

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Escuela de Posgrado**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**IMPACTO DE UN PROCESO INTEGRADO DE EXTRACCIÓN  
LÍQUIDA PRESURIZADA Y PURIFICACIÓN CON RESINAS  
SOBRE LA RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES  
PRESENTES EN ORUJO DE UVA  
(*Vitis vinifera* L. cv. Negra Criolla)**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

Mgr. NILTON CÉSAR LEÓN CALVO

**Para optar el Grado Académico de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**TACNA – PERÚ**

**2025**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Escuela de Posgrado


DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

IMPACTO DE UN PROCESO INTEGRADO DE EXTRACCIÓN  
LÍQUIDA PRESURIZADA Y PURIFICACIÓN CON RESINAS  
SOBRE LA RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES  
PRESENTES EN ORUJO DE UVA  
(*Vitis vinífera* L. cv. Negra Criolla)

Tesis sustentada y aprobada el 05 de noviembre del 2024; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE

:

  
.....  
Dr. Edilberto Pablo Mamani López

SECRETARIO

:

  
.....  
Dr. Edgardo Oscar Avendaño Cáceres

MIEMBRO

:

  
.....  
Dr. Herbert Hernán Soto Gonzales

ASESOR

:

  
.....  
Dr. Herbert Hernán Soto Gonzales

### CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales, en mi condición de asesora acreditada con Resolución de Escuela de Posgrado N° 11283-2022-ESPG/UNJBG del 29 de abril del 2022, del trabajo de tesis titulado: “Impacto de un proceso integrado de extracción líquida presurizada y purificación con resinas sobre la recuperación de polifenoles presentes en orujo de uva (*Vitis vinifera* L. cv. Negra Criolla), presentado por el Sr. Nilton César León Calvo, para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de Ambientales.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 9 %.

Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la tesis y está de acuerdo al nivel PERMITIDO, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado a solicitud del interesado con fines de continuar con los trámites respectivos para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias de Ambientales.

Tacna, 09 octubre 2024

FIRMA ASESOR  
Nombres y apellidos

.....  
Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales  
DNI N° 01317360

FIRMA TESISTA  
Nombres y apellidos

.....  
Sr. Nilton César León Calvo  
DNI N° 23984603



## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo, en primer lugar, a Dios porque me da la oportunidad de seguir avanzando en este camino de la vida.

A mi madre Alejandrina y toda mi familia, quienes me enseñaron con el ejemplo y con amor, a perseverar para lograr mis metas.

A mi esposa Sujey Caso, mi compañera de vida, quien me apoyó constantemente a lo largo de mis estudios de doctorado.

## **AGRADECIMIENTO**

A mis profesores del Doctorado en Ciencias Ambientales, por sus enseñanzas.

A mi asesor, Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales. por su apoyo incondicional para la culminación de la tesis doctoral.

A mi Co-Aesor al Dr. Nils Leander Huamán Castilla, por su apoyo incondicional, para la ejecución y culminación de la tesis doctoral.

Al Grupo de Investigación de TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE ALTO VALOR de la UNAM-MOQUEGUA.

## ÍNDICE GENERAL

|  |      |
|--|------|
| DEDICATORIA .....  | iv   |
| AGRADECIMIENTO .....                                       | v    |
| RESUMEN .....  | xiii |
| ABSTRACT.....  | xiv  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| <br>   |      |
| CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                | 3    |
| 1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....                        | 3    |
| 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....                        | 5    |
| 1.2.1. Problema general.....                               | 5    |
| 1.2.2. Problemas específicos .....                         | 5    |
| 1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN ..... | 6    |
| 1.4 ALCANCES Y LIMITACIONES .....                          | 7    |
| 1.4.1. Alcances .....                                      | 7    |
| 1.4.2. Limitaciones .....                                  | 7    |
| 1.5. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.....                     | 8    |
| 1.5.1. Objetivo general .....                              | 8    |
| 1.5.2. Objetivos específicos.....                          | 8    |
| 1.6. HIPÓTESIS.....  | 8    |
| 1.6.1. Hipótesis general.....                              | 8    |
| 1.6.2. Hipótesis específica.....                           | 8    |
| 1.7. VARIABLES .....                                       | 9    |

|                                       |  |    |
|---------------------------------------|--|----|
| 1.7.1.                                | Identificación de variables .....  | 9  |
| CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO .....       |  | 10 |
| 2.1.                                  | ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....   | 10 |
| 2.1.1.                                | La uva .....   | 12 |
| 2.2.2.                                | Uvas pisqueras .....   | 13 |
| 2.2.3.                                | Orujo de uva .....   | 14 |
| 2.2.4.                                | Polifenoles presentes en el orujo de uva .....   | 15 |
| 2.2.5.                                | Capacidad antioxidante de los polifenoles .....  | 17 |
| 2.2.6.                                | Propiedades bioactivas y tecnológicas de los Polifenoles presentes en piel y semilla de orujo de uva ..... | 19 |
| 2.2.7.                                | Extracción de Polifenoles .....  | 19 |
| 2.2.8.                                | Impacto de la ELP sobre otras tecnologías en la recuperación de polifenoles ....                           | 24 |
| 2.2.9.                                | Purificación de extractos polifenólicos .....  | 26 |
| 2.2.10.                               | Rol de la polaridad del solvente .....   | 28 |
| 2.2.                                  | DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS .....   | 30 |
| 2.3.                                  | MARCO FILOSÓFICO .....   | 32 |
| CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO ..... |  | 35 |
| 3.1.                                  | TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....  | 35 |
| 3.1.1.                                | Tipo de investigación .....  | 35 |
| 3.2.2.                                | Nivel de investigación .....   | 35 |
| 3.2.3.                                | Diseño de la investigación .....   | 36 |
| 3.2.                                  | POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO .....   | 36 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 3.2.1                                     | Población.....  | 36 |
| 3.2.2.                                    | Muestra.....  | 36 |
| 3.4.                                      | OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....   | 38 |
| 3.5.                                      | ACCIONES Y ACTIVIDADES PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO ....  | 40 |
| 3.6.                                      | TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS.....  | 49 |
| 3.6.1.                                    | Materiales.....   | 49 |
| 3.6.2.                                    | Instrumentos.....   | 51 |
| 3.7                                       | TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS .....  | 54 |
| 3.7.1.                                    | Análisis del proceso de extracción:.....  | 54 |
| 3.7.2.                                    | Proceso integrado de extracción - purificación:.....  | 54 |
| 3.7.3.                                    | Optimización del proceso de extracción mediante el diseño compuesto central .   | 55 |
| CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES..... |   | 57 |
| 4.1.                                      | Efecto de la temperatura (100 – 160°C) y concentración de etanol (20 – 60 %) sobre el contenido de compuestos antioxidante y compuestos no deseados presentes en orujo de uva.....  | 57 |
| 4.1.1.                                    | Contenido de polifenoles.....   | 57 |
| 4.1.2.                                    | Capacidad antioxidante .....  | 61 |
| 4.1.3.                                    | El efecto del uso de mezclas agua - etanol a altas temperaturas sobre el perfil de polifenoles .....  | 65 |
| 4.2.                                      | Evaluar el efecto la concentración de etanol (20 – 60 %) en extracción y concentración de eluyente (80 %) en purificación sobre el rendimiento global en el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación..... | 69 |

|                                  |  |     |
|----------------------------------|--|-----|
| 4.2.1.                           | Contenido de polifenoles.....  | 69  |
| 4.2.2.                           | Capacidad antioxidante de los extractos purificados (DPPH y ORAC) .....                            | 71  |
| 4.2.3.                           | El efecto del uso de mezclas agua - etanol en la ELP y PR sobre el perfil de polifenoles .....     | 74  |
| 4.3.                             | Simulación de datos para la optimización de las condiciones de extracción líquido presurizada..... | 77  |
| CONCLUSIONES .....               |  | 81  |
| RECOMENDACIONES.....             |  | 83  |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... |  | 84  |
| ANEXOS .....                     |  | 101 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1</b> Tendencia de la producción de uva año 2022-2023. ....  | 13 |
| <b>Tabla 2</b> <i>Perfil Polifenólico de algunas variedades de orujo de uva (mg/100 gss)</i> .....  | 15 |
| <b>Tabla 3</b> <i>Métodos de extracción de polifenoles</i> .....  | 20 |
| <b>Tabla 4</b> <i>Análisis de los costes de fabricación (CF) para la obtención de extractos polifenólicos utilizando mezcla agua – etanol (30 %)</i> . .... | 25 |
| <b>Tabla 5</b> <i>Polaridad de algunos solventes usados en extracción</i> .....   | 30 |
| <b>Tabla 6</b> <i>Condiciones del proceso de extracción en piel de orujo por líquidos presurizados</i> .<br>.....   | 42 |
| <b>Tabla 7</b> <i>Condiciones del proceso de extracción en semilla de orujo por líquidos presurizados</i> . ....  | 42 |
| <b>Tabla 8</b> <i>Condiciones del proceso de purificación en piel de orujo</i> . ....   | 46 |
| <b>Tabla 10</b> <i>Condiciones del proceso de purificación en semilla de orujo</i> . ....   | 46 |
| <b>Tabla 10</b> <i>Matriz para el diseño compuesto central (DCC)</i> . ....   | 55 |
| <b>Tabla 11</b> <i>Perfil de polifenoles presentes en los extractos de orujo de uva</i> .....   | 66 |
| <b>Tabla 12</b> <i>Perfil de polifenoles presentes en los extractos purificados de orujo de uva</i> . ....  | 76 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Partes de la uva.....  | 12 |
| <b>Figura 2</b> Contenido de polifenoles en residuos agroindustriales. ....  | 14 |
| <b>Figura 3</b> Estructuras químicas de proantocianidinas de orujo de uva .....  | 17 |
| <b>Figura 4</b> Capacidad de reducción de radicales libres por parte de los polifenoles .....                          | 18 |
| <b>Figura 5</b> Mecanismo de extracción convencional de polifenoles .....  | 22 |
| <b>Figura 6</b> Adsorción dinámica de polifenoles .....  | 28 |
| <b>Figura 7</b> Diagrama del proceso de extracción para piel y semilla de orujo de uva por separado.....               | 40 |
| <b>Figura 8</b> Etapas del proceso de purificación de los diferentes extractos crudos .....                            | 44 |
| <b>Figura 9</b> Diagrama del proceso de purificación para piel y semilla de orujo de uva por separado.....             | 45 |
| <b>Figura 10</b> Etapas consideradas para la ejecución de la tesis.....  | 49 |
| <b>Figura 11</b> Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de polifenoles totales..... | 58 |
| <b>Figura 12</b> Interacciones intermoleculares entre la molécula del etanol y los polifenoles ...                     | 59 |
| <b>Figura 13</b> Capacidad antioxidante analizada por DPPH en piel y semilla de orujo .....                            | 62 |
| <b>Figura 14</b> Capacidad antioxidante analizada por ORAC en piel y semilla de orujo .....                            | 65 |
| <b>Figura 15</b> Efecto de la composición de etanol en ELP y PR sobre el contenido de polifenoles totales .....        | 70 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 16</b> Efecto de la composición de etanol en ELP y PR sobre el valor $IC_{50}$ ..... | 72 |
| <b>Figura 17</b> Efecto de la composición de etanol en PLE y PR sobre el valor ORAC .....      | 73 |
| <b>Figura 18</b> Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles.....                 | 78 |
| <b>Figura 19</b> Superficie de respuesta para el contenido de azúcares.....                    | 79 |
| <b>Figura 20</b> Función deseabilidad para optimizar respuestas múltiples .....                | 80 |

## RESUMEN

La investigación titulada “Impacto de un proceso integrado de extracción líquida presurizada y purificación con resinas sobre la recuperación de polifenoles presentes en orujo de uva (*Vitis vinifera* L. cv. Negra Criolla)”, el propósito de esta investigación es evaluar el impacto de la temperatura y concentración de etanol en un proceso integrado de extracción por líquidos presurizados (ELP) y purificación con resinas (PR) sobre la recuperación de polifenoles y compuestos no deseados del orujo de uva. El problema general de esta investigación fue ver ¿Cuál será el efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre la recuperación de polifenoles a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso integrado ELP-PR?, el objetivo primordial fue evaluar el impacto de la temperatura y concentración de etanol en un proceso integrado ELP-PR sobre la recuperación de polifenoles y compuestos no deseados a partir del orujo de uva. Metodológicamente hablando, el tipo de investigación fue analítica, de nivel aplicado, diseño experimental, cuya muestra seleccionada es de 50 kg de orujo de uva, proveniente de la vinificación industrial de uva de la Bodega el Biondi (Mariscal Nieto, Moquegua, Perú). Los resultados obtenidos dieron a conocer que utilizar un 60 % de etanol a 160 °C, permitiendo obtener extractos con alto contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en piel (1,98 mg EAG/gss; IC<sub>50</sub>: 12,22 mg/mL; 36,33 µmol ET/gss) y semilla (12,54 mg EAG/gss; IC<sub>50</sub>: 1,02 mg/mL; 137,65 µmol ET/gss). Interesantemente, durante la purificación, las bajas concentraciones de etanol permitieron recuperar ~80 % de contenido de polifenoles totales en piel y semilla, mientras que la presencia de azúcares fue reducida en ~95 %. Los resultados indican que un incremento en la concentración de etanol hasta un 60 % a 160 °C permitió una extracción selectiva de flavonoles. Sin embargo, las bajas concentraciones de etanol fueron más eficientes para recuperar flavonoles y ácido fenólico en piel y semilla de orujo de uva. Este efecto sugiere la necesidad de ajustar las condiciones de extracción en la ELP-PR para optimizar la eficiencia del proceso y la calidad del extracto final.

Palabras clave: Concentración de etanol, temperatura de extracción, polifenoles totales, capacidad antioxidante, perfil de polifenoles, azúcares reductores.

## ABSTRACT

The research titled "Impact of an Integrated Pressurized Liquid Extraction and Resin Purification Process on the Recovery of Polyphenols from Grape Pomace (*Vitis vinifera* L. cv. Negra Criolla)" aims to evaluate the impact of temperature and ethanol concentration in an integrated process of pressurized liquid extraction (PLE) and resin purification (RP) on the recovery of polyphenols and undesirable compounds from grape pomace. The central problem of this research was to determine the effect of temperature and ethanol concentration on the recovery of polyphenols from grape pomace using an integrated PLE-RP process. The primary objective was to evaluate the impact of temperature and ethanol concentration in an integrated PLE-RP process on the recovery of polyphenols and undesirable compounds from grape pomace.

Methodologically, the research was analytical, applied in nature, with an experimental design. The selected sample consisted of 50 kg of grape pomace from the industrial winemaking of the Bodega el Biondi (Mariscal Nieto, Moquegua, Peru). The results revealed that using 60 % ethanol at 160 °C enabled the extraction of extracts with a high content of polyphenols and antioxidant capacity in the skin (1,98 mg GAE/gds; IC<sub>50</sub>: 12,22 mg/mL; 36,33 µmol TE/gds) and seeds (12,54 mg GAE/gds; IC<sub>50</sub>: 1,02 mg/mL; 137,65 µmol TE/gds). Interestingly, during purification, low ethanol concentrations allowed for the recovery of approximately 80 % of the total polyphenol content in the skin and seeds, while the presence of sugars was reduced by about 95 %. The results indicate that increasing ethanol concentration to 60 % at 160 °C enabled the selective extraction of flavonols. However, lower ethanol concentrations were more efficient in recovering flavanols and phenolic acid in the skin and seeds of grape pomace. This effect suggests the need to adjust extraction conditions in the PLE-RP process to optimize process efficiency and the quality of the final extract.

Keywords: Ethanol concentration, extraction temperature, total polyphenols, antioxidant capacity, polyphenol profile, reducing sugars.

## RESUMO

A pesquisa intitulada “Impacto de um processo integrado de extração líquida pressurizada e purificação com resinas na recuperação de polifenóis presentes no bagaço de uva (*Vitis vinifera* L. cv. Negra Criolla)” teve como objetivo avaliar o impacto da temperatura e da concentração de etanol em um processo integrado de extração por líquidos pressurizados (ELP) e purificação com resinas (PR) sobre a recuperação de polifenóis e compostos indesejáveis do bagaço de uva. O problema central da pesquisa foi: Qual será o efeito da temperatura e da concentração de etanol sobre a recuperação de polifenóis a partir do bagaço de uva utilizando um processo integrado ELP-PR? O objetivo principal foi avaliar o impacto dessas variáveis no processo integrado ELP-PR para recuperar polifenóis e reduzir compostos indesejáveis do bagaço de uva.

Do ponto de vista metodológico, trata-se de uma pesquisa analítica, de nível aplicado, com delineamento experimental. A amostra selecionada consistiu em 50 kg de bagaço de uva, proveniente da vinificação industrial da uva na Vinícola El Biondi (Mariscal Nieto, Moquegua, Peru). Os resultados revelaram que o uso de 60% de etanol a 160 °C permitiu obter extratos com alto teor de polifenóis e capacidade antioxidante tanto na casca (1,98 mg EAG/gss; IC50: 12,22 mg/mL; 36,33 µmol ET/gss) quanto na semente (12,54 mg EAG/gss; IC50: 1,02 mg/mL; 137,65 µmol ET/gss). Interessantemente, durante a purificação, as baixas concentrações de etanol permitiram recuperar aproximadamente 80% do teor total de polifenóis em casca e semente, enquanto a presença de açúcares foi reduzida em cerca de 95%. Os resultados indicam que o aumento da concentração de etanol até 60% a 160 °C favoreceu a extração seletiva de flavonóis. No entanto, concentrações mais baixas de etanol foram mais eficazes na recuperação de flavanóis e ácido fenólico na casca e na semente do bagaço de uva. Esse efeito sugere a necessidade de ajustar as condições de extração no processo ELP-PR para otimizar a eficiência do processo e a qualidade final do extrato.

Palavras-chave: Concentração de etanol, temperatura de extração, polifenóis totais, capacidade antioxidante, perfil de polifenóis, açúcares redutores.

## INTRODUCCIÓN

Moquegua genera una producción de uva de ~6000 tn por año. Esta principal producción se destina a tres principales usos tales como la elaboración de pisco que representa un 44 %, la producción de vinos que representa un 34 % y a la comercialización tanto en el mercado nacional como en el exterior que alcanza el 22%. En particular, la producción de pisco y vino genera residuos agroindustriales tales como el orujo de uva (resto de piel y semilla). Este residuo, carece de valor económico y representa un problema de gestión ambiental para las empresas y familias involucradas en esta industria.

El orujo de uva puede considerarse como una fuente natural de polifenoles, caracterizado por sus propiedades bioactivas, las cuales han despertado el interés de la industria alimentaria como de la farmacéutica. Esta ha propiciado su incorporación en el desarrollo de productos nutraceuticos. Sin embargo, el empleo de técnicas de extracción atmosférica convencionales, como la extracción sólido-líquido, en combinación con el uso de solventes tóxicos tales como metanol, acetona y hexano, son perjudiciales para el medio ambiente. Esto dificulta la posible aplicación industrial de los polifenoles.

Diferentes métodos alternativos han sido desarrollados, tales como la extracción asistida por ultrasonido (EAU), fluidos supercríticos (FS) y extracción por líquidos presurizados (ELP). Los cuales son combinados con solventes amigables con el medio ambiente tales como agua, etanol, glicerol e isopropanol, cuyos resultados han demostrado una alta eficiencia en la recuperación de compuestos bioactivos.

En particular, la ELP es una tecnología alternativa a bajo costo con altos rendimientos en la recuperación de compuestos bioactivos. Sin embargo, estos estudios se centran en los rendimientos obtenidos, dejando de lado la importancia del efecto del solvente de extracción en la determinación de la selectividad de diferentes familias de polifenoles, que incluyen ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos. Por ello, el presente trabajo de investigación propone Evaluar el impacto de la temperatura y concentración de etanol en un proceso integrado de extracción – purificación con resinas sobre la recuperación de

polifenoles y compuestos no deseados a partir del orujo de uva, considerando el relevante rol de la polaridad del solvente sobre la selectividad de específicas familias de polifenoles.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La producción de vino y pisco en el mundo representa una de las principales actividades agrícolas. Esta producción en particular genera grandes cantidades de residuos agroindustriales, los cuales representan un problema de gestión ambiental para las empresas relacionadas con este rubro (Maicas & Mateo, 2020).

Perú es un importante productor de vino, con una producción anual de alrededor de ~50 millones de litros. En particular, Moquegua aporta el 15 % de la producción nacional. Sin embargo, este nivel de producción de vino genera una cantidad considerable de orujo de uva (30 000 tn por año). El orujo de uva es un residuo compuesto de piel y semilla que queda después del proceso de vinificación de la uva. Por lo general, se considera un desecho agroindustrial de bajo valor económico. Además, la acumulación de orujo de uva puede plantear desafíos de gestión ambiental, como la potencial generación de gases de efecto invernadero (MINAGRI, 2020).

A pesar de estos desafíos, el orujo de uva tiene sus beneficios debido a su alta concentración de polifenoles, que son compuestos naturales que se encuentran en las plantas. Los polifenoles tienen beneficios potenciales para la salud, como efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

El orujo de uva contiene una alta concentración de polifenoles, con niveles que alcanzan los (~56 mg/g). Estos polifenoles pertenecen a diferentes familias, incluyendo antocianinas, flavonoles, flavanoles (proantocianidinas) y ácidos fenólicos (Balík et al., 2008; Garrido & Borges, 2013; Vergara-Salinas et al., 2013). Debido a sus aplicaciones potenciales en las industrias alimentarias y farmacéuticas, existe la necesidad de desarrollar tecnologías de extracción que puedan maximizar la recuperación de estos compuestos.

Frente a este escenario, diversos procesos de extracción sólido-líquido han sido propuestos para la obtención de polifenoles a partir de este residuo agroindustrial. Sin embargo, los solventes utilizados, tales como metanol, acetona y hexano, son cuestionables debido a su elevada toxicidad y daños al medio ambiente. En ese sentido, el desarrollo de tecnologías alternativas que promuevan el uso de solventes amigables con el medio ambiente para la obtención de extractos ricos en polifenoles a partir de residuos agroindustriales son aún una tarea pendiente por resolver.

La extracción por líquidos presurizados (ELP) contempla el uso de agua pura como solvente de extracción a altas temperaturas ( $>100$  °C), este método no solo es reconocido como una tecnología limpia, sino también permite una mayor recuperación de polifenoles en comparación con la extracción convencional (sólido-líquido) (Huamán-Castilla, 2020). Sin embargo, el uso de agua pura a altas temperaturas presenta algunas limitaciones como la oxidación e hidrólisis de polifenoles, en particular los de alto grado de polimerización, que son los que presentan propiedades bioactivas y sensoriales más interesantes, formación de compuestos carcinogénicos como el hidroximetilfurfural (HMF), aumenta la extracción de azúcares, todo ello limita la aplicabilidad de los extractos como ingredientes funcionales. Por ello, el uso de etanol como cosolvente en la ELP permitiría no solo reducir la polaridad del solvente de extracción, sino también podría mejorar significativamente la recuperación de polifenoles presentes en el orujo. Sin embargo, el efecto de la temperatura y composición del solvente sobre el contenido de polifenoles y compuestos no deseados que permitan establecer parámetros óptimos de proceso son aún una tarea pendiente por resolver.

La presencia de compuestos no deseados (HMF y azúcares) ha permitido el uso de técnicas complementarias como la purificación mediante el uso de resinas macroporosas o filtración con membranas (Ameer et al., 2017). No obstante, el uso de resinas, una tecnología limpia de bajo costo y fácilmente escalable a nivel industrial de purificación, permite no solo la recuperación de polifenoles, sino también permite la reducción de compuestos no deseados

(Li & Chase, 2010). Sin embargo, aún hasta la fecha las etapas de extracción (ELP) y purificación se siguen evaluando de forma independientemente; mientras el impacto del proceso integrado (extracción-purificación) sobre el rendimiento de polifenoles y la eliminación de compuestos tóxicos (HMF) aún no ha sido evaluado.

Frente a este enfoque global, el presente trabajo de investigación propone desarrollar un proceso aplicable a escala industrial que permita obtener, a partir de orujo de uva, extractos polifenólicos purificados ricos en polifenoles mediante el uso de un método integrado de extracción - purificación.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

### ***1.2.1. Problema general***

- ¿Cuál será el efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre la recuperación de polifenoles a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso integrado de extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas?

### ***1.2.2. Problemas específicos***

- ¿Cuál será el efecto de la temperatura (100 – 160 °C) y concentración de etanol (20 – 60 %) sobre el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso de extracción por líquidos presurizados?
- ¿Cuál será el efecto de diferentes concentraciones de etanol (20 – 60 %) usados en extracción que podrían afectar la recuperación de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación?

### **1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Si bien el orujo de uva es considerado un residuo agroindustrial sin ningún valor económico, su uso como una fuente natural para la obtención de polifenoles permitirá no solo revalorizar este residuo agroindustrial, sino también mitigar los problemas de gestión ambiental de las empresas y familias relacionadas con este rubro.

Las importantes propiedades bioactivas de los polifenoles presentes en el orujo de uva no solo expresadas por su contenido de polifenoles, sino también su capacidad antioxidante evaluado por los métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno), han promovido que la demanda mundial de estos compuestos se incremente significativamente en los últimos años, cuyos precios pueden variar entre los 1000 y 33 000 (dólares americanos) por gramo, dependiendo de su grado de pureza. Por ello, el desarrollo de tecnologías alternativas como la extracción líquida presurizada (ELP) y purificación con resinas no solo permitiría mejorar los rendimientos en la extracción de estos compuestos, sino también permitiría reducir los costos de producción. Esto permitirá establecer a futuro el desarrollo de proyectos productivos enmarcados en la obtención de polifenoles de diversos recursos agroindustriales.

El uso de cosolventes como el etanol durante el proceso integrado de extracción y purificación permitirá no solo reducir las temperaturas de extracción, evitando la formación de compuestos, sino también permitirá la separación y/o eliminación de compuestos no deseados. Además, el rol del cosolvente como regulador de la polaridad de la solución permitiría mejorar la selectividad en la extracción de polifenoles específicos y reducirá la recuperación de compuestos no deseados como los azúcares reductores. En ese contexto, el presente trabajo propone el desarrollo de las condiciones adecuadas de un proceso de extracción y purificación para la obtención de polifenoles presentes en el orujo de uva.

## **1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES**

### ***1.4.1. Alcances***

- Establecer la eficacia de las mezclas agua-etanol a diferentes concentraciones y temperaturas para la extracción de polifenoles.
- Establecer un proceso combinado de ELP y PR para mejorar la recuperación y selectividad de polifenoles específicos.
- Provisión de una metodología aplicable a otros subproductos agroindustriales para la recuperación de compuestos bioactivos.
- Contribución a la valorización del orujo de uva como fuente de polifenoles con propiedades bioactivas.

### ***1.4.2. Limitaciones***

- La investigación se enfoca exclusivamente en la piel y semilla de orujo de uva negra criolla, limitando que los parámetros obtenidos puedan ser usados en otros residuos agroindustriales.
- La variabilidad en la composición química del orujo de uva puede afectar la reproducibilidad de los resultados.
- Las condiciones de extracción y purificación identificadas pueden no ser directamente aplicables a escalas industriales sin antes realizar prototipos a nivel de laboratorio.
- La presencia de etanol en los extractos puede influir en la adsorción y recuperación de polifenoles, lo que requiere un control preciso de las condiciones experimentales.

## **1.5. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN**

### ***1.5.1. Objetivo general***

- Evaluar el impacto de la temperatura y concentración de etanol en un proceso integrado de extracción – purificación con resinas sobre la recuperación de polifenoles y compuestos no deseados a partir del orujo de uva.

### ***1.5.2. Objetivos específicos***

- Evaluar el efecto de la temperatura (100 – 160 °C) y concentración de etanol (20 – 60 %) sobre el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH Y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso de extracción por líquidos presurizados.
- Evaluar el efecto la concentración de etanol (20 – 60 %) en extracción y concentración de eluyente (80 %) en purificación sobre el rendimiento global en el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación.

## **1.6. HIPÓTESIS**

### ***1.6.1. Hipótesis general***

- Es posible mejorar la recuperación de polifenoles con alta capacidad antioxidante presentes en orujo de uva reduciendo la presencia de azúcares reductores a través de concentraciones de etanol a altas temperaturas en un proceso integrado de extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas.

### ***1.6.2. Hipótesis específica***

- El uso de diferentes concentraciones de etanol (20 – 60 %) a altas temperaturas (100 – 160 °C) permitirá mejorar el contenido de polifenoles, capacidad

antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso de extracción por líquidos presurizados.

- El uso de diferentes concentraciones de etanol (20 – 60 %) en extracción podría afectar la recuperación de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación.

## **1.7. VARIABLES**

### ***1.7.1. Identificación de variables***

Las variables de estudio en la investigación son las siguientes:

- Variable independiente:
  - Concentración de etanol en extracción (20, 40 y 60 %, p/p)
  - La temperatura de extracción (100, 130 y 160 °C)
  - Concentración de etanol como eluyente en purificación (80 %)
- Variable dependiente:
  - Polifenoles totales expresados como mg de equivalente de ácido gálico por gramo de orujo seco (mg EAG/gss)
  - Capacidad antioxidante expresada como  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por gramo de orujo seco ( $\mu\text{mol ET/gss}$ )
  - Perfil de polifenoles, expresados como  $\mu\text{g}$  por gramo de orujo seco ( $\mu\text{g/gss}$ )
  - Azúcares reductores, expresados como mg por gramo de orujo seco (mg/gss)

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN**

Huamán, en sus investigaciones, indica que los polifenoles presentes en orujo de uva (*Vitis vinífera*) Carmenere presentan propiedades bioactivas y sensoriales muy interesantes para la industria farmacéutica y alimentaria (Huamán-Castilla, 2020). Sin embargo, los solventes utilizados en un proceso de extracción (sólido líquido) tales como metanol, acetona, hexano, entre otros, son cuestionables debido a su elevada toxicidad y daños al medio ambiente (Huamán-Castilla, 2019). Frente a este escenario, se han promovido el desarrollo de tecnologías limpias (Green technologies) mediante el uso de solventes de grado alimentario amigables con el medio ambiente tales como agua, etanol, glicerol (Athanasiadis et al., 2022). Todo ello, permite la obtención de extractos polifenólicos de grado alimentario, usando altas temperaturas, reducidos volúmenes de solvente y cortos tiempos de proceso (Huamán-Castilla, 2020).

Hasta ahora, se ha propuesto el agua como solvente para la extracción de ELP en condiciones subcríticas (T: 100 - 300 °C), que ha demostrado duplicar los rendimientos en comparación con la extracción convencional. Sin embargo, las altas temperaturas del proceso pueden provocar la degradación de los polifenoles, incluidas las antocianinas y los flavonoles, lo que lleva a la formación de compuestos de Maillard potencialmente cancerígenos, como el hidroximetilfurfural (HMF) (Brachet et al., 2001; García-Jares et al., 2015; Ju & Howard, 2003; Khuwijitjaru et al., 2014; Petersson et al., 2010; José R. Vergara-Salinas et al., 2013). Además, la extracción de azúcares reductores, como la glucosa y la fructosa, se ve favorecida a altas temperaturas, lo que puede limitar el uso de los extractos como ingredientes alimentarios (Plaza et al., 2010b, 2010a, 2013; Plaza & Turner, 2015b).

Mariotti, indica que, si bien la ELP permite recuperar polifenoles y compuestos no deseados (azúcares reductores), es necesario una etapa subsiguiente mediante el uso de purificación con resinas (PR) para la obtención de polifenoles inocuos a partir de orujo de

uva. Por ejemplo, (Mariotti-Celis et al., 2018) evaluó el efecto de bajas temperaturas de extracción (T: 60 -90 °C) y uso de co-solvente etanol (0 – 15 %; v/v) durante el proceso de ELP y concentraciones de eluyente (etanol) en purificación (PR), con la finalidad de favorecer la recuperación de polifenoles y reducir la formación de hidroximetilfurfural (HMF). Interesantemente, la purificación con resinas eliminó la presencia de azúcares en los extractos y redujo ~95 % la presencia de HMF. Las condiciones óptimas del proceso fueron establecidas en 90 °C y 15 % de etanol para la extracción (ELP) y 80 % de eluyente para la purificación (Mariotti-Celis, et al. 2018).

Nils Leander Huamán-Castilla (2019), investigó los efectos de diferentes condiciones en un proceso integrado que involucraba la extracción de líquido presurizado (ELP) (temperatura: 90-150 °C; concentración de etanol: 15 %-50 %) y purificación con resina (PR) (etanol 60-80 %) en la recuperación de polifenoles específicos, incluidos ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos, del orujo de uva. Los hallazgos revelaron que la utilización de etanol como cosolvente resultó en una recuperación significativamente mayor de polifenoles, hasta tres veces más efectiva que cuando se usó agua pura en las mismas condiciones. Curiosamente, se observó que el aumento de la concentración de etanol (> 15 %) durante la etapa de extracción condujo a una disminución en la recuperación de polifenoles durante el paso de purificación posterior. Por lo tanto, para lograr rendimientos óptimos de extracción y purificación requiere trabajar con concentraciones de etanol relativamente más bajas (<15 %).

(Huamán-Castilla, 2020), evaluó la extracción de polifenoles del orujo de uva Carménère mediante extracción líquida presurizada (ELP). Examinaron varias mezclas de agua y glicerol y agua y etanol con concentraciones del 15 %, 32,5 % y 50 % en un sistema de extracción de líquido presurizado (ELP: 10 MPa) y temperaturas de 90 °C, 120 °C y 150 °C. El objetivo era obtener extractos con polifenoles de bajo peso. Los resultados mostraron que el uso de glicerol como cosolvente condujo a rendimientos de polifenoles significativamente más altos en comparación con el etanol. Se encontró que las condiciones

óptimas de extracción eran 150 °C con 32,5 % de glicerol para flavonoles y 50 % de glicerol para flavanoles, estilbenos y ácidos fenólicos.

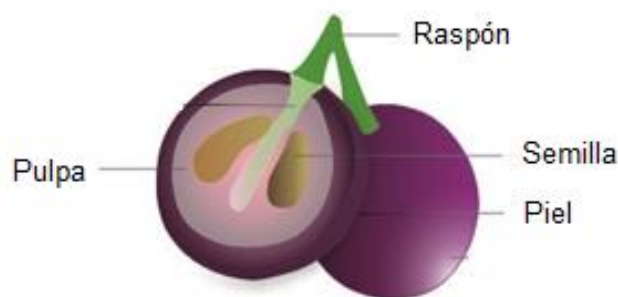
### 2.1.1. *La uva*

La uva pertenece a la familia *vitaceae*, una clasificación de plantas con tendencia a trepar por las superficies fijas. Si bien esta familia posee once géneros diferentes, solo el género *Vitis* es reconocido como fruta vitivinícola (Fernández, 2017).

De acuerdo a la Figura 1, la uva presenta pigmentos, azúcares, proteínas e inclusive levaduras nativas para la elaboración del pisco, donde cada grano de uva se compone básicamente de tres elementos tales como el epicarpio, mesocarpio y endocarpio (Kennedy, 2008)

#### **Figura 1**

*Partes de la uva.*



*Nota:* Oliver (2010)

La piel (Epicarpio u hollejo): Capa exterior del grano o baya de uva que contiene la mayor parte de los componentes colorantes y aromáticos de los vinos. El hollejo aporta también una gran cantidad de taninos, además de otras sustancias como ácidos, celulosa, sustancias aromáticas, pigmentos, entre otras. Otra de las sustancias esenciales contenidas en la piel es la pruina, que resulta fundamental para la elaboración del vino, pues contiene las levaduras que iniciarán la fermentación espontánea del mosto.

La pulpa (Mesocarpio): Formado por grandes células ricas en mosto, es ahí donde se encuentran los principales componentes del mosto (agua y azúcares) que después, mediante

la fermentación, se transformarán en vino, contiene también muchos otros componentes como distintos minerales, azúcares y ácidos (málico y tartárico).

Las pepitas o semillas (Endocarpio): El endocarpio del fruto contiene las semillas, originadas por la fecundación de los óvulos, como máximo hay 4, se encuentran dentro de la pulpa y difieren según las variedades.

### 2.1.2. Uvas pisqueras

En la Tabla 1 vemos que en Perú existen siete variedades de uva destinadas para el procesamiento del pisco, tales como Quebranta, Negra criolla, Albilla, Italia, Torontel, Moscatel Rosado, Mollar y Uvina (A. Garrido et al., 2008). Se estima que la producción de uva alcanzó 152 mil 419 toneladas y se incrementó en 27,6 % con relación a la producción de año 2022 (119 mil 477 toneladas). Este aumento fue impulsado por la anticipación en la cosecha de uvas destinadas al mercado externo y la agroindustria (INEI, 2023).

**Tabla 1**

*Tendencia de la producción de uva año 2022-2023*

| <b>Departamento</b> | <b>Producción 2023<br/>(toneladas)</b> | <b>Producción 2022<br/>(toneladas)</b> | <b>Incremento<br/>(%)</b> |
|---------------------|--|--|---------------------------|
| Ica                 | 68,378                                 | 12,398                                 | 448,1                     |
| La Libertad         | 25,82                                  | 17,263                                 | 49,7                      |
| Áncash              | 12,935                                 | 6,333                                  | 104,1                     |
| Arequipa            | 9,629                                  | 8,245                                  | 16,7                      |
| Cajamarca           | 7,637                                  | 7,223                                  | 5,7                       |
| Lambayeque          | 18,458                                 | 24,333                                 | -24,1                     |
| San Martín          | 3,775                                  | 4,21                                   | -10,4                     |
| Piura               | 2,169                                  | 2,385                                  | -8,9                      |
| <b>Total</b>        | <b>152,419</b>                         | <b>119,477</b>                         | <b>27,6</b>               |

*Nota:* Los datos fueron recolectados por el INEI, el valor negativo significa que hubo una disminución en la producción de uva del año 2022-2023. (INEI, 2023)

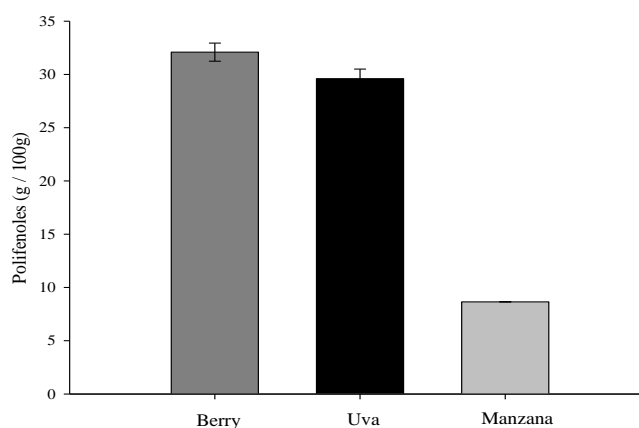
### 2.1.3. Orujo de uva

Perú produce ~50 millones de litros de vino tinto por año a partir de variedades de uva tinta como Cabernet y Merlot, que son las principales variedades de uva utilizadas en la elaboración del vino. Moquegua representa el 15 % de la producción vitivinícola nacional, generando alrededor de 30 000 TM/año de orujo de uva (MINAGRI, 2018). El orujo de uva, que constituye alrededor de un ~25 % del peso fresco de la uva y consiste principalmente en restos de piel y semillas, tiene un valor económico bajo y plantea desafíos de gestión ambiental (Yu & Ahmedna, 2013).

Estudios recientes han revelado que el orujo de uva procedente del proceso de vinificación todavía contiene aproximadamente 60 mg EAG/g de polifenoles, incluidas antocianinas, flavonoles y proantocianidinas (Balík et al., 2008; Garrido & Borges, 2013; Vergara-Salinas et al., 2013). En comparación con otros residuos agroindustriales, el orujo de uva puede considerarse una fuente valiosa de polifenoles, lo que lo convierte en una nueva fuente potencial de ingresos para las familias involucradas en la producción de uva en esta región (Figura 2).

**Figura 2**

*Contenido de polifenoles en residuos agroindustriales*



*Nota:* Huamán-Castilla et al. (2017)

#### 2.1.4. Polifenoles presentes en el orujo de uva

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, con diversas funciones fisiológicas y variadas estructuras químicas que caracterizan a este grupo de moléculas presentes en el orujo de uva (Cutrim y Cortez, 2018). Estos compuestos presentan un anillo fenólico, el cual siempre debe estar hidroxilado (Nils Leander Huamán-Castilla et al., 2017). El contenido medio de polifenoles totales presentes en piel y semillas de la uva varía de  $1,1 \pm 0,2$  y  $16,6 \pm 2,8$  mg EAG/g respectivamente (de la Cerda-Carrasco et al., 2014). Estos residuos presentan diferentes familias de polifenoles específicos, que se pueden clasificar en no flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y flavonoides (flavonoles, antocianinas) (Onache et al., 2022; Peixoto et al., 2018). Las concentraciones de los polifenoles específicos pueden presentar diferencias, dependiendo de algunos factores como las diferencias entre variedades (Tabla 2) (Fontana et al., 2017).

**Tabla 2**

*Perfil Polifenólico de algunas variedades de orujo de uva (mg/100 gss)*

| <b>Compuesto Polifenólico</b> | <b>Moscatel</b> | <b>Negra criolla</b> | <b>Italia</b> | <b>Merlot</b> |
|-------------------------------|-----------------|----------------------|---------------|---------------|
| Ácido gálico                  | 10,71           | 11,12                | 9,25          | 14,07         |
| Ácido                         | 0,13            | 0,05                 | 0,08          | 0,05          |
| Ácido                         | 0,22            | 0,24                 | 0,15          | 0,35          |
| Ácido                         | 0,69            | 0,73                 | 1,02          | 0,37          |
| Catequina                     | 185,68          | 142,80               | 126,60        | 79,24         |
| Epicatequina                  | 142,45          | 123,85               | 76,24         | 85,87         |
| Rutina                        | 0,16            | 0,32                 | 0,14          | 0,08          |
| Quercetina                    | 355,12          | 672,34               | 992,34        | 1208,23       |

|             |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|
| Kaempferol  | 0,29 | 0,54 | 0,21 | 0,99 |
| Resveratrol | 0,35 | 0,58 | 0,35 | 0,31 |

*Nota:* Adaptado de Onache et al. (2022), Peixoto et al. (2018)

#### **2.1.4.1. Polifenoles presentes en semillas de orujo de uva**

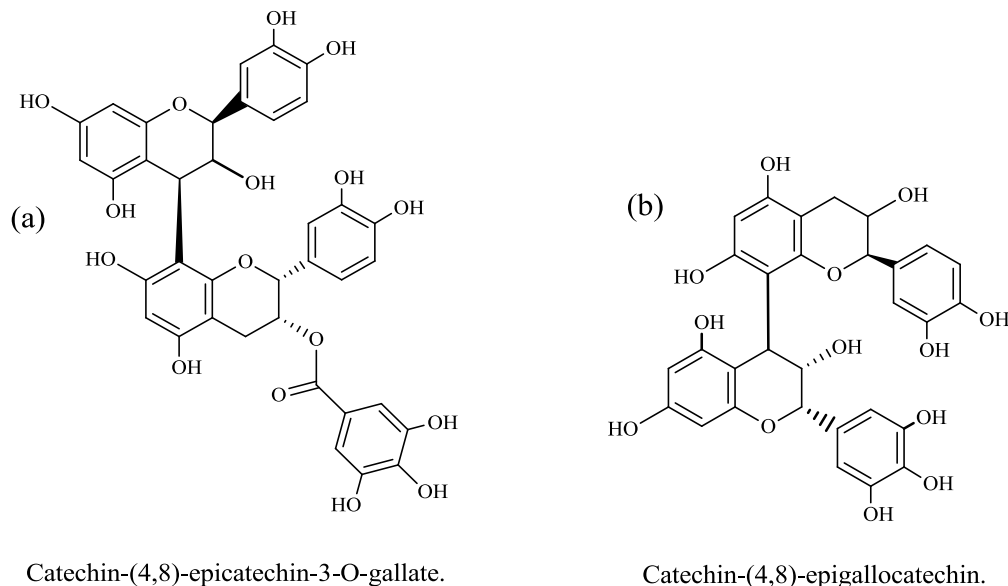
Las semillas de orujo de uva contienen concentraciones significativas de flavanoles (proantocianidinas) y ácidos fenólicos (Obreque-Slier et al., 2010, 2012). En particular, las proantocianidinas o taninos condensados son polifenoles predominantes que se encuentran en las semillas de uva y consisten en monómeros como catequina, epicatequina, epigallocatequina y epicatequina galato, los cuales están unidos entre sí por enlaces C4-C8 o C4-C6 para formar estructuras complejas con pesos moleculares variables (K. Fernández et al., 2007; Khanbabaee & Ree, 2001). Estas proantocianidinas pueden exhibir un alto grado de polimerización (DPM: 11), según (Souquet et al., 1996) y a menudo se esterifican con ácido gálico (~13,8 %) como unidad terminal (Figura 3a) (K. Fernández et al., 2007; Gawel et al., 2001).

#### **2.1.4.2. Polifenoles presentes en piel de orujo de uva**

La piel de uva contiene concentraciones significativas de antocianinas, flavonoles y flavanoles (proantocianidinas o prodelphinidinas) (Obreque-Slier et al., 2010, 2012). A diferencia de las semillas, las proantocianidinas de la piel exhiben una baja proporción de esterificación con ácido gálico (~1,9 %) y se componen principalmente de polímeros que consisten en unidades de epigallocatequina y catequina (Figura 3b) (Bandyopadhyay et al., 2012; Gibbins & Carpenter, 2013; Vidal et al., 2003).

### Figura 3

*Estructuras químicas de proantocianidinas de orujo de uva*



*Nota:* La figura (a) representa la proantocianidina de semilla (K. Fernández et al., 2007; Gawel et al., 2001). La figura (b) representa la proantocianidina de la piel (Bandyopadhyay et al., 2012; Gibbins & Carpenter, 2013; Vidal et al., 2003).

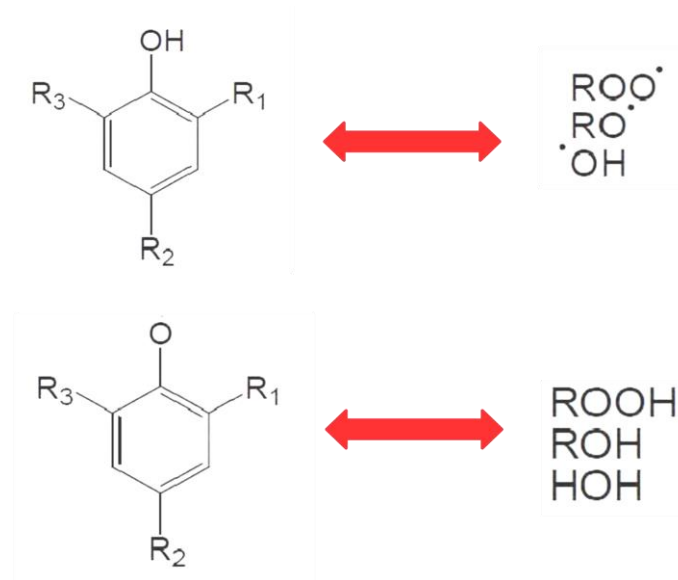
#### 2.1.5. Capacidad antioxidante de los polifenoles

El orujo de uva presenta un remanente entre 50 y 70 % de polifenoles. Estos compuestos han sido asociados con importantes propiedades bioactivas tales como efectos antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, cardioprotectores y vasodilatadores (Onache et al., 2022).

Estos compuestos generalmente son no polares y pueden ser extraídos con solventes de polaridad intermedia como el etanol, metanol y hexano (Valencia et al., 2016). Los extractos obtenidos han demostrado tener una potente actividad antioxidante *in vitro*, debido a capacidad de reducir radicales biológicos tales como anión superóxido, radical hidroxilo, radicales peróxidos (Abbas et al., 2017).

**Figura 4**

*Capacidad de reducción de radicales libres por parte de los polifenoles*



*Nota.* Tsao (2010)

En la Figura 4, podemos observar lo siguiente: ROO: Radical piróxilo, RO: Radical alquilo, OH: Radical hidroxilo, ROOH: Radical Hidroperóxido orgánico, ROH: Alcohol, HOH: Agua; son radicales biológicos generados en el sistema biológico.

Esta habilidad de los polifenoles para neutralizar los radicales libres se debe a su capacidad para donar un electrón o un átomo de hidrógeno (Arranz et al., 2010). El sistema altamente conjugado de los polifenoles con grupos hidroxilo se consideran importantes en las actividades antioxidantes, los cuales actúan como captadores de radicales directos y convirtiéndose ellos mismos en radicales estables, deteniendo así las reacciones de oxidación en nuestro sistema biológico (Figura 4) (Tsao, 2010).

### ***2.1.6. Propiedades bioactivas y tecnológicas de los Polifenoles presentes en piel y semilla de orujo de uva***

Los estudios han demostrado que las proantocianidinas que se encuentran en el orujo de uva, particularmente en la piel y las semillas, pueden exhibir una actividad antioxidante significativa in vivo, particularmente cuando sus características químicas son favorables. De hecho, se ha encontrado que las proantocianidinas son más efectivas que la vitamina E para reducir el daño oxidativo en los tejidos al reducir la oxidación de lípidos o bloquear la producción de radicales libres (Nassiri-Asl & Hosseinzadeh, 2009). Estos compuestos también se han asociado con la promoción de la regeneración ósea y la inhibición del cáncer tanto en ensayos in vitro como in vivo (Ko et al., 2011).

Es importante señalar que las proantocianidinas son las responsables de las características astringentes de los vinos tintos (Vidal et al., 2003). Por lo tanto, la extracción de polifenoles del orujo de uva presenta una oportunidad económicamente atractiva para obtener extractos ricos en estos compuestos beneficiosos. Dadas sus propiedades nutracéuticas y enológicas únicas, la extracción de polifenoles de este residuo agroindustrial podría resultar una fuente valiosa y sostenible de estos compuestos.

### ***2.1.7. Extracción de Polifenoles***

En general, los polifenoles se encuentran en las vacuolas celulares, las cuales están protegidas por paredes de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Braidot et al., 2011). En ese sentido, el método de extracción empleado para su recuperación debe romper estas paredes para liberar estos compuestos (Gao et al., 2019). A la fecha diferentes métodos de extracción han sido desarrollados, los cuales se pueden clasificar en métodos convencionales o extracciones atmosféricas cuyas temperaturas no superan el umbral de los 80 °C y los métodos alternativos que operan a diferentes temperaturas y presiones relativas subcríticas y supercríticas (Ameer et al., 2017). No obstante, la extracción de estos compuestos fenólicos también es influenciada por su naturaleza química, tamaño de partícula, tiempo de almacenamiento y sustancias interferentes, tales como carbohidratos, azúcares, proteínas,

entre otros (Naczk & Shahidi, 2004). Por ello, la correcta elección del método de extracción no solo debe considerar los rendimientos en la recuperación de polifenoles, sino también la reutilización de los solventes orgánicos, la inocuidad del extracto y el impacto ambiental con la finalidad de desarrollar procesos sustentables (Huamán-Castilla et al., 2019).

Los métodos de extracción se caracterizan principalmente por la aplicación de diferentes parámetros de proceso tales como tipo de solvente, mezcla binaria de solvente, temperatura, tamaño de partícula de materia, tiempo de operación y la tecnología utilizada (Cuevas-Valenzuela et al., 2016). La Tabla 3 muestra los principales métodos de extracción:

**Tabla 3**

*Métodos de extracción de polifenoles*

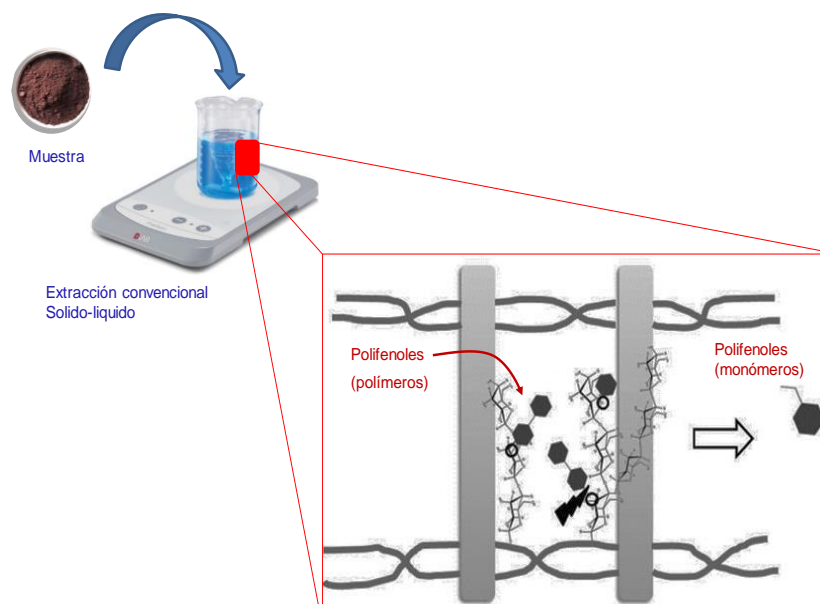
| <b>Método de extracción</b> | <b>Técnica</b>                            | <b>Principio de extracción</b>  |
|-----------------------------|---|---|
| Convencional                | Extracción por solvente (SE)              | Los compuestos se separan en función de sus solubilidades (líquidos inmiscibles)  |
| No convencional             | Extracción asistida por ultrasonido (EAU) | Las ondas sonoras de alta frecuencia que mejoran la liberación de un soluto del sólido por cavitación.  |
|                             | Extracción por líquido presurizados (ELP) | Se utilizan altas presiones para mantener el solvente en estado líquido y pueda ser utilizadas elevadas temperaturas manteniendo el solvente en estado líquido. |
|                             | Extracción asistida por microondas (MAE)  | Aumenta el movimiento molecular y la energía transferencia por radiación electromagnética   |
|                             | Extracción de fluidos supercríticos (SFE) | Mejor solubilidad y transferencia de masa debido a que el solvente se encuentra por encima del punto crítico.   |
|                             | Extracción asistida por enzimas           | Las enzimas ayudan a liberar intracelulares polifenoles y polifenoles liberadores unidos a otras moléculas  |

*Nota:* Cuevas-Valenzuela et al (2016)

### **2.1.7.1.Extracción convencional**

La extracción sólido-líquido es un proceso de transferencia de masa, mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Dicho mecanismo tiene lugar en dos etapas: una primera de lavado, en la que se produce una rápida transferencia de los monómeros de polifenoles desde la superficie del sólido al disolvente, y una segunda etapa de transferencia de materia desde el interior del sólido donde los polifenoles de alto peso molecular mediante difusión al solvente, en la mayoría de sistemas de extracción de la industria alimentaria, se asume que la segunda etapa es el paso limitante del proceso, debido a la resistencia natural que ofrece la fase sólida (a menudo tejidos de origen vegetal) a la transferencia de materia y/o penetración del solvente (Figura 5) (Cacace y Mazza, 2003).

La extracción convencional es el proceso menos eficiente y requiere una mayor demanda energética y un mayor consumo de solvente, limitando su uso a nivel industrial, además, este tipo de proceso hace uso de solventes tóxicos tales como metanol, hexano y acetona (Ameer et al., 2017).

**Figura 5***Mecanismo de extracción convencional de polifenoles*

Nota: (Cacace y Mazza, 2003)

**2.1.7.2. Tecnologías alternativas de extracción (Green Technologies)**

Ultrasonido: El uso de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) con mezclas de agua – cosolvente es una alternativa segura y de bajo costo ampliamente utilizada para la extracción de polifenoles a partir de residuos de origen vegetal (F. Li et al., 2017; Zuin & Ramin, 2018). El mecanismo de extracción implica la formación de burbujas de cavitación, las cuales colapsan cerca de las paredes celulares del tejido vegetal, esto favorece una mejor difusión del solvente en la matriz celular, mejorando la velocidad de transferencia de masa e incrementando la solubilidad de los polifenoles (Medina-Torres et al., 2017). Si bien la EAU aumenta significativamente el rendimiento de extracción en comparación con la extracción convencional, el tipo de solvente, la intensidad de la onda sonora, el tiempo de exposición a la frecuencia del sonido, la temperatura del proceso y la granulometría del producto son variables que afectan este proceso en la recuperación de polifenoles totales y polifenoles

específicos (de Souza et al., 2018; Zuin & Ramin, 2018). Por ejemplo, un cambio de temperatura (20 – 60 °C) y etanol (70 – 90 %) combinado con 40 kHz y 30 min de tiempo de extracción incrementa la recuperación de polifenoles totales en ~35 % de hojas de olivo (Arteaga-Crespo et al., 2020). Por lo tanto, variables como la polaridad solvente y temperatura son parámetros decisivos para una selectiva recuperación de polifenoles específicos a través de la EAU.

Si bien la EAU es una tecnología limpia que usa cortos tiempos de proceso y relativos pequeños volúmenes de solvente, no es un método selectivo, debido a que su proceso no solo permite recuperar polifenoles, sino también extrae compuestos no deseados tales como azúcares, carbohidratos, proteínas entre otros (de Souza et al., 2018; Medina-Torres et al., 2017). Por ello, es necesaria la integración de tecnologías de purificación que permitan obtener extractos polifenólicos inocuos libres de compuestos no deseados.

Extracción líquida presurizada (ELP): Es una tecnología alternativa de grado alimentario y amigable con el medio ambiente que permite reducir los tiempos de extracción y los volúmenes de solventes, así como mejorar el rendimiento de extracción de los polifenoles hasta en un 200 % en comparación con la extracción convencional (Ameer et al., 2017; Plaza & Turner, 2015a). Las altas presiones (~10 MPa) mantienen el solvente en estado líquido, reduciendo significativamente su polaridad, favoreciendo su difusión en la matriz vegetal, mejorando la extractabilidad de los polifenoles (Plaza & Turner, 2015a). No obstante, la ELP es influenciada por las características del solvente, la temperatura de extracción y la estructura química de polifenoles (Huamán-Castilla, et al., 2019).

Si bien el uso de agua pura en la ELP ha sido ampliamente estudiado en la recuperación de polifenoles, el uso de temperaturas extremas ( $\geq 120$  °C) afectan significativamente la composición química de los extractos debido a la hidrólisis del polifenol y la formación de compuestos tóxicos (compuestos de Maillard como hydroxymethylfurfural, HMF) (Mariotti-Celis et al., 2018; Vergara-Salinas et al., 2013). Por ello, el uso de pequeñas concentraciones de etanol hasta un 15 % permite no solo reducir la

polaridad del solvente mejorando significativamente la recuperación de polifenoles, sino también reducen la recuperación de azúcares y la formación de HMF (Gui et al., 2016; Marcus, 2018; Monrad et al., 2010; Otero-Pareja et al., 2015; Tangkhavanich et al., 2014; Wijngaard & Brunton, 2009). Esto permitiría mejorar las estrategias de operación para un futuro escalamiento a nivel industrial, considerando el relevante rol de la composición del solvente en este tipo de procesos.

Además, al igual que la extracción convencional y ultrasonidos la ELP es un proceso no selectivo que permite no solo la recuperación de polifenoles, sino también permite recuperar compuestos no deseados como azúcares, carbohidratos, proteínas entre otros, lo que complica el manejo de los extractos en operaciones posteriores (ej., atomización) y la formulación de alimentos funcionales y nutraceuticos. Por ello, los procesos de extracción deben ser combinados con una subsiguiente etapa de purificación que permita eliminar y/o reducir la presencia de compuestos no deseados.

#### ***2.1.8. Impacto de la ELP sobre otras tecnologías en la recuperación de polifenoles***

La combinación de tiempo y temperatura en el proceso ELP permite mejorar los rendimientos de extracción de polifenoles en comparación con procesos tradicionales a condiciones atmosféricas y alternativos como el ultrasonido. Por ejemplo, Mariotti-Celis et al. (2018) encontraron que el uso de etanol (15 %) a 90 °C bajo condiciones subcríticas (1,01 MPa) permite recuperar 35 % más contenido de polifenoles de orujo de uva en comparación con el uso de acetona (60 %) a 30 °C por un periodo de 2h bajo condiciones atmosféricas. Comportamiento similar fue reportado por Ko et al. (2011), quienes observaron en residuos de cebolla, que el uso de agua pura a 165 °C recuperó 8 veces más contenido de polifenoles en comparación con un proceso convencional (metanol: 15 %, 60 °C, 2h). Interesantemente, bajo condiciones subcríticas, el uso de 50 % de etanol fue 2 veces más eficiente que el uso de agua pura en la recuperación de polifenoles presentes en los residuos de té (Rajapaksha & Shimizu, 2022).

Si bien algunos trabajos reportan ventajas de la ELP sobre la extracción asistida por ultrasonido o viceversa, ambas tecnologías hacen uso de solventes amigables con el medio ambiente y han mostrado buenos rendimientos en la recuperación de polifenoles (Ameer et al., 2017; Carr et al., 2011).

Sin embargo, la correcta elección de un determinado sistema de extracción debe ser analizada desde un punto de vista de costos de producción. Por ello, Santos, Veggi and Meireles (2010, 2012) demostraron que el uso de cortos tiempos de proceso y bajos volúmenes de solvente en la ELP permite reducir en 9, 7 y 6 veces los costos de proceso en comparación con la extracción Soxhlet, ultrasonido y convencional (Tabla 4).

**Tabla 4**

*Análisis de los costes de fabricación (CF) para la obtención de extractos polifenólicos utilizando mezcla agua – etanol (30 %).*

| <b>Técnica</b> | <b>Condiciones de proceso</b> | <b>Capacidad del Extractor (m<sup>3</sup>)</b> | <b>Costos de fenoles totales (US\$/g)</b> |
|----------------|-------------------------------|--|---|
| Convencional   | 30 °C – 2h                    | 0,05   | 3,80                                      |
|                |                               | 0,10   | 2,50                                      |
|                |                               | 0,30   | 1,58                                      |
| Soxhlet        | 30 °C – 8h                    | 0,05   | 9,23                                      |
|                |                               | 0,10   | 5,50                                      |
|                |                               | 0,30   | 2,38                                      |
| Ultrasonido    | 30 °C – 2h                    | 0,05   | 3,70                                      |
|                |                               | 0,10   | 2,46                                      |
|                |                               | 0,30   | 1,86                                      |
| ELP            | 120 °C – 0,15h                | 0,05   | 0,32                                      |
|                |                               | 0,10   | 0,29                                      |
|                |                               | 0,30   | 0,26                                      |

Nota: Santos et al. (2012)

### ***2.1.9. Purificación de extractos polifenólicos***

Si bien, los extractos ricos en polifenoles presentan propiedades específicas para la salud relacionadas con el estrés oxidativo (Cory et al., 2018; Nils Leander Huamán-Castilla et al., 2017), durante ELP y EAU, otros compuestos presentes de forma natural en las matrices vegetales tales azúcares reductores también pueden extraerse (de Souza et al., 2018; María Salomé Mariotti-Celis et al., 2018a; Medina-Torres et al., 2017). En consecuencia, se deben aplicar otros procesos de purificación con la finalidad de eliminar y/o reducir la presencia de estos compuestos no deseados. El método de adsorción/desorción en columnas empacadas con resinas macroporosas no iónicas es uno de los más utilizados para la separación y purificación de polifenoles a partir de productos naturales, debido a su fácil operación, alta eficiencia, bajo costo, amigable con el medio ambiente, fácil escalamiento y regeneración (Ahtiok et al., 2008; Jampani et al., 2014; H. Li et al., 2017). Durante la etapa de adsorción, los polifenoles se retienen en la columna empacada de acuerdo con su afinidad con las resinas macroporosas. Luego, después de una etapa de lavado con agua; los polifenoles son desorbidos y/o recuperados normalmente utilizando soluciones hidroalcohólicas (María Salomé Mariotti-Celis et al., 2018a). Por lo tanto, el rol de la composición del solvente debería ser estudiado en el proceso simultáneo de extracción y purificación, con la finalidad de establecer parámetros óptimos en la recuperación selectiva de polifenoles específicos presentes en el orujo de uva, esto permitirá no solo revalorizar este residuo agroindustrial, sino también abrirá un nuevo enfoque a futuro para un posterior diseño de prototipos a nivel industrial.

En investigaciones previas en orujo de uva, el uso de una solución de etanol mayor al 30 % en extracción (ELP) reduce significativamente la adsorción de polifenoles totales en la subsiguiente etapa de purificación, afectando su recuperación global; sin embargo, algunos polifenoles específicos como los flavonoles aumentaron su rendimiento global (Nils Leander Huamán-Castilla, Martínez, et al., 2019; María Salomé Mariotti-Celis et al., 2018a). Por lo tanto, el rol de la polaridad del solvente debería ser estudiado en el proceso simultáneo de extracción y purificación, con la finalidad de establecer parámetros óptimos en la

recuperación selectiva de polifenoles específicos de las hojas de olivo, esto permitirá no solo revalorizar este residuo agroindustrial, sino también abrirá un nuevo enfoque para su escalamiento a nivel industrial.

### **2.1.9.1. Proceso de adsorción dinámica**

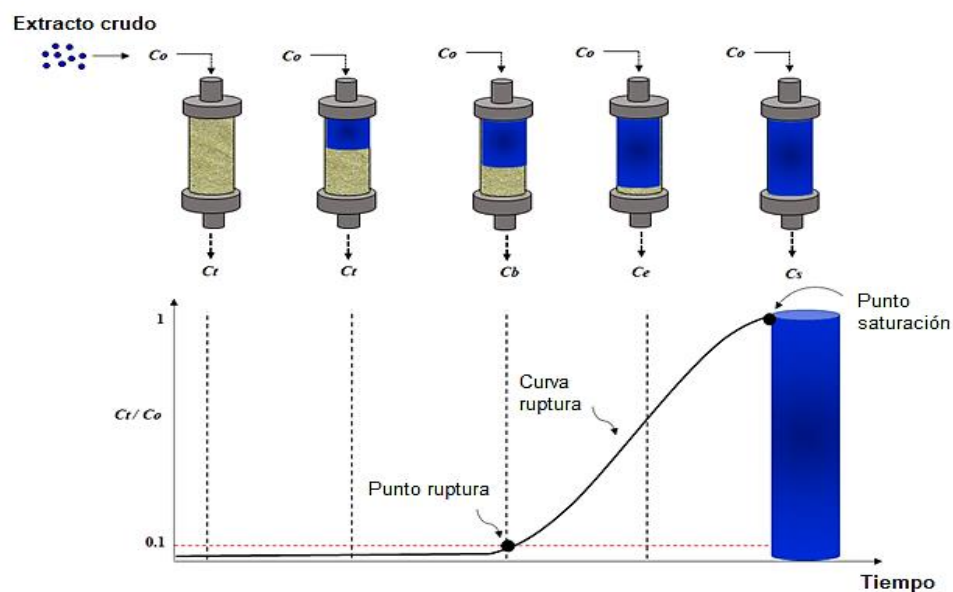
Las resinas no polares presentan la misma estructura química (poliestireno divinilbenceno: PVB), que pueden pre-acondicionarse siguiendo el procedimiento estándar proporcionado por el fabricante antes de la prueba a escala de laboratorio.

La resina se empaqueta dentro de una columna de vidrio para las pruebas de adsorción y desorción. Luego, una solución de extracto crudo rica en polifenoles se pasa a través de una columna empacada a diferentes velocidades de flujo (0,1 - 5 mL/min) y temperaturas (20 – 40 °C) para recolectar diferentes fracciones de la corriente de salida a diferentes intervalos de tiempo (min).

Las curvas de adsorción se obtienen representando la concentración  $C_t/C_0$  frente al tiempo, donde  $C_t$  y  $C_0$  son la concentración de adsorbato de entrada y salida, respectivamente. El punto de ruptura ( $t_b$ ) se determina cuando la concentración de adsorbato alcanza ~10 % de  $C_0$ , el tiempo de saturación ( $t_e$ ), se estima cuando la concentración de adsorbato alcanza ~95 % de  $C_0$ . Finalmente, la capacidad de adsorción se calcula a partir de la siguiente ecuación (Arsuaga et al., 2014) (Figura 6).

$$q = \frac{QC_0}{W} \int_{t=0}^{t=t_e} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt$$

Donde,  $q$  es la capacidad de adsorción (mg/g),  $Q$  es el caudal (mL/min),  $C_0$  es la concentración inicial de polifenoles,  $t_e$  es el tiempo de saturación (min),  $C$  es la concentración de polifenoles al tiempo de saturación ( $t_e$ ).

**Figura 6***Adsorción dinámica de polifenoles*

Nota: (Arsuaga et al., 2014)

Para determinar la capacidad de desorción, los polifenoles adsorbidos por la resina deben ser recuperados mediante un proceso de desorción. Para tal fin, etanol (80 %) es utilizado como eluyente (entre 60 – 80 %) a un caudal entre 1 - 5 mL/min. Diferentes fracciones de la corriente de salida a diferentes intervalos de tiempo (min) serán recogidas con la finalidad de establecer la cinética de desorción y la capacidad de desorción dinámica.

### **2.1.10. Rol de la polaridad del solvente**

Los polifenoles son moléculas que presentan anillos aromáticos (fracción no polar) y uno o más grupos hidroxilo (fracción polar) en su estructura química (Vijayalaxmi et al., 2015). Estas características químicas y las características del solvente explican la solubilidad de los polifenoles durante el proceso de extracción (Cheigh et al., 2015). Aunque la polaridad generalmente es expresada en términos de su constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), este parámetro no considera las interacciones intermoleculares entre el soluto y el solvente. Por lo tanto, una definición correcta de la polaridad del solvente debe incluir todas las posibles interacciones

intermoleculares entre las moléculas de soluto y las moléculas de solvente (Katritzky et al., 2004; Reichardt, 1994).

Los parámetros solvatocrómicos de Kamlet-Taft permiten comprender la afinidad del solvente por un compuesto específico y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con este compuesto, que se expresan como polaridad/polarizabilidad ( $\pi^*$ ) y acidez ( $\alpha$ ) respectivamente (Jessop, 2011). La Tabla 5, muestra que el agua pura, el etanol y glicerol son reconocidos como solventes próticos debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura química (Jessop et al., 2012). Tal es así que, bajo condiciones atmosféricas a 30°C, el agua presenta una polaridad más alta ( $\pi^*$ : 1,14) que el etanol ( $\pi^*$ : 0,71) y glicerol ( $\pi^*$ : 0,51). No obstante, la capacidad del glicerol para formar enlaces hidrógeno ( $\alpha$ : 1,21) es relativamente mayor en comparación con el agua ( $\alpha$ : 1,07) y etanol ( $\alpha$ : 0,98) (Jessop et al., 2012). Por ello, algunos polifenoles son altamente solubles en mezclas de agua - glicerol y agua – etanol debido a la capacidad del etanol y glicerol para modular la polaridad del solvente y formar un alto número de interacciones intermoleculares con los grupos funcionales de polifenoles (Galanakis et al., 2013; Huamán-Castilla, Mariotti-Celis, Martínez-Cifuentes, et al., 2020). Por lo tanto, la optimización del proceso integrado de extracción y purificación de los polifenoles presentes en las hojas de olivo requiere estudios específicos complementarios que consideren la estructura química del polifenol y el relevante rol del solvente de extracción.

**Tabla 5***Polaridad de algunos solventes usados en extracción*

| <b>Solvente</b> | <b><math>\alpha</math></b> | <b><math>\beta</math></b> | <b><math>\pi^*</math></b> |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Agua</b>     | 1,17                       | 0,14                      | 1,09                      |
| <b>Etanol</b>   | 0,83                       | 0,75                      | 0,51                      |
| <b>Glicerol</b> | 1,21                       | 0,51                      | 0,62                      |
| <b>Metanol</b>  | 0,93                       | 0,66                      | 0,58                      |

*Nota:* Jessop et al. (2012) -  $\alpha$ : es el parámetro de acidez,  $\beta$ : es el parámetro de basicidad y  $\pi^*$ : es el parámetro de polaridad/polarizabilidad.

## 2.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

**Semilla:** Las semillas de uva son un subproducto de desperdicio obtenido después de la elaboración de vino o jugo y presentan una buena fuente de compuestos funcionales, como polifenoles. La extracción es un paso muy importante para el uso posterior de componentes fenólicos. El efecto de diferentes temperaturas y sólidos. Las semillas están formadas por dos capas envolventes, a modo de corteza, y por un contenido llamado albumen, donde en su interior y en la parte angosta de la semilla, se encuentra el germen o embrión de la nueva planta. Las capas exteriores se conocen como testa y tegmen, que son leñosas y duras, además de ser ricas en taninos. El albumen, donde descansa el embrión, contiene aceite, llamado aceite de semilla de uva, el cual se puede extraer de distintas maneras. El aceite bruto de estas semillas se enrancia muy rápido al contacto con el aire y, si entra en la producción de vino y piscos, les agregaría un olor y sabor desagradables (Ramos, 2015).

**Polifenoles:** Los polifenoles son compuestos bioactivos presentes de forma natural en frutas y verduras, que se caracterizan por su gran capacidad antioxidante. De hecho, se ha demostrado que una ingesta promedio de 1 g / día de polifenoles es 10 veces mejor que el consumo de vitamina C y 100 veces mejor que la vitamina E y los carotenoides para proteger los tejidos del cuerpo contra los agentes de estrés oxidativo (Scalbert & Williamson, 2000).

Desde un punto de vista químico, estos compuestos se pueden clasificar en dos grupos principales: flavonoides (flavonoles, antocianinas y flavonoides) y no flavonoides (estilbenos y ácidos fenólicos) (J. Garrido & Borges, 2013). Estos últimos se caracterizan por una estructura de un solo anillo de 6 átomos de carbono, mientras que los flavonoides tienen dos anillos de 6 átomos de carbono.

**Extracción Líquida Presurizada (ELP):** Es una tecnología alternativa de grado alimentario y amigable con el medio ambiente que permite reducir los tiempos de extracción y los volúmenes de solventes, así como mejorar el rendimiento de extracción de los polifenoles hasta en un 200 % en comparación con la extracción convencional (Plaza et al., 2010b, 2010a, 2013; Plaza & Turner, 2015b). Las altas presiones (~10 MPa) mantienen el solvente en estado líquido, reduciendo significativamente su polaridad, favoreciendo su difusión en la matriz vegetal, mejorando la extractabilidad de los polifenoles (Plaza & Turner, 2015b).

**Temperatura:** La temperatura es el parámetro más importante que influye en la cinética de la transferencia de masa desde la matriz de muestra al solvente líquido en la extracción por líquidos presurizados y, por lo tanto, es crucial para tener éxito en el proceso de lixiviación. En ciertos casos, el aumento de la temperatura puede promover la formación de efectos adversos, como la degradación de los compuestos termolábiles o la mejora de las reacciones secundarias que podrían influir en otros pasos del proceso analítico y / o la calidad del producto final. Vergara-Salinas et al. (2013)

**Compuestos Fenólicos:** Metabolitos secundarios producidos por las plantas, con diversas funciones fisiológicas, y se caracteriza por tener uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos directamente a un anillo aromático. Estos compuestos son conocidos por sus propiedades antioxidantes (Cutrim y Cortez, 2018).

**Desecho de la Producción de Vino:** Los desechos de la producción de vino son subproductos generados durante el proceso de vinificación, que incluye al orujo de uva. El cual contiene altas concentraciones de compuestos bioactivos como polifenoles, y puede ser

aprovechado en la industria alimentaria y farmacéutica. La gestión adecuada de estos residuos no solo reduce el impacto ambiental, sino que también ofrece oportunidades económicas al convertirlos en recursos valiosos, Vergara-Salinas et al. (2013).

**La Concentración de una solución:** La concentración se define como el cociente entre la cantidad de soluto y la cantidad de solvente o entre la cantidad de soluto y la cantidad de solución. La concentración es una variable intensiva, puesto que su valor no se modifica con el tamaño de la muestra (Lamarque & Damián, 2008).

### 2.3. MARCO FILOSÓFICO

La investigación científica se orienta en cuantificar los extractos fenólicos de la semilla de uva, residuo agroindustrial, pero antes de ello se estudia la extracción de aceite de la semilla debido a que el aceite interfiere en la extracción de compuestos fenólicos. La extracción de compuestos fenólicos con agua subcrítica y convencionales (acetona, metanol, etanol) fue analizada y evaluada bajo las siguientes líneas filosóficas: observacional y experimental. Según expertos y defensores del modelo positivista, la experimentación es el verdadero método o el mejor método de investigación científica, por lo que se enfatiza que la investigación experimental es la investigación verdadera (Muñoz, 2007). El escepticismo o racionalismo crítico del filósofo Karl Raimund Popper también se considera como una tendencia para significar la capacidad de refutar una teoría que es falseada por un hecho. Según Popper, si una teoría no se puede refutar, entonces se puede confirmar a través de la aceptación condicional. Ninguna teoría es completamente verdadera, pero en el mejor de los casos es "irresistible".

Filosofía ambiental, Leff plantea y defiende la idea de que la crisis ambiental es una crisis del conocimiento, y debe quedar claro que las propuestas epistemológicas no persiguen la esencia de lo real, ni una verdad absoluta. Según Leff, el nuevo camino de la epistemología ecológica implica cambiar fronteras, crear y aplicar nuevos conceptos, y articular áreas de conocimiento previamente aisladas. Tal concepto de percibir el entorno en relación con la realidad, y luego como un fragmento del universo de las cosas (realidad), que es fiel al

constructivismo, ya no está en el contexto de la escena del descubrimiento también, sino en un contexto científico creativo (Duval, 2007). La epistemología ambiental es un viaje para descubrir qué es el medio ambiente. El medio ambiente es el dominio de la relación entre naturaleza y cultura, materia y símbolo, complejidad del ser y del pensamiento. En este trayecto se va desplegando un itinerario epistemológico. La epistemología ecológica es la política del conocimiento con el “objetivo” de hacer sostenible la vida; es un conocimiento que combina las condiciones únicas de vida en el planeta, con la aspiración a la vida humana; potencial ecológico y productivo de la negatividad (entropía negativa, desequilibrio transitorio) con creatividad cultural. La epistemología ecológica está dando paso a nuevos conocimientos; conocimiento resultante del signo del límite, la ley limitante de la naturaleza, la ley necesaria de la entropía (Leff, 2006). La epistemología ecológica reconoce la influencia de las formas de conocimiento en la construcción y destrucción de la realidad; representación imaginativa e identidad de concepto y realidad; La preponderancia del conocimiento sobre las relaciones éticas (Leff, 2006) .

NOUVEL (1991), discute el concepto de modelo con relación al de metáfora, destacando la primera visión. En palabras de este autor: Los modelos ya no se crean, al contrario, se construyen y comparan. Los modelos están vinculados a dos procesos: Primero, la abstracción, en la cual encontramos cuáles son los factores más importantes del problema y saber si un elemento es importante, necesitamos ver su impacto relativo en la evolución del sistema. El segundo proceso es la interpretación, tenemos que entender que así es como se pueden relacionar los elementos del modelo (parámetros, variables) y su comportamiento con los componentes, características y comportamientos reales del sistema sin que queramos modelar el proceso de adsorción dinámica de polifenoles.

Los Siglos XVI y XVII, en estos periodos históricos, emergieron aspectos trascendentales para las matemáticas en general, y en particular para el concepto de función cuadrática. Además, una mirada a la actividad científica de esta época, en tanto hallazgos y producciones, estuvieron vinculados a la relación de los científicos con su cosmovisión, dada la importancia de estos eventos, ya que algunos procesos que fueron relevantes para el

desarrollo de los objetos matemáticos, en la actualidad tienen presencia en las matemáticas en la educación; Se necesita una mirada especial a estos procesos porque podría explicar qué impulsó a los científicos a generar este tipo de conocimiento. Al respecto, algunos historiadores de la ciencia, en particular de las matemáticas, entre ellos, (Kline, 1972) afirma que Matemáticos y científicos se inspiraron en las supersticiones de la teología de la Edad Media, que inspiró la visión de que todos los fenómenos de la naturaleza no solo están relacionados, sino que también están interrelacionados. Siguen un plan común: cada acto de la naturaleza sigue un plan establecido por una razón.

Reconociendo que dicha causa primera es Dios como creador del Universo, es así como la afirmación de Galileo Galilei en palabras de (Kline, 1972) dice:

La filosofía [natural] está escrita en este gran libro, que está siempre ante nuestros ojos, me refiero al universo, pero no podemos entender hasta que primero aprendemos el lenguaje y entendemos los símbolos en los que está escrito. El libro está escrito en el lenguaje de las matemáticas y los símbolos son triángulos, círculos y otras figuras geométricas, sin él no serías capaz de entender las palabras en él, sin él estarías vagando en el oscuro laberinto en vano.

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

##### ***3.1.1. Tipo de investigación***

La investigación es analítica, porque se centra en analizar el impacto de un proceso integrado de extracción líquida presurizada y purificación con resinas en la recuperación de polifenoles en orujo de uva. Se descompone y examina cómo diferentes variables (proceso de extracción, purificación con resinas) afectan un resultado específico (recuperación de polifenoles). Este enfoque de descomposición y análisis de relaciones entre variables caracteriza a nuestro estudio como analítico.

La investigación analítica es aquella que busca descomponer un fenómeno o situación en sus componentes para entender mejor cómo funcionan y cómo se relacionan entre sí. Según Hernández, Collado y Lucio (2014), este tipo de investigación implica la identificación de causas, efectos, y mecanismos que subyacen en el objeto de estudio.

##### ***3.1.2. Nivel de investigación.***

La investigación no solo busca entender los procesos de extracción y purificación, sino también mejorar la recuperación de polifenoles, un componente bioactivo, con aplicaciones industriales y de salud. El propósito práctico del estudio es proponer un proceso aplicable a escala industrial que permita optimizar la recuperación de polifenoles purificados ricos en polifenoles con un valor comercial y funcional; lo clasifica como de nivel aplicado.

La investigación aplicada, según Hernández, Fernández y Baptista (2014), tiene como objetivo generar conocimientos que puedan aplicarse en la resolución de problemas específicos. A diferencia de la investigación básica, que busca ampliar el conocimiento

teórico, la investigación aplicada se orienta hacia la práctica y la implementación de soluciones en un contexto particular.

### ***3.1.3. Diseño de la investigación***

En nuestra investigación, se están manipulando variables independientes (como las condiciones del proceso integrado, extracción líquida presurizada y purificación con resinas) para observar su efecto sobre una variable dependiente (la recuperación de polifenoles). El control y la manipulación de estas variables en un entorno controlado es lo que define a nuestro estudio como experimental. Se están probando hipótesis específicas sobre cómo estos procesos afectan la recuperación de polifenoles, lo cual es característico de un diseño experimental.

El diseño experimental, según Kerlinger y Lee (2002), implica la manipulación intencional de una o más variables independientes para observar el efecto que esto produce en una o más variables dependientes. Este tipo de diseño es riguroso y controlado, permitiendo establecer relaciones de causalidad.

## **3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO**

### ***3.2.1. Población***

En el contexto de esta investigación, la población se define como la totalidad del orujo de uva generado a partir del proceso de vinificación industrial de uvas en la región de Moquegua, específicamente de la Bodega Biondi, ubicada en la Provincia de Mariscal Nieto – Moquegua. Esta población se compone de los residuos sólidos obtenidos durante el proceso de vinificación, que incluye principalmente pieles, semillas, y otros subproductos resultantes del prensado de las uvas.

### ***3.2.2. Muestra***

La muestra seleccionada para esta investigación es de aproximadamente 50 kg de orujo de uva, proveniente de la vinificación industrial de uva de la misma bodega mencionada.

Para asegurar la representatividad y la calidad del material, el orujo recolectado será sometido a un proceso de selección manual para separar la piel de la semilla. Ambas fracciones (piel y semilla) serán consideradas como submuestras en el estudio. Estas submuestras serán envasadas en bolsas de polietileno y almacenadas bajo condiciones de congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con el fin de preservar sus propiedades hasta el momento de su análisis y procesamiento en las etapas experimentales del estudio.

La elección de esta muestra está basada en la necesidad de obtener un material homogéneo y representativo de la población de orujo de uva, permitiendo así la generalización de los resultados obtenidos en los análisis de extracción y purificación de polifenoles.

### 3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Operacionalización de variables

| <b>Variable Independiente</b> | <b>Definición Conceptual</b>  | <b>Definición Operacional</b>  | <b>Dimensiones</b>        | <b>Indicadores</b>         | <b>Escala</b>      |
|-------------------------------|---|--|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| Concentración de co-solvente  | Se define como la proporción de co-solvente (como co-solvente etanol) en la mezcla utilizada durante la ELP. (Lamarque & Damián, 2008).                                 | Porcentaje de co-solvente utilizado en la mezcla con el solvente                 | Proporción de co-solvente | Porcentaje de etanol (%)   | Razón (20-60 %)    |
| Concentración de eluyente     | Se define como la cantidad de eluyente usada para desplazar los polifenoles de las resinas durante el proceso de purificación. (Mariotti-Celis, et al. 2018)            | Porcentaje de eluyente utilizado en el proceso de purificación : con resinas. et | Proporción de eluyente    | Porcentaje de eluyente (%) | Razón (80 %)       |
| Temperatura de extracción     | Se define como el parámetro que influye en la cinética de transferencia de masa desde la matriz de muestra al solvente líquido en la ELP, Vergara-Salinas et al. (2013) | Temperatura a la que se realiza el proceso de extracción.                        | Temperatura               | Grados Celsius (°C)        | Razón (100-160 °C) |

| Variable Dependiente   | Definición Conceptual  | Definición Operacional  | Dimensiones            | Indicadores   | Escala                           |
|------------------------|--|---|------------------------|---|----------------------------------|
| Polifenoles totales    | Se definen los polifenoles como compuestos bioactivos presentes de forma natural en frutas y verduras, que se caracterizan por su gran capacidad antioxidante. (Scalbert & Williamson, 2000) | Medida cuantitativa de los polifenoles presentes en el extracto utilizando métodos espectrofotométricos.  | Composición química    | Miligramos de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) | Razón (mg EAG/gss)               |
| Capacidad antioxidante | Se define como la capacidad del extracto para neutralizar radicales libres. (Brand-Williams et al., 1995).   | Medida de la capacidad antioxidante utilizando métodos como DPPH o ORAC.  | Actividad antioxidante | IC50 (concentración necesaria para inhibir 50%)     | Razón ( $\mu\text{mol ET/gss}$ ) |
| Perfil de polifenoles  | Se define como la distribución de diferentes tipos de polifenoles en el extracto. (Prior et al., 2010).  | Análisis cualitativo y cuantitativo de los diferentes tipos de polifenoles presentes en el extracto mediante cromatografía líquida de interacción (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia. | Composición química    | Área bajo la curva (HPLC)                           | Razón ( $\mu\text{g/gss}$ )      |
| Azúcares reductores    | Se define como azúcares presentes en el extracto que pueden reducir otras sustancias. Varela et al.(2003).   | Medida de los azúcares reductores presentes en el extracto utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a un detector de índice de refracción.                             | Composición química    | Miligramos por gramo de orujo seco (mg)             | Razón (mg/gss de muestra)        |

*Nota:* Elaboración propia, EAG Equivalencia de ácido gálico, gss Gramo de orujo seco, ET Equivalencia de Trolox.

### 3.4. ACCIONES Y ACTIVIDADES PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

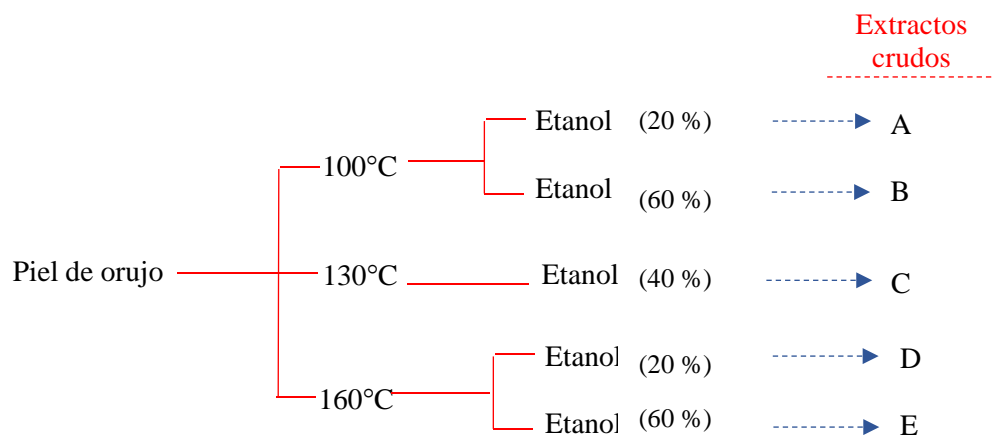
#### a) *Extracción líquida presurizada (ELP):*

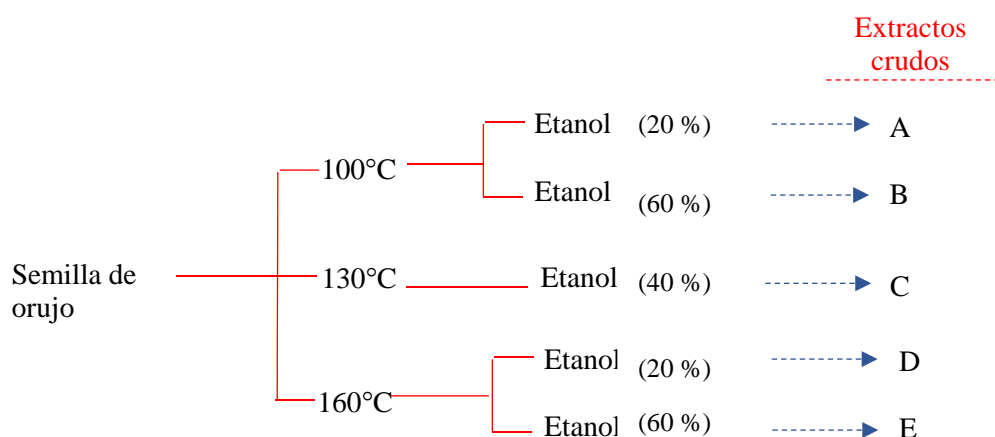
La ELP extrajo los polifenoles presentes en la piel y semilla del orujo de uva por separado, utilizando concentraciones de etanol (20 % - 60 %) a diferentes temperaturas de extracción (100 °C – 160 °C).

Se siguió la metodología propuesta por Vergara-Salinas et al. (2013), con algunas modificaciones. Aproximadamente 5 gramos de piel o semilla de orujo de uva en base seca fueron sometidos a temperaturas (100, 130 y 160 °C), combinadas con diferentes niveles de co-solvente (20, 40 y 60 %) dentro de un sistema de extracción de líquidos presurizados (ASE: 150 Dionex). Las condiciones de proceso en el ASE incluyeron 10 atmósferas de presión interna, 5 minutos de extracción estática, 150 segundos de purga y un ciclo de proceso (Figura 7).

#### Figura 7

*Diagrama del proceso de extracción para piel y semilla de orujo de uva por separado*





*Nota:* Los valores A, B, C, D y E representan la combinación de la temperatura entre (100, 130 y 160 °C) con diferentes niveles de co-solvente (20, 40 y 60 %).

Se realizaron un total de 21 pruebas, analizando polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y perfil de polifenoles. Las respuestas fueron evaluadas mediante un diseño factorial  $2^K$  con tres puntos centrales, permitiendo evaluar el efecto de los factores en estudio sobre las variables respuesta ( $p$ -valor < 0,05), como se muestra en la Tabla 6 y 7.

**Tabla 6**

*Condiciones del proceso de extracción en piel de orujo por líquidos presurizados.*

| i | T (°C) | C (%) | R1 | R2 | R3 |
|---|--------|-------|----|----|----|
| 1 | 100    | 20    |    |    |    |
| 2 | 160    | 20    |    |    |    |
| 3 | 100    | 60    |    |    |    |
| 4 | 160    | 60    |    |    |    |
| 5 | 130    | 40    |    |    |    |
| 6 | 130    | 40    |    |    |    |
| 7 | 130    | 40    |    |    |    |

*Nota:* T es temperatura de extracción, C es co-solvente (etanol) y R representan las repeticiones.

**Tabla 7**

*Condiciones del proceso de extracción en semilla de orujo por líquidos presurizados.*

| i | T (°C) | C (%) | R1 | R2 | R3 |
|---|--------|-------|----|----|----|
| 1 | 100    | 20    |    |    |    |
| 2 | 160    | 20    |    |    |    |
| 3 | 100    | 60    |    |    |    |
| 4 | 160    | 60    |    |    |    |
| 5 | 130    | 40    |    |    |    |
| 6 | 130    | 40    |    |    |    |
| 7 | 130    | 40    |    |    |    |

*Nota:* T es temperatura de extracción, C es co-solvente (etanol) y R representan las repeticiones.

***b) Extracción convencional (EC):***

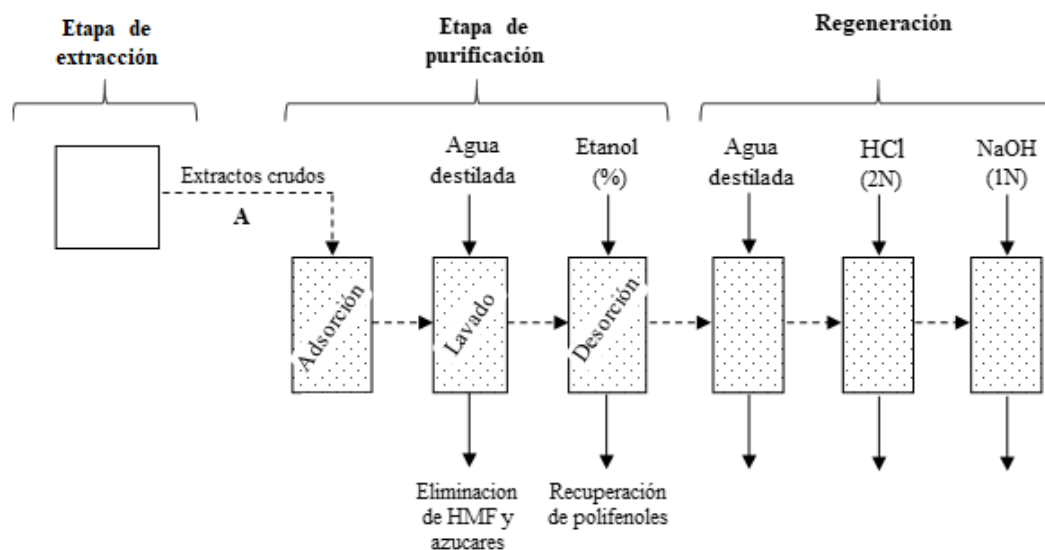
La EC se llevó a cabo con el propósito de comparar los resultados obtenidos por la ELP versus la extracción convencional (acetona al 60 %), la misma que ha demostrado efectividad para la recuperación de polifenoles en comparación con otros solventes (agua y etanol). En resumen, la EC fue realizada a 60 °C combinada con acetona (60 % p/p), siguiendo la metodología propuesta por (Zadernowski et al., 2005). Se utilizaron ~5 g de muestra (base seca), los cuales se colocaron en un matraz de 250 mL de volumen, el cual estuvo protegido de la luz. Las condiciones de proceso fueron: velocidad de agitación, 500 RPM durante 1 h para obtener una relación de muestra sólida: volumen de extracto de 1:10. Después, los extractos crudos fueron recolectados y almacenados en viales ámbar a -20 °C para su posterior análisis.

***c) Purificación con resinas***

El proceso de extracción permitió obtener la mejor temperatura del proceso. Entonces, los extractos obtenidos a esa temperatura de extracción fueron purificados a 30 °C en un sistema especialmente armado para este fin con el objetivo de obtener extractos purificados ricos en polifenoles libres de compuestos no deseados. Este proceso de purificación es un fenómeno de adsorción física conocido como fisisorción, el cual se rigió mediante interacciones no polares entre el polifenol y la superficie de la resina y consistió de 4 etapas (adsorción, lavado, desorción y regeneración) (Figura 8).

**Figura 8**

*Etapas del proceso de purificación de los diferentes extractos crudos*

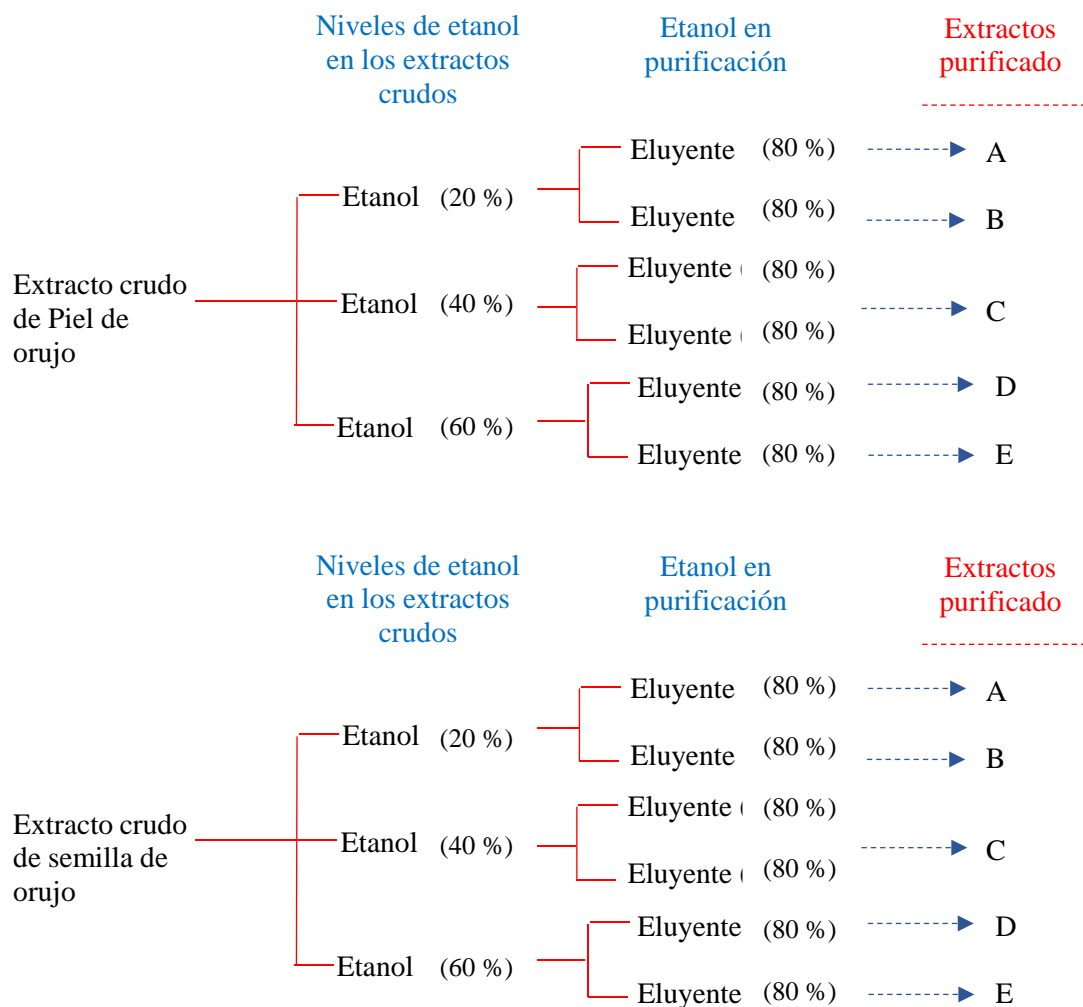


*Nota:* HMF hidroximetilfurfural, HCl (2N) cloruro de hidrogeno 2 normal, NaOH (1N) hidróxido de sódio 1 normal.

Los parámetros de este proceso, se definió en base a nuestras investigaciones previas en procesos integrados de extracción/purificación (Mariotti-Celis et al., 2018). En resumen, ~50 mL de extracto crudo con un caudal de 3 mL/min fueron pasados a través de una columna de vidrio ( $\varnothing$ : 25 mm; h: 100 mm) empaquetada con ~18 g de resina macroporosa no iónica HP-20 (Diaion, Tokio, Japón). Luego, 100 mL de agua destilada fueron pasados para la etapa de lavado. Después, los polifenoles se recuperaron en la etapa de desorción, evaluando diferentes concentraciones de etanol (80 %). Finalmente, la columna fue regenerada utilizando 100 mL de agua destilada, 100 mL de NaOH (1N) y 100 ml de HCl (2N). Los extractos purificados se recogieron y almacenaron en viales ámbar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

**Figura 9**

*Diagrama del proceso de purificación para piel y semilla de orujo de uva por separado*



*Nota:* En la etapa de purificación para piel y semilla de orujo de uva, los valores A, B, C, D y E representan las combinaciones de concentración de etanol con eluyente (80 %).

Las variables respuesta evaluadas en este proceso de purificación fueron, polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), azúcares reductores y perfil de polifenoles. Entonces, se llevaron a cabo un total de 18 para piel y semilla por separado. Las respuestas fueron analizadas mediante un diseño factorial completo 3x2 que permitió evaluar el efecto de los factores en estudio sobre las variables respuesta ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) como se muestra en la (Tabla 8 y 9).

**Tabla 8***Condiciones del proceso de purificación en piel de orujo*

| Etanol (%) | Eluyente (%) | R1 | R2 | R3 |
|------------|--------------|----|----|----|
| 20         | 80           |    |    |    |
| 20         | 80           |    |    |    |
| 40         | 80           |    |    |    |
| 40         | 80           |    |    |    |
| 60         | 80           |    |    |    |
| 60         | 80           |    |    |    |

*Nota:* Etanol (%), es el cosolvente presente en los extractos crudos. Eluyente (%), es la concentración de etanol que se usará en la desorción durante la purificación y R representan las repeticiones.

**Tabla 9***Condiciones del proceso de purificación en semilla de orujo*

| Etanol (%) | Eluyente (%) | R1 | R2 | R3 |
|------------|--------------|----|----|----|
| 20         | 80           |    |    |    |
| 20         | 80           |    |    |    |
| 40         | 80           |    |    |    |
| 40         | 80           |    |    |    |
| 60         | 80           |    |    |    |
| 60         | 80           |    |    |    |

*Nota:* Etanol (%), es el cosolvente presente en los extractos crudos. Eluyente (%), es la concentración de etanol que se usará en la desorción durante la purificación y R representan las repeticiones.

***d) Determinación de polifenoles totales.***

El contenido polifenoles totales (CPT) de las muestras se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965). En resumen, un volumen de 3,75 mL de agua destilada, 0,5 mL de muestra y 0,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) se mezclaron con 0,5 mL de una solución de carbonato de sodio (10 % p/v). La absorbancia fue medida a 765 nm (Espectrómetro UV 1240, Shimadzu, Kioto, Japón) después de un tiempo de reacción de 1h a temperatura ambiente, Los resultados se expresarán en mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por muestra.

Previo al análisis, se preparó una curva de calibración con ácido gálico como estándar (0 – 50 mg/L) antes de analizar los extractos obtenidos.

***e) Determinación de capacidad antioxidante por DPPH***

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó utilizando el método de inhibición del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) (Brand-Williams et al., 1995). En resumen, se mezcló 0,1 mL de extracto con 3,9 ml de solución DPPH (0,1 mM), luego la solución se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. La reducción de DPPH se medirá a 517 nm (espectrómetro UV 1240, Shimadzu, Kioto, Japón). La CI50 (mg/L), definida como la concentración de extracto efectiva necesario para inhibir el 50 % de la actividad del radical DPPH, se calculó y comparo con Trolox, utilizando la ecuación de capacidad antioxidante equivalente Trolox (CAET) ( $CAET = CI50 \text{ Trolox} / CI50 \text{ muestra}$ ) (José R. Vergara-Salinas et al., 2013). Los valores de capacidad antioxidante se expresaron como  $\mu\text{M}$  de equivalente de Trolox (ET) por gramo de orujo seco ( $\mu\text{mol ET/gss}$ ).

***f) Capacidad Antioxidante; Método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)***

Los análisis ORAC de los extractos obtenidos se llevaron a cabo en un fluorómetro de microplaca de acuerdo a la metodología propuesta por Chirinos et al. (2008). AAPH se utilizó como generador de radicales peroxilo, trolox como estándar y fluoresceína como

emisor de fluorescencia. Previamente, se prepararon soluciones de fluoresceína 48nM y una solución de AAPH 153nM, todos diluidos en una solución buffer de PBS (pH 7,4). En resumen, se mezclaron 25  $\mu$ L de muestra (blanco), estándar de Trolox o muestra diluida, que luego fueron incubadas durante 10 minutos a 37 °C antes de la inyección automática en el lector de microplacas. La fluorescencia se midió a 485 nm ( $\lambda$ : excitación) y a 520 nm ( $\lambda$ : emisión) cada minuto durante 50 min. Los valores ORAC finales se calcularon utilizando el área bajo la curva y se expresaron como  $\mu$ mol de ET por gramo de muestra.

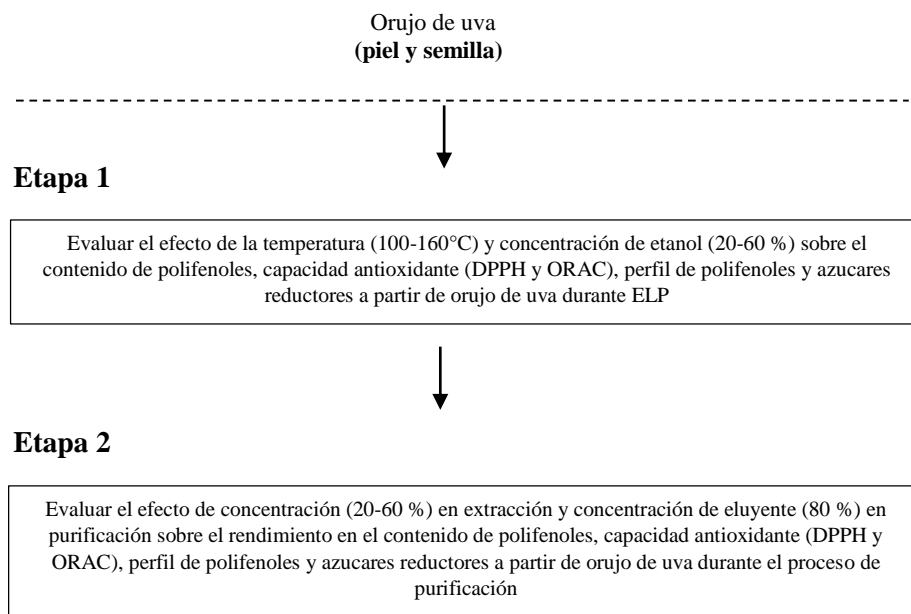
***g) Perfil de polifenoles***

El perfil de polifenoles está expresado como  $\mu$ g por gramo de orujo seco ( $\mu$ g/gss). La distribución oligomérica de proantocianidinas fue determinada por cromatografía líquida de interacción hidrofílico acoplado a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD), según la metodología propuesta por (Prior et al., 2010).

***h) Contenido de azúcares reductores:***

Los azúcares reductores fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC-IR), según el método de Varela et al.(2003).

Para la ejecución de la investigación se procedió a realizar las actividades plasmadas en el siguiente flujograma:

**Figura 10***Etapas consideradas para la ejecución de la tesis**Nota:* Elaboración propia**3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS****3.5.1. Materiales.**

Recolección de 50 kg de orujo de uva de la Bodega el Biondi (Mariscal Nieto, Moquegua, Perú). Primero se procederá a separar la piel de la semilla, las cuales serán envasadas en bolsas de polietileno para después ser congeladas a -20°C.

Se procederá a la extracción de polifenoles a partir de piel y semilla por separado mediante la extracción por líquidos presurizados (ELP) para subsecuentemente realizar el proceso de purificación con resinas.

- **Características Técnicas del equipo de extracción por líquidos presurizados**

El sistema permite trabajar con muestras sólidas o semisólidas en la celda de extracción, cuyo proceso de operación se realiza de la siguiente manera:

- El llenado de muestra en la celda es manual.
- El sistema asegura y sella la celda de forma automática una vez iniciado el proceso de extracción
- La celda se calienta y presuriza.
- La muestra se mantiene a 1500 psi (10 atm) y la temperatura deseada.
- El solvente (acuoso u orgánico) se bombea e inyecta en la celda, según el volumen deseado de extracción.
- El sistema, según las condiciones de proceso (temperatura, ciclos de extracción y tiempos estáticos) emite una alarma, la cual indica la finalización del proceso de extracción.
- El sistema permite la purga con nitrógeno y liberación de la celda de extracción
- El sistema tiene sensores de control que advierten del sobrellenado en las muestras recolectadas.
- Temperatura de trabajo del horno de 40 a 200 ° C; con sistema automático de apagado después ocho horas sin actividad del sistema.
- Presión de funcionamiento de la bomba de 10,35 MPa (1500 psi).
- Válvulas de alta presión: alivio de presión y estática.
- Válvulas de baja presión: purga, cebado y neumática.
- Sensor de botella de recolección, cuando las agujas están en la posición "abajo", los sensores detectan si un recipiente de recolección está presente y si está lleno.
- Sensores de temperatura, presión y tiempo.
- Sensor de celda.
- Sensores de detección de vapor dentro del sistema (hidrocarburos).
- Pantalla digital externa que permita programar el equipo: Temperatura, tiempo de proceso, purga y ciclos de extracción.
- Indicadores audibles y visuales a falta de energía eléctrica, con alarma, timbre de llamada y funciones de restauración automática.
- Dos puertas, cada una con llave en las cerraduras de cada una para la purga y recolección de la muestra.

- Sistema de inyección de nitrógeno (incluye sensores).
- Voltaje: 220 V, Frecuencia: 60 Hz.

### 3.5.2. *Instrumentos.*

- **Equipos**

- Extractor acelerado de solventes DIONEX modelo ASE-150.
- Baño maría (22 litros)
- Bomba peristáltica de 0,2 a 10 ml/min.
- Homogeneizador por Ultrasonido
- Agitador con plataforma para tubos, placas y crioviales
- Agitador magnético con calentador digital
- Espectrofotómetro UV-visible de 6 celdas
- Balanza analítica precisión 0,1 mg
- Balanza de precisión de 2 kg precisión 0,01 g

- **Material de laboratorio.**

- Micropipeta 0-10 uL
- Micropipeta 10 - 1000 uL
- Micropipeta 100 - 5000 uL
- Columna de vidrio de alta presión para cromatografía líquida preparativas dimensiones.
- Cubeta de cuarzo 1mL 10mm
- Columna de vidrio para cromatografía 26 mm x 100 mm
- Puntera (tips) para micropipeta 101 ul - 1000 ul x 1000
- Puntera (tips) para micropipeta 1000 ul - 5000 ul x 100
- Puntera (tips) para micropipeta 10 ul - 100 ul x 1000
- Puntera (tips) para micropipeta 20 ul - 200 ul x 1001
- Matraz erlenmeyer de vidrio borosilicato 100 ml
- Matraz erlenmeyer de vidrio borosilicato 250 ml
- Matraz aforado (fiola) de vidrio de clase a 10 ml con tapa de polipropileno

- Matraz aforado (fiola) de vidrio de clase a 500 ml con tapa de polipropileno
  - Matraz aforado (fiola) de vidrio de clase a 1 l con tapa de polipropileno
  - Matraz aforado (fiola) de vidrio de clase a 5 ml con tapa de polipropileno 5 ml
  - Probeta de vidrio clase a graduada 50 ml
  - Probeta de vidrio clase a graduada 100 ml
  - Probeta de vidrio clase a graduada 250 ml
  - Vaso de precipitados de vidrio borosilicato graduado 100 ml
  - Vaso de precipitados de vidrio borosilicato graduado 200 ml
  - Vaso de precipitados de vidrio borosilicato graduado 500 ml
  - Pipeta volumétrica terminal de vidrio clase a x 10 ml
  - Pipeta volumétrica terminal de vidrio clase a x 5 ml
  - Propipeta automática 0,0 ml a 10 ml
  - Espátula de acero inoxidable doble punta (cuchara y plana) 14cm
  - Espátula de acero inoxidable doble punta (cuchara y plana) 20 cm
  - Frasco gotero de vidrio transparente x 10 ml
  - Gradilla de plástico para 96 punteras (tips) de 10 - 100  $\mu$ l
  - Gradilla de plástico para 96 punteras (tips) de 10 - 100  $\mu$ l
  - Gradilla de plástico para 96 punteras (tips) de 100 - 1000  $\mu$ l
  - Microplaca de poliestireno 96 pocillos fondo plano
  - Microplaca de polipropileno 96 pocillos fondo plano para cultivo celular.
- **Reactivos Químicos.**
- Reactivo Trolox (500 mg)
  - Reactivo ABTS (5g)
  - Reactivo Fenol Folinciocalteu x 500 mL
  - Resina no polar de Estireno - Divinilbenceno hp-20 x 500g
  - Resina no polar Depoliaromatico - Hidrófobo xad16n x 500g
  - Metanol (grado hplc, 2,5l)
  - Etanol (grado hplc, 2,5 l)

- Ácido gálico (25 g)
- Fluoresceína x 100 g
- 2,2'-Azobis (2-Metilpropionamidina) diclorhidrato 97 % x 100 g
- Reactivo folin y ciocalteus x 500 ml concentración 2, o normal, fcos. C/tapa hermética, protocolo d/anal
- 2,2-Difenil-1-Picril Hidrázilo x 50 mg
- Estándar usp ácido clorogénico x 50 mg
- Estándar usp quercetina x 500 mg
- Estándar usp kaempferol x 15 mg
- Estándar usp de catequina x 25 mg
- Estándar usp de epigallocatequina x 20 mg
- Estándar usp de oleuropeina x 20 mg
- Ácido 2-Hidroxi-3,5-Dinitrobenzoico p.s. X 100 g
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado p.a. X 1 kg
- D (+) glucosa anhidra (gc) mayor de 99,5 % x 250 g
- Cloruro de litio p.a. X 500 g
- Acetato de potasio q.p. 99 % x 500g
- Cloruro de magnesio p.a. x 500g
- Nitrato de calcio q.p. x 500g
- Nitrato de magnesio p.a. x 250g
- Nitrato de sodio p.a. x 500g
- Cloruro de sodio q.p. x 500g
- Cloruro de potasio q.p. x 500g
- Cloruro de bario p.a. x 500g
- Sulfato de potasio p.a. x 500g
- Fenol p.a. x 250 g
- Ácido 3,5 Dinitrosalicílico p.a. x 500 g
- Ácido clorhídrico 11 pa
- Ácido ferúlico p.a. x 100 mg

- Ácido vanílico x 100 g
- Ácido cafeico grado hplc concentración  $\geq 98$  % x 5 g
- Rutina 100 % grado analítico x 100 mg
- Epigallocatequina galato grado hplc concentración  $\geq 90$  % x 50 mg
- Ácido protocatecuico grado hplc x 50mg
- Ácido siríngico grado hplc x 10 g
- Estándar de epicatequina x 10 mg
- Epigallocatequina galato grado hplc concentración  $\geq 90$  % x 50 mg
- Tierra de diatomeas grado acs x 1 kg

### **3.6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS**

#### ***3.6.1. Análisis del proceso de extracción:***

Se evaluaron un total de 21 observaciones mediante un arreglo factorial  $2^k$ , el cual fue analizado mediante un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 % para evaluar el efecto de los factores en estudio tales como temperatura (100, 130, 160°C) y concentración de etanol (20, 40, 60 %) sobre las variables respuesta (polifenoles totales, azúcares reductores y capacidad antioxidante). Para determinar diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación Tukey. El programa Statgraphics Plus 4,0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) se utilizó para analizar de todos los datos.

#### ***3.6.2. Proceso integrado de extracción - purificación:***

Un total de 21 observaciones fueron realizadas en un proceso combinado de extracción y purificación con la finalidad de establecer si la presencia de etanol en los extractos obtenidos durante la ELP puede afectar la recuperación de polifenoles durante la purificación con resinas. Los resultados fueron analizados mediante un arreglo factorial  $2^k$ . Luego, un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 % permitió evaluar el efecto de los factores en estudio, tales como temperatura (100, 130, 160 °C) y concentración de etanol (20, 40, 60 %) sobre las variables respuesta (polifenoles totales, azúcares reductores y capacidad

antioxidante). Para establecer diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación Tukey. El programa Statgraphics Plus 4,0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) permitió el análisis de todos los datos.

### 3.6.3. Optimización del proceso de extracción mediante el diseño compuesto central

Para encontrar las condiciones óptimas del proceso de extracción, se utilizó un diseño experimental central Compuesto, el cual fue establecido en las condiciones óptimas del proceso (posible zona de curvatura), donde las variables independientes fueron la temperatura (x1) y concentración de etanol (x2). La matriz del diseño incluyó un total de 11 tratamientos, de los cuales 4 fueron en condiciones axiales, 4 en condiciones factoriales y 3 fueron en el punto central Tabla 11.

**Tabla 10**

*Matriz para el diseño compuesto central (DCC)*

| Niveles del diseño |        | Niveles experimentales |          | Variables respuesta |    |
|--------------------|--------|------------------------|----------|---------------------|----|
| x1                 | x2     | T °C                   | Etanol % | y1                  | y2 |
| -1                 | -1     | 100                    | 20       |                     |    |
| -1                 | 1      | 100                    | 60       |                     |    |
| 1                  | -1     | 160                    | 20       |                     |    |
| 1                  | 1      | 160                    | 60       |                     |    |
| -1,414             | 0      | 87,57                  | 40       |                     |    |
| 1,414              | 0      | 172,43                 | 40       |                     |    |
| 0                  | -1,414 | 130                    | 11,72    |                     |    |
| 0                  | 1,414  | 130                    | 68,28    |                     |    |
| 0                  | 0      | 130                    | 40       |                     |    |
| 0                  | 0      | 130                    | 40       |                     |    |
| 0                  | 0      | 130                    | 40       |                     |    |

*Nota:* y1 es el contenido total de polifenoles; y2 es el contenido de azúcares

El procesamiento y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el programa Statgraphics Plus 4,0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Esto permitió encontrar superficies tridimensionales para cada respuesta en particular (contenido de polifenoles y azúcares). Se evaluaron los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes, y se establecieron regresiones lineales de primer orden o segundo orden según el ajuste de mínimos cuadrados.

Finalmente, para encontrar un óptimo de las condiciones de extracción que permitieran la mayor recuperación de polifenoles con concentraciones mínimas de azúcares, se aplicó el enfoque de superficie de respuesta utilizando la función de deseabilidad. La deseabilidad ( $d$ ) se calculó usando la Ecuación 1, donde se buscaba una respuesta máxima prevista para el contenido de polifenoles. La Ecuación 2, se utilizó para la respuesta prevista en el contenido de azúcares donde se deseaba un valor mínimo ( $U$ ).

$$d = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y} < L \\ \left(\frac{\hat{y} - L}{T - L}\right) & \text{si } L \leq \hat{y} \leq T \\ 1 & \text{si } \hat{y} > T \end{cases} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$d = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{y} < T \\ \left(\frac{U - \hat{y}}{U - T}\right) & \text{si } T \leq \hat{y} \leq U \\ 0 & \text{si } \hat{y} > U \end{cases} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $T$  y  $L$  representan los valores objetivos para la respuesta prevista más alta y más baja dentro del espacio temperatura y concentración de etanol, dependiendo de si se había establecido un valor mínimo o máximo deseado.  $\hat{y}$  representa las respuestas previstas que se derivarán de las regresiones múltiples calculadas anteriormente para cada superficie de respuesta individual.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

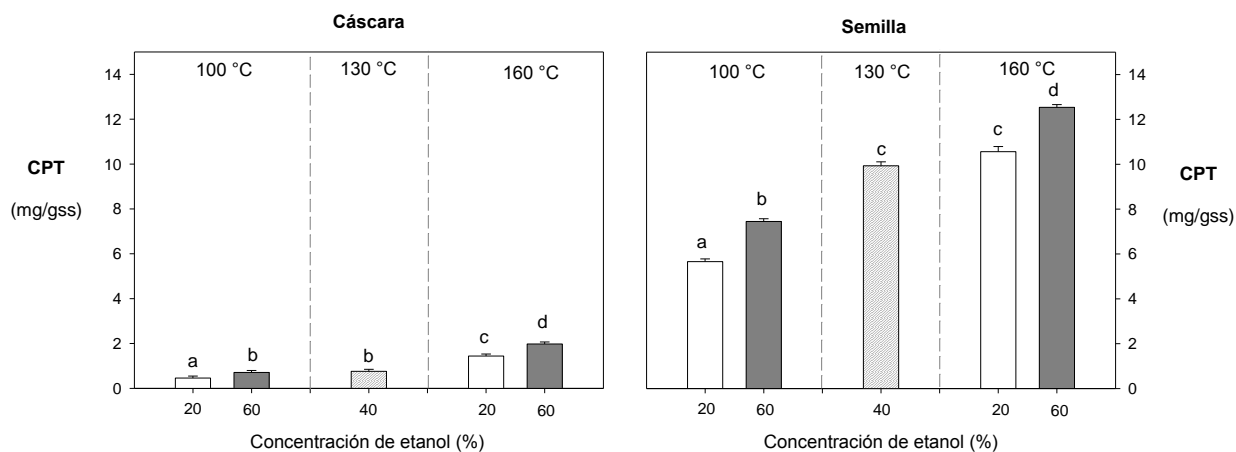
#### **4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA (100 – 160°C) Y CONCENTRACIÓN DE ETANOL (20 – 60 %) SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS NO DESEADOS PRESENTES EN ORUJO DE UVA**

##### ***4.1.1. Contenido de polifenoles***

Si bien diversos estudios han promovido el uso de agua para recuperar polifenoles de diversos residuos agroindustriales, el uso de mezclas agua-etanol podría mejorar la recuperación de estos compuestos (Cheng et al., 2021; Mariotti-Celis et al., 2018). De acuerdo con nuestros resultados, el análisis de varianza (anexo 4) muestra que de manera independiente la temperatura y concentración de etanol tienen un efecto significativo positivo ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) sobre el Contenido de Polifenoles (CPT) en los extractos obtenidos. Interesantemente, los efectos combinados (interacción temperatura x concentración de solvente) también presentaron efectos estadísticamente significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). Esto sugiere que el impacto sobre el contenido de polifenoles varía de manera simultánea en función de la temperatura y concentración de etanol utilizado y viceversa (Figura 11).

**Figura 11**

*Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de polifenoles totales*



*Nota:* CPT representa el contenido de polifenoles totales, las letras diferentes indican la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

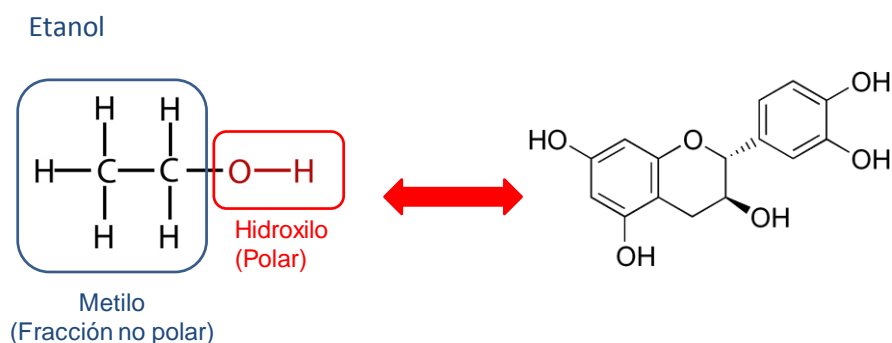
#### 4.1.1.1. Efecto del solvente

Los extractos obtenidos a partir de semillas de orujo de uva presentaron importantes concentraciones de polifenoles (5,66 - 12,54 mg EAG/gss). Interesantemente, los cambios de temperatura y etanol mejoraron la recuperación de estos compuestos. Por ejemplo, un incremento en la concentración de etanol de 20 % a 60 % mejoró la recuperación de polifenoles en 18 % y 31 % con 100 °C y 160 °C, respectivamente. Mientras, para piel de orujo, un cambio en la concentración de etanol de 20 % a 60 % mejoró la recuperación de polifenoles en 37 % y 54 % con 100°C y 160°C (Figura 11). Este efecto del uso de etanol fue reportado por otros trabajos de investigación. Mariotti-Celis et al. (2018) informaron que el incremento de etanol de 0 a 15 % combinado con 60 °C mejoró en un 37 % la recuperación de polifenoles en orujo de uvas tintas derivados de la industria del vino. Similar comportamiento fue reportado para otras matrices vegetales. Por ejemplo, Tierney et al. (2013) demostraron bajo condiciones subcríticas que un incremento de concentración de 0 a 80 % de etanol a 60 °C favorece en un 37 % la recuperación de polifenoles presentes en algas pardas; mientras Rosa et al. (2019) observaron que los cambios de 0 a 80 % de etanol con 60 °C permitieron recuperar un 48 % más de contenido de polifenoles. Al respecto, los

polifenoles presentan dos tipos de grupos funcionales, una fracción polar (grupos hidroxilo) y una fracción no polar (grupo fenólico) (Huamán-Castilla et al., 2017). Esto permite que estos compuestos tengan una mayor afinidad por aquellos solventes de polaridad intermedia que presentan una fracción polar y no polar. Al respecto, el etanol al presentar un grupo hidroxilo (fracción polar) y un grupo metilo (fracción no polar), establece interacciones intermoleculares con los grupos funcionales del polifenol (grupo hidroxilo y anillos aromáticos) en comparación con el agua, que solo presenta grupos hidroxilo en su estructura química (Figura 12) (Galanakis et al., 2013).

**Figura 12**

*Interacciones intermoleculares entre la molécula del etanol y los polifenoles*



*Nota:* Elaboración propia.

#### 4.1.1.2. Efecto de la temperatura

La temperatura tuvo un efecto positivo en la extractabilidad de los compuestos fenólicos presentes en piel y semilla de orujo de uva (Figura 11). Por ejemplo, si fijamos la concentración de etanol a 60 % con un cambio de 100 a 160 °C, la recuperación de estos compuestos incrementa en 1,6 y 2,7 veces en piel y semilla de orujo (Figura 11). Similar comportamiento en otras matrices vegetales también fue reportado por Huamán-Castilla et al. (2023) quienes observaron que un aumento de la temperatura de 70 a 130 °C, permite

incrementar la recuperación de polifenoles en 3,5, 4,2 veces con (agua pura) y 15 % de etanol en arándanos de descarte, respectivamente. Mariotti-Celis et al. (2018) informaron que el incremento de temperatura de 60 a 90 °C combinado con 15 % de etanol mejoró en un 42 % la recuperación de polifenoles en orujo de uvas tintas derivados de la industria del vino. Similar comportamiento del efecto de la composición de la temperatura también fue reportado para otras matrices vegetales. Por ejemplo, Otero et al. (2018) demostraron que incrementos de temperatura de 80 a 160 °C combinado con mezclas agua-etanol (50 %) mejoró la recuperación de polifenoles en 39 % a partir de algas pardas; mientras, Santana et al. (2019) informaron que la extractabilidad de los polifenoles mejoró en 6 % cuando la temperatura aumentó de 40 a 60 °C usando agua pura en semillas de Guaraná. Los incrementos de temperatura en un proceso de extracción subcrítica incrementan la energía cinética del solvente, esto propicia que las moléculas del solvente aceleren y colapsen la matriz vegetal, mejorando la solubilidad de los polifenoles debido a la ruptura de esta matriz (Mustafa & Turner, 2011; Plaza & Turner, 2015). Además, Vergara-Salinas et al. (2013) mencionan que los incrementos de temperatura bajo condiciones subcríticas favorecen los fenómenos de transferencia de masa debido a un incremento en la permeabilidad del tejido vegetal que permite la difusión de los polifenoles al solvente de extracción. Por otro lado, si bien la temperatura tiene un efecto positivo en la recuperación de polifenoles, es importante considerar algunos reportes que mencionan que temperaturas mayores a 120 °C podrían favorecer la formación de compuestos tóxicos como el hidroximetilfurfural, un compuesto carcinogénico en roedores (J. R. Vergara-Salinas et al., 2015).

Las mejores condiciones fueron establecidas a 160 °C con 60 % de etanol, esto permitió recuperar 12,54 mg EAG/gss y 1,98 mg EAG/gss para semilla y piel de orujo, respectivamente (Figura 11). Al respecto, Huamán-Castilla et al. (2017) reportaron que la piel de uva contiene entre 30 y 40 % del total de polifenoles presentes con respecto a la semilla con un 60 y 70 %. Entonces, es de esperar que los extractos obtenidos a partir de semillas presenten un mayor contenido de estos compuestos bioactivos. Además, durante el proceso de vinificación, la etapa de fermentación lixivia más fácilmente aquellos polifenoles

presentes en la piel de uva para formar parte del mosto del pisco (Álvarez-Yanamango et al., 2019).

#### **4.1.1.3. Efecto de la temperatura x solvente**

La Figura 11, muestra que el efecto positivo de la concentración de etanol sobre el CPT varía conforme incrementa la temperatura en cáscara y semilla de orujo de uva (Figura 11). Esta interacción significa que el efecto de uno de los factores no es constante, sino que cambia según el nivel del otro factor. Por ejemplo, el aumento en la concentración de etanol tiene un efecto más fuerte sobre el CPT cuando la temperatura es más alta o viceversa. Esto significa que la combinación adecuada de ambos factores maximiza la recuperación de polifenoles durante el proceso de extracción líquido presurizada, cuyas mejores condiciones fueron establecidas con temperaturas altas (160 °C) y concentraciones de etanol altas (60 %).

#### **4.1.2. Capacidad antioxidante**

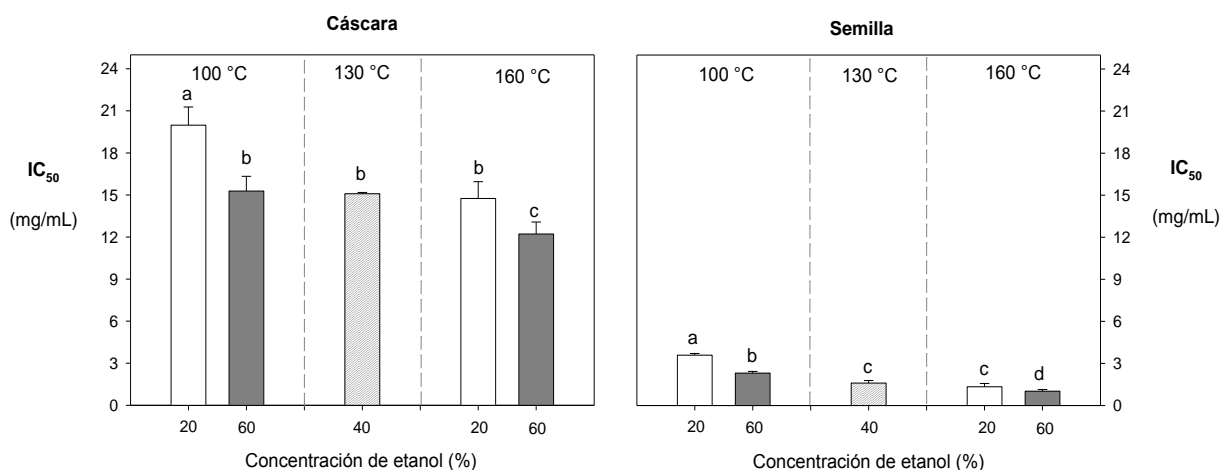
La capacidad antioxidante fue analizada mediante los métodos DPPH y ORAC, los cuales permitieron evaluar la capacidad de los polifenoles para inhibir un radical específico. Por ejemplo, el método DPPH evaluó la capacidad de los polifenoles para neutralizar el radical DPPH, un radical libre que difiere de otras especies reactivas generadas biológicamente; mientras, el método ORAC midió la capacidad de los polifenoles para neutralizar los radicales peróxilo, similar a los radicales biológicos libres generados dentro de un organismo (Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021). Por ello, para el presente estudio, ambos métodos fueron realizados como análisis complementarios para correlacionar la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en nuestros extractos.

De acuerdo con nuestros resultados, el análisis de varianza (anexo 5 y 6) la temperatura tiene un efecto significativo ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) sobre los valores  $IC_{50}$  y ORAC. Entonces, un incremento en la temperatura de extracción, permite disminuir e incrementar significativamente los valores de capacidad antioxidante expresados como  $IC_{50}$  y ORAC, respectivamente en los extractos de cáscara y semilla de orujo de uva. Mientras, la variación

en los niveles de concentración de etanol (20, 40, 60 %) muestran diferencias significativas en los valores  $IC_{50}$  y ORAC. La interacción entre los factores (concentración x temperatura) fueron significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) debido a que los efectos de un factor (temperatura) varían según el nivel del otro factor (concentración de etanol). La Figura 13 y 14 muestra que, cuando se combinan temperaturas más altas con mayores concentraciones de etanol, se obtienen variaciones significativas en los valores  $IC_{50}$  y ORAC lo que sugiere que el efecto sinérgico de ambos factores maximiza la extracción de compuestos antioxidantes.

**Figura 13**

*Capacidad antioxidante analizada por DPPH en piel y semilla de orujo*



*Nota:* Elaboración propia -  $IC_{50}$  representa la capacidad para inhibir el 50 % de radical DPPH, las letras diferentes indican la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.1. DPPH

La temperatura tuvo un efecto positivo en la extractabilidad de los compuestos fenólicos presentes en piel y semilla de orujo de uva. Estos resultados indican que los valores de  $IC_{50}$  de los extractos disminuyeron a medida que la temperatura y concentración de etanol incrementaron. Entonces, los extractos con un mayor valor  $IC_{50}$  necesitan una mayor cantidad de extracto para inhibir el 50 % del radical DPPH (Figura 13). Por ejemplo, si fijamos la temperatura a 160 °C, un incremento en la composición de etanol de 20 a 60 %, permitió

obtener valores de  $IC_{50}$  de 14,75 y 12,22 respectivamente (Figura 13). Estos resultados establecen que el valor de  $IC_{50}$  disminuyó en ~17 % en los extractos de cáscara de orujo de uva; mientras que bajo las mismas condiciones los extractos de semilla de orujo permitieron obtener valores de  $IC_{50}$  de 1,34 y 1,02 estos resultados establecen una reducción del valor  $IC_{50}$  en ~23 % (Figura 13). Estos resultados son consistentes con otros estudios previos que han demostrado el impacto positivo de la composición del solvente sobre el potencial reductor/antioxidante de los extractos de diversas matrices vegetales (Ghafoor et al., 2009; Khan et al., 2010; Machado et al., 2017). Por ejemplo, Tierney et al. (2013) demostraron que un incremento de concentración de 0 a 80 % de etanol a 60 °C reducía en un 64 % el valor  $IC_{50}$ . Drosou et al. (2015) reportó que los incrementos de etanol de 0 a 50 % en la composición del solvente reducían en 53 % el  $IC_{50}$  en orujo de uva. Ghafoor et al. (2009) reportó que los cambios de etanol de 40 a 60 % favorecen en 24 % la habilidad para inhibir el radical DPPH. En ese sentido, los polifenoles presentan grupos hidroxilo (OH) y una fracción no polar en su estructura química, los cuales tienen la capacidad de transferir átomos de hidrógeno con la finalidad de reducir el radical DPPH. Entonces, cuanto mayor es el contenido de polifenoles presentes en los extractos, menor será el valor  $IC_{50}$  (Allcca-Alca et al., 2021; Huamán-Castilla., 2020; Huamán-Castilla et al., 2019). Esto explica porque los extractos de semilla tienen un menor valor  $IC_{50}$  comparado con los extractos de cáscara de orujo de uva.

Por otro lado, si se fijaba la concentración de etanol a 60 %, los incrementos de temperatura de 100 a 160 °C permitieron obtener valores de  $IC_{50}$  de 15,28 y 12,22 respectivamente (Figura 13), estos resultados permitieron reducir el valor de  $IC_{50}$  en 20 % para cáscara, bajo las mismas condiciones los extractos de semilla permitieron obtener valores de  $IC_{50}$  de 2,31 y 1,02 el cual permitió reducir el valor de  $IC_{50}$  en 55 % (Figura 13). Bajo condiciones subcríticas, Gan & Baroutian (2022) reportaron que un incremento de temperatura de 120 a 150 °C reduce el valor  $IC_{50}$  en 65 %. Nastić et al. (2018) reportó una disminución del 40 % en el valor  $IC_{50}$  cuando la temperatura de proceso incrementó de 100 a 160 °C. Mariotti-Celis et al. (2018) observó que un incremento de 75 a 90 °C redujo en 15 % el valor de capacidad antioxidante expresado como  $IC_{50}$ . Los incrementos de temperatura

permiten acelerar las moléculas del solvente (energía cinética) favoreciendo la ruptura de la matriz celular y posterior liberación de polifenoles (Huamán-Castilla, Gajardo-Parra, et al., 2023). Entonces, una mayor concentración de polifenoles presentes en el extracto durante la ELP permitiría una mayor recuperación de polifenoles, consecuentemente, el valor  $IC_{50}$  de los extractos obtenidos sería menor.

#### 4.1.2.2. ORAC

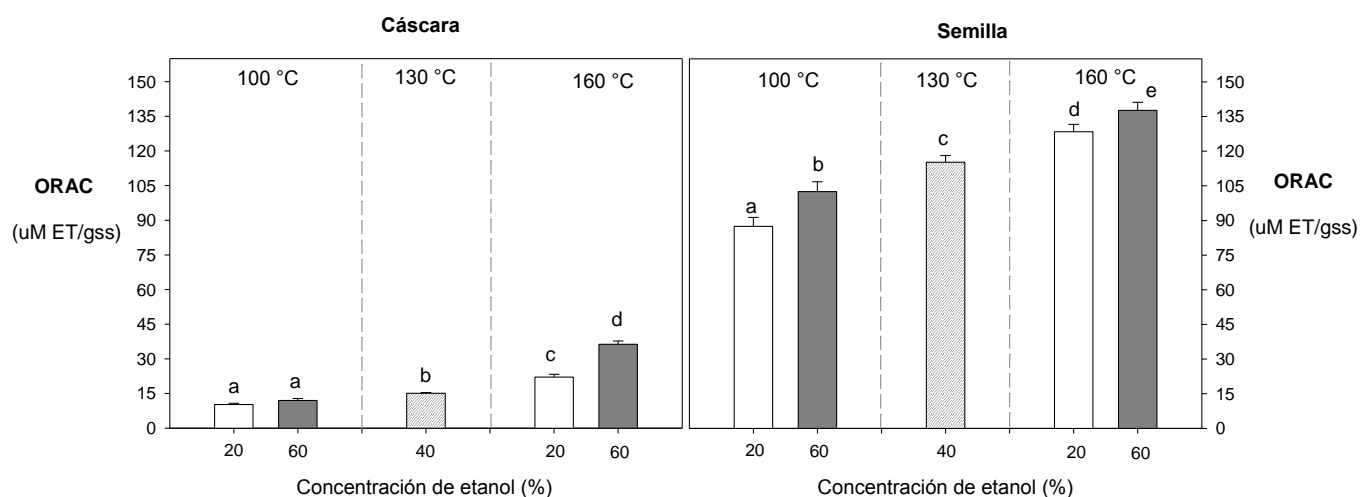
El análisis ORAC evaluó la habilidad de los polifenoles para reducir los radicales biológicos conocidos como peróxilos ( $ROO\cdot$ ), el cual es una de las más comunes especies reactivas de oxígeno en el organismo (Roy et al., 2010). Por ello, cuando los extractos presentan un alto contenido de polifenoles, la capacidad antioxidante del extracto es mayor (Goyeneche et al., 2015).

De acuerdo con nuestros resultados, independientemente de la concentración del solvente (60 % de etanol), cuando la temperatura incrementó de 100 a 160 °C, la capacidad antioxidante mejoró en 64 y 7 % para semilla y cascara de orujo de uva, respectivamente (Figura 14). Diversos trabajos han referido que los incrementos de temperatura en un proceso de extracción subcrítica favorecieron a la recuperación de polifenoles, esto debido a la reducción de la polaridad del etanol, estas condiciones incrementaron la habilidad del solvente para interactuar con los grupos funcionales de los polifenoles, así como la ruptura de la matriz vegetal; y por ende mejoraron la capacidad de los extractos evaluados por ORAC (Allcca-Alca et al., 2021; Castejón et al., 2021; Erpel, 2022; Nastić et al., 2018). No obstante, si bien los valores ORAC son elevados, es importante mencionar que, debido a las altas temperaturas (>120 °C), también se promovieron la formación de nuevos compuestos antioxidantes. Por ejemplo, Plaza et al. (2010) reportaron que cuando en un proceso de extracción con líquidos presurizados (ELP) la temperatura excede los 120 °C, se favorece la formación de compuestos antioxidantes como producto de la reacción de Maillard. Consecuentemente, la capacidad antioxidante de los extractos también es favorecida. Esto podría proponer que se utilicen altas temperaturas de extracción durante la ELP para mejorar

las características antioxidantes del extracto. Sin embargo, Vergara-Salinas et al. (2015) y Mariotti-Celis et al. (2018), mencionaron que las altas temperaturas de proceso (>120 °C) favorecerían la formación de compuestos tóxicos que podrían limitar el uso de los extractos en futuras aplicaciones alimentarias.

**Figura 14**

*Capacidad antioxidante analizada por ORAC en piel y semilla de orujo*



*Nota:* Elaboración propia - ORAC (expresado  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por gramo de orujo), las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### **4.1.3. El efecto del uso de mezclas agua - etanol a altas temperaturas sobre el perfil de polifenoles**

Para mejorar la comprensión del rol de la polaridad del solvente sobre la recuperación de polifenoles específicos, se realizó un análisis de perfil de polifenoles a cada condición del proceso de extracción, considerando la temperatura de extracción (100, 130 y 160 °C) y diferentes mezclas de agua - etanol (20, 30 y 60 %) como factores estudio (Tabla 11).

**Tabla 11***Perfil de polifenoles presentes en los extractos de orujo de uva*

| Descripción                      |         | Proceso de extracción |                |                |                |                |
|----------------------------------|---------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                  |         | 100°C                 | 100°C          | 130°C          | 160°C          | 160°C          |
|                                  |         | (20 %)                | (60 %)         | (30 %)         | (20 %)         | (60 %)         |
|                                  |         | Promedio<br>CV        | Promedio<br>CV | Promedio<br>CV | Promedio<br>CV | Promedio<br>CV |
| <b>Ácidos fenólicos (µg/gss)</b> |         |                       |                |                |                |                |
| Gálico                           | Semilla | 6,52<br>0,03          | 7,82<br>0,04   | 9,14<br>0,04   | 19,60<br>0,04  | 21,66<br>0,06  |
|                                  | Piel    | 0,22<br>0,05          | 0,65<br>0,03   | 1,03<br>0,05   | 1,32<br>0,02   | 1,67<br>0,05   |
| Elágico                          | Semilla | ND                    | ND             | ND             | 2,12<br>0,02   | 4,55<br>0,02   |
|                                  | Piel    | ND                    | 0,01<br>0,02   | 0,541<br>0,01  | 1,67<br>0,05   | 2,51<br>0,03   |
| Protocatechuico                  | Semilla | ND                    | ND             | 0,68<br>0,07   | 3,33<br>0,03   | 5,31<br>0,08   |
|                                  | Piel    | ND                    | ND             | 0,11<br>0,03   | 0,13<br>0,02   | 0,22<br>0,01   |
| Cafeico                          | Semilla | ND                    | ND             | ND             | 3,02<br>0,04   | 4,92<br>0,04   |
|                                  | Piel    | ND                    | 0,48<br>0,06   | 1,28<br>0,05   | 1,54<br>0,06   | 2,53<br>0,06   |
| Clorogénico                      | Semilla | 4,92<br>0,01          | 5,12<br>0,02   | 5,69<br>0,03   | 4,82<br>0,05   | 6,66<br>0,07   |
|                                  | Piel    | ND                    | ND             | ND             | 1,38<br>0,02   | ND             |
| Cumarico                         | Semilla | 0,25<br>0,02          | 0,31<br>0,03   | 0,21<br>0,02   | 0,65<br>0,07   | 2,24<br>0,02   |
|                                  | Piel    | ND                    | ND             | ND             | 0,37<br>0,03   | ND             |
| <b>Flavanoles (µg/gss)</b>       |         |                       |                |                |                |                |
| Catequina                        | Semilla | 47,33<br>0,03         | 46,05<br>0,04  | 85,92<br>0,05  | 96,33<br>0,07  | 85,91<br>0,08  |
|                                  | Piel    | 0,01<br>0,00          | 0,21<br>0,01   | 0,63<br>0,02   | 1,11<br>0,02   | 0,17<br>0,03   |
| Epicatequina                     | Semilla | 17,60<br>0,05         | 15,62<br>0,07  | 36,25<br>0,04  | 41,72<br>0,06  | 28,53<br>0,07  |
|                                  | Piel    | 1,16<br>0,02          | 3,74<br>0,02   | 5,41<br>0,01   | 7,23<br>0,02   | 1,07<br>0,02   |
| Epigalocatequina                 | Semilla | 1,23<br>0,03          | 7,22<br>0,02   | 1,98<br>0,03   | 13,21<br>0,04  | 18,14<br>0,08  |
|                                  | Piel    | 0,01<br>0,00          | 0,01<br>0,00   | 0,47<br>0,02   | 0,53<br>0,03   | 2,03<br>0,02   |
| Galocatequina                    | Semilla | 3,18<br>0,03          | 6,52<br>0,03   | 6,12<br>0,04   | 7,42<br>0,09   | 3,27<br>0,04   |
|                                  | Piel    | 0,67<br>0,02          | ND             | 0,34 0,03      | ND             | ND             |
| <b>Flavonoles (µg/gss)</b>       |         |                       |                |                |                |                |
| Quercetina                       | Semilla | ND                    | ND             | ND             | ND             | ND             |
|                                  | Piel    | 11,72<br>0,02         | 8,61<br>0,03   | 9,25<br>0,03   | 12,41<br>0,03  | 3,21<br>0,02   |
| Kaempferol                       | Semilla | ND                    | ND             | ND             | ND             | ND             |
|                                  | Piel    | 2,51<br>0,05          | 1,83<br>0,02   | 1,52<br>0,02   | 5,12<br>0,06   | 2,93<br>0,08   |

*Nota:* Los resultados se expresan como µg de polifenol específico por gramo de sólido seco. CV: coeficiente de variación (n=3).

#### 4.1.3.1. Ácidos fenólicos

El rendimiento de ácidos fenólicos mejoró con el incremento de etanol y temperatura durante la ELP (Tabla 11). Por ejemplo, cuando la temperatura incrementó de 100 a 160 °C combinado con 60 % de etanol se recuperaron 45 y 7 µg de ácidos fenólicos /gss para semilla y piel de orujo de uva (Tabla 11). El efecto positivo de la temperatura también fue reportado por García-Jares et al. (2015) quienes informaron que la extractabilidad de los ácidos fenólicos mejoró aproximadamente 8 veces cuando la temperatura aumentó de 100 a 150 °C, utilizando agua pura como solvente de extracción en un proceso ELP; mientras Huamán-Castilla et al. (2019) reportaron que los cambios de 0 a 50 % de etanol a 150 °C mejoraron 4 veces la recuperación de ácidos fenólicos.

Por otro lado, el uso de etanol como cosolvente en el proceso ELP permitió disminuir la polaridad del solvente, favoreciendo las interacciones no polares (Erpel, 2022). Esto explicaría la afinidad de la molécula de etanol para formar interacciones intermoleculares con los grupos funcionales de los ácidos fenólicos (hidroxilo y fenólico). Por ello, diversos estudios han demostrado que los ácidos fenólicos son moléculas orgánicas que tienen mayor afinidad por solventes orgánicos, como el etanol, debido a interacciones intermoleculares (fuerzas de dispersión de London) (Allica-Alca et al., 2021; Huamán-Castilla et al., 2019; Mariotti-Celis et al., 2018). La mejor condición de proceso fue establecida a 160 °C con 60 % de etanol (Tabla 11). Esto permitió recuperar una mayor proporción de ácido gálico con 21,66 µg/gss y 1,67 µg/gss para semilla y piel de orujo (Tabla 11).

#### 4.1.3.2. Flavanoles

Bajo condiciones subcríticas (P: ~10MPa), las altas temperaturas favorecieron la recuperación de estos compuestos. Sin embargo, cuando la concentración de etanol es mayor al 20 % la recuperación disminuyó (Tabla 11). Por ejemplo, si bien el uso de 20 % de etanol a 160 °C recuperó 158 µg/gss, cuando la concentración incrementó a 60 % de etanol la recuperación de estos compuestos se redujo a 135 µg/gss. Esto representó una reducción de 25 % en la recuperación de flavanoles de semilla de orujo (Tabla 11). Mientras, en el caso de

la cáscara de orujo, la recuperación de estos compuestos se reduce en 44 % bajo las mismas condiciones (Tabla 11). Este efecto del etanol bajo condiciones atmosféricas también fue advertido por otros trabajos de investigación sobre este tipo de familias específicas. Por ejemplo, Huamán-Castilla et al. (2019) reportaron que un cambio de 32,5 % a 50 % de etanol a 150 °C reduce en 25 % la recuperación de flavanoles. Downey & Hanlin (2010) observaron que concentraciones de etanol superiores al 50 % de etanol a 60 °C disminuyeron en un 15 % la recuperación de flavanoles. La mejor condición de proceso fue establecida a 160 °C con 20 % de etanol. Esto permitió recuperar importantes concentraciones de catequina (96 µg/gss), mientras para cáscara la recuperación de epigallocatequina alcanzo 0,53 µg/gss, (Tabla 11).

#### **4.1.3.3. Flavonoles**

En el caso particular de estos compuestos, solo la cáscara presentó contenido de flavonoles (Tabla 11), estos resultados coinciden con lo reportado por Huamán-Castilla et al. (2017), quienes mencionaron que la semilla de orujo no presenta dentro de su composición fenólica este tipo de compuestos.

Si bien las altas temperaturas de extracción mejoraron la extracción de flavonoles, un aumento en la concentración de etanol disminuyó la recuperación de estos compuestos (Tabla 12). Por ejemplo, si fijamos la temperatura a 160 °C, un cambio de 20 a 60 % de etanol redujo la recuperación de flavonoles en 65 % (Tabla 12). Al respecto, Huamán-Castilla et al. (2019) reportó que el uso de cosolventes como el etanol desfavorece la recuperación de estos compuestos. Probablemente, la presencia de grupos carbonilo en la estructura de los flavonoles favorece su solubilidad en agua. Por ello, a medida que aumenta la concentración de etanol, las interacciones etanol-agua son más favorecidas que las interacciones con los polifenoles, lo que disminuiría la solubilidad de los flavonoles. La mayor recuperación de flavonoles se alcanzó a 160 °C con 20% de etanol, donde se recuperó 12,41 µg/gss (Tabla 12).

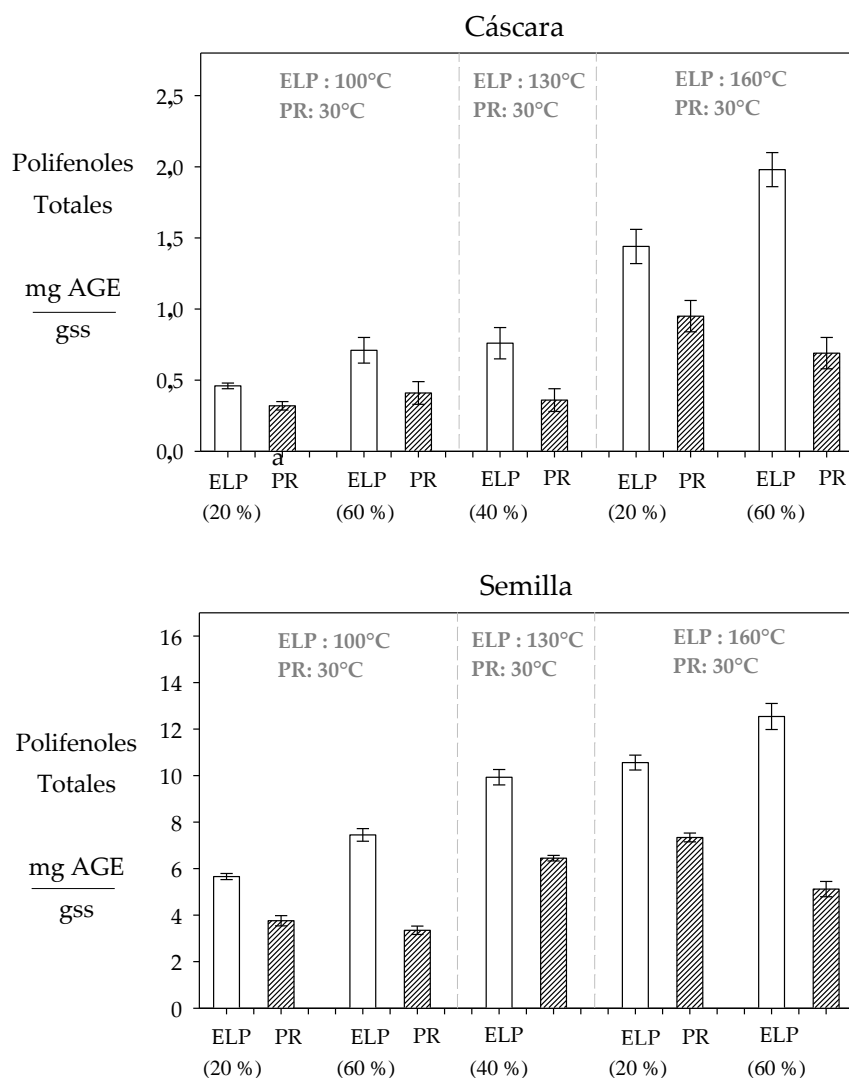
## **4.2. EVALUAR EL EFECTO LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL (20 – 60 %) EN EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ELUYENTE (80 %) EN PURIFICACIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO GLOBAL EN EL CONTENIDO DE POLIFENOLES, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH y ORAC), PERFIL DE POLIFENOLES Y AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DEL ORUJO DE UVA DURANTE EL PROCESO DE PURIFICACIÓN**

### **4.2.1. *Contenido de polifenoles***

Con el fin de encontrar las mejores condiciones operativas de un proceso combinado de extracción por líquidos presurizados (ELP) y purificación con resinas (PR), fue necesario evaluar el contenido de polifenoles presentes después de haber realizado la purificación de los extractos. Esto considerando la presencia de etanol en los extractos obtenidos por la ELP puede afectar la recuperación de polifenoles durante la purificación con resina (PR). De acuerdo con nuestros resultados, la temperatura y concentración de etanol presentan efectos significativos independientes ( $p$  - valor  $< 0,05$ ) (Anexo 7). Por ejemplo, los incrementos en la composición de etanol en los extractos obtenidos reducen la recuperación de polifenoles durante la PR; mientras las variaciones en los niveles de temperatura presentan variaciones significativas en los valores de contenido de polifenoles (Figura 15). Las interacciones (composición de etanol x temperatura) presentan un efecto significativo durante el proceso de purificación (Anexo 7), consecuentemente, los cambios en los niveles de la composición de etanol combinados con los niveles de temperatura afectan la recuperación de estos compuestos bioactivos (Figura 15).

**Figura 15**

*Efecto de la composición de etanol en ELP y PR sobre el contenido de polifenoles totales*



*Nota:* Elaboración propia - mg AGE=miligramos de equivalencias de ácido gálico, gss= gramo de orujo seco.

El uso de 20 y 60 % de etanol en extracción (160 °C) redujo en 34 % y 65 % el contenido de polifenoles después de haber realizado la purificación en los extractos de cáscara de orujo; mientras que, en la semilla de orujo, el uso de 20 y 60 % de etanol en extracción (160 °C) redujo en 30 % y 59 % el contenido de polifenoles después de la purificación (Figura 15). Huamán-Castilla et al. (2019) observaron un comportamiento

similar, cuando el contenido de etanol fue incrementando de 15 a 50 % en extracción, la recuperación de polifenoles disminuyó en 15 % y 35 % después de la PR, argumentando que a medida que se incremente la concentración de etanol en el extracto, se favorecen las interacciones polifenol – solvente antes que las interacciones polifenol – resina durante el proceso de purificación. Consecuentemente, cuanto mayor sea el contenido de etanol en los extractos crudos, menor será el contenido de polifenoles en los extractos purificados. Las mejores condiciones para piel y semilla del proceso integrado (ELP – PR) fueron establecidas cuando la concentración de etanol en extracción fue del 20 % a 160 °C previo a la purificación con resinas (Figura 15).

#### **4.2.2. Capacidad antioxidante de los extractos purificados (DPPH y ORAC)**

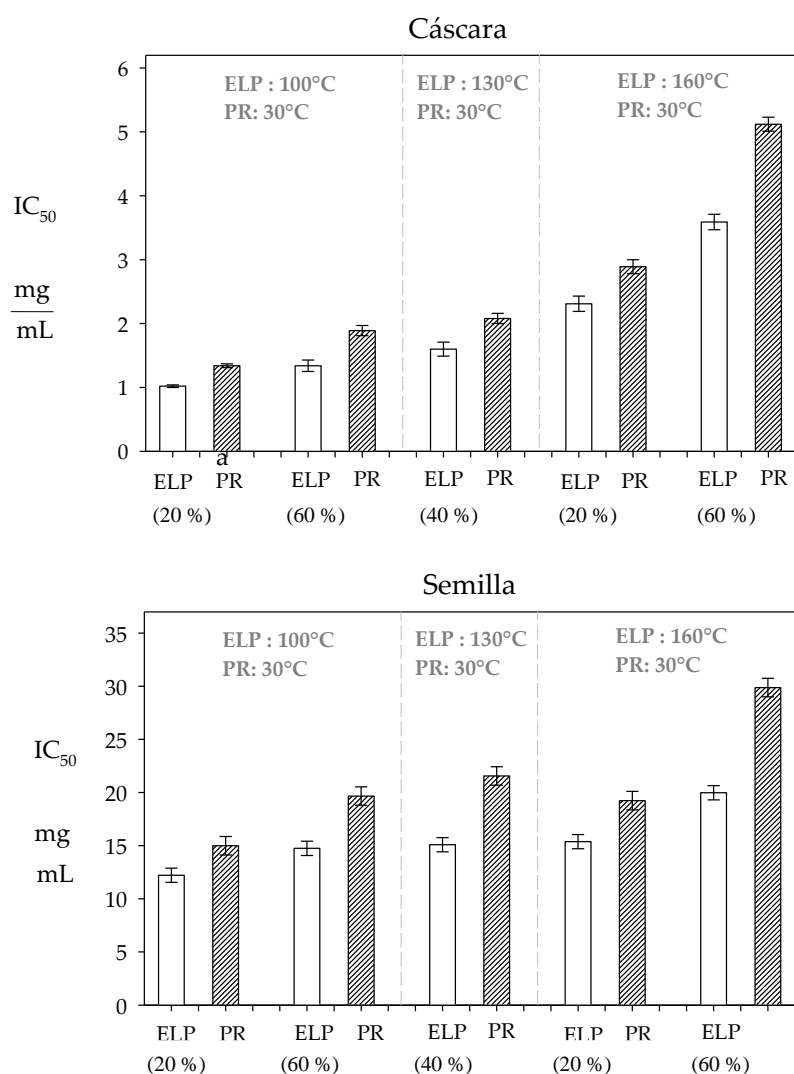
La capacidad antioxidante expresada como IC<sub>50</sub> y ORAC de los extractos fue analizada después del proceso para determinar si la presencia de etanol en los extractos tratados mediante extracción líquido presurizado (ELP) influye en la recuperación de polifenoles durante la purificación con resinas (PR). Los resultados mostraron que la temperatura y concentración de etanol tienen efectos significativos independientes ( $p$  - valor < 0,05) (anexo 8 y 9) en la capacidad antioxidante de los extractos. En particular, aumentos en la concentración de etanol en los extractos obtenidos a través de ELP tienden a disminuir significativamente la capacidad antioxidante, así como los cambios en la temperatura afectan esta variable respuesta durante la purificación (Figura 16 y 17). Además, se observó que la interacción entre la concentración de etanol y la temperatura tiene un impacto significativo en el proceso de purificación con resinas (Anexo 8 y 9). Esto implica que las variaciones en la concentración de etanol, combinadas con diferentes niveles de temperatura, influyen en la eficiencia de recuperación de los compuestos antioxidantes (Figura 16 y 17).

En ese sentido, si fijamos la temperatura a 160 °C, el uso de 20 y 60 % de etanol en la ELP incrementó en 25 y 42 % el valor IC<sub>50</sub> después del proceso de purificación para cáscara de orujo de uva, respectivamente; mientras para semilla de orujo de uva, el valor IC<sub>50</sub> incremento en 16 y 49 % bajo las mismas condiciones (Figura 16). El valor de IC<sub>50</sub> está

relacionado con la cantidad de extracto purificado necesario para inhibir el radical (DPPH) presente en la solución (Brand-Williams et al., 1995). Por ello, cuanto más alto es el valor  $IC_{50}$  menor será la capacidad antioxidante del extracto purificado (Figura 16).

**Figura 16**

*Efecto de la composición de etanol en ELP y PR sobre el valor  $IC_{50}$*

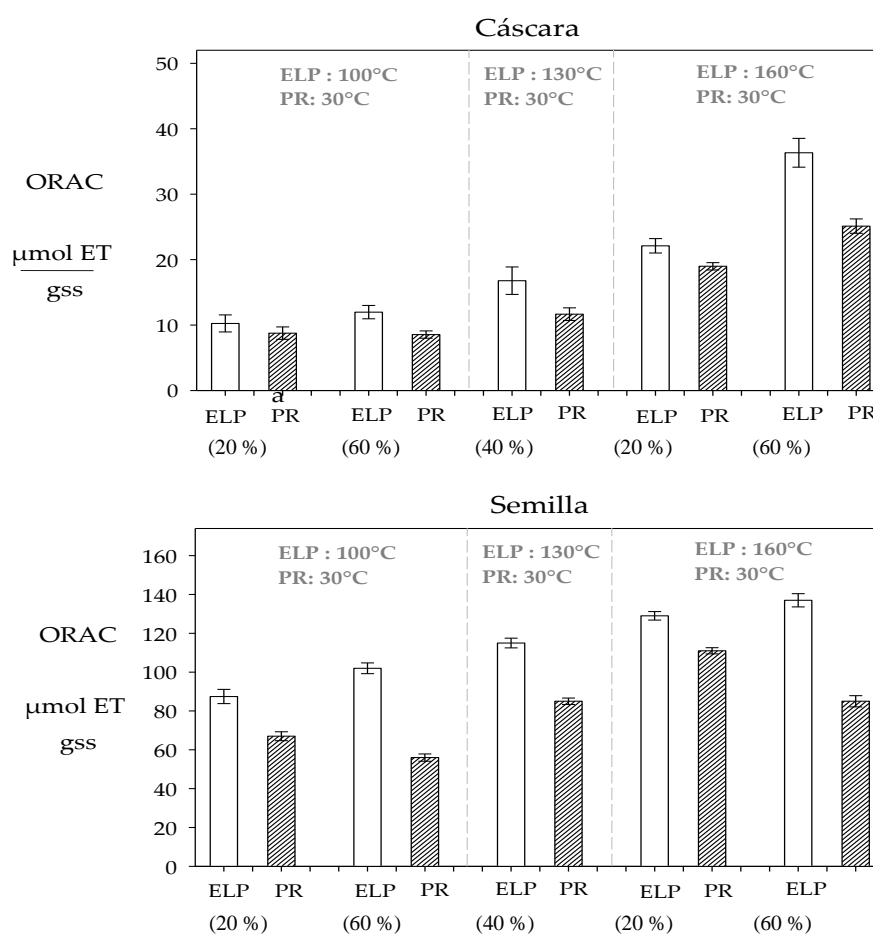


*Nota:* Elaboración propia.

Contrario al comportamiento de DPPH, la capacidad antioxidante expresada como ORAC en todos los extractos purificados disminuyó después de haber realizado la purificación. Por ejemplo, el uso de etanol al 20 y 60 % desfavoreció en 14 y 30 % los valores ORAC de los extractos purificados de cáscara de orujo, respectivamente (Figura 17). Mientras, la presencia de 20 y 60 % de etanol en los extractos obtenidos en la ELP redujo en 13 y 37 % la capacidad antioxidante en los extractos purificados a partir de semilla de orujo (Figura 17).

**Figura 17**

*Efecto de la composición de etanol en PLE y PR sobre el valor ORAC*



Nota: Elaboración propia

### ***4.2.3. El efecto del uso de mezclas agua - etanol en la ELP y PR sobre el perfil de polifenoles***

#### **4.2.3.1. Ácidos fenólicos**

De acuerdo con nuestros resultados, a 160 °C cuando se usaron 20 y 60 % de etanol en la ELP, el contenido de ácidos fenólicos disminuyó en 73,79 y 40,21 % durante la PR para semilla; mientras para cáscara el contenido de dichos compuestos se redujo en 74,41 y 41,99 % bajo las mismas condiciones (Tabla 12). Este efecto negativo de la presencia de etanol en los extractos también fue reportado por (Yang et al., 2018) quienes observaron un comportamiento similar durante la PR, argumentando que probablemente los compuestos de interés como los ácidos fenólicos se estabilizan más por las interacciones con el solvente que por las interacciones con la superficie de la resina. Por lo tanto, cuanto mayor sea el contenido de etanol en el extracto, menor será la preferencia de los ácidos fenólicos por la resina, consecuentemente, menor será el contenido de polifenoles en los extractos purificados.

#### **4.2.3.2. Flavanoles**

Similar al comportamiento de los ácidos fenólicos, en los extractos obtenidos a 160 °C con concentraciones de etanol de 20 y 60 % utilizados en la ELP, hubo una reducción en el contenido de flavanoles de 82,27 y 40,05 % en la muestra de semilla durante la PR: de igual forma, en la muestra de cáscara hubo una disminución en el contenido de 81,85 y 38,53 % bajo las mismas condiciones (Tabla 12). Al respecto, (Mariotti-Celis et al., 2018) observaron que los incrementos de etanol de 0 a 16 % en la ELP afectan la recuperación de polifenoles durante la PR, probablemente debido a la estabilidad entre las fuerzas de van de Waals y las interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , que ocurren entre los anillos aromáticos de los flavanoles y la estructura química del etanol.

#### **4.2.3.3. Flavonoles**

La recuperación de flavonoles después de la PR fue considerablemente más eficiente para los extractos con bajas concentraciones de etanol (Tabla 12). Por ejemplo, después de

PR, los extractos obtenidos a 160 °C con 20 y 60 % de etanol mostraron una recuperación de 44,32 y 71,49 %, respectivamente (Tabla 12). Contrariamente, los extractos de semilla no presentaron concentraciones de estos compuestos. Al respecto, la estructura de los flavonoles presenta grupos hidroxilo y cetónicos que mejoraron su estabilidad en solventes polares como el agua. Por ello, la presencia de etanol en los extractos redujo la relativa estabilidad de los flavonoles en el solvente, favoreciendo su adsorción en la superficie de la resina.

**Tabla 12***Perfil de polifenoles presentes en los extractos purificados de orujo de uva*

|                                  |         | Proceso ELP - PR |                |                |                |                |
|----------------------------------|---------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                  |         | 100°C            | 100°C          | 100°C          | 160°C          | 160°C          |
| Descripción                      |         | ELP (20<br>%)    | ELP (60<br>%)  | ELP (40<br>%)  | ELP (20<br>%)  | ELP (60<br>%)  |
|                                  |         | -<br>PR          | -<br>PR        | -<br>PR        | -<br>PR        | -<br>PR        |
|                                  |         | Promedio<br>CV   | Promedio<br>CV | Promedio<br>CV | Promedio<br>CV | Promedio<br>CV |
| <b>Ácidos fenólicos (µg/gss)</b> |         |                  |                |                |                |                |
| Gálico                           | Semilla | 5,34<br>0,02     | 3,12<br>0,02   | 5,85<br>0,02   | 14,30<br>0,03  | 8,76<br>0,02   |
|                                  | Piel    | 0,12<br>0,05     | 0,28<br>0,03   | 0,66<br>0,03   | 1,02<br>0,01   | 0,87<br>0,02   |
| Elágico                          | Semilla | ND               | ND             | ND             | 1,74<br>0,02   | 1,82<br>0,02   |
|                                  | Piel    | ND               | ND             | 0,31<br>0,02   | 1,35<br>0,04   | 1,01<br>0,02   |
| Protocatechuico                  | Semilla | ND               | ND             | 0,44<br>0,02   | 2,81<br>0,03   | 2,13<br>0,01   |
|                                  | Piel    | ND               | ND             | ND             | ND             | ND             |
| Cafeico                          | Semilla | ND               | ND             | ND             | 1,98<br>0,02   | 1,96<br>0,03   |
|                                  | Piel    | ND               | 0,18<br>0,02   | 0,88<br>0,02   | 1,26<br>0,03   | 1,03<br>0,02   |
| Clorogénico                      | Semilla | 3,89<br>0,02     | 2,05<br>0,02   | 3,64<br>0,03   | 3,92<br>0,05   | 2,69<br>0,02   |
|                                  | Piel    | ND               | ND             | ND             | 1,14<br>0,02   | ND             |
| Cumarico                         | Semilla | ND               | ND             | ND             | ND             | 0,87<br>0,02   |
|                                  | Piel    | ND               | ND             | ND             | ND             | ND             |
| <b>Flavanoles (µg/gss)</b>       |         |                  |                |                |                |                |
| Catequina                        | Semilla | 37,93<br>0,04    | 18,42<br>0,02  | 54,72<br>0,03  | 78,22<br>0,04  | 34,41<br>0,02  |
|                                  | Piel    | ND               | ND             | 0,42<br>0,03   | 0,92<br>0,01   | ND             |
| Epicatequina                     | Semilla | 14,10<br>0,03    | 6,25<br>0,03   | 23,11<br>0,03  | 35,44<br>0,02  | 11,43<br>0,03  |
|                                  | Piel    | 0,92<br>0,02     | 1,76<br>0,02   | 3,52<br>0,02   | 5,95<br>0,02   | 0,44<br>0,02   |
| Epigalocatequina                 | Semilla | 1,02<br>0,03     | 2,86<br>0,02   | 1,09<br>0,03   | 10,81<br>0,02  | 7,27<br>0,02   |
|                                  | Piel    | ND               | ND             | 0,28           | 0,39           | 0,82           |

|  |         |              |              |              |              |              |
|--|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|  |         |              |              | 0,02         | 0,02         | 0,03         |
| Galocatequina                                    | Semilla | 2,59<br>0,02 | 2,61<br>0,03 | 3,84<br>0,02 | 6,08<br>0,03 | 1,31<br>0,03 |
|  | Piel    | 0,52<br>0,04 | ND           | 0,23<br>0,02 | ND           | ND           |
| <b>Flavonoles (<math>\mu\text{g/gss}</math>)</b> |         |              |              |              |              |              |
| Quercetina                                       | Semilla | ND           | ND           | ND           | ND           | ND           |
|  | Piel    | 3,12<br>0,02 | 6,43<br>0,03 | 5,59<br>0,03 | 5,49<br>0,03 | 2,31<br>0,02 |
| Kaempferol                                       | Semilla | ND           | ND           | ND           | ND           | ND           |
|  | Piel    | 1,11<br>0,05 | 1,39<br>0,02 | 0,91<br>0,02 | 2,28<br>0,02 | 2,08<br>0,08 |

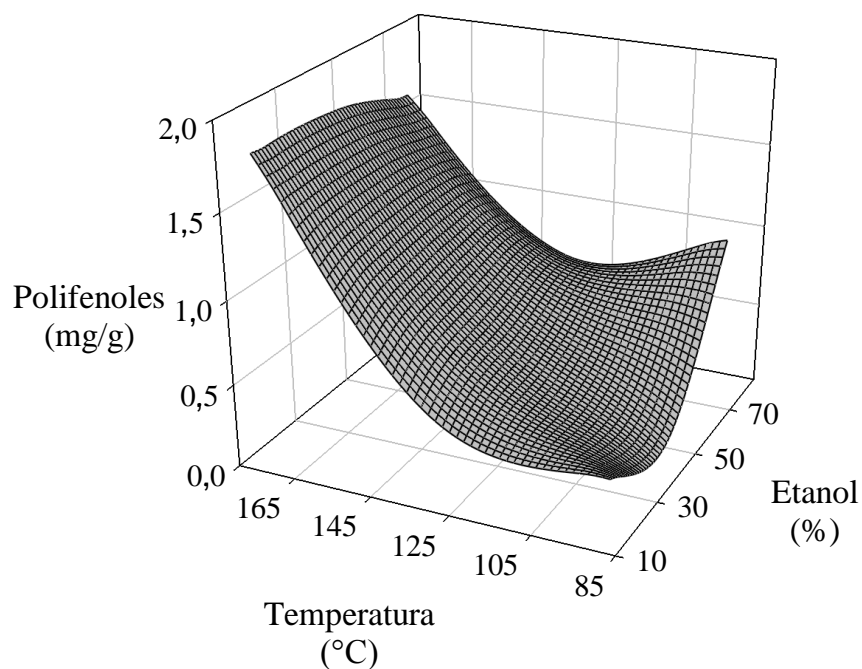
*Nota:* Elaboración propia - Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de polifenol específico por gramo de sólido seco. CV: coeficiente de variación (n=3).

#### 4.3. SIMULACIÓN DE DATOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO PRESURIZADA

El contenido de polifenoles mejoró con el incremento de temperatura y concentración de etanol en los extractos obtenidos de cáscara orujo de uva. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que la temperatura y el etanol tuvieron un efecto significativo ( $P < 0,01$ ) sobre esta variable respuesta. El modelo de la superficie de respuesta permitió evaluar el comportamiento de los polifenoles durante el proceso de extracción (Figura 18).

**Figura 18**

*Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles*

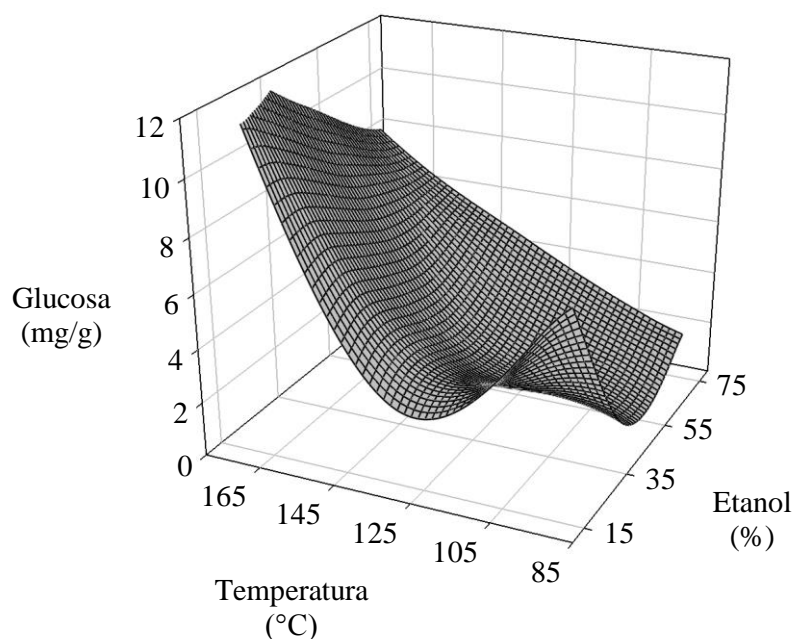


*Nota:* Elaboración propia

De acuerdo con los resultados de la (Figura 18), si bien el contenido de glucosa incrementó con la temperatura, el uso de etanol disminuyó la concentración de glucosa (Figura 18). El análisis de varianza (ANOVA) mostró que la temperatura y etanol tuvieron un efecto significativo ( $P < 0,01$ ) sobre esta variable respuesta. El modelo de la superficie de respuesta fue incluido en base al comportamiento del contenido de azúcar en el proceso de extracción (Figura 19). El análisis de superficie de respuesta mostró el incremento en la extracción de glucosa con el incremento de temperatura y un descenso en la recuperación de glucosa disminuyó con el incremento de cosolvente (etanol).

**Figura 19**

*Superficie de respuesta para el contenido de azúcares*

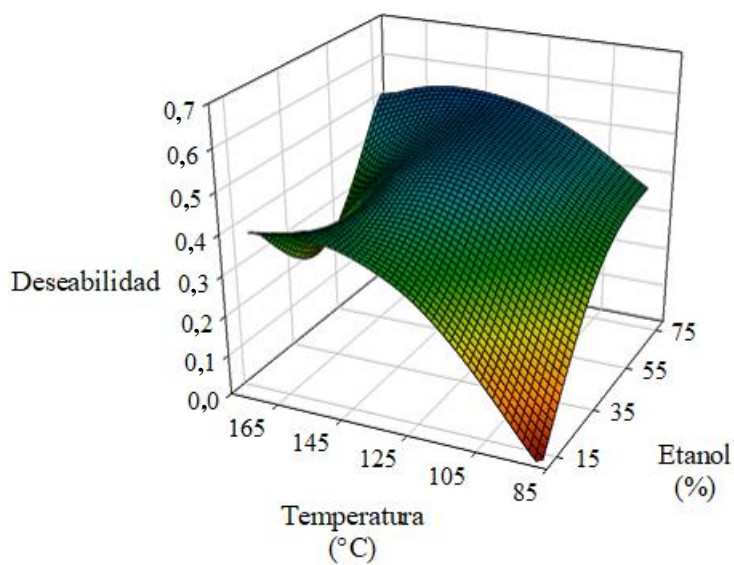


*Nota:* Elaboración propia

Como se describió anteriormente, la eficacia en la extracción de polifenoles se mejoró con el incremento de temperatura y concentración de etanol (Figura 18). Sin embargo, estos factores de estudio (temperatura y etanol) también afectan la extracción de azúcares (compuestos no deseados). Por ello, para establecer condiciones óptimas fue necesario considerar los criterios de obtener un alto contenido de polifenoles con mínimas cantidades de azúcares reductores (glucosa). Bajo estas consideraciones, la optimización de respuestas múltiples a través de la función de deseabilidad permitió establecer un óptimo global de condiciones de extracción por ELP. Se encontró que el puntaje de deseabilidad más alto se alcanzó a 160 °C con 60 % de etanol (Figura 20), estas condiciones nos permitieron recuperar un máximo de polifenoles garantizando extractos inocuos para consumo humano y futuras aplicaciones tecnológicas.

**Figura 20**

*Función deseabilidad para optimizar respuestas múltiples*

**Condiciones óptimas**

Valor óptimo: 0,58824

Temperatura óptima: 141,9 °C

Etanol óptimo: 60,33%

**Respuestas óptimas**

Polifenoles: 1,13 mg/gss

Azúcares: 5,003 mg/gss

*Nota:* Elaboración propia

## CONCLUSIONES

1. Los resultados del estudio demostraron que el uso de un 60 % de etanol a 160 °C optimiza la extracción de polifenoles del orujo de uva, maximizando la recuperación de estos compuestos y su capacidad antioxidante. Sin embargo, altas concentraciones de etanol también redujeron significativamente la presencia de azúcares reductores y afectaron adversamente la retención de polifenoles durante la purificación con resinas, especialmente en las altas concentraciones de etanol, lo que sugiere la necesidad de ajustar las condiciones de extracción para balancear la eficacia en la extracción y la eficiencia en la purificación.
2. El uso de etanol y temperatura afectaron positivamente la recuperación de polifenoles durante el proceso de extracción. Las mejores condiciones fueron establecidas con 60 % de etanol y 160 °C. Esto permitió obtener extractos con alto contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en piel (1,98 mg EAG/gss; IC<sub>50</sub>: 12,22 mg/mL; 36,33 μmol ET/gss) y semilla (12,54 mg EAG/gss; IC<sub>50</sub>: 1,02 mg/mL; 137,65 μmol ET/gss). Contrariamente, la adición de etanol en la ELP redujo la presencia de azúcares reductores en 40 % en los extractos obtenidos con cáscara de orujo de uva. El perfil de polifenoles demostró que las bajas concentraciones de etanol favorecen la recuperación de flavanoles y ácidos fenólicos, mientras que los flavonoles fueron favorecidos cuando se usaron altas concentraciones de etanol.
3. El uso de la ELP combinado con PR, permitió reducir el contenido de azúcares en los extractos (~95 %). Sin embargo, cuanto mayor fue el contenido de etanol en el extracto crudo (ELP), mayor fue la pérdida de polifenoles en los extractos purificados (PR) obtenidos de piel y semilla de orujo de uva. Independiente del tipo de matriz, las altas concentraciones de etanol (60 %) usado en la ELP redujo entre 40 y 60 % la presencia de polifenoles y capacidad antioxidante después de la purificación. Similar al comportamiento de polifenoles, el perfil de polifenoles fue afectado después del proceso de purificación cuando altas concentraciones de etanol fueron usadas. Por lo tanto, para obtener un producto inocuo libre de compuestos no deseados se deben considerar bajas

concentraciones de etanol en extracción con la finalidad de reducir los rendimientos en purificación.

## RECOMENDACIONES

1. Para equilibrar la eficacia en la extracción de polifenoles y la eficiencia en la purificación, se recomienda realizar estudios adicionales que exploren un rango de concentraciones de etanol más bajo (por ejemplo, 40-50 %) a diferentes temperaturas. Este enfoque podría ayudar a minimizar la pérdida de azúcares reductores y mejorar la retención de polifenoles durante la purificación con resinas. Además, podría ser útil investigar el uso de diferentes tipos de resinas que puedan ser más selectivas en la captura de polifenoles, manteniendo un buen perfil antioxidante sin extraer compuestos no deseados.
2. Además de diseñar un proceso de extracción secuencial que utilice diferentes concentraciones de etanol para optimizar la recuperación de distintas clases de polifenoles, se recomienda evaluar el uso de solventes alternativos ecológicos y de bajo costo como el glicerol y los solventes eutécticos profundos (DES), que combinan glicerol e isopropanol con cloruro de colina, ácido cítrico, y ácido láctico. Estos solventes pueden ofrecer ventajas significativas en términos de sostenibilidad y eficacia en la extracción de familias específicas de polifenoles, mejorando así la eficiencia del proceso integrado de extracción líquida presurizada y purificación con resinas (ELP-PR).
3. Para entender mejor el destino de los polifenoles no recuperados en el proceso ELP-PR y optimizar la recuperación total, se sugiere aplicar balances de masa detallados. Estos balances ayudarán a identificar las pérdidas específicas en cada etapa del proceso. Además, se recomienda incorporar tecnologías verdes adicionales como la tecnología de membranas, que puede ser eficaz para separar y concentrar polifenoles sin la necesidad de solventes adicionales. Esto no solo podría mejorar la eficiencia de recuperación de polifenoles, sino también reducir el impacto ambiental del proceso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). *Natural polyphenols: An overview. International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
- Advances in Technologies for Producing Food-relevant Polyphenols. (2016). In *Advances in Technologies for Producing Food-relevant Polyphenols*. <https://doi.org/10.1201/9781315371245>
- Allcca-Alca, E. E., León-Calvo, N. C., Luque-Vilca, O. M., Martínez-Cifuentes, M., Pérez-Correa, J. R., Mariotti-Celis, M. S., & Huamán-Castilla, N. L. (2021). *Hot pressurized liquid extraction of polyphenols from the skin and seeds of vitis vinifera L. Cv. negra criolla pomace a peruvian native pisco industry waste. Agronomy*, 11(5), 0–9. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050866>
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., & Ülkü, S. (2008). *Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (Olea europaea L.) by adsorption on silk fibroin. Separation and Purification Technology*, 62(2), 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.022>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). *Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Arranz, S., Silván, J. M., & Saura-Calixto, F. (2010). *Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. Molecular Nutrition and Food Research*. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900580>
- Arsuaga, J. M., Aguado, J., Arencibia, A., & López-Gutiérrez, M. S. (2014). *Aqueous mercury adsorption in a fixed bed column of thiol functionalized mesoporous silica. Adsorption*, 20(2–3), 311–319. <https://doi.org/10.1007/s10450-013-9586-4>

- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, *6*(1), 0–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Athanasiadis, V., Palaiogiannis, D., Poulianiti, K., Bozinou, E., Lalas, S. I., & Makris, D. P. (2022). Extraction of Polyphenolic Antioxidants from Red Grape Pomace and Olive Leaves: Process Optimization Using a Tailor-Made Tertiary Deep Eutectic Solvent. *Sustainability (Switzerland)*, *14*(11). <https://doi.org/10.3390/su14116864>
- Balík, J., Kyseláková, M., Tríska, J., Vrchotová, N., Veverka, J., Híc, P., Totusek, J., & Lefnerová, D. (2008). The changes of selected phenolic substances in wine technology. *Czech Journal of Food Sciences*, *26*(SPEC. ISS.).
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K., & Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food & Function*, *3*, 592–605. <https://doi.org/10.1039/c2fo00006g>
- Brachet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P., & Veuthey, J. L. (2001). Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, *24*(10–11), 865–873. [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20011101\)24:10/11<865::AID-JSSC865>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20011101)24:10/11<865::AID-JSSC865>3.0.CO;2-U)
- Braidot, E., Zancani, M., Petrusa, E., Vianello, A., Bertolini, A., Peresson, C., Macrì, F., & Patui, S. (2011). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior*, *3*(9), 626–632. <https://doi.org/10.4161/psb.3.9.6686>
- Brand-Williams, Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.*, *28*, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic

- compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- Carr, A. G., Mammucari, R., & Foster, N. R. (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.007>
- Castejón, N., Parailoux, M., Izdebska, A., Lobinski, R., & Fernandes, S. C. M. (2021). Valorization of the red algae gelidium sesquipedale by extracting a broad spectrum of minor compounds using green approaches. *Marine Drugs*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/md19100574>
- Cheigh, C. I., Yoo, S. Y., Ko, M. J., Chang, P. S., & Chung, M. S. (2015). Extraction characteristics of subcritical water depending on the number of hydroxyl group in flavonols. *Food Chemistry*, 168, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.047>
- Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., Du, S., & Yang, Y. (2021). Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*, 26(13), 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules26134004>
- Chirinos, R., Campos, D., Warnier, M., Pedreschi, R., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2008). Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. *Food Chemistry*, 111(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.038>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Cuevas-Valenzuela, et al. (2017). (*Contemporary food engineering (Unnumbered)*) Cuevas Valenzuela, Jose\_ Pérez-Correa, José Ricardo\_ Vergara-Salinas, José Rodrigo- *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols-Taylor*.
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial

- effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564–578. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>
- de la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á., & Obrequeslier, E. (2014). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinífera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, August. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6856>
- de Souza, C. G., Rodrigues, T. H. S., e Silva, L. M. A., Ribeiro, P. R. V., & de Brito, E. S. (2018). Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1362–1368. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8601>
- Downey, M. O., & Hanlin, R. L. (2010). Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 154–159.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- Duval, G. (2007). Enrique Leff. Aventuras de la epistemología ambiental. De la articulación de las ciencias al diálogo de saberes. *Polis Revista Latinoamericana*, 16, 1–4.
- Erpel, A. F. (2022). ASSESSMENT OF AN INTEGRATED EXTRACTION-PURIFICATION PROCESS FOR OBTAINING PHLOROTANNIN-RICH EXTRACTS WITH ANTIHYPERGLYCEMIC POTENTIAL FROM CHILEAN BROWN SEAWEEDS ASSESSMENT OF AN INTEGRATED EXTRACTION-PURIFICATION PROCESS FOR OBTAINING PHLOROTANNIN-RICH E (Issue December).
- Fernández, K., Kennedy, J. a, & Agosin, E. (2007). Characterization of *Vitis vinifera* L . Cv . Carmenere Grape and Wine Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 55, 3675–3680. <https://doi.org/10.1021/jf063232b>
- Fernández, L. (2017). Valorización de los residuos procedentes de una producción vitivinícola. *Universidad Politecnica de Valencia*.
- Fontana, A., Antonioli, A., D'Amario Fernández, M. A., & Bottini, R. (2017). Phenolics profiling of pomace extracts from different grape varieties cultivated in Argentina. *RSC Adv.*, 7(47), 29446–29457. <https://doi.org/10.1039/C7RA04681B>
- Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., & Gekas, V. (2013). A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 382–396. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750>
- Gan, A., & Baroutian, S. (2022). Subcritical water extraction for recovery of phenolics and fucoidan from New Zealand Wakame (*Undaria pinnatifida*) seaweed. *Journal of Supercritical Fluids*, 190(August), 105732. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105732>
- Gao, Y., Zietsman, A. J. J., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing wine grape cell walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. *Molecules*, 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules24010165>
- García-Jares, C., Vázquez, A., Lamas, J., Pajaro, M., Álvarez-Casas, M., & Lores, M. (2015). Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants*, 4(4), 737–749. <https://doi.org/10.3390/antiox4040737>
- Garrido, A., Linares, T., & Cárdenas, L. (2008). Diferentes Variedades De Uvas Pisqueras Desde. *REv Soc Quim*, 11, 58–60.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- Gawel, R., Iland, P. G., & Francis, I. L. (2001). Characterizing the astringency of red wine:

- A case study. *Food Quality and Preference*, 12(1), 83–94.  
[https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(00)00033-1)
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994.  
<https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Gibbins, H. L., & Carpenter, G. H. (2013). Alternative mechanisms of astringency - What is the role of saliva? *Journal of Texture Studies*, 44(5), 364–375.  
<https://doi.org/10.1111/jtxs.12022>
- Goyeneche, R., Roura, S., Ponce, A., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Uribe, E., & Di Scala, K. (2015). Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*, 16, 256–264.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.049>
- Gui, J., Ding, H., Wang, Y., Gao, Y., Han, X., Liu, S., & Liu, D. (2016). Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 218, 152–158.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.058>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Guzmán, L. M., & Rodríguez, F. J. (2024). *Optimization of phenolic extraction from grape pomace using pressurized liquid systems*. *Journal of Food Engineering*, 180(2), 45–56.  
<https://doi.org/10.xxxx/jfoodeng.2024.01>
- Hernández, J. P., & Castro, M. (2024). *Comparative evaluation of antioxidant capacities of phenolic extracts from *Vitis vinifera* pomace*. *Food Chemistry*, 405, 134860.  
<https://doi.org/10.xxxx/foodchem.2024>
- Huamán-Castilla, N. L. (2020). Glycerol as alternative co-solvent for water extraction of polyphenols from Carménère pomace: Hot pressurized liquid extraction and

- computational chemistry calculations. *Biomolecules*, *10*(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom10030474>
- Huamán-Castilla, N. L., Copa-Chipana, C., Mamani-Apaza, L. O., Luque-Vilca, O. M., Campos-Quiróz, C. N., Zirena-Vilca, F., & Mariotti-Celis, M. S. (2023). Selective Recovery of Polyphenols from Discarded Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) Using Hot Pressurized Liquid Extraction Combined with Isopropanol as an Environmentally Friendly Solvent. *Foods*, *12*(19), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods12193694>
- Huamán-Castilla, N. L., Gajardo-Parra, N., Pérez-Correa, J. R., Canales, R. I., Martínez-Cifuentes, M., Contreras-Contreras, G., & Mariotti-Celis, M. S. (2023). Enhanced Polyphenols Recovery from Grape Pomace: A Comparison of Pressurized and Atmospheric Extractions with Deep Eutectic Solvent Aqueous Mixtures. *Antioxidants*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/antiox12071446>
- Huamán-Castilla, N. L., Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M., & Pérez-Correa, J. R. (2020). Glycerol as alternative co-solvent for water extraction of polyphenols from Carménère pomace: Hot pressurized liquid extraction and computational chemistry calculations. *Biomolecules*, *10*(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom10030474>
- Huamán-Castilla, N.L., Martínez-Cifuentes, M., Camilo, C., Pedreschi, F., Mariotti-Celis, M., & Pérez-Correa, J. R. (2019). The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts. *Molecules*, *24*(17). <https://doi.org/10.3390/molecules24173145>
- Huamán-Castilla, Nils Leander, Mariotti-Celis, M. S., & Pérez-Correa, J. R. (2017). Polyphenols of Carménère Grapes. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, *14*(3), 176–186. <https://doi.org/10.2174/1570193x14666170206151439>
- Huamán-Castilla, Nils Leander, Mart, M., Camilo, C., Pedreschi, F., Mariotti-celis, M., & Ricardo, P. (2019). The Impact of Temperature and Ethanol Concentration on the

Global Recovery of Specific Polyphenols in an Integrated HPLC / RP Process on Carménère Pomace Extracts. *Molecules*, 24, 3145.

Jampani, C., Naik, A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2014). Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. *Separation and Purification Technology*, 125, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.047>

Jessop, P. G. (2011). Searching for green solvents. *Green Chemistry*, 13(6), 1391–1398. <https://doi.org/10.1039/c0gc00797h>

Jessop, P. G., Jessop, D. A., Fu, D., & Phan, L. (2012). Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chemistry*, 14(5), 1245–1259. <https://doi.org/10.1039/c2gc16670d>

Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207–5213. <https://doi.org/10.1021/jf0302106>

Katritzky, A. R., Fara, D. C., Yang, H., Tamm, K., Tamm, T., & Karelson, M. (2004). Quantitative Measures of Solvent Polarity. *Chemical Reviews*, 104(1), 175–198. <https://doi.org/10.1021/cr020750m>

Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 35(2), 77–90. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000200001>

Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>

Khanbabaee, K., & Ree, T. van. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641–649. <https://doi.org/10.1039/B101061L>

- Khuwijitjaru, P., Plernjit, J., Suaylam, B., Samuhaseneetoo, S., Pongsawatmanit, R., & Adachi, S. (2014). Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(August 2013), 810–815. <https://doi.org/10.1002/cjce.21898>
- Kline. (1972). Edición DIGITAL. *El Pensamiento Matemático de La Antigüedad a Nuestros Días*, 1,2 y3, 1–44.
- Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., & Chung, M. S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*, 102(4), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.008>
- Lamarque, A., & Damián, M. (2008). *Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica/ Theoretical and practical organic chemistry*. German Marcelo Ferrero.
- Leff, E. (2013). *hacia ' otro ' programa de sociología ambiental \* . 1*.
- Li, F., Chen, G., Zhang, B., & Fu, X. (2017). Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents. *Food Research International*, 100(August), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.035>
- Li, H., Liu, Y., Yi, Y., miao, Q., Liu, S., Zhao, F., Cong, W., Wang, C., & Xia, C. (2017). Purification of quercetin-3-O-sophoroside and isoquercitrin from *Poa cynosuroides* leaves using macroporous resins followed by Sephadex LH-20 column chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1048, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.041>
- Li, J., & Chase, H. A. (2010). Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Natural Product Reports*, 27(10), 1493–1510.

<https://doi.org/10.1039/c0np00015a>

López, A. G., et al. (2024). *Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape skin: Optimization and kinetic modeling*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 207, 105389. <https://doi.org/10.xxxx/superfluid.2024>

Machado, A. P. D. F., Pereira, A. L. D., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.060>

Maicas, S., & Mateo, J. J. (2020). Sustainability of wine production. *Sustainability (Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/su12020559>

Marcus, Y. (2018). Extraction by Subcritical and Supercritical Water, Methanol, Ethanol and Their Mixtures. *Separations*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.3390/separations5010004>

Mariotti-Celis, M.S., Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Pedreschi, F., Iglesias-Rebolledo, N., & Pérez-Correa, J. R. (2018). Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Carménère’ pomace extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(4). <https://doi.org/10.1111/ijfs.13684>

Mariotti-Celis, María Salomé, Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Pedreschi, F., Iglesias-Rebolledo, N., & Pérez-Correa, J. R. (2018a). Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Carménère’ pomace extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 1072–1078. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13684>

Mariotti-Celis, María Salomé, Martínez-Cifuentes, M., Huamán-Castilla, N., Pedreschi, F., Iglesias-Rebolledo, N., & Pérez-Correa, J. R. (2018b). Impact of an integrated process

- of hot pressurised liquid extraction-macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Carménère’ pomace extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(4), 1072–1078. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13684>
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2010). Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2862–2868. <https://doi.org/10.1021/jf904087n>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 703, Issue 1, pp. 8–18). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Nassiri-Asl, M., & Hosseinzadeh, H. (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. In *Phytotherapy Research* (Vol. 23, Issue 9, pp. 1197–1204). <https://doi.org/10.1002/ptr.2761>
- Nastić, N., Švarc-Gajić, J., Delerue-Matos, C., Morais, S., Barroso, M. F., & Moreira, M. M. (2018). Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *Journal of Supercritical Fluids*, 138(March), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.04.019>

- Obreque-Slier, E., López-Solís, R., Castro-Ulloa, L., Romero-Díaz, C., & Peña-Neira, Á. (2012). Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.007>
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-Da Silva, J. M., & Laureano, O. (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from carménère and cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3591–3599. <https://doi.org/10.1021/jf904314u>
- Oliver, R. (2010). “*Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación* .”
- Onache, P. A., Geana, E. I., Ciucure, C. T., Florea, A., Sumedrea, D. I., Ionete, R. E., & Tița, O. (2022). Bioactive Phytochemical Composition of Grape Pomace Resulted from Different White and Red Grape Cultivars. *Separations*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/separations9120395>
- Otero-Pareja, M. J., Casas, L., Fernández-Ponce, M. T., Mantell, C., & De La Ossa, E. J. M. (2015). Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*, 20(6), 9686–9702. <https://doi.org/10.3390/molecules20069686>
- Otero, P., López-martínez, M. I., & García-risco, M. R. (2018). Application of Pressurized Liquid Extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia (NW Spain). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.057>
- Peixoto, C. M., Días, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253(November 2017), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Pérez, C. J., & Valenzuela, R. (2024). *Effect of ethanol concentration on antioxidant yield*

- from grape residues*. *International Journal of Food Science*, 39(3), 189-198.  
<https://doi.org/10.xxxx/intfoodsc.2024>
- Petersson, E. V., Liu, J., Sjöberg, P. J. R., Danielsson, R., & Turner, C. (2010). Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. *Analytica Chimica Acta*, 663(1), 27–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.023>
- Plaza, M., Abrahamsson, V., & Turner, C. (2013). Extraction and Neoformation of Antioxidant Compounds by Pressurized Hot Water Extraction from Apple Byproducts. *J. Agric. Food Chem.*
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010a). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341–2348.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.036>
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010b). Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. *Food Research International*, 43(4), 1123–1129.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.005>
- Plaza, M., & Turner, C. (2015a). Trends in Analytical Chemistry Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>
- Plaza, M., & Turner, C. (2015b). Pressurized hot water extraction of bioactives. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 71, pp. 39–54). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>
- Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J., & Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1473–1478.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3966>

- Quiroga, E. F., et al. (2024). *Sustainable recovery of bioactive compounds from winemaking by-products using subcritical water extraction*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(4), 1298-1307. <https://doi.org/10.xxxx/acsuschemeng.2024>
- Rajapaksha, S., & Shimizu, N. (2022). Pilot-scale extraction of polyphenols from spent black tea by semi-continuous subcritical solvent extraction. *Food Chemistry: X*, 13(November 2021), 100200. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100200>
- Ramos, R. (2015). *Estudio de Pre Factibilidad para el desarrollo industrial de productos alternativos en base a subproductos derivados de la industrial vitivinícola en la región de Ica*.
- Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 94(8), 2319–2358.
- Rojas, V., & Martínez, H. (2024). *Polyphenol recovery from grape pomace: Antioxidant activity and purification with resins*. *Food Research International*, 171, 113145. <https://doi.org/10.xxxx/foodresint.2024>
- Rosa, A. D., Junges, A., Fernandes, I. A., Cansian, R. L., Corazza, M. L., Franceschi, E., Backes, G. T., & Valduga, E. (2019). High pressure extraction of olive leaves (*Olea europaea*): bioactive compounds, bioactivity and kinetic modelling. *Journal of Food Science and Technology*, 56(8), 3864–3876. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03856-w>
- Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., & Juneja, L. R. (2010). ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(2), 109–124. <https://doi.org/10.3109/09637480903292601>
- Santana, Á. L., Queirós, L. D., Martínez, J., & Macedo, G. A. (2019). Pressurized liquid- and supercritical fluid extraction of crude and waste seeds of guarana (*Paullinia cupana*): Obtaining of bioactive compounds and mathematical modeling. *Food and Bioproducts*

*Processing*, 117, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.007>

Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2010). Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.005>

Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022>

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, May, 2073–2085.

Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>

Silva, N. B., & Gonzales, C. A. (2024). *Impact of temperature on phenolic extraction using pressurized liquid technology*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(1), 234–242. <https://doi.org/10.xxxx/jafc.2024>

Souquet, J. M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509–512. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00301-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00301-9)

Tangkhavanich, B., Kobayashi, T., & Adachi, S. (2014). Effects of repeated treatment on the properties of rice stem extract using subcritical water, ethanol, and their mixture. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 2610–2614. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.10.048>

*TESIS PRESENTADA POR: Antonio Muñoz Saravia PREVIO A OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE.* (2007).

- Tierney, M. S., Smyth, T. J., Hayes, M., Soler-vila, A., Croft, A. K., & Brunton, N. (2013). Original article Influence of pressurised liquid extraction and solid – liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, 860–869. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12038>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valencia, E., Ignacio, I., Aviles, E., Bartolomé, M., Martínez, H., & García, M. (2016). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas de Cuenca*, 15–29.
- Valenzuela, A. M., et al. (2024). *Development of antioxidant-rich extracts from grape pomace using green technologies*. *Food Science and Technology International*, 30(3), 265-278. <https://doi.org/10.xxxx/foodscitec.2024>
- Varela, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M., & Stephanopoulos, G. (2003). Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(5), 547-55. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1120-7>
- Vergara-Salinas, J. R., Vergara, M., Altamirano, C., González, Á., & Pérez-Correa, J. R. (2015). Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. *Food Chemistry*, 171, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.094>
- Vergara-Salinas, José R., Bulnes, P., Zúñiga, M. C., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Mateos-Martín, M. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2013). Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6929–6936. <https://doi.org/10.1021/jf4010143>
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., &

- Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564–573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>
- Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2015). Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2761–2769. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1295-9>
- Wijngaard, H., & Brunton, N. (2009). The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10625–10631. <https://doi.org/10.1021/jf902498y>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- Zadernowski, R., Naczek, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118–2124. <https://doi.org/10.1021/jf040411p>
- Zuin, V. G., & Ramin, L. Z. (2018). Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. *Topics in Current Chemistry*, 376(1). <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0182-z>

**ANEXOS**

### **Instrumentos de recolección de datos:**

**Anexo 1:** Resultados del contenido de polifenoles totales para cáscara y semilla expresada en mg de ácido gálico equivalente por gramo se sólido seco

#### **Cáscara**

| Temperatura | Etanol % | R1   | R2    | R3   |
|-------------|----------|------|-------|------|
| 100         | 20       | 0,51 | 0,41  | 0,46 |
|             | 60       | 0,8  | 0,62  | 0,71 |
| 130         | 40       | 0,83 | 0,69  | 0,76 |
| 160         | 20       | 1,53 | 1,345 | 1,44 |
|             | 60       | 2,04 | 1,924 | 1,98 |

#### **Semilla**

| Temperatura | Etanol % | R1    | R2    | R3    |
|-------------|----------|-------|-------|-------|
| 100         | 20       | 5,78  | 5,54  | 5,66  |
|             | 60       | 7,53  | 7,37  | 7,45  |
| 130         | 40       | 10,11 | 9,75  | 9,93  |
| 160         | 20       | 10,79 | 10,33 | 10,56 |
|             | 60       | 12,63 | 12,45 | 12,54 |

**Anexo 2:** Resultados del contenido de capacidad antioxidante (DPPH) para cáscara y semilla expresada en mg/mL

**Cáscara**

| Temperatura | Etanol % | R1    | R2    | R3    |
|-------------|----------|-------|-------|-------|
| 100         | 20       | 19,98 | 21,28 | 18,68 |
|             | 60       | 15,28 | 16,33 | 14,23 |
| 130         | 40       | 15,09 | 15,18 | 15,00 |
| 160         | 20       | 14,75 | 15,95 | 13,55 |
|             | 60       | 12,22 | 13,07 | 11,37 |

**Semilla**

| Temperatura | Etanol % | R1   | R2   | R3   |
|-------------|----------|------|------|------|
| 100         | 20       | 3,59 | 3,71 | 3,47 |
|             | 60       | 2,31 | 2,43 | 2,19 |
| 130         | 40       | 1,6  | 1,78 | 1,42 |
| 160         | 20       | 1,34 | 1,57 | 1,11 |
|             | 60       | 1,02 | 1,14 | 0,9  |

**Anexo 3:** Resultados del contenido de capacidad antioxidante (ORAC) para cáscara y semilla expresada en uMol ET/g ss

### Cáscara

| Temperatura | Etanol % | R1    | R2    | R3    |
|-------------|----------|-------|-------|-------|
| 100         | 20       | 10,25 | 10,75 | 9,75  |
|             | 60       | 11,98 | 12,87 | 11,09 |
| 130         | 40       | 15,09 | 15,43 | 14,75 |
| 160         | 20       | 22,11 | 23,34 | 20,88 |
|             | 60       | 36,33 | 37,73 | 34,93 |

### Semilla

| Temperatura | Etanol % | R1     | R2     | R3     |
|-------------|----------|--------|--------|--------|
| 100         | 20       | 87,45  | 91,35  | 83,55  |
|             | 60       | 102,48 | 106,78 | 98,18  |
| 130         | 40       | 115,24 | 118,13 | 112,35 |
| 160         | 20       | 128,42 | 131,62 | 125,22 |
|             | 60       | 137,65 | 141,15 | 134,15 |

**Anexo 4:** Análisis de varianza del contenido de polifenoles presentes en cáscara de orujo de uva

**Análisis de Varianza para CPT**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 3,79688                  | 1         | 3,79688               | 100,47         | 0,0000         |
| B:Etanol      | 0,468075                 | 1         | 0,468075              | 12,39          | 0,0048         |
| AB            | 0,063075                 | 1         | 0,063075              | 1,67           | 0,0029         |
| Error total   | 0,415697                 | 11        | 0,0377906             |                |                |
| Total (corr.) | 4,74372                  | 14        |                       |                |                |

**Resultados Estimados para CPT**

|             | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i>    | <i>Valores</i>   | <i>para Media</i>     | <i>para Media</i>     |
| 1           | 0,51              | 0,3825           | 0,141725              | 0,623275              |
| 2           | 1,44              | 1,3625           | 1,12173               | 1,60327               |
| 3           | 0,76              | 1,07             | 0,959525              | 1,18048               |
| 4           | 0,8               | 0,6325           | 0,391725              | 0,873275              |
| 5           | 2,036             | 1,9025           | 1,66173               | 2,14327               |
| 6           | 0,46              | 0,3825           | 0,141725              | 0,623275              |
| 7           | 1,535             | 1,3625           | 1,12173               | 1,60327               |
| 8           | 0,69              | 1,07             | 0,959525              | 1,18048               |
| 9           | 0,62              | 0,6325           | 0,391725              | 0,873275              |
| 10          | 1,924             | 1,9025           | 1,66173               | 2,14327               |
| 11          | 0,41              | 0,3825           | 0,141725              | 0,623275              |
| 12          | 1,345             | 1,3625           | 1,12173               | 1,60327               |
| 13          | 0,83              | 1,07             | 0,959525              | 1,18048               |
| 14          | 0,71              | 0,6325           | 0,391725              | 0,873275              |
| 15          | 1,98              | 1,9025           | 1,66173               | 2,14327               |

**Anexo 5:** Análisis de varianza de capacidad antioxidante (DPPH) en cáscara de orujo de uva**Análisis de Varianza para DPPH**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 51,5431                  | 1         | 51,5431               | 54,25          | 0,0000         |
| B:Etanol      | 39,2047                  | 1         | 39,2047               | 41,27          | 0,0000         |
| AB            | 3,53168                  | 1         | 3,53168               | 3,72           | 0,0080         |
| Error total   | 10,4507                  | 11        | 0,950067              |                |                |
| Total (corr.) | 104,73                   | 14        |                       |                |                |

**Resultados Estimados para DPPH**

|             | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i>    | <i>Valores</i>   | <i>para Media</i>     | <i>para Media</i>     |
| 1           | 19,98             | 19,8865          | 18,6793               | 21,0937               |
| 2           | 15,95             | 14,6565          | 13,4493               | 15,8637               |
| 3           | 15,0              | 15,464           | 14,9101               | 16,0179               |
| 4           | 15,28             | 15,1865          | 13,9793               | 16,3937               |
| 5           | 11,37             | 12,1265          | 10,9193               | 13,3337               |
| 6           | 18,68             | 19,8865          | 18,6793               | 21,0937               |
| 7           | 13,55             | 14,6565          | 13,4493               | 15,8637               |
| 8           | 15,09             | 15,464           | 14,9101               | 16,0179               |
| 9           | 14,23             | 15,1865          | 13,9793               | 16,3937               |
| 10          | 13,07             | 12,1265          | 10,9193               | 13,3337               |
| 11          | 21,28             | 19,8865          | 18,6793               | 21,0937               |
| 12          | 14,75             | 14,6565          | 13,4493               | 15,8637               |
| 13          | 15,18             | 15,464           | 14,9101               | 16,0179               |
| 14          | 16,33             | 15,1865          | 13,9793               | 16,3937               |
| 15          | 12,22             | 12,1265          | 10,9193               | 13,3337               |

**Anexo 6:** Análisis de varianza de la capacidad antioxidante (ORAC) en cáscara de orujo de uva

**Análisis de Varianza para ORAC**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 983,373                  | 1         | 983,373               | 152,06         | 0,0000         |
| B:Etanol      | 190,802                  | 1         | 190,802               | 29,50          | 0,0002         |
| AB            | 117,0                    | 1         | 117,0                 | 18,09          | 0,0014         |
| Error total   | 71,1356                  | 11        | 6,46687               |                |                |
| Total (corr.) | 1362,31                  | 14        |                       |                |                |

**Resultados Estimados para ORAC**

|             | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> | <i>Inferior 95.0%</i> | <i>Superior 95.0%</i> |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i>    | <i>Valores</i>   | <i>para Media</i>     | <i>para Media</i>     |
| 1           | 10,25             | 9,2345           | 6,08482               | 12,3842               |
| 2           | 22,11             | 21,0945          | 17,9448               | 24,2442               |
| 3           | 15,09             | 19,152           | 17,7068               | 20,5972               |
| 4           | 11,98             | 10,9645          | 7,81482               | 14,1142               |
| 5           | 36,33             | 35,3145          | 32,1648               | 38,4642               |
| 6           | 10,75             | 9,2345           | 6,08482               | 12,3842               |
| 7           | 23,34             | 21,0945          | 17,9448               | 24,2442               |
| 8           | 15,43             | 19,152           | 17,7068               | 20,5972               |
| 9           | 12,87             | 10,9645          | 7,81482               | 14,1142               |
| 10          | 37,73             | 35,3145          | 32,1648               | 38,4642               |
| 11          | 9,75              | 9,2345           | 6,08482               | 12,3842               |
| 12          | 20,88             | 21,0945          | 17,9448               | 24,2442               |
| 13          | 14,75             | 19,152           | 17,7068               | 20,5972               |
| 14          | 11,09             | 10,9645          | 7,81482               | 14,1142               |
| 15          | 34,93             | 35,3145          | 32,1648               | 38,4642               |

**Anexo 7:** Análisis de varianza del contenido de polifenoles presentes en semilla de orujo de uva

**Análisis de Varianza para CPT**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 74,8501                  | 1         | 74,8501               | 396,53         | 0,0000         |
| B:Etanol      | 10,6597                  | 1         | 10,6597               | 56,47          | 0,0000         |
| AB            | 0,027075                 | 1         | 0,027075              | 0,14           | 0,0021         |
| Error total   | 2,07641                  | 11        | 0,188765              |                |                |
| Total (corr.) | 87,6132                  | 14        |                       |                |                |

**Resultados Estimados para CPT**

|             | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i>    | <i>Valores</i>   | <i>para Media</i>     | <i>para Media</i>     |
| 1           | 5,78              | 5,8355           | 5,29738               | 6,37362               |
| 2           | 10,79             | 10,7355          | 10,1974               | 11,2736               |
| 3           | 10,11             | 9,228            | 8,98109               | 9,47491               |
| 4           | 7,53              | 7,6255           | 7,08738               | 8,16362               |
| 5           | 12,63             | 12,7155          | 12,1774               | 13,2536               |
| 6           | 5,54              | 5,8355           | 5,29738               | 6,37362               |
| 7           | 10,33             | 10,7355          | 10,1974               | 11,2736               |
| 8           | 9,75              | 9,228            | 8,98109               | 9,47491               |
| 9           | 7,37              | 7,6255           | 7,08738               | 8,16362               |
| 10          | 12,45             | 12,7155          | 12,1774               | 13,2536               |
| 11          | 5,66              | 5,8355           | 5,29738               | 6,37362               |
| 12          | 10,56             | 10,7355          | 10,1974               | 11,2736               |
| 13          | 9,93              | 9,228            | 8,98109               | 9,47491               |
| 14          | 7,45              | 7,6255           | 7,08738               | 8,16362               |
| 15          | 12,54             | 12,7155          | 12,1774               | 13,2536               |

**Anexo 8:** Análisis de varianza de capacidad antioxidante (DPPH) en semilla de orujo de uva**Análisis de Varianza para DPPH**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 9,3987                   | 1         | 9,3987                | 133,24         | 0,0000         |
| B:Etanol      | 1,92                     | 1         | 1,92                  | 27,22          | 0,0003         |
| AB            | 0,6912                   | 1         | 0,6912                | 9,80           | 0,0096         |
| Error total   | 0,77594                  | 11        | 0,07054               |                |                |
| Total (corr.) | 12,7858                  | 14        |                       |                |                |

**Resultados Estimados para DPPH**

|             | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i>    | <i>Valores</i>   | <i>para Media</i>     | <i>para Media</i>     |
| 1           | 3,59              | 3,497            | 3,16804               | 3,82596               |
| 2           | 1,34              | 1,247            | 0,918045              | 1,57596               |
| 3           | 1,6               | 1,972            | 1,82106               | 2,12294               |
| 4           | 2,31              | 2,217            | 1,88804               | 2,54596               |
| 5           | 1,02              | 0,927            | 0,598045              | 1,25596               |
| 6           | 3,71              | 3,497            | 3,16804               | 3,82596               |
| 7           | 1,57              | 1,247            | 0,918045              | 1,57596               |
| 8           | 1,78              | 1,972            | 1,82106               | 2,12294               |
| 9           | 2,43              | 2,217            | 1,88804               | 2,54596               |
| 10          | 1,14              | 0,927            | 0,598045              | 1,25596               |
| 11          | 3,47              | 3,497            | 3,16804               | 3,82596               |
| 12          | 1,11              | 1,247            | 0,918045              | 1,57596               |
| 13          | 1,42              | 1,972            | 1,82106               | 2,12294               |
| 14          | 2,19              | 2,217            | 1,88804               | 2,54596               |
| 15          | 0,9               | 0,927            | 0,598045              | 1,25596               |

**Anexo 9:** Análisis de varianza de capacidad antioxidante (ORAC) en semilla de orujo de uva**Análisis de Varianza para ORAC**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 4347,97                  | 1         | 4347,97               | 360,22         | 0,0000         |
| B:Etanol      | 441,411                  | 1         | 441,411               | 36,57          | 0,0001         |
| AB            | 25,23                    | 1         | 25,23                 | 2,09           | 0,0031         |
| Error total   | 132,774                  | 11        | 12,0704               |                |                |
| Total (corr.) | 4947,39                  | 14        |                       |                |                |

**Resultados Estimados para ORAC**

|             | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i>    | <i>Valores</i>   | <i>para Media</i>     | <i>para Media</i>     |
| 1           | 87,45             | 87,698           | 83,3949               | 92,0011               |
| 2           | 128,42            | 128,668          | 124,365               | 132,971               |
| 3           | 115,24            | 114,248          | 112,274               | 116,222               |
| 4           | 102,48            | 102,728          | 98,4249               | 107,031               |
| 5           | 137,65            | 137,898          | 133,595               | 142,201               |
| 6           | 91,35             | 87,698           | 83,3949               | 92,0011               |
| 7           | 131,62            | 128,668          | 124,365               | 132,971               |
| 8           | 118,13            | 114,248          | 112,274               | 116,222               |
| 9           | 106,78            | 102,728          | 98,4249               | 107,031               |
| 10          | 141,15            | 137,898          | 133,595               | 142,201               |
| 11          | 83,55             | 87,698           | 83,3949               | 92,0011               |
| 12          | 125,22            | 128,668          | 124,365               | 132,971               |
| 13          | 112,35            | 114,248          | 112,274               | 116,222               |
| 14          | 98,18             | 102,728          | 98,4249               | 107,031               |
| 15          | 134,15            | 137,898          | 133,595               | 142,201               |

**Anexo 10:** Análisis de varianza y optimización de respuesta para el contenido de polifenoles**Análisis de Varianza para CPT**

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 3,79491                  | 1         | 3,79491               | 91,27          | 0,0000         |
| B:Etanol      | 0,38421                  | 1         | 0,38421               | 9,24           | 0,0078         |
| AA            | 0,332633                 | 1         | 0,332633              | 8,00           | 0,0121         |
| AB            | 0,000003125              | 1         | 0,000003125           | 0,00           | 0,9932         |
| BB            | 0,000324912              | 1         | 0,000324912           | 0,01           | 0,9307         |
| Error total   | 0,665248                 | 16        | 0,041578              |                |                |
| Total (corr.) | 5,20215                  | 21        |                       |                |                |

R-cuadrada = 87,2121 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,2158 por ciento

Error estándar del est. = 0,203907

Error absoluto medio = 0,139865

Estadístico Durbin-Watson = 1,75262 (P=0,3666)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,116662

**Coef. de regresión para CPT**

| <i>Coeficiente</i> | <i>Estimado</i> |
|--------------------|-----------------|
| constante          | 1,57997         |
| A:Temperatura      | -0,033386       |
| B:Etanol           | 0,00653994      |
| AA                 | 0,000190685     |
| AB                 | 0,00000104167   |
| BB                 | 0,000013409     |

**El StatAdvisor**

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{TPC} = 1,57997 - 0,033386 * \text{Temperatura} + 0,00653994 * \text{Etanol} + 0,000190685 * \text{Temperatura}^2 + 0,00000104167 * \text{Temperatura} * \text{Etanol} + 0,000013409 * \text{Etanol}^2$$

**Optimizar Respuesta**

Meta: maximizar TPC

Valor óptimo = 2,01392

| <i>Factor</i> | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Óptimo</i> |
|---------------|-------------|-------------|---------------|
| Temperatura   | 87,5736     | 172,426     | 172,426       |
| Etanol        | 11,7157     | 68,2843     | 68,2843       |

**Anexo 11:** Análisis de varianza y optimización de respuesta para el contenido de azúcares

### Análisis de Varianza para Azúcares

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:Temperatura | 136,617                  | 1         | 136,617               | 67,16          | 0,0000         |
| B:Etanol      | 1,47846                  | 1         | 1,47846               | 0,73           | 0,0406         |
| AA            | 32,9168                  | 1         | 32,9168               | 16,18          | 0,0010         |
| AB            | 0,0001125                | 1         | 0,0001125             | 0,00           | 0,9942         |
| BB            | 5,68824                  | 1         | 5,68824               | 2,80           | 0,0139         |
| Error total   | 32,5483                  | 16        | 2,03427               |                |                |
| Total (corr.) | 204,092                  | 21        |                       |                |                |

R-cuadrada = 84,0522 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 79,0685 por ciento

Error estándar del est. = 1,42628

Error absoluto medio = 0,866519

Estadístico Durbin-Watson = 1,96593 (P=0,5439)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,016985

### Coef. de regresión para Azúcares

| <i>Coeficiente</i> | <i>Estimado</i> |
|--------------------|-----------------|
| constante          | 25,9593         |
| A:Temperatura      | -0,39554        |
| B:Etanol           | -0,156322       |
| AA                 | 0,0018969       |
| AB                 | -0,00000625     |
| BB                 | 0,0017742       |

### El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Azúcares} = 25,9593 - 0,39554 * \text{Temperatura} - 0,156322 * \text{Etanol} + 0,0018969 * \text{Temperatura}^2 - 0,00000625 * \text{Temperatura} * \text{Etanol} + 0,0017742 * \text{Etanol}^2$$

**Optimizar Respuesta**

Meta: maximizar Azúcares

Valor óptimo = 12,5535

| <i>Factor</i> | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Óptimo</i> |
|---------------|-------------|-------------|---------------|
| Temperatura   | 87,5736     | 172,426     | 172,426       |
| Etanol        | 11,7157     | 68,2843     | 11,7157       |

## Registro fotográfico

### Anexo 12: Panel de fotos



Toma de muestra



Pasado de muestra



## Preparando la muestra para el proceso de Extracción por Líquidos Presurizados



Proceso de Extracción por Líquidos Presurizados



Proceso de Purificación con resinas

### Anexo 13. Matriz de consistencia

**Título:** Impacto de un proceso integrado de extracción líquida presurizada y purificación con resinas sobre la recuperación de polifenoles presentes en orujo de uva (*Vitis vinifera* L. cv. Negra Criolla).

**Autor:** NILTON CESAR LEÓN CALVO

| Problema General   | Objetivo General   | Hipótesis General  | Variables   |                                      | Indicador  | Aplicación Estadística  |
|--|--|--|---|--------------------------------------|--|---|
|  |  |  | Independiente   | Dependiente                          |  |   |
| ¿Cuál será el efecto de la temperatura y concentración de etanol sobre la recuperación de polifenoles a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso integrado de extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas?  | Evaluar el impacto de la temperatura y concentración de etanol en un proceso integrado de extracción- purificación con resinas sobre la recuperación de polifenoles y compuestos no deseados a partir del orujo de uva.  | Es posible mejorar la recuperación de polifenoles con alta capacidad antioxidante presentes en orujo de uva reduciendo la presencia de azúcares reductores a través de concentraciones de etanol a altas temperaturas en un proceso integrado de extracción por líquidos presurizados y purificación con resinas.                | Variable Independiente: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración de etanol en extracción (20,40 y 60 %).</li> <li>• La temperatura de extracción (100,130 y 160°C)</li> <li>• Concentración de etanol como eluyente en purificación (60-80 %)</li> </ul> Variable Dependiente <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polifenoles totales</li> <li>• Capacidad antioxidante</li> <li>• Perfil de polifenoles</li> <li>• Azúcares reductores</li> </ul> |                                      |  |   |
| Problemas específicos  | Objetivos específicos  | Hipótesis específicas  |   |                                      |  |   |
| a) ¿Cuál será el efecto de la temperatura (100 – 160°C) y concentración de etanol (20 – 60 %) sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso de extracción por líquidos presurizados? | a) Evaluar el efecto de la temperatura (100 – 160°C) y concentración de etanol (20 – 60 %) sobre el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH Y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso de extracción por líquidos presurizados. | El uso de diferentes concentraciones de etanol (20 – 60 %) a altas temperaturas (100 – 160°C) permitirá mejorar el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva mediante el uso de un proceso de extracción por líquidos presurizados. | Concentración de etanol (%)   | Polifenoles totales (mg EAG/gss),    | ~ 24 mg EAG/gss, (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018).  | Diseño factorial 2K con tres puntos centrales que permitirá evaluar el efecto de los factores en estudio sobre las variables respuesta (p-valor < 0.05) |
|  |  |  | Temperatura de extracción (°C)  | Perfil de polifenoles (µg/gss)       | 2 a 200 µg/gss, (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018).   |   |
|  |  |  |   | Capacidad antioxidante (µmol ET/gss) | ~ 50 µmol ET/gss, (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018). |   |
|  |  |  |   | Azúcares reductores (mg/gss)         | 3 a 15 mg/gss (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018).     |   |
| b) ¿Cuál será el efecto de diferentes concentraciones de etanol (20 – 60 %) usados en extracción que podrían afectar la recuperación de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación?                 | b) Evaluar el efecto la concentración de etanol (20 – 60 %) en extracción y concentración de eluyente (80 %) en purificación sobre el rendimiento global en el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y   | El uso de diferentes concentraciones de etanol (20 – 60 %) en extracción podría afectar la recuperación de polifenoles, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), perfil de polifenoles y azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación.  | Concentración de etanol como eluyente (%)   | Polifenoles totales (mg EAG/gss),    | ~ 12 mg EAG/gss, (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018).  | Diseño factorial 2K con tres puntos centrales que permitirá evaluar el efecto de los factores en estudio sobre las variables respuesta (p-valor < 0.05) |
|  |  |  | Temperatura de extracción (°C)  | Perfil de polifenoles (µg/gss)       | 1 a 100 µg/gss, (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018).   |   |
|  |  |  |   | Capacidad antioxidante (µmol         | ~ 25 µmol ET/gss, (Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez                |   |

|  |   |  |  |   |  |  |
|--|---|--|--|---|--|--|
|  | azúcares reductores a partir del orujo de uva durante el proceso de purificación. |  |  | ET/gss)<br>Azúcares reductores (mg/gss) | Correa, 2018).<br>1 a 8 mg/gss<br>(Mariotti-Celis, Huamán-Castilla, Pedreshi F, & Pérez Correa, 2018). |  |
|--|---|--|--|---|--|--|

**Artículo 14. Artículo Científico****EXTRACCIÓN ÓPTIMA MULTI-RESPUESTA DE  
POLIFENOLES PRESENTES EN ORUJO DE UVA BAJO  
CONDICIONES SUBCRITICAS**

Nilton César León Calvo<sup>a\*</sup>, Karol Cecilia Torres Ramírez<sup>b</sup>, Erik Edwin Alleca Alca<sup>b</sup>,  
Nils Leander Huaman Castilla<sup>b</sup>

**RESUMEN**

El orujo de uva es un residuo agroindustrial con importantes concentraciones de polifenoles, así como de azúcares reductores; los cuales limitan su uso en el desarrollo de alimentos nutraceuticos. Por ello, el objetivo fue evaluar el efecto de la composición del solvente (etanol: 20 – 60%) y temperatura (100 - 160°C) sobre la recuperación de polifenoles y contenido de azúcares a partir de orujo de uva mediante un proceso de extracción subcrítica. Para tal fin, la muestra fue acondicionada dentro de un sistema de extracción por líquidos presurizados. Luego, mediante un diseño central compuesto se establecieron las condiciones óptimas de extracción (temperatura y etanol) para maximizar el contenido de polifenoles con mínima presencia de azúcares reductores (glucosa). Los incrementos en la concentración de etanol (20 - 60%) y altas temperaturas mejoran la recuperación de polifenoles; mientras que la presencia de etanol reduce la extracción de azúcares reductores. Contrariamente, los incrementos de temperatura incrementan la presencia de compuestos no deseados (glucosa). El proceso de optimización permitió maximizar la recuperación de polifenoles con un mínimo contenido de glucosa, cuyos parámetros fueron fijados a 141.9°C con 60.3% de etanol. Por ello, el uso de etanol permite no solo mejorar la recuperación de polifenoles, sino también reduce la presencia de azúcares reductores. Asimismo, la optimización de respuesta múltiple es una técnica que permite maximizar la obtención de compuestos antioxidantes con mínima presencia de compuestos no deseados.

**Palabras clave:** Orujo de uva, extracción líquido presurizada, polifenoles, glucosa, optimización de respuesta múltiple.

a Doctorado en Ciencias Ambientales, Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Av. Miraflores S/N, Apartado Postal 316, Tacna, Perú. [niltoncesarleon@gmail.com](mailto:niltoncesarleon@gmail.com)  
b Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Moquegua.

## OPTIMAL MULTI-RESPONSE EXTRACTION OF POLYPHENOLS PRESENT IN GRAPE POMACE UNDER SUBCRITICAL CONDITIONS

### ABSTRACT

Grape pomace is an agroindustrial residue with significant concentrations of polyphenols and reducing sugars, which limit its use in developing nutraceuticals. Therefore, the objective was to evaluate the effect of solvent composition (ethanol: 20–60%) and temperature (100–160°C) on polyphenols and sugar content recovery from grape pomace using a subcritical extraction process. To this end, the sample was conditioned within a pressurized liquid extraction system. Optimal extraction conditions (temperature and ethanol) were then established using a central composite design to maximize polyphenol content with minimal reducing sugars (glucose). Increased ethanol concentration (20–60%) and high temperatures improve polyphenol recovery, while the presence of ethanol reduces the extraction of reducing sugars. Conversely, temperature increases increase the presence of undesirable compounds (glucose). The optimization process maximized polyphenol recovery with minimal glucose content, with parameters set at 141.9°C with 60.3% ethanol. Therefore, using ethanol not only improves polyphenol recovery but also reduces the presence of reducing sugars. Furthermore, multiple response optimization is a technique that maximizes the yield of antioxidant compounds with minimal presence of undesirable compounds.

**Keywords:** Grape pomace, pressurized liquid extraction, polyphenols, glucose, multiple-response optimization.

### INTRODUCCIÓN

La industria vitivinícola genera residuos orgánicos tales como bagazos, semillas, cascara, raspones y hojas, los cuales son derivados del procesamiento del vino (1). Estos residuos representan un problema de gestión ambiental debido a la generación de gases de efecto invernadero, así como la contaminación del agua y suelos de las zonas donde se acumulan (2). En particular, el orujo de uva es un residuo compuesto de cascara y semillas obtenidos después de la fermentación del vino (3) y es considerado una fuente natural rica en compuestos polifenólicos (4).

Los polifenoles son un grupo diverso de compuestos presentes en diversas matrices vegetales, cuya estructura química presenta múltiples grupos hidroxilo unidos a estructuras aromáticas (5). Estos compuestos presentan propiedades bioactivas que ayudan en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas (6). Sin embargo, los métodos de extracción que permitan obtener extractos ricos en polifenoles para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas aún son objeto de investigación (7).

Si bien existen diversas técnicas de extracción bajo condiciones atmosféricas que permiten recuperar compuestos fenólicos; estos métodos requieren prolongados tiempos de proceso, grandes cantidades de solvente, así como el uso de solventes tóxicos (metanol, hexano) con bajos rendimientos de recuperación en los compuestos de interés

(8). Esto limita el uso de los extractos en futuras aplicaciones alimentarias, así como su escalamiento a nivel industrial (9). Contrariamente, la extracción por líquidos presurizados (ELP) es una técnica emergente amigable con el medio ambiente que trabaja bajo condiciones subcríticas (10). Esta técnica reduce ampliamente los tiempos de proceso y superan los rendimientos de compuestos de interés en comparación con las técnicas de extracción atmosféricas (11).

Existen trabajos en ELP que reportan parámetros óptimos de proceso como temperatura y concentración de etanol sobre la recuperación de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y algunos compuestos interferentes como hidroximetilfurfural (HMF) y metales pesados a partir de frutas y hortalizas (12,13).

Si bien existe mucha información sobre parámetros óptimos de extracción, estos no consideran el análisis de respuesta múltiples que permitan determinar condiciones óptimas que maximicen el contenido de compuestos antioxidantes y minimicen la presencia de compuestos interferentes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar bajo condiciones subcríticas, el efecto del uso de mezclas agua-etanol y temperatura sobre el contenido de polifenoles y azúcares reductores a partir de semilla de orujo de uva. Además, mediante un diseño central compuesto se determinó las condiciones óptimas de extracción considerando respuestas múltiples.

## PARTE EXPERIMENTAL

### **Materia prima**

~20 kg de orujo de uva de la variedad negra criolla fueron recolectados de la bodega Antonio Biondi e Hijos, Moquegua, Perú. El orujo fue transportado al Laboratorio de Extracción de Compuestos de Alto Valor (LECAV) de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua. Luego, las muestras fueron congeladas inmediatamente a -20 °C. Posteriormente, las muestras fueron molidas hasta obtener un tamaño de partícula de 2 mm utilizando un molino de pulso Bosch TSM6A013B (Alemania).

### **Extracción de polifenoles**

5 g de semilla de orujo y 40 g de tierra diatomea fueron mezcladas y colocadas en una celda de extracción de 100 mL dentro del Sistema de Extracción de Líquidos Presurizados (ASE Dionex, Thermofisher, San José, California, USA). Las condiciones de proceso fueron fijadas de 100 a 160°C combinadas con concentraciones de etanol de 20 a 60%. Estos parámetros fueron fijados con 10 atm de presión, con un tiempo de extracción de 5 minutos y 250 segundos de purga de nitrógeno. Los extractos obtenidos fueron almacenados a -20°C en envases ámbar para futuros análisis.

Para encontrar las condiciones óptimas del proceso de extracción, se utilizó un diseño Central Compuesto (DCC), el cual fue establecido en las condiciones óptimas del proceso (posible zona de curvatura), donde las variables independientes fueron la temperatura (x1) y concentración de etanol (x2). La matriz del diseño incluyó un total de 11 tratamientos, de los cuales 4 fueron en condiciones axiales, 4 en condiciones factoriales y 3 fueron en el punto central (Tabla 1).

**Tabla 1.** Matriz para el diseño compuesto central (DCC)

| Niveles del diseño |                | Niveles experimentales |          | Variables respuesta |                |
|--------------------|----------------|------------------------|----------|---------------------|----------------|
| x <sub>1</sub>     | x <sub>2</sub> | T °C                   | Etanol % | y <sub>1</sub>      | y <sub>2</sub> |
| -1                 | -1             | 100                    | 20       |                     |                |
| -1                 | 1              | 100                    | 60       |                     |                |
| 1                  | -1             | 160                    | 20       |                     |                |
| 1                  | 1              | 160                    | 60       |                     |                |
| -1.414             | 0              | 87.57                  | 40       |                     |                |
| 1.414              | 0              | 172.43                 | 40       |                     |                |
| 0                  | -1.414         | 130                    | 11.72    |                     |                |
| 0                  | 1.414          | 130                    | 68.28    |                     |                |
| 0                  | 0              | 130                    | 40       |                     |                |
| 0                  | 0              | 130                    | 40       |                     |                |
| 0                  | 0              | 130                    | 40       |                     |                |

Donde: y<sub>1</sub> es el contenido total de polifenoles; y<sub>2</sub> es el contenido de azúcares

El procesamiento y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el programa Statgraphics Plus 4.0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Esto permitió encontrar superficies tridimensionales para cada respuesta en particular (contenido de polifenoles y azúcares). Se evaluaron los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes, y se establecieron regresiones lineales de primer orden o segundo orden según el ajuste de mínimos cuadrados, según el siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \mathcal{E}$$

Donde: Y es la respuesta (cantidad de polifenoles o azúcares extraídos); X<sub>1</sub> es la temperatura codificada; X<sub>2</sub> es la concentración de etanol codificada; β son los coeficientes del modelo y  $\mathcal{E}$  es el error experimental.

Finalmente, Para encontrar un óptimo de las condiciones de extracción que permitieran la mayor recuperación de polifenoles con concentraciones mínimas de azúcares, se aplicó el enfoque de superficie de respuesta utilizando la función de deseabilidad. La deseabilidad ( $d$ ) se calculó usando la Ecuación 1, donde se buscaba una respuesta máxima prevista para el contenido de polifenoles. La Ecuación 2 se utilizó para la respuesta prevista en el contenido de azúcares donde se deseaba un valor mínimo ( $U$ ).

$$d = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y} < L \\ \left(\frac{\hat{y} - L}{T - L}\right), & \text{si } L \leq \hat{y} \leq T \\ 1 & \text{si } \hat{y} > T \end{cases} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$d = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{y} < T \\ \left(\frac{U - \hat{y}}{U - T}\right), & \text{si } T \leq \hat{y} \leq U \\ 0 & \text{si } \hat{y} > U \end{cases} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $T$  y  $L$  representan los valores objetivo para la respuesta prevista más alta y más baja dentro del espacio temperatura y concentración de etanol, dependiendo de si se había establecido un valor mínimo o máximo deseado.  $\hat{y}$  representa las respuestas previstas que se derivaron de las regresiones múltiples calculadas anteriormente para cada superficie de respuesta individual.

#### **Determinación de Polifenoles Totales**

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó con el reactivo Folin Ciocalteu, siguiendo el método de Singleton et al. (14), En resumen, un volumen de 3.75 mL de agua destilada, 0.5 mL de muestra y 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) se mezclaron con 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (10% p / v). Luego, la absorbancia se medirá a 765 nm (Espectrómetro UV-Vis Genesys 150, Thermofisher, San José, CA, USA) después un tiempo de reacción de 1 h a temperatura ambiente. Los resultados se expresarán en mg EAG (equivalente de ácido gálico) por gramo de sólido seco.

#### **Determinación de azúcares reductores**

Se cuantificó glucosa siguiendo el procedimiento propuesto por Wilson et al. (15). Primeramente, se realizó la filtración de los extractos de algas pardas con una jeringa acoplada con un filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , insertando las muestras en viales ámbar de 1,5 mL. El análisis se ejecutó utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado con un detector de índice de refracción (IR) a 35 °C. El equipo inyectó 1  $\mu\text{L}$  de muestra pretratada a un flujo de 0,75 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de Acetonitrilo/agua (75/25%), se trabajó en modalidad isocrática. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Luna® 5  $\mu\text{m}$  NH2 100 Å. Las concentraciones se hallaron de acuerdo con las curvas de calibración (10 mg/mL – 50 mg/mL) de glucosa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de polifenoles.

Los extractos obtenidos mediante condiciones subcríticas presentaron concentraciones de polifenoles que varían de 0.23 a 1.89 mg EAG/ gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura y etanol presentaron un efecto positivo en la recuperación de polifenoles totales (Tabla 2). Por ejemplo, el uso de 20% de etanol con un incremento de 100 a 160 °C permitió recuperar 3 veces más contenido de polifenoles; mientras que el uso de 60% de etanol con incrementos de 100 a 160°C recupero 2.8 veces más contenido de estos compuestos bioactivos (Tabla 2). Además, el análisis de varianza mostro que la los efectos principales (temperatura y etanol) tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles ( $P < 0.0001$ ), así como la interacción de ambos factores (temperatura x etanol) tuvieron efecto significativo sobre la variable respuesta ( $P < 0.001$ ).

Comportamientos similares fueron reportados por Huaman et. al. (16) quienes encontraron que los incrementos de temperatura de 90 a 150°C con agua pura y 30% de etanol mejora en 14 y 37% la recuperación de polifenoles. Mariotti et. al. (13) observaron que los incrementos de temperatura de 60 a 90°C mejora en 16 y 28% la recuperación de polifenoles con agua pura y 15% de etanol. Bajo condiciones subcríticas, las altas temperaturas aceleran la energía cinética del solvente, favoreciendo la ruptura de la matriz vegetal (17); consecuentemente los polifenoles son liberados. Además, el uso de etanol permita una mayor solubilidad de los polifenoles debido a la presencia de dos fracciones polar y no polar en su estructura química, los cuales interactúan con los grupos hidroxilo y aromáticos de los polifenoles, respectivamente (18).

**Tabla 2.** Caracterización química de los extractos obtenidos bajo condiciones subcríticas (ELP).

| Etanol (%) | Temperatura (°C) | Contenido de polifenoles (mg EAG/g ss) | Contenido de glucosa (mg/g ss) |
|------------|------------------|--|--------------------------------|
| 130        | 40               | 0.685                                  | 3.11                           |
| 100        | 20               | 0.36                                   | 4.68                           |
| 160        | 20               | 1.36                                   | 8.16                           |
| 100        | 60               | 0.78                                   | 2.16                           |
| 160        | 60               | 0.91                                   | 5.46                           |
| 130        | 40               | 0.71                                   | 3.26                           |
| 87.5736    | 40               | 0.21                                   | 1.26                           |
| 172.426    | 40               | 1.84                                   | 11.04                          |
| 130        | 11.7157          | 0.53                                   | 3.18                           |
| 130        | 68.2843          | 0.81                                   | 4.86                           |
| 130        | 40               | 0.74                                   | 3.21                           |
| 130        | 40               | 0.65                                   | 3.09                           |
| 100        | 20               | 0.42                                   | 4.92                           |
| 160        | 20               | 1.515                                  | 11.34                          |

|         |         |      |       |
|---------|---------|------|-------|
| 100     | 60      | 0.82 | 2.52  |
| 160     | 60      | 1.89 | 9.09  |
| 130     | 40      | 1.04 | 3.12  |
| 87.5736 | 40      | 0.23 | 1.38  |
| 172.426 | 40      | 1.78 | 10.68 |
| 130     | 11.7157 | 0.54 | 3.24  |
| 130     | 68.2843 | 0.85 | 5.1   |
| 130     | 40      | 0.68 | 3.11  |

Los valores de contenido de polifenoles y contenido de glucosa son el promedio de 3 repeticiones (n= 3). Las desviaciones estándar varían entre 0.02 y 0.09 para polifenoles totales y entre 0.085 y 0.254 para el contenido de glucosa.

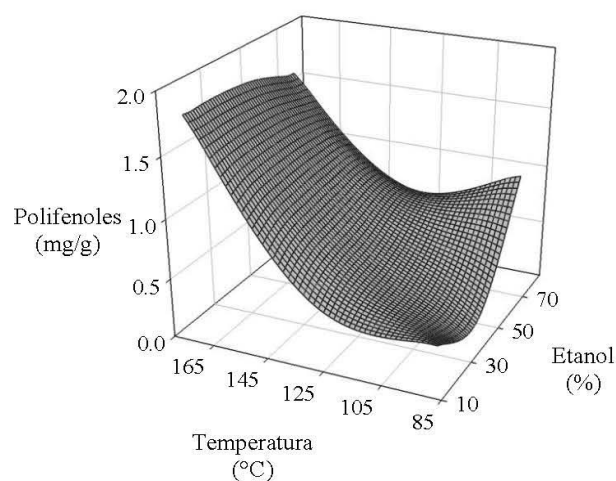
Para explicar el efecto de la temperatura y etanol sobre el contenido de polifenoles, un modelo predictivo de superficie de respuesta fue establecido, el cual cuantifica la relación entre una variable dependiente (CPT) y dos variables independientes (T y E) mediante una ecuación cuadrática (Tabla 3). La inclusión de términos lineales, cuadráticos y de interacción permite modelar efectos no lineales y sinérgicos entre la temperatura y la concentración de etanol sobre la respuesta. Los coeficientes asociados a cada término indican la dirección y magnitud de esta influencia. Por ejemplo, los coeficientes negativos de los términos lineales sugieren una disminución de la respuesta al aumentar individualmente la temperatura o la concentración de etanol, mientras que los términos cuadráticos positivos señalan una posible curvatura en la superficie de respuesta para ambas variables (T y E). La presencia en el modelo de la interacción (TxE) implica que el efecto de la temperatura sobre la respuesta está condicionado por la concentración de etanol (Tabla 3).

**Tabla 3.** Modelos predictivos del comportamiento del efecto de la temperatura y composición del solvente sobre las respuestas (contenido de polifenoles y azúcares reductores) de los extractos obtenidos.

| Respuesta                        | Modelo  | R <sup>2</sup> |
|----------------------------------|---|----------------|
| Contenido de polifenoles (CPT)   | $Y_1 = 4.5224 - 0.0765 \times T - 0.0105 \times E + 0.0003 \times T^2 + 0.0001 \times T \times E + 0.0008 \times E^2$ | 0.9876         |
| Contenido de azúcares reductores | $Y_2 = 3.4325 + 0.3034 \times T - 0.0798 \times E - 0.0011 \times T^2 - 0.001 \times T \times E + 0.0012 \times E^2$  | 0.9745         |

La superficie de respuesta muestra el efecto de la interacción sinérgica entre la temperatura (100 - 160°C) y la concentración de etanol (20 - 60%) sobre la extracción de polifenoles (Figura 1). La respuesta no sigue una tendencia lineal con respecto a las variables independientes, cuyo rendimiento de polifenoles mejora con el incremento de temperatura y concentraciones de etanol (>30%). Interesantemente, las bajas concentraciones de etanol no favorecen una mayor extracción de compuestos fenólicos (Figura 1). Si bien las condiciones óptimas fueron establecidas con 160°C y 60% de

etanol, es necesario analizar los datos con la presencia de compuestos no deseados como los azúcares reductores (glucosa) con la finalidad de establecer condiciones de proceso que garanticen una máxima recuperación de polifenoles con una menor presencia de azúcares reductores.



**Figura 1.** Superficie de respuesta del efecto de la composición de solvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles.

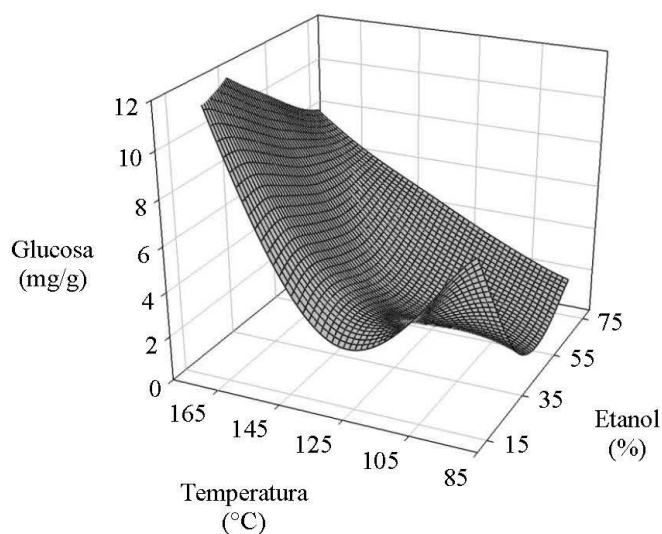
#### **Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de compuestos no deseados (azúcares reductores).**

Bajo condiciones subcríticas, el contenido de azúcares reductores presentes en los extractos varía de 1.26 a 11.34 mg/gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura mejoran la recuperación de azúcares; contrariamente, la presencia de etanol tiene un efecto negativo sobre estos compuestos (Tabla 2). Por ejemplo, los cambios incremento de 100 a 160 °C permite incrementar en 75 y 35% la recuperación de azúcares con 20 y 60% de etanol, respectivamente (Tabla 2). El análisis de varianza mostro que el efecto positivo de la temperatura ( $P < 0.0005$ ) y efecto negativo del contenido de etanol ( $P < 0.002$ ); mientras la interacción de ambos factores presento un efecto significativo sobre la variable respuesta (contenido de azúcares) ( $P < 0.0012$ ).

Mariotti et. al. (13) demostró que los incrementos de etanol en la composición del solvente de extracción de 0 a 15% a 90°C reducen la presencia en el contenido de glucosa en 18%. Mamani-Parí et. al. (18) demostraron que la presencia de etanol a altas temperaturas reduce la presencia de azúcares reductores en los extractos obtenidos. Bajo condiciones subcríticas, la polaridad del solvente es reducida drásticamente, limitando la formación de puentes hidrogeno (19,20); consecuentemente es probable que las interacciones de los azúcares con las moléculas de agua se reduzca limitando su solubilidad y extracción.

El modelo predictivo de superficie de respuesta muestra la relación entre el contenido de azúcares y dos variables independientes temperatura (T) y etanol (E) mediante una ecuación cuadrática (Tabla 3). Los términos lineales, cuadráticos y de interacción permite modelar efectos no lineales y sinérgicos entre la temperatura y la concentración de etanol sobre la respuesta. Los coeficientes positivos indican que los incrementos de temperatura favorecen la recuperación de azúcares, mientras que los términos negativos lineales sugieren que la presencia de etanol disminuye la presencia de azúcares (Tabla 3).

La superficie de respuesta (Figura 2) muestra la influencia significativa de la temperatura (100 - 160 °C) y la concentración de etanol (20 - 60%) sobre la obtención de glucosa (1.23 - 11.34 mg/g). Existe una tendencia general a la disminución en la recuperación de glucosa a medida que la concentración de etanol incrementa. En contraste, Las altas temperaturas favorecen una mayor extracción de glucosa. La superficie muestra una pendiente descendente desde la región de baja temperatura y baja concentración de etanol hacia la región de alta temperatura y alta concentración de etanol. Esto sugiere que para optimizar el rendimiento de glucosa se deben considerar temperaturas intermedias (125°C) con altas concentraciones de etanol (30%).



**Figura 2.** Superficie de respuesta del efecto de la composición de solvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles.

#### Optimización de respuestas múltiples

Como se describió previamente, la recuperación de polifenoles mejora a temperaturas más altas. Sin embargo, la extracción de azúcares reductores como la glucosa también se acelera a temperaturas más altas; mientras la presencia de etanol reduce la presencia de estos compuestos no deseados. Entonces, si consideramos ambas respuestas (polifenoles y azúcares) de manera individual no existe una condición de extracción

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de polifenoles.

Los extractos obtenidos mediante condiciones subcríticas presentaron concentraciones de polifenoles que varían de 0.23 a 1.89 mg EAG/ gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura y etanol presentaron un efecto positivo en la recuperación de polifenoles totales (Tabla 2). Por ejemplo, el uso de 20% de etanol con un incremento de 100 a 160 °C permitió recuperar 3 veces mas contenido de polifenoles; mientras que el uso de 60% de etanol con incrementos de 100 a 160°C recupero 2.8 veces más contenido de estos compuestos bioactivos (Tabla 2). Además, el análisis de varianza mostro que la los efectos principales (temperatura y etanol) tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles ( $P < 0.0001$ ), así como la interacción de ambos factores (temperatura x etanol) tuvieron efecto significativo sobre la variable respuesta ( $P < 0.001$ ).

Comportamientos similares fueron reportados por Huaman et. al. (16) quienes encontraron que los incrementos de temperatura de 90 a 150°C con agua pura y 30% de etanol mejora en 14 y 37% la recuperación de polifenoles. Mariotti et. al. (13) observaron que los incrementos de temperatura de 60 a 90°C mejora en 16 y 28% la recuperación de polifenoles con agua pura y 15% de etanol. Bajo condiciones subcríticas, las altas temperaturas aceleran la energía cinética del solvente, favoreciendo la ruptura de la matriz vegetal (17); consecuentemente los polifenoles son liberados. Además, el uso de etanol permita una mayor solubilidad de los polifenoles debido a la presencia de dos fracciones polar y no polar en su estructura química, los cuales interactúan con los grupos hidroxilo y aromáticos de los polifenoles, respectivamente (18).

**Tabla 2.** Caracterización química de los extractos obtenidos bajo condiciones subcríticas (ELP).

| Etanol (%) | Temperatura (°C) | Contenido de polifenoles (mg EAG/g ss) | Contenido de glucosa (mg/g ss) |
|------------|------------------|--|--------------------------------|
| 130        | 40               | 0.685                                  | 3.11                           |
| 100        | 20               | 0.36                                   | 4.68                           |
| 160        | 20               | 1.36                                   | 8.16                           |
| 100        | 60               | 0.78                                   | 2.16                           |
| 160        | 60               | 0.91                                   | 5.46                           |
| 130        | 40               | 0.71                                   | 3.26                           |
| 87.5736    | 40               | 0.21                                   | 1.26                           |
| 172.426    | 40               | 1.84                                   | 11.04                          |
| 130        | 11.7157          | 0.53                                   | 3.18                           |
| 130        | 68.2843          | 0.81                                   | 4.86                           |
| 130        | 40               | 0.74                                   | 3.21                           |
| 130        | 40               | 0.65                                   | 3.09                           |
| 100        | 20               | 0.42                                   | 4.92                           |
| 160        | 20               | 1.515                                  | 11.34                          |

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaya-Chantaca D, Flores-Gallegos AC, Iliná A, Aguilar C, Sepúlveda-Torre L, Ascacio-Vadlès J, et al. La industria vinícola como fuente de valiosos residuos agroindustriales The wine industry as a source of valuable agro-industrial wastes. *CienciaAcierta*. 2021;(67):123–45.
2. Chowdhary P, Gupta A, Gnansounou E, Pandey A, Chaturvedi P. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environ Pollut* [Internet]. 2021;278:116796. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116796>
3. Garcia-Lomillo J, González-San José M. Applications of Wine Pomace in the Food Industry Approaches and Functions. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16.
4. Huaman-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Perez-Correa JR. Polyphenols of Caménère Grapes. *Mini Rev Org Chem* [Internet]. 2017;14(3):176–86. Available from: <http://www.eurekaselect.com/149810/article>
5. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313–52.
6. Adebooye OC, Alashi AM, Aluko RE. A brief review on emerging trends in global polyphenol research. *J Food Biochem*. 2018;42(4):0–7.
7. Cheng Y, Xue F, Yu S, Du S, Yang Y. Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*. 2021;26(13):1–38.
8. Souilem S, Fki I, Kobayashi I, Khalid N, Neves MA, Isoda H, et al. Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries. *Food Bioprocess Technol*. 2017;10(2):229–48.
9. Al-Suod H, Ratiu IA, Górecki R, Buszewski B. Pressurized liquid extraction of cyclitols and sugars: optimization of extraction parameters and selective separation. *J Sep Sci*. 2019;42(6):1265–72.
10. Huamán-Castilla NL, Díaz Huamaní KS, Palomino Villegas YC, Alcca-Alca EE, León-Calvo NC, Colque Ayma EJ, et al. Exploring a Sustainable Process for Polyphenol Extraction from Olive Leaves. *Foods*. 2024;13(2):1–13.
11. Huamán-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Perez-Correa JR. Glycerol as Alternative Co-Solvent for Water Extraction of Polyphenols from Carménère Pomace : Hot Pressurized Liquid Extraction and Computational Chemistry Calculations. *Biomolecules*. 2020;10:1–14.
12. Vergara-Salinas JR, Bulnes P, Zúñiga MC, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Mateos-Martín ML, et al. Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *J Agric Food Chem*. 2013;61(28):6929–36.
13. Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Huamán-Castilla N, Pedreschi F, Iglesias-Rebolledo N, Pérez-Correa JR. Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Caménère’ pomace extracts. *Int J Food Sci Technol*. 2018;53(4).

14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965 Jan;16(3):144 LP – 158.
15. Wilson, A. M., Work, T. M., Bushway, A. A., & Bushway RJ. HPLC determination of fructose, glucose, and sucrose in potatoes. *J Food Sci.* 1981;46(1):300–10.
16. Huaman-Castilla NL. The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts. *Molecules.* 2019;24(17):1–16.
17. Huamán-Castilla NL, Gajardo-Parra N, Pérez-Correa JR, Canales RI, Martínez-Cifuentes M, Contreras-Contreras G, et al. Enhanced Polyphenols Recovery from Grape Pomace: A Comparison of Pressurized and Atmospheric Extractions with Deep Eutectic Solvent Aqueous Mixtures. *Antioxidants.* 2023;12(7).
18. Parí SM, Juárez MLM, Vilca FZ, Vilca OML, Alca EEA, Escobedo-Pacheco E, et al. Alternative green extraction techniques to enhance recovery of antioxidant compounds from red peel prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *Discov Food* [Internet]. 2024;4(1). Available from: <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00140-5>
19. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol.* 2012;26(2):68–87.
20. Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int J Food Prop.* 2013;16(2):382–96.