5 min (Almajano et al., 2008; Chan et al., 2010; Samaniego-Sánchez et al., 2011). El extracto obtenido fue filtrado y enfriado.

Una vez obtenidos los extractos se realizaron diluciones desde 2.5% hasta 20% sobre una solución electrolítica, con la finalidad de ensayar la influencia del factor concentración en las medidas voltamétricas. La función de la solución electrolítica es facilitar la circulación de la corriente entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo de forma que puedan ser medidos los fenómenos electroquímicos que se puedan generar en este último. La

solución electrolítica utilizada fue una mezcla de fosfato de potasio y dihidrógeno fosfato de potasio 0.01 M, ajustada a pH 7.4.

Caracterización de la capacidad antioxidante de los extractos de plantas mediante análisis químicos de referencia.

Con la finalidad de conocer cuál es la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas ensayadas, estas primero fueron caracterizadas mediante la determinación de la capacidad antioxidante por el método químico de referencia ABTS. Estos valores así obtenidos servirán de referencia para evaluar posteriormente la capacidad antioxidante obtenida mediante la técnica voltamétrica.

Determinación de la capacidad antioxidante por el método de referencia ABTS

Dado que en el estudio se pretende utilizar la voltametría diferencial de pulsos en la determinación de la capacidad antioxidante de extractos, esta tuvo que ser ensayada mediante un método de referencia. Para ello se utilizó el método químico ABTS desarrollado por Re et al. (1999) y Awika et al. (2003) y modificado durante la realización del trabajo con la finalidad de ajustarlo a la solución electrolítica utilizada.

El método ABTS mide la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (6 - hidroxil- 2, 5, 7, 8 – tetrametilcromo - 2 - ácido carboxílico) el cual es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol (vitamina E) con un alto poder antioxidante.

El método se basa en la cuantificación espectrofotométrica del radical 2.29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+) que no ha reaccionado con el compuesto antioxidante (trolox como patrón o sustancias presentes en disoluciones a evaluar). La descripción del método se detalla en el capítulo 3: Capacidad antioxidantes de frutas peruanas.

Para cuantificar la capacidad antioxidante de los extractos se elaboró una curva estándar de trolox como antioxidante sintético de referencia. Para ello

se prepararon diluciones a concentraciones desde 100 hasta 625 μM en base fosfato de potasio. La curva obtenida fue (ecuación 1):

$$y = 647.43x + 49.62 \quad (R^2=0.995) \quad (1)$$

Donde: y es concentración de trolox en μM y x es la diferencia de Abs

Determinación de la capacidad antioxidante total mediante lengua electrónica voltamétrica

En la determinación de la capacidad antioxidante total mediante la lengua electrónica voltamétrica se utilizó el equipo y tren de pulsos descritos en los capítulos anteriores y en la introducción. Para ello se prepararon diluciones (desde 2,5% hasta 20%) de las infusiones empleando buffer fosfato (0.01 M) ajustado a pH 7.4. La utilización de este buffer además asegura que la cantidad de analito en las mayores diluciones sea el suficiente como para permitir el paso de corriente.

Una vez obtenidas las diluciones, estas fueron medidas por la lengua electrónica obteniendo así la respuesta eléctrica de cada una de ellas; estas respuestas fueron introducidas en los modelos de predicción obtenidos para los patrones trolox y catequina, los cuales están expresados a pH 7.4 y que se definieron para tal fin. Así la capacidad antioxidante queda expresada como equivalentes de trolox (ET) o catequina (EC).

Los modelos utilizados, como se ha descrito en el capítulo 2, fueron 6; uno generado a partir de la información obtenida de los voltagramas generados por la totalidad de los electrodos y los pulsos, otro a partir de la información procedente solo de los electrodos formados por los metales nobles, 2 más obtenidos al aplicar los métodos de selección de variables VIP-PLS y iPLS al conjunto de todos los datos y finalmente 2 últimos al aplicar estos mismos métodos de selección a los datos procedentes de los electrodos nobles. Además en el caso de la predicción utilizando el patrón catequina se utilizaron 6 modelos más, los cuales fueron obtenidos de forma similar, pero solo utilizando las tres primeras diluciones ensayadas.

Análisis estadístico

Las respuestas voltamétricas obtenidas fueron inicialmente estudiadas mediante el análisis de componentes principales (PCA) con la finalidad de visualizar posibles datos anómalos, así como posibles tendencias espontáneas de agrupación.

La predicción de la capacidad antioxidante total de los extractos de las plantas (disoluciones de inca muña, aliso, chinchilcoma, pachasalvia y té verde) se determinó utilizando la herramienta estadística de análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), cuya bondad fue evaluada a partir de los valores del coeficiente de determinación (R^2), desviación BIAS y el error por el cálculo de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE) de la predicción (P). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con PLS Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, EE.UU.), una extensión de la caja de herramientas en el entorno computacional Matlab 7.6 (The Mathworks, Natick, Massachusetts, EE.UU.).

Una vez obtenidos los valores predichos para cada una de las diluciones obtenidas y dado que el comportamiento no fue lineal se aplicó *el método de la pendiente* de Liteanu et al., (1976); Locatelli et al., (2003), utilizando el criterio de la prueba *t de student*. En ella, los valores de capacidad antioxidante obtenidos empleando el método matemático se graficó. En la mayoría de los casos se observó para la primera mitad de la gráfica una tendencia lineal, siendo la restante exponencial. La primera parte se ajustó a una ecuación lineal (ecuación 3) de acuerdo con el método de mínimos cuadrados. Luego se calcula el límite de confianza (δ) que es la diferencia absoluta entre los valores experimental y calculado, según el criterio *t-student* en el 95% de significación.

$$E_{AAc} = E_{AAo} + b \cdot f_c \quad (3)$$

Donde; “ E_{AAc} ” es Equivalentes ácido ascórbico calculado, “ f_c ” es el factor de concentración, “ b ”, la pendiente y el intercepto E_{AAo}

Calculo del valor extremo (δ) que es igual a la mitad de la anchura del límite de confianza (ecuación 4):

$$|E_{AAexp} - E_{AAc}| = \delta \quad (4)$$

Dónde: “ E_{AAexp} ” es el valor experimental es

La determinación de la capacidad antioxidante es expresada como $E_{AAc} \pm \delta$

Finalmente los valores obtenidos fueron comparados con los obtenidos por el método de referencia ABTS a fin de validar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la capacidad antioxidante de los extractos de plantas mediante análisis químico de referencia

En la tabla 4.1 se muestra la capacidad antioxidante de las plantas, determinada mediante el análisis químico de referencia ABTS, expresado en equivalentes de trolox (ET). La mayor capacidad antioxidante expresada como ET fue para el té verde (13.51 ± 0.92 mM), siendo este valor similar a los obtenidos por otros autores (Majchrzak et al., 2004; Almajano et al., 2008; Samaniego-Sánchez et al., 2011). Al té le siguió el aliso (10.58 ± 1.09 mM) (Chirinos et al., 2013), inca muña (6.91 ± 0.47 mM) (Chirinos et al., 2011), chinchilcoma (6.32 ± 0.86) (Chirinos et al., 2013) y finalmente pachasalvia (4.13 ± 0.45 mM), si bien en este último caso los valores fueron inferiores a los observados por otros autores (5.11 mM) (Chirinos et al., 2013).

TABLA 4.1. Capacidad antioxidante de las plantas.

Muestra	Humedad, %	mM ET	μ mol ET/ g ms
Inca muña	5.92 \pm 0.03	6.91 \pm 0.47	779.07 \pm 84.88
Aliso	6.59 \pm 0.07	10.58 \pm 1.09	1132.72 \pm 95.97
Chinchilcoma	11.15 \pm 0.07	6.32 \pm 0.86	711.69 \pm 8.45
Pachasalvia	9.46 \pm 0.05	4.13 \pm 0.45	456.01 \pm 40.62
Té verde	7.19 \pm 0.04	13.51 \pm 0.92	1455.32 \pm 99.29

Determinación de la capacidad antioxidante total mediante lengua electrónica voltamétrica

Del mismo modo que en el capítulo anterior (capacidad antioxidante de frutas peruanas) una vez obtenidos los voltagramas para cada una de las diluciones de los diferentes extractos de plantas, estos fueron visualizados y analizados mediante el análisis de componentes principales (PCA). Como puede observarse en la figura 4.1, en la que en este caso se muestra a modo de ejemplo una de los experimentos realizados para el aliso y para la inca muña, existió una agrupación espontánea de las respuestas en función de la dilución medida. Este resultado, al igual que ocurría para las frutas peruanas, mostraría como existe una respuesta voltamétrica ligada a algún componente presente en las disoluciones el cual podría estar asociado a la capacidad antioxidante. En base a estos resultados, se procedió a la determinación de la capacidad antioxidante empleando los modelos basados en el patrón trolox y catequina.

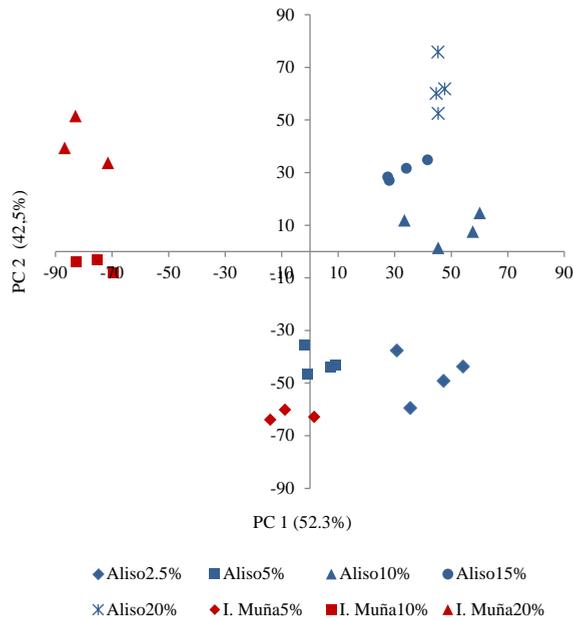


FIGURA 4.1. Análisis de componentes principales PCA para diluciones de aliso y de inca muña.

Cuantificación como equivalentes de trolox

Para obtener la capacidad antioxidante, la respuesta voltamétrica de cada una de las diluciones de los extractos de plantas, fue introducida en los seis modelos matemáticos de predicción, obteniéndose así la capacidad antioxidante de cada dilución expresada como equivalentes de trolox (ET) en milimoles (mM). En la figura 4.2 se muestra a modo de ejemplo los equivalentes de trolox predichos por el modelo de predicción generado por la información de todos los electrodos frente al factor de dilución. Como se observa para la mayoría de los extractos existió una linealidad entre ambos valores y teniendo en cuenta la pendiente de las rectas mostradas, el té verde sería la planta que presentaría una mayor capacidad antioxidante, mientras que el pachasalvia sería la de menor, coincidiendo con lo observado mediante el método de referencia ABTS (tabla 4.1). El resto de extractos quedarían indeterminados entre ellos dado que las rectas se entrecruzan.

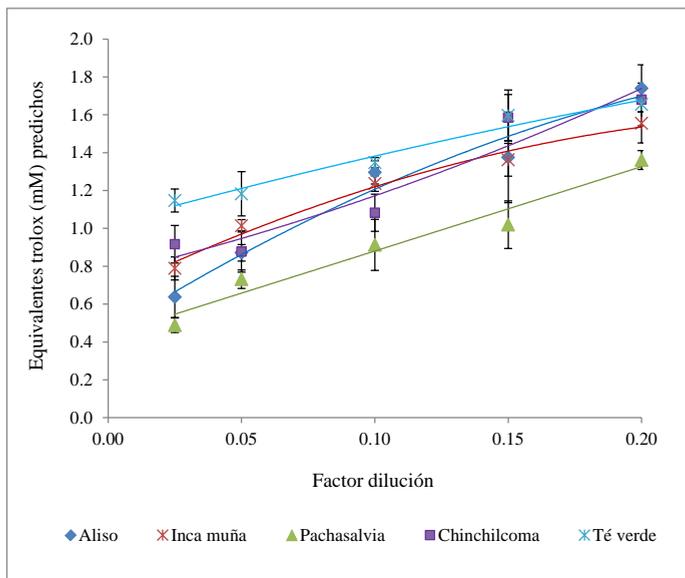


FIGURA 4.2. Predicción de la capacidad antioxidante de los extractos de plantas (equivalentes de trolox) mediante el modelo de todas las variables.

Para el resto de modelos el comportamiento fue similar al observado, si bien muchos de ellos no tuvieron una tendencia tan lineal como la observada en la figura 4.2. En la figura 4.3 se muestran los valores de capacidad antioxidante predicha por cada uno de los 6 modelos de predicción, para las diferentes diluciones de aliso, frente al factor dilución. Como se puede observar, al igual que ocurría en las predicciones de los zumos de fruta (ver capítulo 3. Capacidad antioxidante de frutas peruanas), en este caso también existieron modelos cuya predicción no se comportaron de forma lineal, por lo que se procedió a aplicar el método de la pendiente utilizando el criterio de la prueba *t de student*, a la relación entre el factor de dilución y su capacidad antioxidante predicha por cada uno de los modelos.

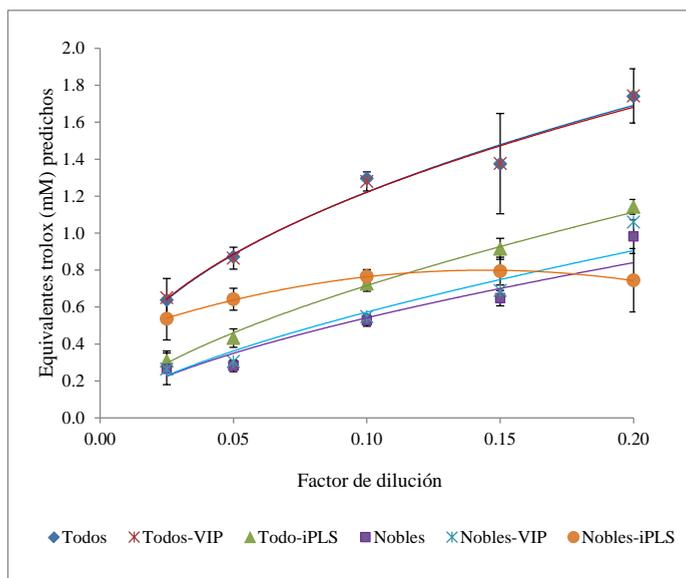


FIGURA 4.3. Predicción de la capacidad antioxidante de los extractos de aliso (equivalentes de trolox) mediante los 6 modelos de predicción.

En las tablas 4.2 y 4.3 se muestran los resultados de la prueba *t de student* para cada uno de los modelos y plantas ensayadas. Como puede observarse no todos los modelos fueron capaces de predecir la capacidad antioxidante de las plantas. Los valores que no presentaron diferencias estadísticas ($p\text{-values} < 0.05$) se muestran resaltados en negrita. En el caso del té verde, con la mayor capacidad antioxidante de todas las plantas ensayadas, a excepción del modelo de predicción formado por la selección iPLS sobre los metales nobles, todos los modelos fueron capaces de predecir la capacidad antioxidante de este ($ET_{ABTS} = 13.51 \pm 0.92$). En el caso del aliso ($ET_{ABTS} = 10.58 \pm 1.09$), los modelos que mejor predicción realizaron fueron el generado a partir de toda la información voltamétrica, el obtenido tras la selección VIP sobre la totalidad de la información (muy similar al anterior) y el generado por la selección iPLS sobre los metales nobles. Para el resto de las plantas, chinchilcoma, pachasalvia e inca muña, los modelos generados a partir de toda la información y mediante la selección VIP sobre esta, no

fueron capaces de predecir la capacidad antioxidante. En cambio el resto de modelos si lo fueron para la chinchilcoma ($ET_{ABTS} = 6.32 \pm 0.86$) y pachasalvia ($ET_{ABTS} = 4.13 \pm 0.45$). Para la inca muña, solo los modelos generados por los metales nobles y la selección VIP de estos (muy similar al anterior) fueron capaces de predecir su capacidad antioxidante ($ET_{ABTS} = 6.91 \pm 0.47$), si bien esta no fue tan buena como en todos los casos anteriores.

TABLA 4.2. Estimación de los equivalentes de trolox de las plantas té verde y aliso.

Modelos	Té verde ($ET_{ABTS} = 13.51 \pm 0.92$)		
	Ecuación	R ²	ET ± δ
Todo	$y=3.193x + 1.050$	0.967	13.2 ±0.05
Todo-VIP	$y=3.609x + 1.037$	0.96	13.48 ±0.06
Todo-iPLS	$y=7.142x + 0.554$	0.981	13.96 ±0.08
Nobles	$y=6.772x + 0.630$	0.977	14.52 ±0.08
Nobles-VIP	$y=6.191x + 0.746$	0.949	13.3 ±0.11
Nobles-iPLS	$y=5.83x + 0.296$	0.997	11.67 ±0.02
Aliso ($ET_{ABTS} = 10.58 \pm 1.09$)			
Todo	$y=5.653x + 0.590$	0.869	11.27 ±0.17
Todo-VIP	$y=5.666x + 0.588$	0.883	11.26 ±0.16
Todo-iPLS	$y=4.760x + 0.205$	0.995	6.71 ±0.03
Nobles	$y=4.051x + 0.116$	0.956	5.15 ±0.06
Nobles-VIP	$y=4.441x + 0.107$	0.967	5.46 ±0.06
Nobles-iPLS	$y=2.965x + 0.475$	0.98	11.11 ±0.04

* Valores en negrita: sin diferencia estadística (p-value<0.05) con el método de referencia ABTS.

TABLA 4.3. Estimación de los equivalentes de trolox de las plantas chinchilcoma, pachasalvia e inca muña.

Modelos	Chinchilcoma ($ET_{ABTS} = 6.32 \pm 0.86$)		
	Ecuación	R ²	ET $\pm \delta$
Todo	$y=5.073x + 0.696$	0.92	11.7 ± 0.12
Todo-VIP	$y=5.425x + 0.612$	0.911	11.25 ± 0.13
Todo-iPLS	$y=5.536x + 0.113$	0.984	6.61 ± 0.06
Nobles	$y=3.986 + 0.171$	0.998	5.61 ± 0.01
Nobles-VIP	$y=3.925x + 0.168$	0.998	5.53 ± 0.01
Nobles-iPLS	$y=2.200x + 0.364$	0.925	5.67 ± 0.05
	Pachasalvia ($ET_{ABTS} = 4.13 \pm 0.45$)		
Todo	$y=4.455x + 0.435$	0.958	8.6 ± 0.07
Todo-VIP	$y=4.286x + 0.460$	0.948	8.66 ± 0.08
Todo-iPLS	$y=2.679 + 0.224$	0.977	4.81 ± 0.03
Nobles	$y=1.163x + 0.337$	0.788	4.37 ± 0.05
Nobles-VIP	$y=1.676x + 0.253$	0.979	3.7 ± 0.02
Nobles-iPLS	$y=2.107x + 0.304$	0.936	4.54 ± 0.05
	Inca muña ($ET_{ABTS} = 6.91 \pm 0.47$)		
Todo	$y=4.100x + 0.761$	0.964	11.35 ± 0.07
Todo-VIP	$y=3.850x + 0.844$	0.984	11.89 ± 0.04
Todo-iPLS	$y=2.485x + 0.226$	0.606	4.64 ± 0.17
Nobles	$y=2.413x + 0.395$	0.912	6.18 ± 0.07
Nobles-VIP	$y=2.377x + 0.424$	0.873	6.41 ± 0.08
Nobles-iPLS	$y=3.426x - 0.243$	0.778	1.81 ± 0.22

* Valores en negrita: sin diferencia estadística ($p\text{-value} < 0.05$) con el método de referencia ABTS.

Estos resultados ponen de manifiesto como las respuestas voltamétricas de cada una de las plantas ensayadas depende de sus propios compuestos antioxidantes presentes en la disolución, los cuales pueden hacer que un electrodo tenga una mayor o menor respuesta, independientemente de la cualidad que se esté determinando. Esto conlleva la realización de una selección de electrodos y pulsos los cuales sean los más idóneos para la

determinación. Si observamos la figura 4.4, en la que se representa la respuesta voltamétrica del Co, electrodo muy influyente en el modelo generado por todas las respuestas y en el que se realiza la selección VIP sobre estas (ver capítulo 2; Patrones antioxidantes. Modelos de predicción), para una concentración similar de trolox, aliso e inca muña, la respuesta voltamétrica de la inca muña es menor que la de trolox y aliso.

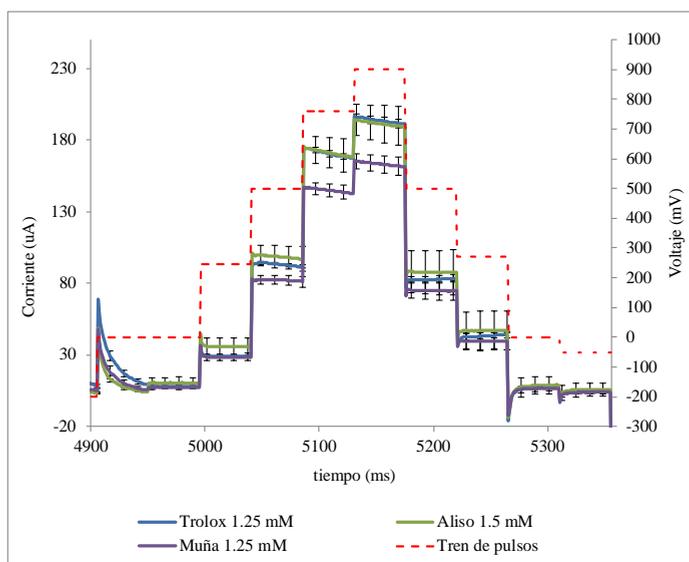


FIGURA 4.4. Respuesta eléctrica del electrodo de Co en trolox ($ET_{ABTS} = 1.25$ mM), Aliso ($ET_{ABTS} = 1.5$ mM) e Inca muña ($ET_{ABTS} = 1.25$ mM).

Cuantificación como equivalentes de catequina

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las plantas utilizando como patrón la catequina, primero estas tuvieron que ser expresadas teóricamente en base a esta. Para ello y teniendo en cuenta que 1 mM de catequina equivale a 2.44 mM de trolox (Meyer et al., 1998); ver capítulo 2; Patrones antioxidantes. Modelos de predicción) se calculó la equivalencia teórica en las plantas (tabla 4.4).

TABLA 4.4. Equivalencia de catequina de las plantas

Muestra	mM ET	mM EC (teóricos)*
Inca muña	6.391 ± 0.47	2.83 ± 0.19
Aliso	10.58 ± 1.09	4.34 ± 0.45
Chinchilcoma	6.32 ± 0.86	2.59 ± 0.31
Pachasalvia	4.13 ± 0.45	1.69 ± 0.18
Té verde	13.51 ± 0.92	5.54 ± 0.38

* Obtenida en el capítulo 2, donde 1 mM EC es igual a 2.44 mM ET

Cuando las respuestas voltamétricas fueron introducidas en los 6 modelos obtenidos utilizando como patrón catequina, y al igual que ocurría para la cuantificación como equivalentes de trolox, en el caso de la catequina también se tuvo que aplicar el método de la pendiente utilizando el criterio de la prueba *t de student*. Como se observa en las tablas 4.5 y 4.6, en las que se muestran los equivalentes de catequina de las plantas obtenidas por lo diferentes modelos matemáticos de predicción, para los casos en los que se pudo aplicar en ninguno de los ellos se pudo obtener un valor similar al teórico, siendo en todos los casos muy superior. Como se comentó en el capítulo 2 (Patrones antioxidantes. Modelos de predicción) cuando se ensayaron los modelos utilizando trolox como sustancia a evaluar, las elevadas capacidades antioxidantes de las disoluciones de catequina usadas para desarrollar los modelos hicieron que estos no fueron aptos para las predicciones. Si bien existía una correlación entre la respuesta voltamétrica y las concentraciones utilizadas, estas luego no eran equivalentes cuanto se utilizaban para predicciones.

TABLA 4.5. Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas té verde y aliso.

Modelos	Té verde ($EC_{\text{teórico}} = 5.54 \pm 0.38 \text{ mM}$)		
	Ecuación	R ²	ET ±δ
Todo	$y=15.139x + 2.4167$	0.662	34.47 ± 2.7
Todo-VIP	$y=30.701x + 1.159$	0.937	42.29 ± 0.95
Todo-iPLS	$y=8.2367x + 1.8948$	0.985	27.18 ± 0.12

Nobles	-	-	-
Nobles-VIP	$y=2.81x + 2.0122$	1	22.93 ± 0.24
Nobles-iPLS	$y=8.4358x + 1.9148$	0.983	27.58 ± 0.13
Aliso ($EC_{teórico} = 4.34 \pm 0.45$ mM)			
Todo	$y=22.693x - 0.5022$	0.999	18.68 ± 0.18
Todo-VIP	$y=26.143x - 0.57$	0.98	20.71 ± 0.29
Todo-iPLS	$y=6.8609x + 0.034$	0.955	7.18 ± 0.12
Nobles	$y=1.8533x + 0.984$	0.537	11.22 ± 0.14
Nobles-VIP	-	-	-
Nobles-iPLS	$y=9.2282x - 0.0689$	0.998	7.2 ± 0.12

TABLA 4.6. Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas chinchilcoma, pachasalvia e inca muña.

Modelos	Chinchilcoma ($EC_{teórico} = 2.59 \pm 0.31$ mM)		
	Ecuación	R ²	ET ±δ
Todo	$y=34.025x - 0.1498$	0.965	31.46 ± 0.59
Todo-VIP	$y=44.097x + 0.0777$	0.999	45.43 ± 0.15
Todo-iPLS	-	-	-
Nobles	-	-	-
Nobles-VIP	-	-	-
Nobles-iPLS	-	-	-
Pachasalvia ($EC_{teórico} = 1.69 \pm 0.18$ mM)			
Todo	$y=18.788x - 0.4883$	0.989	14.88 ± 0.48
Todo-VIP	$y=28.469x - 1.4358$	0.983	16.98 ± 0.92
Todo-iPLS	-	-	-
Nobles	-	-	-
Nobles-VIP	-	-	-
Nobles-iPLS	-	-	-
Inca muña ($EC_{teórico} = 2.83 \pm 0.19$ mM)			
Todo	$y=22.903x + 0.7925$	0.918	30.83 ± 0.82
Todo-VIP	$y=28.738x + 0.7861$	0.87	36.6 ± 1.33

Todo-iPLS	-	-	-
Nobles	$y=6.3419x + 1.3055$	0.547	19.4 ± 0.69
Nobles-VIP	$y=1.1178x + 2.1061$	0.995	22.18 ± 0.01
Nobles-iPLS	-	-	-

En base a este resultado ya en el capítulo 2 se definieron 6 nuevos modelos pero esta vez generados solo a partir de las tres primeras diluciones de catequina ensayadas. En las tablas 4.7 y 4.8 se muestran los resultados de predicción de los equivalentes de catequina con los nuevos modelos generados. Los valores que no presentaron diferencias estadísticas (p -values<0.05) se muestran resaltados en negrita. En general los modelos que fueron capaces de generar predicciones fueron menos que en el caso del patrón trolox. Para el aliso ningún modelo fue capaz de predecir su capacidad antioxidante, si para el té verde en el que los modelos generados por las respuestas de todos los metales, de los metales nobles y la selección de estos mediante el algoritmo genérico iPLS, tuvieron valores sin diferencias significativas con el valor de referencia. Estos resultados podrían mostrar que en el caso de estos dos extractos, la utilización de trolox como patrón y por consiguiente sus modelos serían los idóneos para su cuantificación. En el caso de la chinchilcoma, solo el modelo generado por la selección de la respuesta en los metales nobles por iPLS fue capaz de predecir la capacidad antioxidante, por lo que al igual que en el caso del té y el aliso, los modelos trolox serían más aconsejables en su predicción ($EC_{teórico} = 2.59 \pm 0.31$ mM). En cambio para pachasalvia y la inca muña los modelos, generado por todos los electrodos y el generado por la selección VIP de estos, fueron capaces de predecir la capacidad antioxidante. Para estas dos plantas, si bien los modelos trolox generados principalmente por la información procedente de los electrodos nobles, pueden ser útiles en la predicción de su capacidad antioxidante, los modelos procedentes de catequina, empleando toda la información también lo pueden ser, si bien dado que en este último caso los modelos fueron generados solo empleando tres concentraciones sería necesario ampliar el estudio o bien buscar nuevos patrones sobre los que generar nuevos modelos.

TABLA 4.7. Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas té verde y aliso, nuevo modelo de tres concentraciones.

Modelos	Té verde ($EC_{teórico} = 5.54 \pm 0.38$ mM)		
	Ecuación	R ²	ET $\pm \delta$
Todo	$y=5.1015x + 0.1836$	0.96	6.57 ± 0.82
Todo-VIP	$y=5.4265x + 0.1904$	0.967	6.95 ± 0.87
Todo-iPLS	$y=3.4693x + 0.4064$	0.949	7.53 ± 0.1
Nobles	$y=4.2589x + 0.0795$	0.896	4.89 ± 0.62
Nobles-VIP	$y=4.0506x + 0.4654$	0.976	7.77 ± 0.94
Nobles-iPLS	$y=3.0225x + 0.3945$	0.969	6.18 ± 0.75
Aliso ($EC_{teórico} = 4.34 \pm 0.45$ mM)			
Todo	$y=3.9945x - 0.1379$	0.943	2.87 ± 0.08
Todo-VIP	$y=3.9945x - 0.1379$	0.943	2.73 ± 0.11
Todo-iPLS	$y=2.4055x - 0.0158$	0.991	2.56 ± 0.02
Nobles	$y=4.6001x - 0.3344$	0.989	1.42 ± 0.05
Nobles-VIP	$y=2.5065x - 0.0396$	0.996	2.48 ± 0.01
Nobles-iPLS	$y=1.422x + 0.1114$	0.996	2.13 ± 0.02

* Valores en negrita: sin diferencia estadística (p-value<0.05) con el método de referencia ABTS.

TABLA 4.8. Estimación de los equivalentes de catequina de las plantas chinchilcoma, pachasalvia e inca muña, nuevo modelo de tres concentraciones.

Modelos	Chinchilcoma ($EC_{teórico} = 2.59 \pm 0.31$ mM)		
	Ecuación	R ²	ET $\pm \delta$
Todo	$y=4.6642x - 0.0654$	0.98	4.04 ± 0.05
Todo-VIP	$y=4.8151x - 0.0649$	0.982	4.2 ± 0.05
Todo-iPLS	$y=2.0313x - 0.0578$	0.988	1.48 ± 0.02
Nobles	$y=3.0446x - 0.1924$	0.967	1.21 ± 0.04
Nobles-VIP	$y=2.6429x - 0.1265$	0.956	1.44 ± 0.04
Nobles-iPLS	$y=1.5545x + 0.1094$	0.964	2.6 ± 0.02

Pachasalvia ($EC_{teórico} = 1.69 \pm 0.18$ mM)			
Todo	$y=2.5426x - 0.0956$	0.955	1.63 ±0.04
Todo-VIP	$y=2.9217x - 0.1415$	0.968	1.57 ±0.04
Todo-iPLS	$y=1.2676x - 0.0131$	0.991	1.14 ±0.01
Nobles	$y=0.8369x + 0.0045$	0.973	0.88 ±0.01
Nobles-VIP	$y=1.0989x + 0.0182$	0.754	1.27 ±0.05
Nobles-iPLS	$y=0.8769x + 0.1583$	0.943	2.38 ±0.02
Inca muña ($EC_{teórico} = 2.83 \pm 0.19$ mM)			
Todo	$y=3.8834x - 0.0693$	0.949	3.33 ±0.43
Todo-VIP	$y=4.1401x - 0.056$	0.931	3.69 ±0.48
Todo-iPLS	-	-	-
Nobles	$y=1.8477x - 0.1453$	0.808	0.69 ±0.11
Nobles-VIP	$y=1.5354x + 0.0675$	0.983	2.08 ±0.02
Nobles-iPLS	-	-	-

* Valores en negrita: sin diferencia estadística ($p\text{-value}<0.05$) con el método de referencia ABTS.

CONCLUSIÓN

La lengua electrónica voltamétrica es capaz de determinar capacidad antioxidante de las plantas peruanas de acuerdo al perfil electroquímico existente entre el patrón antioxidante y las plantas evaluadas. En general el patrón trolox es el que en mayor medida es capaz de predecir la capacidad antioxidante de las plantas, si bien no todos los modelos obtenidos a partir de este tuvieron la misma capacidad. En cambio los modelos generados a partir del patrón catequina, y solo algunos de los obtenidos utilizando solo las tres primeras diluciones, son capaces de predecir dicha característica, y no para todas las plantas.

En el caso del té verde como del aliso, los modelos trolox obtenidos a partir de toda la información o mediante la selección de VIP de esta, serían los modelos que mejor predicen su capacidad antioxidante. En cambio para el resto de extractos, chinchilcoma, pachasalvia e inca muña, los modelos obtenidos a partir de la información procedente de los metales nobles y la selección VIP de esta, serían los que mejor predicen su capacidad

antioxidante. La influencia del electrodo de Co, en los modelos en los que está presente, podría ser la causa de las malas predicciones para estas plantas.

En el caso de los modelos obtenidos a partir del patrón catequina, cuando estos son generados a partir de las tres primeras diluciones utilizando toda la información o mediante selección VIP de esta, solo son capaces de predecir la capacidad antioxidante de pachasalvia e inca muña. Si bien, dado que los modelos son generados solo empleando tres concentraciones, sería necesario ampliar el estudio a fin de obtener un modelo más robusto.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcañiz, M., Vivancos J., Masot, R., Ibañeza, J., Raga, M., Martínez-Máñez, R. and Soto, J. (2012). Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 111: 122–128.
- Almajano, M. P., Carbo, R., López Jiménez, J. A. and Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 108: 55-63.
- Ashraf, A., Adil Sarfraz, R., Abid Rashid, M. and Shahid, M. (2015). Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *Journal of food and Drug Analysis*. 23: 109-115.
- Awika, J.M., Rooney, LL.W., Wu, X., Prior, R.L. and Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *J. Agric. Food Chem*. 51: 6657-6662.
- Brack A. (1999). *Diccionario Enciclopédico de las Plantas Útiles del Perú*. CBC. Cuzco, Perú.

- Bhattacharyya, R., Tudu, B., Das, S.Ch., Bhattacharyya, N., Bandyopadhyay, R. and Pramanik, P. (2012). Classification of black tea liquor using cyclic voltammetry. *Journal of Food Engineering*. 109: 120-126.
- Carraz, M., Lavergne, C., Jullian, V., Wright, W., Gairin, J. E., Mercedes Gonzales de la Cruz, M. and Bourdy, G. (2015). Antiproliferative activity and phenotypic modification induced by selected Peruvian medicinal plants on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 166: 185-199.
- Cetó, X., Capdevila, J., Mínguez, S., Del Valle, M. (2014). Voltammetric BioElectronic Tongue for the analysis of phenolic compounds in rosé cava wines. *Food Research International*. 55: 455-461
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Chong, K.L., Tan, J.B.L. and Wong, S.K. (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23: 185-189.
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*. 47: 145-152.
- Chirinos, R., Huamán, M., Betalleluz-Pallardel, I.; Pedreschi, R. and Campos, D. (2011). Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*. 128: 711-716.
- Doroteo, V.H., Díaz, C., Terry, C. y Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Rev Soc Quím Perú*. 79 (1):13-20.
- Galvez, L., Kwon, Y.I., Apostolidis, E. and Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of

- commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*. 101(12): 4676-4689.
- Ghosh, A., Tudu, B., Tamuly, P., Bhattacharyya, N., Bandyopadhyay, R. 2012. Prediction of theaflavin and thearubigin content in black tea using a voltammetric electronic tongue. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 116: 57-66.
- Ha, D., Sun, Q., Su, K., Wan, H., Li, H., Xu, N., Sun, F., Zhuang, L., Hu, N., Wang, P. (2015). Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors *Sensors and Actuators B: Chemical*. 207, Part B: 1136-1146.
- Liteanu, C., Popescu, L.C. and Hopârtean, E. (1976). Estimation of the linearity domain limit for the ion-sensitive membrane electrode function. *Analitical Chemistry*, 48 (13).
- Locatelli, Cl. and Torsi, G. (2003). Analytical procedures for the simultaneous voltammetric determination of heavy metals in meals. *Microchemical Journal*, 75, 233-240.
- Majchrzak , D., Mitter, S. and Elmadfa, I. (2004). The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chemistry* 88: 447-451.
- Masek, A., Chrzescijanska, E., Kosmalska, A. and Zaborski, M. (2012). Antioxidant activity determination in Sencha and Gun Powder green tea extracts with the application of voltammetry and UV-VIS spectrophotometry. *Comptes Rendus Chimie*. 15: 424-427.
- Meyer, A. S., Heinonen, M. and Frankel, E.N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, yanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*. 61: 71-75.
- Novak, I., Šeruga, M., Komorsky-Lovric, S. (2010). Characterisation of catechins in green and black teas using square-wave voltammetry and RP-HPLC-ECD. *Food Chemistry*. 122: 1283-1289.

- Pamo-Reyna, O.G. (2009). Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública*. 26(3): 314-323.
- Rojas, R., Bustamante, B., José Bauer, J., Fernández, I., Albán, J. and Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 88 (2-3): 199-204.
- Re, R.; Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9/10):.1231-1237.
- Salaverry, O. y Cabrera, J. (2014). Florística de algunas plantas medicinales. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 31(1):165-168.
- Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J.J., Blanca-Herrera, R., Villalón-Mir, M., López-García de la Serrana, H. and López Martínez, M.C. (2011). The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 44: 79-86.

4. CONCLUSIONES

El estudio ha permitido desarrollar la técnica de lengua electrónica voltamétrica generando modelos matemáticos de predicción de la capacidad antioxidante, expresada como equivalentes de trolox, de todas las plantas ensayadas té verde, aliso, chinchilcoma, pachasalvia e inca muña. En cambio solo ha podido generar modelos para la predicción de las frutas camu camu y tumbo expresándose esta como equivalentes de ácido ascórbico.

El estudio de las variables; incidencia de las primeras reacciones que se producen en el entorno electrodo-solución sobre las sucesivas, para una misma medición, del efecto de la presencia de O₂ en las soluciones y del pH de estas, mostró como solo las dos últimas tienen influencia sobre la respuesta voltamétrica.

Para la obtención de soluciones más estables que puedan ser medidas voltaméricamente con un menor error es necesario que estas estén burbujeadas con un gas como puede ser el N₂, el cual desplaza al O₂ inhibiendo las reacciones de oxidación que este genera. Además en el caso de soluciones ácidas, como puede ser el ácido ascórbico, es necesario que estas estén a un pH de 4.8 dado que a este pH las soluciones son más estables que a pH más básicos como 7.4.

De los modelos desarrollados, el modelo generado utilizando el patrón ácido ascórbico, empleando la información procedente de todos los electrodos y el generado a partir de la selección iPLS de esta, son los que mejor predicen la capacidad antioxidante de ambas frutas, si bien en el caso del camu camu también lo son los modelos obtenidos a partir de la selección VIP de la información de todos los electrodos o el generado a partir de la selección VIP de la información procedente de los electrodos nobles. La gran influencia del electrodo de plata sobre el patrón ácido ascórbico, y la respuesta en este de las frutas evaluadas, podría ser la causa de la capacidad para su predicción.

En el caso de los modelos obtenidos a partir del patrón ácido gálico, solo los obtenidos a partir de la información procedente de todos los electrodos y de la selección VIP de esta, son capaces de predecir la capacidad antioxidante de camu camu. Para el resto de frutas ninguno de los modelos desarrollados es capaz de evaluar su capacidad

antioxidante. En este caso la gran influencia del electrodo de cobre sobre el patrón ácido gálico, y la respuesta en este de las frutas evaluadas, podría ser la causa de la capacidad para su predicción.

En la determinación de la capacidad antioxidante de las plantas, el patrón trolox es el que en mayor medida es capaz de predecir la capacidad antioxidante de las plantas, si bien no todos los modelos obtenidos a partir de este tuvieron la misma capacidad. En cambio los modelos generados a partir del patrón catequina, y solo algunos de los obtenidos utilizando solo las tres primeras diluciones, son capaces de predecir dicha característica, y no para todas las plantas.

En el caso del té verde como del aliso, los modelos trolox obtenidos a partir de toda la información o mediante la selección de VIP de esta, serían los modelos que mejor predicen su capacidad antioxidante. En cambio para el resto de extractos, chinchilcoma, pachasalvia e inca muña, los modelos obtenidos a partir de la información procedente de los metales nobles y la selección VIP de esta, serían los que mejor predicen su capacidad antioxidante. La influencia del electrodo de Co, en los modelos en los que está presente, podría ser la causa de las malas predicciones para estas plantas.

En el caso de los modelos obtenidos a partir del patrón catequina, cuando estos son generados a partir de las tres primeras diluciones utilizando toda la información o mediante selección VIP de esta, solo son capaces de predecir la capacidad antioxidante de pachasalvia e inca muña. Si bien, dado que los modelos son generados solo empleando tres concentraciones, sería necesario ampliar el estudio a fin de obtener un modelo más robusto.

