

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

***Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a
partir de un subproducto del procesamiento industrial
de mora***

Elaborado por:

Ana María Quirós Blanco

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

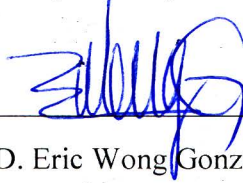
San José, Costa Rica

2016

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

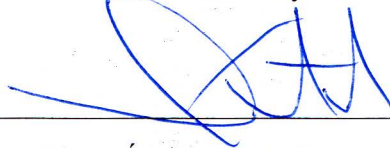
Aprobado por:



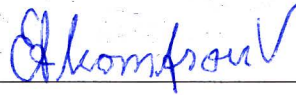
Ph.D. Eric Wong González
Presidente del Tribunal



M.Sc. Marvin Soto Retana
Director del Proyecto



Ph.D. Óscar Acosta Montoya
Asesor del Proyecto



Lic. Eduardo Thompson Vicente
Asesor del Proyecto



M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda
Profesora Designada

DEDICATORIA

A mi abuelo Ing. Víctor Manuel Quirós Zúñiga (1928-1992), profesor de Estado, Ingeniero Agrónomo y agente de extensión agrícola de Abangares. Por ser mi inspiración para el camino que voy a iniciar como profesional.

A mis papás Zulay Blanco Sánchez y Francisco Quirós Mekbel por ser mi apoyo y mi luz. Ustedes también son licenciados.

A Dios, porque siempre voy a tener presentes tantas bendiciones.

AGRADECIMIENTOS

Con la conclusión de este trabajo final de graduación quisiera empezar agradeciendo al comité asesor de este proyecto. Al profe Eduardo Thompson por darme la oportunidad de ser asistente y luego continuar con mi TFG en el proyecto Valorización de Subproductos de Mora y Guayaba y por siempre estar tan atento a colaborar. Al profe Óscar Acosta por sus oportunos comentarios del proyecto, por brindarme la oportunidad de participar en la asistencia de Apoyo Tecnológico, por ser una excelente persona y un excelente tutor en mi formación académica. Al profe Marvin, director de este TFG, gracias por velar que el proyecto y mi formación fueran merecedores de una mención de honor, por enseñarme tantas cosas y ser una excelente guía. Siempre voy a estar muy agradecida y orgullosa de este comité.

Un agradecimiento muy especial a todos los profesores de la Escuela de Tecnología de Alimentos quienes siempre fueron muy especiales conmigo. Al profe Eric, presidente del tribunal, gracias por dejar una huella valiosa en mi formación y por darme confianza el día de la defensa. A doña Marta Bustamante por brindarme su ayuda en momentos importantes. A Diana Víquez por su amistad y confianza en mí. A todos los que trabajan en la Escuela y el CITA, gracias por toda la ayuda y cariño, a Giova, Luis, Tati, Nela, Wendy y doña Rocío. A Eduardo por enseñarme el método de polifenoles y a Caro y Graciela, por ayudarme con el HPLC. Siempre agradecida por toda la ayuda que me brindaron.

A todos mis compañeros de TA. Gracias. Cada uno de ustedes son excelentes como personas y como profesionales. Gracias por enseñarme tanto y ofrecerme tanto cariño en estos años. Carlos y Valerie gracias por siempre hacerme reír tanto. A mis compañeras más cercanas Nati, Glori, Xime, Vale, Ana, Mari y Yocky, por ser siempre un ejemplo para mí y por la infinidad de lindos recuerdos que tengo con ustedes, gracias chicas. Una dedicatoria y agradecimiento especial a Glori Herrera, por ser la mejor compañera de tesis, porque con su determinación y apoyo incondicional logré alcanzar la meta de terminar este TFG en el tiempo previsto, de todo corazón gracias.

A mis compañeras de la competencia DSDC del IFT, Molibananas y Criketas, porque juntas crecimos personal y profesionalmente, y vivimos una aventura especial y única en la

vida. Felicidades por atreverse a tomar el reto y superarlo con éxito y por abrir el paso a todas las generaciones futuras de estudiantes de TA. Siempre voy a estar muy orgullosa de ustedes. Una mención de honor a la profe Jessie por atreverse a hacer algo diferente, por guiarnos en todo momento, por impulsarnos a alcanzar ese sueño, y personalmente gracias por llegar en el momento justo para convertirse en mi mejor tutora, por enseñarme tanto y servirme de ejemplo para siempre dar lo mejor como persona y profesional.

A toda mi familia, gracias por darme tanto apoyo, amor y por siempre sentirse orgullosos de mí. A Vero, Pao y Esteban, gracias por ser mi ejemplo como mis primos abangareños en la UCR. A Pao gracias por guiarme en la U y ayudarme con mi primera matrícula. A Mariana mi compañera fiel de todos estos años, gracias. Gracias a mis amigos, Kia, Mey, Kari y Ce por tantas risas y aventuras, por apoyarme y quererme tanto.

A papi y mami por realizar una excelente labor como padres, por dedicarse a formarnos de la mejor manera, siempre voy a estar muy orgullosa de ser su hija. A Manuel, el mejor hermano, por ser un excelente compañero de vida y por siempre escuchar mis historias de TA con atención, aunque no entendiera mucho.

GRACIAS, cada uno de ustedes siempre van a contar con mi agradecimiento y mi cariño.

Índice General

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
Índice de Cuadros.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Nomenclatura.....	xi
Resumen.....	xii
1. Justificación.....	1
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivo General.....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3. Marco teórico.....	6
3.1 Generalidades de la mora.....	6
3.2 Producción de mora en Costa Rica.....	6
3.3 Subproducto del procesamiento industrial de mora (SPIM).....	7
3.4 Compuestos polifenólicos de interés.....	7
3.4.1. Polifenoles.....	7
3.4.2. Antocianinas.....	7
3.4.3. Elagitaninos.....	8
3.4.4. Polifenoles de la mora.....	8
3.4.5. Polifenoles del SPIM.....	10
3.5 Capacidad antioxidante de polifenoles.....	11
3.5.1. Efecto positivo de polifenoles de mora en la salud.....	12
3.6 Extracción de una matriz alimentaria (sólido-líquido).....	13
3.6.1. Extracción de compuestos polifenólicos.....	14
3.6.2. Extracción asistida por ultrasonido.....	17
3.6.3. Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos.....	19
4. Materiales y métodos.....	20
4.1 Localización.....	20
4.2 Materias primas.....	20

4.2.1.	Condiciones de almacenamiento y preparación del SPIM	21
4.3	Métodos de extracción de polifenoles	21
4.3.1.	Extracción convencional.....	21
4.3.2.	Extracción asistida por ultrasonido.....	24
4.4	Metodología.....	24
4.4.1.	Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles.	24
4.4.2	Optimización de la extracción de polifenoles.....	26
4.5	Análisis físico-químicos	32
4.5.1.	Polifenoles totales.....	32
4.5.2.	Antocianinas y elagitaninos por HPLC	33
4.5.3.	Acidez titulable	34
4.5.4.	Humedad.....	34
5.	Resultados y discusión	35
5.1	Cinéticas de extracción de polifenoles del SPIM	35
5.1.1.	Polifenoles totales.....	35
5.1.2.	Antocianinas	39
5.1.3.	Elagitaninos	42
5.1.4.	Selección del tiempo de extracción para la optimización.....	44
5.2	Optimización de la extracción de polifenoles del SPIM.....	46
5.2.1.	Resultados de las superficies de respuesta.....	46
5.2.2.	Aplicación del modelo de superficie de respuesta.....	47
5.2.3.	Optimización de extracción de polifenoles totales	49
5.2.4.	Optimización de extracción de antocianinas.....	52
5.2.5.	Zonas óptimas de extracción.....	54
5.2.6.	Verificación de los modelos	55
5.2.7.	Función de deseabilidad.....	57
5.2.8.	Potencial utilización del extracto rico en polifenoles como producto nutracéutico	61
6.	Conclusiones	63
7.	Recomendaciones.....	64
8.	Bibliografía.....	66
9.	Anexos.....	74

Índice de Cuadros

Cuadro I. Composición de las principales antocianinas y elagitaninos encontrados en la mora género <i>Rubus adenotrichos</i>	9
Cuadro II. Contenidos de polifenoles reportados para el SPIM obtenido del procesamiento de <i>Rubus adenotrichos</i>	11
Cuadro III. Composición de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en las moras Evergreen y Marion, fruto entero y solo semillas.	11
Cuadro IV. Estudios científicos realizados sobre la utilización de subproductos como fuente de antioxidantes.	19
Cuadro V. Condiciones de extracción utilizadas para la elaboración de las cinéticas de extracción de polifenoles del SPIM.	24
Cuadro VI. Variables independientes y los niveles empleados en un diseño central compuesto rotatable para la optimización de la extracción de polifenoles a partir del SPIM. 27	
Cuadro VII. Diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de polifenoles del SPIM.	28
Cuadro VIII. Masa de SPIM y de disolvente requerida para obtener un volumen total de extracción de 500 mL y velocidad de agitación utilizada en cada corrida.	29
Cuadro IX. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer y pseudo primer orden en la extracción convencional y asistida por ultrasonido de polifenoles del SPIM. ..	35
Cuadro X. Parámetros obtenidos mediante el modelo de pseudo primer orden para la extracción de polifenoles totales mediante el método convencional y asistido por ultrasonido.	37
Cuadro XI. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de extracción de antocianinas del SPIM analizado hasta los 180 minutos de extracción.	41
Cuadro XII. Parámetros obtenidos mediante el modelo de pseudo primer orden para la extracción de antocianinas mediante el método convencional y asistido por ultrasonido. ..	42

Cuadro XIII. Análisis estadístico de los modelos de extracción de elagitaninos del SPIM.	43
Cuadro XIV. Parámetros obtenidos mediante el modelo de pseudo primer orden para la extracción de elagitaninos mediante el método convencional y asistido por ultrasonido. ...	44
Cuadro XV. Valores obtenidos de las variables respuesta analizadas en los extractos, en la optimización de extracción de polifenoles del SPIM.	46
Cuadro XVI. Parámetros de ajuste y bondad obtenidos para cada variable al aplicar la metodología de superficie de respuesta.	47
Cuadro XVII. Rangos de los factores donde se obtuvo la zona óptima de cada variable respuesta.	54
Cuadro XVIII. Porcentajes de extracción de polifenoles y antocianinas del SPIM, y composición inicial del SPIM.	59
Cuadro XIX. Valores de variables respuesta predichos según el modelo y obtenidos por experimentación durante la verificación de dos puntos en la zona óptima de la superficie de respuesta.	56
Cuadro XX. Caracterización de la composición química del SPIM.	74
Cuadro XXI. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en 100 g de SPIM.	74
Cuadro XXII. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de acidez y sólidos solubles en 100 g de SPIM.	75
Cuadro XXIII. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en base seca de extracto.	75
Cuadro XXIV. Probabilidad de los coeficientes de regresión para los modelos generados en la superficie de respuesta para las diferentes variables respuesta.	76

Índice de Figuras

Figura 1. Equipos directo e indirecto de extracción asistida por ultrasonido (Adaptado de Takeuchi <i>et al.</i> , 2009).....	18
Figura 2. Fotografía del subproducto del procesamiento industrial de mora <i>Rubus adenotrichos</i> (SPIM).	20
Figura 3. Esquema del equipo utilizado para la extracción de polifenoles del SPIM.	22
Figura 4. Diagrama del flujo de proceso de extracción de polifenoles del SPIM.	23
Figura 5. Cinéticas de extracción de polifenoles del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, aplicando el modelo de primer orden (A) y pseudo primer orden (B).	36
Figura 6. Cinéticas de extracción de antocianinas del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	40
Figura 7. Cinéticas de extracción de antocianinas del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, aplicando el modelo de primer orden (A) y pseudo primer orden (B).	41
Figura 8. Cinéticas de extracción de elagitaninos del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, aplicando el modelo de primer orden (A) y pseudo primer orden (B).	43
Figura 9. Superficie de respuesta de los factores analizados sobre el contenido extraído de polifenoles totales del SPIM (escala de colores indica mg AG/100 g SPIM. Rojo: mayor concentración, Verde: menor concentración. El tercer factor en cada gráfico se fijó en el valor del punto central).....	50
Figura 10. Superficie de respuesta de los factores analizados sobre el contenido extraído de antocianinas del SPIM (escala de colores representa mg C-3G/100 g SPIM. Rojo: mayor concentración, Verde: menor concentración. El tercer factor en cada gráfico se fijó en el valor del punto central).....	52

Figura 11. Optimización de las condiciones de extracción mediante la función de deseabilidad de Statistica 7 (la línea azul punteada indica extracción óptima con un valor de deseabilidad de 0,85 y las líneas azules sólidas indican el intervalo de confianza al 95%). 58

Figura 12. Condiciones de extracción seleccionadas para realizar la verificación de los modelos de superficie de respuesta (las líneas azules sólidas señalan el 95% de confianza del valor óptimo de extracción, las líneas amarillas señalan las condiciones del punto 1 y las líneas grises señalan las condiciones del punto 2)..... 55

Figura 13. Extractos obtenidos en la optimización de extracción de polifenoles del SPIM.
..... 76

Nomenclatura

AE	Ácido elágico
AG	Ácido gálico
ATCs	Antocianinas
BH	Base húmeda
BS	Base seca
C-3G	Cianidina 3-glucósido
R²	Coefficiente de determinación
R²-adj	Coefficiente de determinación ajustado
E/A	Concentración de etanol
k	Constante de velocidad de extracción
a	Constante de integración del modelo de pseudo primer orden
ρ	Densidad
ETs	Elagitaninos
EtOH	Etanol
EC	Extracción convencional
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
PT_∞	Polifenoles totales al infinito
PT	Polifenoles totales
p	Probabilidad
p_{fa}	Probabilidad de falta de ajuste
S/S	Relación disolvente:SPIM
SPIM	Subproducto del procesamiento industrial de mora
T	Temperatura

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar distintas condiciones de un proceso convencional de extracción de compuestos polifenólicos utilizando etanol acuoso como disolvente, así como aplicando una extracción asistida por ultrasonido, con el fin de optimizar la extracción de polifenoles del subproducto del procesamiento industrial de la mora (SPIM) *Rubus adenotrichos*, para obtener un extracto etanólico rico en polifenoles, que signifique una alternativa para el aprovechamiento del subproducto.

En la investigación se realizó un análisis de la extracción de polifenoles totales (PT), antocianinas (ATCs) y elagitaninos (ETs) estableciendo las cinéticas de extracción durante ocho horas aplicando 60°C, una relación disolvente/SPIM de 2,5 y una concentración de etanol de 67,5%, tanto en la extracción convencional (EC) como en la asistida por ultrasonido (EAU). A las cinéticas generadas se les aplicaron modelos de primer orden y pseudo primer orden. Para ambos métodos de extracción EC y EAU de PT y ATCs se obtuvo que el modelo de mejor ajuste fue el de pseudo primer orden con valores de R^2 -adj 0,9289 EC y 0,9382 EAU para PT y 0,9495 EC y 0,8760 EAU para ATCs. Las cinéticas de ATCs se evaluaron hasta 180 minutos de extracción antes de que iniciara su proceso de degradación. Los valores de la constante de velocidad de extracción k (min^{-1}) obtenidos con el modelo, resultaron no ser significativamente diferentes para la EC y EAU, en la extracción de PT y ATCs, con un 95% de confianza. Para las cinéticas de ETs no se obtuvo un buen ajuste de los modelos analizados debido a la variabilidad de los datos.

En la optimización mediante un diseño central compuesto rotatable, de 3 factores (temperatura, relación disolvente/SPIM (S/S) y concentración de etanol (E/A)) se lograron optimizar dos variables respuesta, PT y ATCs. Según la función de deseabilidad del programa Statistica®, con un valor de 0,85, las condiciones de extracción óptimas fueron 58,4°C, 4,0 S/S y 50% E/A, con las que se obtienen los valores óptimos de PT 1419 mg AG/100 g SPIM y ATCs 132 mg C-3G/100 g SPIM, lo que representa una extracción del 82% de PT y 87% de ATCs contenidas en el SPIM. Por lo tanto, los resultados indican que sí se logró una adecuada extracción de polifenoles del SPIM y que la obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir del SPIM representa un potencial aprovechamiento de dicho subproducto.

1. Justificación

Históricamente las frutas han sido conocidas como una fuente rica en micronutrientes esenciales y fibras. Recientemente, las frutas son reconocidas además por ser una importante fuente de una amplia gama de fitoquímicos, como lo son los compuestos polifenólicos, que individualmente o combinados pueden beneficiar la salud de las personas (Haminiuk *et al.*, 2012).

En los últimos años, el estudio de compuestos polifenólicos en frutas ha venido en crecimiento (Haminiuk *et al.*, 2012). Se ha reportado que los compuestos polifenólicos tienen una actividad antioxidante multifuncional en el organismo, ya que pueden actuar como agentes reductores, agentes donadores de hidrógeno o desactivadores de radicales libres (Dai *et al.*, 2009). Diversos estudios indican que una dieta rica en compuestos polifenólicos puede evitar el daño oxidativo, el cual se relaciona con la promoción del envejecimiento y sus enfermedades relacionadas (Haminiuk *et al.*, 2012).

La mora, fruta parte del género *Rubus*, posee un alto contenido de antocianinas y otros compuestos fenólicos, principalmente flavonoles y elagitaninos (Kaume *et al.* 2012). Esta fruta ha sido altamente apreciada por los consumidores por su alto contenido de nutrientes y sus beneficios a la salud (Ivanovic *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que la mora posee un mayor contenido de antocianinas y otros antioxidantes que otras frutas, convirtiéndola en una fruta de alto interés como fuente de este tipo de compuestos (Dai *et al.*, 2009).

Actualmente, en Costa Rica se realiza el procesamiento industrial de mora en pequeñas y medianas empresas para obtener mermeladas, jaleas, jugos o pulpas. La oferta de mora en el mercado nacional ha venido en aumento. Según datos de oferta mayorista del Centro Nacional de Abastecimiento y Distribución de Alimentos (CENADA), el volumen comercializado de mora mostró un incremento de 45 toneladas del año 2009 al 2012 (CNP, 2013).

En el procesamiento de la mora se genera un subproducto conformado por cáscaras y semillas, el cual es desechado por las plantas procesadoras. Este subproducto representa alrededor de un 20% del peso de la mora (Soto, 2014), razón por la cual resulta de gran

interés brindar un valor agregado a este subproducto, con el fin de tener un impacto positivo en el ambiente y en la economía de los productores.

El subproducto de mora puede ser aprovechado para obtener aceite, además de ser una fuente de fibra (Hoed *et al.*, 2009) y de compuestos polifenólicos (Tumbas-Saponjac *et al.*, 2014). Siriwoharn y Wrolstad (2004) reportan un mayor contenido de procianidinas y elagitaninos en las semillas de mora que en el fruto sin semillas, por lo que rescatan su gran potencial como fuente de compuestos nutracéuticos y antioxidantes naturales.

Para el aprovechamiento del residuo industrial de mora como fuente de compuestos polifenólicos puede realizarse un proceso de extracción y su eficacia depende de las condiciones a las cuales se lleve a cabo el proceso. Los polifenoles presentes en plantas pueden estar de forma simple, polimerizados o incluso pueden estar ligados a otros componentes como carbohidratos y proteínas, lo cual significa que lograr un sistema de extracción para estructuras tan distintas pueda ser complejo (Takeuchi *et al.*, 2009). Por lo anterior, la escogencia de un disolvente apropiado es un aspecto fundamental en el proceso de extracción de estos compuestos.

Para la extracción convencional de polifenoles de frutos como mora, arándanos, uvas y sus residuos se han utilizado disolventes orgánicos y combinaciones (con agua u otros compuestos orgánicos). El uso de disolventes orgánicos en la industria alimentaria genera preocupación por los residuos que puedan permanecer en el extracto, la exposición de las personas al disolvente, la disposición de los desechos y la contaminación del ambiente (Shi *et al.*, 2003). Por lo anterior, el etanol identificado como disolvente GRAS (*generally recognized as safe*), resulta una buena opción para procesos de extracción de compuestos bioactivos en la industria alimentaria, ya que es biológicamente seguro (Nawaz *et al.*, 2006; Da Fonseca *et al.*, 2015) y resulta afín a estos compuestos. Roopchand *et al.* (2013) reportan un rendimiento de extracción de polifenoles totales de residuos de arándanos 3,6 veces mayor con etanol acuoso al 50% que con agua pura

La extracción convencional de compuestos polifenólicos presenta la desventaja de consumir altas cantidades de disolvente, tener un considerable consumo energético y requerir largos tiempos de extracción, que pueden provocar la degradación de los compuestos bioactivos de interés. El uso de métodos novedosos de extracción, conocidos

como *tecnologías verdes* se plantea como una alternativa a los métodos tradicionales, ya que reducen el uso de disolventes, disminuyendo el impacto ambiental, y aceleran los procesos de extracción haciéndolos más eficientes (Ivanovic *et al.*, 2014). Entre estas tecnologías se encuentran las extracciones asistidas por ultrasonido o microondas, o las que utilizan fluidos supercríticos.

La extracción asistida por ultrasonido se ha destacado entre las nuevas tecnologías de extracción por su menor costo, por requerir menos equipo y por su simplicidad y efectividad para extraer compuestos polifenólicos (Ghafoor *et al.*, 2009; Ivanovic *et al.*, 2014). Actualmente, este tipo de extracción asistida es ampliamente utilizada a escala de laboratorio para extraer compuestos polifenólicos de tejidos vegetales (Ghafoor *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Galvan *et al.*, 2012; Aybastier *et al.*, 2013; Ivanovic *et al.*, 2014; Ghitescu *et al.*, 2015). Al utilizar ultrasonido en la extracción se intensifican los procesos de transferencia de masa y se mejora la penetración y capilaridad del disolvente en el tejido vegetal, los cuales facilitan el acceso del disolvente para extraer los compuestos (Da Porto *et al.*, 2013).

En el país, se han realizado diversos estudios sobre el procesamiento y las propiedades funcionales de la mora, como los siguientes: efecto de la maduración de la mora sobre el contenido de polifenoles (Acosta-Montoya *et al.* 2010), posibilidad de separación de elagitaninos de jugo de mora mediante ultrafiltración (Acosta *et al.*, 2014) y obtención de un extracto del subproducto industrial de mora rico en elagitaninos mediante tecnología de membranas (Soto, 2014). Estos estudios han brindado información valiosa sobre métodos de purificación y separación de compuestos polifenólicos como elagitaninos, pero es necesario evaluar el proceso de extracción de polifenoles del subproducto de mora para optimizar su eficiencia y eficacia y así lograr obtener el mayor provecho del subproducto para su potencial implementación a nivel industrial.

En la actualidad, la utilización de los residuos del procesamiento de uvas para la producción de vino (principalmente sus semillas), representa un buen ejemplo de aprovechamiento de subproductos, ya que se utilizan para la obtención de aceite y de compuestos polifenólicos. En el mercado se ofrecen diversos productos alimenticios y farmacéuticos elaborados a partir de polifenoles recuperados de estas semillas. A nivel

industrial existen patentes que describen el proceso de obtención de polifenoles a partir de semillas de uva mediante disoluciones acuosas de etanol, agua caliente con tratamiento de pH y dióxido de carbono supercrítico. El extracto rico en polifenoles que se pretende obtener con este estudio puede ser utilizado como ingrediente alimenticio y podría ser comercializado como se hace actualmente con extractos de semillas de uva y otras bayas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar distintas condiciones de un proceso convencional de extracción de compuestos polifenólicos utilizando etanol acuoso como disolvente, así como un método alternativo aplicando una extracción asistida por ultrasonido, con el fin de generar la información necesaria para el aprovechamiento del subproducto del procesamiento industrial de la mora (*Rubus adenotrichos*) y así obtener un extracto etanólico rico en polifenoles.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el proceso de extracción de polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora (SPIM) utilizando etanol como disolvente y aplicando ultrasonido, para la obtención de un extracto rico en polifenoles que pueda ser utilizado como un ingrediente alimenticio.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles a partir del SPIM, a escala de laboratorio.
2. Evaluar las condiciones de proceso (temperatura, relación SPIM-disolvente y concentración de etanol en el disolvente) para la optimización de la extracción de polifenoles a escala de laboratorio, a partir del SPIM, aplicando la metodología de superficie de respuesta.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades de la mora

La mora pertenece al género *Rubus* de la familia de Rosaceae, tiene un peso entre los 3 y 12 gramos y se describe como un fruto agregado compuesto por múltiples drupas donde cada una contiene una semilla (Kaume *et al.*, 2012). La mora se considera como una fruta de alto interés en el mercado por su alto contenido de antocianinas, elagitaninos y compuestos polifenólicos. Se estima que la producción mundial de mora (*Rubus* sp.) es de 154.578 toneladas al año, donde Norteamérica representa la zona de mayor producción (Kaume *et al.*, 2012).

3.2 Producción de mora en Costa Rica

Según el Consejo Nacional de Producción, en Costa Rica se comercializan principalmente 3 variedades de mora: Vino, Negrita y Castilla (CNP, 2013). La mora Vino, de nombre científico *Rubus adenotrichos*, posee las mejores características físicoquímicas, siendo así la preferida por los consumidores y la de mayor comercialización en el país (Orozco *et al.*, 2011). A partir de la década de 1990, grandes empresas privadas se interesaron por la producción de este cultivo para su comercialización como fruta fresca, pulpa y jugo, en el mercado nacional e internacional (CNP, 2013).

En Costa Rica la oferta de mora en el mercado nacional ha venido en aumento. La Asociación de Productores y Exportadores de Mora y Frutales de Altura de Costa Rica (APROCAM), que en el año 2005 cubrió un 80% del total de la producción de mora en Costa Rica, reportó en el periodo 2003-2009 una producción de 862,9 toneladas de mora (Orozco *et al.*, 2011). APROCAM reúne aproximadamente a 350 pequeños productores de las zonas altas de cultivo de mora en el país como Pérez Zeledón, Los Santos y El Guarco (Acan-Efe, 2005).

3.3 Subproducto del procesamiento industrial de mora (SPIM)

Durante el procesamiento industrial de la mora, al realizar el despulpado de la fruta para obtener pulpas, concentrados, mermeladas, entre otros, se genera un subproducto conformado principalmente por semillas y cáscaras. Según el tipo de operación aplicada para el despulpado, el residuo generado puede significar entre un 5% y un 20% del peso total del fruto procesado (Siriwoharn & Wrolstad, 2004; Gancel *et al.*, 2011; Soto, 2014). El subproducto de la mora puede ser aprovechado realizando una extracción de compuestos de interés, como lo son el aceite (Hoed *et al.*, 2009) o los compuestos polifenólicos (Tumbas-Saponjac *et al.*, 2014). Recientemente, se ha estudiado la funcionalidad de los extractos polifenólicos obtenidos a partir del subproducto de mora, así como sus efectos en la salud, revelando su potencial para ser utilizado como fuente de antioxidantes (Siriwoharn & Wrolstad, 2004; Hoed *et al.*, 2009; Godevac *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013; Radočaj *et al.*, 2014; Tumbas-Saponjac *et al.*, 2014).

3.4 Compuestos polifenólicos de interés

3.4.1. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos pertenecen a un grupo diverso de moléculas, reconocidos como metabolitos secundarios en plantas que tienen una amplia gama de estructuras y funciones. La estructura de los polifenoles se compone de un anillo aromático que tiene unido uno o más grupos hidroxilo, y su estructura puede variar entre una molécula simple hasta un polímero complejo de alta masa molecular (Haminiuk *et al.*, 2012). Los polifenoles pueden ser solubles en agua o insolubles en agua. En el primer grupo se encuentran los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides y quinonas, mientras que en el segundo grupo están los taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos (Haminiuk *et al.*, 2012).

3.4.2. Antocianinas

Las antocianinas son los compuestos polifenólicos, pertenecientes al grupo de los flavonoides, responsables de brindar los colores desde rojo hasta negro a las frutas y

vegetales (Kaume *et al.* 2012). Las antocianinas corresponden a una antocianidina con uno o más azúcares unidos. Esta estructura glicosilada confiere una mayor estabilidad y solubilidad en agua con respecto a las antocianidinas. Las principales antocianidinas identificadas en bayas son pelargonidina, cianidina, delfinidina, petunidina y malvidina (Wrolstad & Skrede, 2002). La amplia gama de antocianinas identificadas en la naturaleza se debe a las distintas combinaciones de la posición de unión, número y tipo de azúcares que pueden encontrarse en sus estructuras (Wrolstad & Skrede, 2002).

3.4.3. Elagitaninos

Los elagitaninos son una clase importante de polifenoles que han recibido mucha atención en los últimos años por sus beneficios a la salud. Estos compuestos son moléculas conformadas por una glucosa esterificada con ácido hexahidroxiidifénico (HHDP). El HHDP se reacomoda espontáneamente a la forma de dilactona, conocida con el nombre ácido elágico (Hager & Howard, 2007), compuesto que existe en la naturaleza principalmente en la forma de elagitaninos (Wrolstad & Skrede, 2002). Los elagitaninos y derivados del ácido elágico son identificados por cromatografía líquida, y los resultados son comúnmente reportados como equivalentes de ácido elágico debido a la diversidad de la elagitaninos y la falta de estándares para estos compuestos (Kaume *et al.*, 2012).

3.4.4. Polifenoles de la mora

La mora es una fuente rica en polifenoles, especialmente flavonoides (como antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles y proantocianinas) y elagitaninos (Hager & Howard, 2007; Kaume *et al.*, 2012). El contenido de polifenoles totales de la mora puede rondar entre 114 y 1056 mg equivalentes de ácido gálico (AG) en 100 g de peso fresco o base húmeda (BH) (Hager & Howard, 2007). En estudios de la mora de la especie *Rubus adenotrichos* se ha reportado un contenido de polifenoles totales de 786,2 mg AG en 100 g de fruta fresca (Mertz *et al.*, 2007), y un contenido de polifenoles de 580 mg AG en 100 g de fruta fresca en un estado de maduración grado 1 (fruta color rojo claro) (Acosta-Montoya *et al.*, 2010). Se ha reportado que los principales polifenoles de *Rubus adenotrichos* son los elagitaninos, específicamente lambertianina C y sanguína H6, los cuales representan el 92 % de los

polifenoles de la fruta poco madura (maduración grado 1) y el 62 % de los polifenoles de la fruta completamente madura (maduración grado 3) según el estudio realizado por Acosta-Montoya *et al.* (2010). El detalle de la composición de los principales polifenoles de la mora se presenta en el Cuadro I.

Cuadro I. Composición de las principales antocianinas y elagitaninos encontrados en la mora género *Rubus adenotrichos*.

Polifenoles	Composición 1* (mg compuesto/100 g BS)	Composición 2* (mg compuesto/100 g BS)
Antocianinas		
Cianidina 3-Glucósido	680 ± 20	830 ± 30
Cianidina 3-(6' malonil) glucósido	40 ± 3	66 ± 40
Total antocianinas (BS)	720	896
Total antocianinas (BH)	133,2 ¹	133,5 ²
Elagitaninos		
Lambertianina C	598 ± 20	800 ± 40
Sanguína H6	420 ± 17	660 ± 30
Total elagitaninos (BS)	1018	1460
Total elagitaninos (BH)	188,3 ¹	217,5
Referencia	Mertz <i>et al.</i> , 2007	Acosta-Montoya <i>et al.</i> , 2010

*Valores reportados para mora completamente madura, grado 3 de maduración según Acosta-Montoya *et al.*, 2010. ¹Humedad reportada: 81,5 ± 0,5 %. ²Humedad reportada para grado 3 de maduración: 85,1 ± 0,3 %. BH: base húmeda o peso fresco. BS: base seca.

3.4.4.1 Antocianinas en mora

El 94 % de las antocianinas de la mora poseen una estructura no acilada con ácidos alifáticos como acético, succínico, oxálico o malónico y de estas un 90 % son monoglicosiladas, es decir, que poseen un azúcar unido al flavano, y el 10 % como estructuras diglicosiladas (dos azúcares unidos). Los principales azúcares unidos a las antocianinas corresponden a glucosa, rutinosa, xilosa y arabinosa (Hager & Howard, 2007).

Las principales antocianinas identificadas en la mora son: cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-xilósido, cianidina-3-dioxialil-glucósido (Kaume *et al.* 2012). La cianidina-3-glucósido representa la antocianina más representativa del total de antocianinas identificadas en la mora. Se ha reportado que esta representa un 87,5 % del total de antocianinas (Elisia *et al.*, 2007) o un 94 % del total según lo indicado en el Cuadro I, composición 1.

El contenido de antocianinas en la mora varía según las condiciones ambientales, la zona de cultivo, la variedad, el grado de madurez y el procesamiento. En un estudio se mostró como el contenido de antocianinas varía de 114,4 a 241,5 mg/100 g BH en seis genotipos distintos de mora (Kaume *et al.* 2012). Además, se ha reportado que a medida que aumenta el grado de madurez de la fruta aumenta su contenido de antocianinas de 1,14 mg/g base seca (BS) de la fruta no madura a 8,96 mg/g BS de la fruta completamente madura (Acosta-Montoya *et al.*, 2010).

3.4.4.2 Elagitaninos en mora

La mora contiene una mezcla compleja de elagitaninos que varían según su peso molecular entre 302,2 del ácido elágico, hasta 3740,6 de lambertianina D. Varios estudios han evaluado el contenido de elagitaninos en mora, el cual varía entre 8 y 70 mg/100 g (Hager *et al.*, 2010), 84,7-130,4 mg/100 g (Kaume *et al.*, 2012), 188,3 mg/100 g (Mertz *et al.*, 2007) o 378,4 mg/100 g (Acosta-Montoya *et al.*, 2010), todos en BH. Los dos principales elagitaninos encontrados en las moras, lambertianina C y sanguína H-6 (Cuadro I), fueron reportados por Hager *et al.* (2008) como el 67% del total de los elagitaninos identificados. La molécula lambertianina C corresponde a uno de los compuestos polifenólicos identificados en la mora con mayor masa molecular con un valor de 2805,9 Da (Hager *et al.*, 2008).

3.4.5. Polifenoles del SPIM

Se ha reportado que las semillas, un subproducto del procesamiento industrial de la mora (SPIM), poseen una alta concentración de compuestos polifenólicos, principalmente elagitaninos (Wrolstad & Skrede, 2002; Siriwoharn & Wrolstad, 2004; Bushman *et al.* 2004), por lo que se catalogan como una fuente potencial de compuestos antioxidantes naturales. Incluso, se ha reportado que el 12% del total de elagitaninos de la fruta se encuentra en la pulpa, mientras que el 88% restante se encuentra en las semillas (Kaume *et al.*, 2012). Al analizar los compuestos polifenólicos de las semillas de mora mediante HPLC, se reportó la presencia de procianidinas, elagitaninos, ácido elágico y derivados, y no se encontraron flavonoles (Siriwoharn & Wrolstad, 2004). Los valores reportados de polifenoles en el SPIM del género *Rubus adenotrichos* se presentan en el Cuadro II.

Cuadro II. Contenidos de polifenoles reportados para el SPIM obtenido del procesamiento de *Rubus adenotrichos*.

Polifenoles ¹	Composición 1 (mg compuesto/100 g SPIM BH)	Composición 2 (mg compuesto/100 g SPIM BH)
PT	959 ± 103	598 ± 60
ATCs	55 ± 2	41,3 ± 1,7
ETs	252 ± 2	111,4*
Referencia	Soto, 2014	Gancel <i>et al.</i> , 2011

¹PT: polifenoles totales, mg ácido gálico. ATCs: antocianinas, mg de cianidina 3-glucósido. ETs: elagitaninos, mg de ácido elágico. *Reportado como la suma del contenido de Lambertianina C y Sanguína H6

La comparación de la composición del fruto con la de las semillas del Cuadro III, muestra que las semillas de mora poseen un mayor contenido de polifenoles totales que la fruta, así como un menor contenido de antocianinas monoméricas.

Cuadro III. Composición de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en las moras Evergreen y Marion, fruto entero y solo semillas^{1,2}.

Muestra	Polifenoles totales (mg AG/100 g BH)	Antocianinas (mg C-3G/100 g BH)
Mora		
Evergreen	822 ± 861	154 ± 328
Marion	844 ± 861	225 ± 328
Semillas		
Evergreen	1460 ± 1491	1,72 ± 0,01
Marion	1753 ± 1491	24,2 ± 0,01

¹Adaptado de Siriwoharn & Wrolstad, 2004. ²Valores expresados como ± el cuadrado medio del error, n=2.

3.5 Capacidad antioxidante de polifenoles

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o impedir la oxidación de lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas inhibiendo la iniciación o propagación de cadenas de reacciones oxidativas (Wang, 2006). Un inadecuado equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en el organismo, provoca la aparición del estrés oxidativo. Este estrés oxidativo es generado por el desbalance de especies reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la capacidad de un sistema biológico de reparar el daño provocado a los componentes de las células (Apak *et al.*, 2011). Entre las moléculas ROS, también conocidas como radicales libres se encuentran los aniones de los grupos hidroxilo y superóxido, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno atómico (Apak *et al.*, 2011).

Los antioxidantes se pueden clasificar según su mecanismo de acción, como antioxidantes primarios o secundarios. En el caso de los primarios, estos rompen las cadenas de reacciones oxidativas al inhibir la iniciación o propagación del radical libre y los secundarios previenen la oxidación retardando la reacción donde se forman los radicales libres (Apak *et al.*, 2011). Recientemente, ha aumentado el interés por encontrar fuentes naturales de antioxidantes, como es el caso de los fitonutrientes de las frutas. Estos fitonutrientes corresponden principalmente a compuestos polifenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos (Haminiuk *et al.*, 2012). Estos compuestos pueden actuar de forma independiente o en combinación (Wang, 2006), para evitar el daño oxidativo que favorece el envejecimiento y sus enfermedades relacionadas (Haminiuk *et al.*, 2012).

En general, las frutas como las bayas, han mostrado que poseen una alta capacidad de atrapar las especies reactivas al oxígeno generadas químicamente. Incluso, se ha demostrado que la mora posee una mayor capacidad antioxidante que la frambuesa y la fresa (Wang, 2006). Lo anterior se relaciona con el hecho de que la mora posee una alta cantidad de cianidina 3-glucósido, un antioxidante fuerte, mientras que la fresa posee pelargonidina-3-glucósido y ácido ascórbico, los cuales son antioxidantes débiles (Wang, 2006).

3.5.1. Efecto positivo de polifenoles de mora en la salud

Las enfermedades no transmisibles son enfermedades de larga duración, lenta progresión y a las cuales se atribuyen un alto porcentaje de las muertes en el mundo. Dentro de este grupo se encuentran 4 tipos principales: cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes. Desde hace varios años se ha especulado que los compuestos polifenólicos, especialmente el grupo de los flavonoides, contribuyen a disminuir la incidencia de estas enfermedades (Haminiuk *et al.*, 2012).

Estudios epidemiológicos han mostrado que un consumo diario de frutas y vegetales posiblemente reducen algunos tipos de cáncer, principalmente gastrointestinal, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Haminiuk *et al.*, 2012). En el caso específico de

los polifenoles de la mora, en particular las antocianinas, se ha visto que poseen un efecto antioxidante, anti-inflamatorio, hipoglicemiante, además son inhibidores de adipogénesis (formación de adipocitos), disminuyen los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y logran inducir la saciedad contrarrestando el sobrepeso (Santhakumar *et al.*, 2014).

Los altos niveles de especies reactivas al oxígeno se han asociado con el desarrollo y la progresión de diabetes con resistencia a la insulina y con hiperglicemia (Azofeifa, 2013). El suministro de una bebida con 25 % jugo de mora (*Rubus adenotrichos*) microfiltrado durante 40 días a ratas diabéticas, mostró una reducción de la glucosa plasmática en un 48,6 %, triglicéridos en un 43,5 % y colesterol en un 28,6 %, con respecto a animales control que consumieron agua. Además, se mejoró la capacidad antioxidante del plasma en un 7 %, disminuyeron los niveles de peroxidación lipídica en plasma en un 19 % y en el tejido renal en un 23 % (Azofeifa, 2013). Este jugo presentaba un contenido aproximado de 623 mg/L de polifenoles, 130 mg/L antocianinas y 48 mg/L elagitaninos.

En la evaluación del efecto hipoglicemiante, hipolipemiante y antioxidante de un extracto rico en elagitaninos obtenido a partir del subproducto industrial de mora *Rubus adenotrichos* (polifenoles totales 133 mg/g BS, elagitaninos 78 mg/g BS) en un modelo *in vivo* de ratas diabéticas, se obtuvo una reducción de la glicemia de hasta 29 % los días 15 y 28 del experimento, y una reducción de un 28 % del colesterol total y 58 % de triglicéridos en el día 49 (Alpízar, 2015). Con este estudio *in vivo* sobre los beneficios de la mora en la salud, se estableció que a partir del subproducto o del jugo, se puede preparar un producto nutracéutico con efectos hipoglicemiante e hipolipemiante que potencialmente podría ser utilizado como coadyuvante para el tratamiento farmacológico de personas diabéticas (Azofeifa, 2013; Alpízar, 2015).

3.6 Extracción de una matriz alimentaria (sólido-líquido)

La extracción sólido-líquido es una operación unitaria que involucra la remoción de un compuesto de interés, el soluto, presente en una matriz sólida utilizando un líquido, el disolvente, que es capaz de disolver el soluto. El proceso involucra la agitación del sólido, en este caso el alimento y el disolvente juntos, ya sea en proceso de una etapa o de varias

etapas, manteniéndolos por un tiempo predeterminado y luego separando el disolvente. En el período donde se mantiene el sólido y el líquido juntos ocurren 3 etapas: ingreso del disolvente al sustrato y solubilización del soluto, movimiento de la disolución del interior del alimento hacia su superficie y por último dispersión de la disolución en la mayoría del disolvente (Takeuchi *et al.*, 2009).

3.6.1. Extracción de compuestos polifenólicos

Una extracción es generalmente el primer paso en el aislamiento de compuestos polifenólicos de tejidos vegetales. La composición y la naturaleza de los compuestos polifenólicos a ser extraídos determinan la escogencia de las condiciones de extracción. La extracción es influenciada por la naturaleza química de los compuestos, el método de extracción utilizado, las condiciones y la presencia de interferencias (Takeuchi *et al.*, 2009).

Debido a la variedad de compuestos polifenólicos existentes y su capacidad para ligarse a otros componentes como carbohidratos y proteínas (Haminiuk *et al.*, 2012), resulta difícil desarrollar un proceso capaz de recuperar todos los polifenoles presentes en una matriz vegetal. Los factores más importantes que afectan la extracción de polifenoles de productos naturales son el tipo de disolvente, relación disolvente/sólido, temperatura y tiempo de contacto, tamaño de partícula y pH del medio (Takeuchi *et al.*, 2009).

3.6.1.1 Disolvente

Para la extracción de polifenoles de frutos como mora, arándanos, uvas y sus residuos, se utilizan disolventes orgánicos puros o combinados tales como: etanol acuoso (con agua a distintas proporciones) (Shi *et al.*, 2003; Nawaz *et al.*, 2006; Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Karvela *et al.*, 2009; Sant'Anna *et al.*, 2012; Librán *et al.*, 2013; Roopchand *et al.*, 2013; Da Fonseca *et al.*, 2015), metanol acidificado con ácido clorhídrico o acético (Aybastier *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Tumbas-Saponjac *et al.*, 2014) o mezclas de metanol o etanol con acetona y acetato de etilo (Vatai *et al.*, 2009; Agustin-Salazar *et al.*, 2014).

Según la clasificación de disolventes orgánicos de la FDA, los disolventes de la clase 3 como etanol, acetona y acetato de etilo, pueden ser utilizados en el procesamiento de

alimentos cumpliendo las buenas prácticas de manufactura, y se conocen como disolventes GRAS (Generally Recognized as Safe). Los disolventes clase 2 como metanol, hexano o acetonitrilo pueden ser utilizados sólo bajo condiciones específicas, por su toxicidad inherente (Takeuchi *et al.*, 2009). Se ha reportado que el etanol es un disolvente eficiente para la extracción de polifenoles y se cataloga como GRAS, por lo que es muy utilizado en la obtención de polifenoles de matrices vegetales para la producción de nutraceuticos (Takeuchi *et al.*, 2009; Vatai *et al.*, 2009).

3.6.1.2 Relación disolvente-sólido

Según los principios de transferencia de masa, la fuerza motriz que produce la transferencia es el gradiente de concentración del producto de interés que existe entre el sólido y el disolvente, el cual es mayor cuando se utiliza una mayor relación disolvente/sólido (S/S). Por lo tanto, una mayor relación S/S permitirá mayor extracción de sólidos de la muestra. Sin embargo, tomando en cuenta que el costo de la utilización de disolvente repercute directamente en el costo del proceso de extracción y que una mayor cantidad de disolvente significa un proceso de concentración del compuesto de interés más costoso, se debe considerar que la relación S/S a seleccionar debe ser analizada y optimizada (Takeuchi *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que la relación S/S puede tener una interacción con la temperatura. En estos casos la premisa de que a mayor S/S utilizado mayor índice de extracción no es siempre cierta. En un estudio donde se evaluó el efecto de S/S y la temperatura sobre la extracción de polifenoles de semillas de uva, se obtuvo que a diferentes temperaturas la relación S/S donde se logró una mejor extracción resultó variable. Así, por ejemplo, a una temperatura de 60 °C se obtuvo mayor extracción con una relación S/S de 20 mL/g que con una de 30 mL/g (Bucić-Kojić *et al.*, 2007).

3.6.1.3 Temperatura y tiempo de extracción

La temperatura y tiempo de extracción son factores importantes ligados al proceso de extracción que deben ser analizados con detalle. Ambos factores se encuentran muy relacionados en su efecto sobre la efectividad de la extracción y poseen un rol muy

importante en los aspectos económicos del proceso para una aplicación industrial (Takeuchi *et al.*, 2009).

En general, se ha reportado que altas temperaturas mejoran la eficiencia de la extracción, ya que incrementan la solubilidad y la tasa de difusión de los compuestos hacia el disolvente (Takeuchi *et al.*, 2009). Sin embargo, en la extracción de compuestos polifenólicos se debe prestar atención a su estabilidad en altas temperaturas. En el caso de antocianinas, altas temperaturas de extracción (>50 °C) aceleran su proceso de degradación (Dai *et al.*, 2009). Para la extracción de compuestos termosensibles resulta preferible el uso de bajas temperaturas y altos tiempos de extracción. Por lo tanto, estas variables deben ser optimizadas para cada sistema de extracción específico para maximizar los rendimientos y satisfacer los aspectos económicos (Takeuchi *et al.*, 2009).

3.6.1.4 Tamaño de partícula

El rendimiento de la extracción de polifenoles se puede ver afectado por las variaciones en el tamaño de partícula. La transferencia de masa en una extracción se puede mejorar si se utiliza un tamaño de partícula pequeño ya que facilita la penetración del disolvente en la matriz sólida (Takeuchi *et al.*, 2009). Esto fue analizado en la extracción de polifenoles de semilla de uva molida con distintos tamaños de partícula, donde la mayor extracción de 66,8 mg AG/g BS se obtuvo con el menor tamaño de partícula (0,16-0,125 mm) y la menor extracción de 23,9 mg AG/g BS con el mayor tamaño de partícula (>0,63 mm) (Bucić-Kojić *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha reportado que un tamaño de partícula muy pequeño brinda coeficientes de variación altos en el resultado por un posible efecto de aglomeración de partículas. Además, con los menores tamaños se extrae una mayor cantidad de proteínas las cuales brindan resultados positivos con el reactivo Folin-Ciocalteu causando una interferencia en la determinación espectrofotométrica de polifenoles totales, lo cual podría sobreestimar el valor de polifenoles obtenido (Bucić-Kojić *et al.*, 2007).

3.6.1.5 Valor de pH

En la extracción de polifenoles, el pH puede tener un rol significativo en su desempeño. El pH bajo afecta favorablemente en la extracción dado que al agregar ácido y disminuir su

valor se aumenta la estabilidad de los polifenoles (principalmente las antocianinas), su solubilidad y la desintegración de las paredes celulares facilitando la difusión de los compuestos del sólido al disolvente (Takeuchi *et al.*, 2009). En un estudio de extracción de polifenoles de semilla de uva utilizado etanol acidificado con ácido cítrico, se encontró que a pH de 3,2 se optimiza la extracción de polifenoles y pro-antocianinas, mientras que a pH 2 se optimiza la extracción de flavanoles (Karvela *et al.*, 2009).

3.6.2. Extracción asistida por ultrasonido

Con el desarrollo de las *tecnologías verdes* o *química verde* en los últimos años, las técnicas de extracción más amigables con el ambiente se han hecho más atractivas para la industria y la investigación. La extracción de compuestos bioactivos asistida por ultrasonido es una de las tecnologías emergentes en este campo. Esta tecnología ofrece una alta reproducibilidad en tiempos cortos, un manejo simple y una reducción en el consumo de energía al disminuir tiempo y temperatura de extracción (Khan *et al.*, 2010).

Cuando una extracción sólido-líquido es asistida con ultrasonido se provoca una intensificación en las tasas de transferencia de masa, una mejora en la penetración del disolvente en el tejido vegetal y un aumento de la capilaridad, efectos que facilitan el ingreso del disolvente en el sólido. Se ha establecido que estos factores mencionados ocurren principalmente por el colapso de las burbujas producidas por la cavitación, que generan una disrupción de las paredes celulares del tejido vegetal (Da Porto *et al.*, 2013). Para lograr una mejor extracción de los compuestos utilizando ultrasonido es necesario optimizar los factores que influyen en la generación de ondas, como lo son la frecuencia, la potencia de sonicación, el tiempo de proceso y la distribución de las ondas de ultrasonido (Khan *et al.*, 2010).

En algunos estudios se ha reportado un mejor rendimiento de extracción de polifenoles de aronia o *chokeberry* al realizar una extracción asistida por ultrasonido durante 15 minutos, cuando se compara con una extracción sin ultrasonido por 60 minutos (Galvan *et al.*, 2012). De igual manera, se obtuvo una extracción de polifenoles 3 veces más rápida mediante el

uso de ultrasonido que en una extracción convencional de cáscaras de naranja (Khan *et al.*, 2010).

Para realizar una extracción asistida por ultrasonido se tienen disponibles varios tipos de equipos, ya sea continuos o discontinuos, donde los segundos son los más utilizados en la actualidad. Los equipos de ultrasonido discontinuos se pueden considerar directos o indirectos (Figura 1) según su forma de generar cavitación. En los equipos directos la muestra se encuentra en contacto directo con la superficie que emite las ondas, y en los equipos indirectos el recipiente con la muestra se encuentra sumergido en el baño del líquido que recibe las ondas de ultrasonido (Takeuchi *et al.*, 2009).

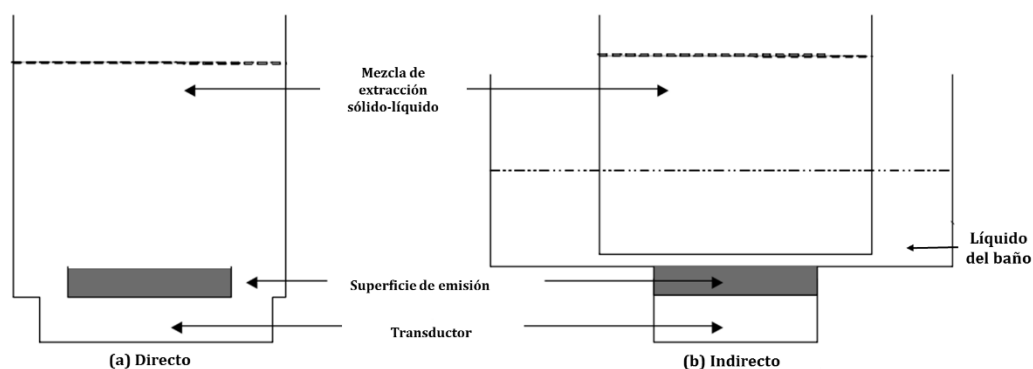


Figura 1. Equipos directo e indirecto de extracción asistida por ultrasonido (Adaptado de Takeuchi *et al.*, 2009).

Los equipos más utilizados en la extracción asistida por ultrasonido son los baños y las sondas. El baño de ultrasonido se utiliza principalmente para limpiar accesorios de equipos y cuenta con un transductor en el fondo o sumergido en el tanque del baño (Figura 1b). Este equipo resulta económico y accesible por lo que es comúnmente utilizado. Su principal desventaja es el líquido del baño que rodea al recipiente que contiene la mezcla líquido-sólido de la extracción, el cual provoca una disminución del efecto de las ondas generadas por ultrasonido (Takeuchi *et al.*, 2009).

La cavitación producida por el ultrasonido puede ser generada directamente en la mezcla líquido-sólido cuando una sonda generadora se coloca en el interior del recipiente de extracción. Esta sonda tiene la capacidad de suministrar grandes cantidades de energía,

aunque su desventaja es que las ondas se generan en dirección axial, provocando altas intensidades cerca de la sonda, pero disipándose en dirección radial (Takeuchi *et al.*, 2009).

3.6.3. Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos

Los subproductos generados en el procesamiento de frutas y vegetales, como cáscaras, semillas y residuos de despulpado o prensado, todavía contienen grandes cantidades de compuestos polifenólicos, razón por la cual son una fuente potencial de antioxidantes naturales (Ignat *et al.*, 2011). Debido a esto, muchos estudios han analizado y optimizado la extracción de polifenoles de subproductos de frutas. En el Cuadro IV se muestran algunos de los estudios realizados sobre el tema.

Cuadro IV. Estudios científicos realizados sobre la utilización de subproductos como fuente de antioxidantes.

Subproducto	Tipo de extracción ¹ (mejores condiciones)	Polifenoles totales extraídos	Referencia
Semilla de uva molida	EC. 25-80 °C, EtOH 50%, L/S 10-40 mL/g, 120 min	14,72 mg AG/g - 66,81 mg AG/g BS	Bucić-Kojić <i>et al.</i> , 2007
Residuo del prensado de uva	EC. 60 °C, EtOH 50% y Acetona-agua 50%	17,3 mg AG/g a 20,2 mg AG/g BS	Vatai <i>et al.</i> , 2009
Semilla de uva molida	EAU. 56 °C, EtOH 53,1% y 29 min	5,44 mg AG/100 mL extracto	Ghafoor <i>et al.</i> , 2009
Residuo del prensado de uva	EC. 60 °C, EtOH 50%, 120 min, y L/S 50 mL/g bs.	2261 mg AG/100 g BS residuo	Sant'Anna <i>et al.</i> , 2012
Residuo del prensado de arándanos rojos	EC. 80 °C, EtOH 50%, 120 min, L/S 10:1 y pH 2	964 mg AG/L extracto	Roopchand <i>et al.</i> , 2013
Residuo del prensado de uva	EC. 20-23 °C, EtOH 75%, 120 min, S/L 1/25 y pH 2	4,58- 28,06 mg AG/g extracto	Librán <i>et al.</i> 2013
Residuo del prensado de uva	EAM. 100 °C, H ₂ O y 8 min	3,68 g AG/100 g BS extracto	Brahim <i>et al.</i> , 2014
Residuo del prensado de mora	PLE. 100 °C, EtOH 50%, 30 min, 7,5 MPa	7,36 mg AG/g BH	Da Fonseca <i>et al.</i> , 2014
Residuo de mora	SFE-US. 60 °C, 20 MPa, 120 min, L/S 400kg/kg	4,44 mg AG/g extracto	Pasquel <i>et al.</i> , 2014
Cáscaras de uva y semilla de uva molida	SW. 80-120 °C y 10 MPa	Cáscaras 44,3-77,0 mg AG/g Semillas 44 - 124 mg AG/g	Duba <i>et al.</i> , 2015

¹EC: extracción convencional con disolvente, EAU: extracción asistida con ultrasonido, EAM: extracción asistida por microondas, PLE: extracción con altas presiones, SW: extracción con agua supercrítica, SFE-US: extracción con CO₂ supercrítico asistida por ultrasonido, L/S: relación líquido sólido, S/L: relación sólido líquido, BS: base seca, BH: base húmeda. EtOH: Etanol.

4. Materiales y métodos

4.1 Localización

Las pruebas de extracción de polifenoles se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Los análisis físico-químicos se realizaron en los laboratorios de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), instituciones ubicadas en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca.

4.2 Materias primas

La materia prima utilizada en el proyecto es un subproducto del procesamiento industrial de mora (SPIM) (Figura 2), el cual es obtenido de la etapa de despulpado en la preparación de una pulpa de mora. Este subproducto fue facilitado por la empresa Protica S.A., ubicada en San Diego de Tres Ríos, Cartago. El SPIM es desechado por la empresa y representa aproximadamente un 20 % del total de mora procesada. La composición química del SPIM se presenta el Cuadro XX de Anexos. La mora de la cual se obtiene el residuo es de la variedad Vino (*Rubus adenotrichos*) y es cosechada en las zonas altas de Pérez Zeledón.



Figura 2. Fotografía del subproducto del procesamiento industrial de mora *Rubus adenotrichos* (SPIM).

El etanol utilizado proviene de la Fábrica Nacional de Licores ubicada en Rincón de Salas de Grecia, Alajuela. Este etanol se define como alcohol puro y posee un $96,2 \pm 0,2$ % v/v de grado alcohólico y una densidad relativa (20 °C/ 20°C) de $0,806 \pm 0,005$. La ficha de certificación de alcohol puro se presenta en Anexos.

4.2.1. Condiciones de almacenamiento y preparación del SPIM

El SPIM fresco, proveniente de un único lote, se mantuvo en congelación a -18 °C durante el desarrollo de las pruebas experimentales (realizadas en un periodo de tres meses), tomando en cuenta que, según datos reportados, el contenido de polifenoles en mora congelada se mantiene constante durante un mes y disminuye solamente un 11% luego de 3 meses de almacenamiento a temperaturas de congelación (Dai *et al.*, 2009). Una vez recolectado el residuo se almacenó en congelación en bolsas de 5 kg. Al iniciar las pruebas experimentales éste se empacó en bolsas laminadas metalizadas de 300 g, cantidad que representa el tamaño máximo de una corrida de extracción. Previo a cada corrida, una bolsa de 300 g de SPIM era colocada 24 horas antes a 5 °C para ser descongelada.

El SPIM fue utilizado fresco y no seco y molido dado que en pruebas preliminares se detectaron varios inconvenientes: el SPIM molido debía ser desengrasado proceso que podía incorporar residuos del disolvente orgánico hexano en el extracto y en el proceso se logró extraer alta variedad de compuestos que dificultaban la elucidación de los ATCs y ETs en los cromatogramas obtenidos mediante HPLC. Además, se verificó que la cantidad de polifenoles totales extraídos del SPIM entero y fresco representaban una buena parte de los polifenoles extraídos del SPIM seco y molido.

4.3 Métodos de extracción de polifenoles

4.3.1. Extracción convencional

4.3.1.1 Equipo

El sistema utilizado en la extracción de polifenoles del SPIM se muestra en la Figura 3. El recipiente de extracción corresponde a un frasco de vidrio con tapa que asegura un cierre hermético, la cual tiene acoplados un termómetro, agitador y condensador. Este recipiente

fue colocado en un baño de agua caliente con control de temperatura. El sistema de agitación acoplado corresponde a un rotor Eurostar 60 (IKA[®], Alemania), con propela de disco plano de 6 hojas (tipo Rushton) y un condensador metálico enfriado por agua con serpentín interno para aumentar el área de transferencia de calor.

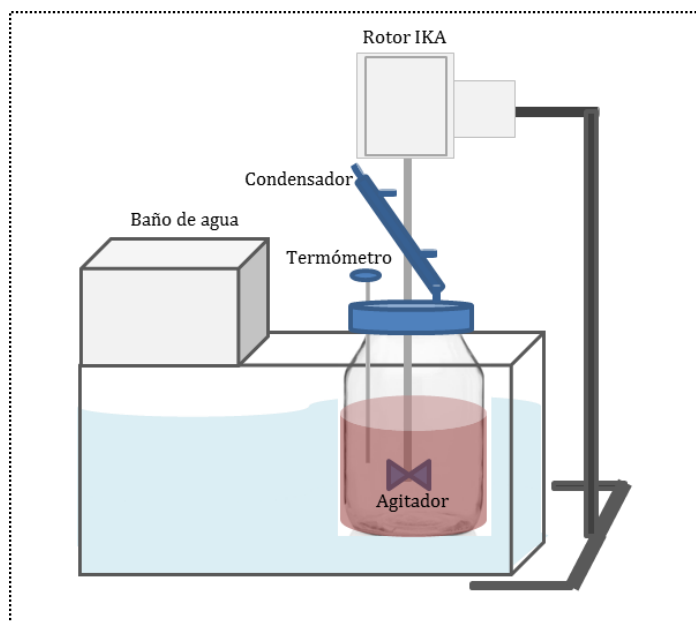


Figura 3. Esquema del equipo utilizado para la extracción convencional de polifenoles del SPIM.

4.3.1.2 Procedimiento de extracción

Para realizar la extracción de polifenoles se siguió el proceso detallado en la Figura 4. El volumen de extracción utilizado para cada corrida fue de 500 mL de acuerdo con la Ecuación 4 de la sección 4.4.2.2. El precalentamiento fue realizado en microondas por periodos entre 1,5 y 2,5 min, hasta alcanzar temperaturas entre 50 °C y 58 °C, según la temperatura de extracción que correspondiera. En el proceso la temperatura del baño se mantuvo 5 °C por encima de la temperatura de extracción, de tal forma que la temperatura dentro del recipiente de extracción (controlada con termómetro) se estabilizaba a los 3 minutos de proceso. La velocidad de extracción fue calculada para cada corrida con la Ecuación 5 (sección 4.4.2.2) asegurando una suspensión total de los sólidos. Para el enfriamiento, el recipiente de vidrio fue colocado en un baño con agua de hielo, hasta alcanzar una temperatura de 20 °C. Seguidamente se realizó el escurrido, donde se

separaron las semillas con un tamiz. Luego de la centrifugación, llevada a cabo en una centrífuga 5810R (Eppendorf[®], Alemania) se midió la masa del extracto obtenido y éste se almacenó a -18 °C en frascos de vidrio ámbar y bolsas metalizadas por un máximo de 7 días antes de realizar los análisis físico-químicos.

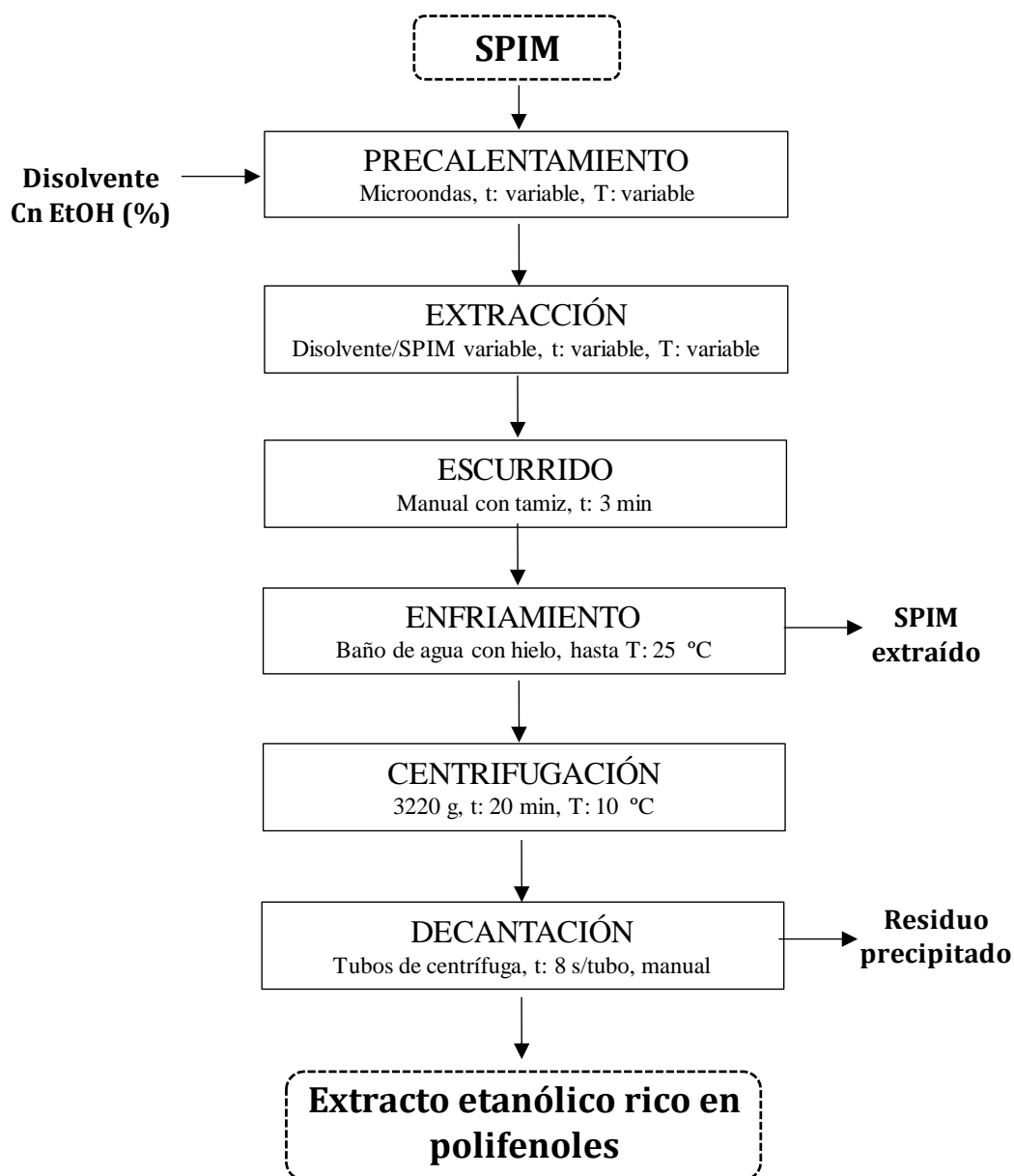


Figura 4. Diagrama del flujo de proceso de extracción de polifenoles del SPIM.

4.3.2. Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido se realizó de la misma manera que la extracción convencional, pero colocando el recipiente de extracción en un baño ultrasónico modelo 3210 (Branson[®], EUA), operado a una frecuencia de 40 kHz y una potencia de 130 W. El procedimiento de extracción es el mismo que el detallado en la Figura 4, tomando en cuenta que la temperatura del baño fue medida con termómetro.

4.4 Metodología

4.4.1. Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles.

4.4.1.1 Procedimiento

Para determinar el efecto de la aplicación de ultrasonido sobre la extracción de polifenoles del SPIM, se realizaron dos cinéticas de extracción. La primera cinética se realizó mediante una extracción convencional y la segunda mediante una extracción asistida por ultrasonido, con 3 repeticiones para ambos casos. Las condiciones de extracción utilizadas, presentadas en el Cuadro V, corresponden a las condiciones del punto central de la superficie de respuesta de la sección siguiente, establecidas de acuerdo a lo indicado en la literatura como aquellas donde se logra una adecuada extracción de compuestos polifenólicos.

Cuadro V. Condiciones de extracción utilizadas para la elaboración de las cinéticas de extracción de polifenoles del SPIM¹.

Parámetro	Valor del punto central
Temperatura (°C)	60
Relación SPIM/Etanol (m/m)	1:2,5
Concentración de etanol (% m/m)	67,5

¹Se utilizó una velocidad de agitación de 275 rpm, la cual se determinó aplicando la ecuación de Zwietering para mantener condiciones de mezclado con suspensión total de los sólidos (Leng *et al.*, 2008).

El tiempo total del análisis fue de 8 horas (480 min) según lo realizado por Khan *et al.* (2010) para las cinéticas de extracción de polifenoles. Muestras de 2,5 mL fueron tomadas una vez para cada repetición a los 5, 60, 180, 300 y 480 minutos, y en al menos dos repeticiones a los 30, 45, 120 y 360 minutos, para abarcar tiempos diferentes de muestreo con un menor número de muestras. En cada repetición se muestrearon 7 tiempos en total.

Las extracciones se realizaron según el proceso detallado en la Figura 4. Para cada tiempo, se tomó la muestra con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos Eppendorf de 2,5 mL, los cuales fueron guardados en bolsas metalizadas en congelación a -18 °C. Para el análisis de las muestras los tubos se colocaron en una centrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf®, Alemania) por un tiempo de 15 minutos para no sobrecalentar la muestra, ya que este tipo de centrífuga no cuenta con sistema de enfriamiento.

En el caso de la extracción asistida por ultrasonido utilizando baño ultrasónico, según el manual de funcionamiento del equipo y lo comprobado mediante experimentación, la temperatura de estabilización fue de 62 ± 5 °C, lo cual permitió que el ensayo fuera realizado en la temperatura requerida de 60 °C.

4.4.1.2 Modelado de cinéticas y análisis estadístico

Para realizar las cinéticas de extracción se estableció gráficamente la cantidad de polifenoles extraídos con respecto al tiempo. Utilizando el programa SigmaPlot 10.0 (Systat Software®, USA) se realizó el modelado de las cinéticas mediante dos modelos de extracción, uno de primer orden según lo expuesto por Khan *et al.* (2010), y otro de pseudo primer orden según el trabajo de Sant'Anna *et al.* (2012), con el fin de encontrar el modelo con mejor ajuste. Los modelos descritos se presentan en las Ecuaciones 1 y 2.

Modelo de primer orden

$$Ci_t = Ci_\infty(1 - e^{-kt}) \quad [1]$$

Modelo de pseudo primer orden

$$Ci_t = Ci_\infty - \frac{Ci_\infty}{e^{kt+a}} \quad [2]$$

Donde,

C_i : contenido del compuesto de interés en el tiempo t (mg del compuesto/100 mL)

$C_{i\infty}$: contenido máximo de compuesto de interés (mg del compuesto/100 mL)

t : tiempo de extracción (min)

k : constante aparente de la velocidad de extracción de primer orden o pseudo primer orden (min^{-1})

a : constante de integración (adimensional)

La constante k obtenida con unidades min^{-1} , es un parámetro que indica la velocidad de extracción y permite analizar cuál proceso resulta más rápido en la extracción de polifenoles del SPIM. Para el análisis estadístico de los valores de la constante k se aplicó un diseño irrestricto aleatorio de dos tratamientos (convencional y asistida con ultrasonido) y se realizó una comparación de medias mediante la prueba *t-student* para un 95% de confianza, obtenida mediante el programa Excel 2013 (Microsoft®, USA). El valor k fue obtenido mediante el programa SigmaPlot® para cada repetición de las cinéticas, lo que permitió contar con 3 repeticiones en cada tratamiento para la comparación de medias. Las cinéticas de extracción se realizaron para los siguientes compuestos: polifenoles totales (PT: mg de ácido gálico/mL extracto), antocianinas (ATCs: mg de cianidin 3-glucósido/mL extracto) y elagitaninos (ETs: mg de ácido elágico/mL extracto).

4.4.2 Optimización de la extracción de polifenoles

4.4.2.1 Diseño experimental

Para la extracción de polifenoles del SPIM se aplicó la metodología de superficie de respuesta, utilizando un diseño central compuesto rotatable (DCCR) de tres factores, los cuales fueron: temperatura, relación disolvente/SPIM y concentración de etanol. Lo anterior con el fin de evaluar el efecto de los factores sobre la extracción de polifenoles totales (mg AG/100 g SPIM y mg/g BS extracto), antocianinas (mg C 3-G/100 g SPIM y mg/g BS extracto), elagitaninos (mg AE/100 g SPIM y mg/g BS extracto) y acidez titulable (mg ácido málico/100 g extracto). La acidez titulable se incluyó para evaluar la pureza del extracto.

Los factores independientes y sus 5 niveles codificados y naturales se muestran en el Cuadro VI. Los niveles de los factores relación disolvente/SPIM y concentración de etanol

fueron establecidos según lo indicado en la literatura y para el factor temperatura el máximo nivel fue determinado de acuerdo con evaluaciones en pruebas preliminares, donde se obtuvo que la temperatura de extracción no podía superar los 75 °C porque a aproximadamente 78 °C se alcanzaba el punto de ebullición del etanol.

Cuadro VI. Variables independientes y los niveles empleados en un diseño central compuesto rotatable para la optimización de la extracción de polifenoles a partir del SPIM.

Variable independiente	Niveles codificados				
	-1,682	-1	0	1	1,682
	Niveles naturales				
Temperatura (°C)	45,0	51,1	60,0	68,9	75,0
Relación Disolvente/SPIM (m/m)	1,0	1,6	2,5	3,4	4,0
Concentración de etanol (% m/m)	50,0	57,1	67,5	77,9	85,0

El número de puntos experimentales del DCCR utilizado fue obtenido mediante el programa Statistica 7 (Statsoft®, USA), y puede ser calculado utilizando la Ecuación 3:

$$N = 2^k \text{ (puntos factoriales)} + 2k \text{ (puntos axiales)} + n_0 \text{ (puntos centrales)} \quad [3]$$

Donde,

N: número de los puntos experimentales

k: número de factores independientes del diseño experimental

n_0 : número de puntos centrales del diseño experimental

El número de puntos experimentales obtenido fue de 20, ya que $k=3$ y $n_0=6$, por lo que se evaluaron 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 6 puntos centrales. Los experimentos realizados se llevaron a cabo de manera aleatoria para minimizar el efecto de variables no controlables. En el Cuadro VII se muestra el diseño experimental para los 3 factores y sus 5 niveles.

Cuadro VII. Diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de polifenoles del SPIM.

Ensayo		Factores ¹		
Orden estándar	Orden aleatorio	Temperatura (°C)	Relación Disolvente/SPIM (m/m)	Concentración de etanol (% m/m)
1	4	51,1 (-1,0)	1,6 (-1,0)	57,1 (-1,0)
2	7	51,1 (-1,0)	1,6 (-1,0)	77,9 (1,0)
3	20	51,1 (-1,0)	3,4 (1,0)	57,1 (-1,0)
4	8	51,1 (-1,0)	3,4 (1,0)	77,9 (1,0)
5	10	68,9 (1,0)	1,6 (-1,0)	57,1 (-1,0)
6	3	68,9 (1,0)	1,6 (-1,0)	77,9 (1,0)
7	6	68,9(1,0)	3,4 (1,0)	57,1 (-1,0)
8	12	68,9 (1,0)	3,4 (1,0)	77,9 (1,0)
9	15	45,0 (-1,682)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
10	1	75,0 (+1,682)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
11	13	60,0 (0,0)	1,0 (-1,682)	67,5 (0,0)
12	14	60,0 (0,0)	4,0 (+1,682)	67,5(0,0)
13	9	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	50,0 (-1,682)
14	16	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	85,0 (+1,682)
15	11	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
16	2	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
17	5	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
18	19	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
19	17	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)
20	18	60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)

¹Valores presentados entre paréntesis corresponden a los niveles codificados evaluados en cada ensayo.

4.4.2.2 Procedimiento

Para la optimización de las condiciones de extracción de polifenoles del SPIM, se evaluó el proceso de extracción convencional según lo descrito en la sección 4.3.1.2, utilizando el equipo que se muestra en la Figura 3. El tiempo de extracción fue determinado a partir de los resultados obtenidos de la evaluación descrita en el apartado 4.4.1.2, como el tiempo donde se alcanza el equilibrio en la extracción de polifenoles.

Para realizar la extracción se agregó la cantidad de SPIM y disolvente requerido para mantener un volumen de extracción de 500 mL, estos valores utilizados por cada corrida se presentan en el Cuadro VIII, así como las velocidades de agitación utilizadas para cada ensayo.

Cuadro VIII. Masa de SPIM y de disolvente requerida para obtener un volumen inicial de extracción de 500 mL y velocidad de agitación utilizada en cada corrida.

Ensayo		Masa SPIM (g)	Masa Disolvente (g)	Velocidad de agitación (rpm) ¹
Orden estándar	Orden aleatorio			
1	4	185,2	296,4	270
2	7	178,6	285,7	300
3	20	105,9	360,2	245
4	8	101,3	344,5	270
5	10	185,2	296,4	270
6	3	178,6	285,7	300
7	6	105,9	360,2	245
8	12	101,3	344,5	270
9	15	131,2	328,1	275
10	1	131,2	328,1	275
11	13	242,0	242,0	305
12	14	90,0	360,1	255
13	9	135,8	339,5	255
14	16	127,5	318,8	290
15	11	131,2	328,1	275
16	2	131,2	328,1	275
17	5	131,2	328,1	275
18	19	131,2	328,1	275
19	17	131,2	328,1	275
20	18	131,2	328,1	275

¹La velocidad de agitación se determinó aplicando la ecuación de Zwietering para mantener condiciones de mezclado con suspensión total de los sólidos (Leng *et al.*, 2008).

Para obtener las masas descritas en el Cuadro VIII se utilizó la Ecuación 4, donde se establece el supuesto de que la suma de los volúmenes de SPIM y disolvente corresponde al volumen inicial de extracción. Realizando el cálculo se despejó el valor de la masa de SPIM. La densidad de SPIM fue obtenida mediante diferencia de volumen, agregando una cantidad conocida de agua a una masa conocida de SPIM hasta alcanzar un volumen en una probeta. La densidad del disolvente se obtuvo midiendo la masa en balanza analítica de un volumen exacto del disolvente medido con pipeta aforada.

$$V_{\text{inicial de extracción}} = \left(m_{\text{SPIM}} * \frac{1}{\rho_{\text{SPIM}}} \right) + \left(\overbrace{X_{\text{S/S}} * m_{\text{SPIM}}}^{m_{\text{disolvente}}} * \frac{1}{\rho_{\text{disolvente}}} \right) \quad [4]$$

Donde,

V_{inicial} : volumen inicial de extracción, 500 mL

m_{SPIM} : masa SPIM (g), variable a despejar

ρ_{SPIM} : densidad del SPIM (g/mL)

$X_{\text{s/s}}$: relación disolvente/SPIM ($X = m_{\text{disolvente}}/m_{\text{semilla}}$)

La velocidad de agitación utilizada en los ensayos (Cuadro VIII) se calculó mediante la ecuación de Zwietering que establece N_{js} el valor de velocidad requerido para una suspensión completa, donde ninguna partícula se mantiene más de 1-2 segundos en el fondo del tanque (Leng *et al.*, 2008).

Ecuación de Zwietering

$$N_{js} = sv^{0,1} \left[\frac{g \Delta\rho}{\rho_1} \right] x^{0,13} d_p^{0,20} D^{-0,85} \quad [5]$$

Donde,

N_{js} : velocidad de giro para suspender partículas (rps, s^{-1})

s : factor geométrico de propela de disco de 6 hojas (valor 3, según Zwietering, 1958)

v : viscosidad cinemática del líquido (m^2/s)

$v = \mu/\rho$ obtenida a partir de la viscosidad dinámica (μ) cuantificada por el método de Ostwald

g : constante gravitacional ($9,8 m/s^2$)

ρ_1 : densidad del líquido (kg/m^3)

$\Delta\rho$: diferencia de densidad entre sólido y líquido (kg/m^3)

X : fracción sólido-líquido

d_p : diámetro promedio de partícula (0,0028 m)

D : diámetro agitador (0,051 m)

4.4.2.3 Cálculo de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos extraídos del SPIM

Para determinar el grado de extracción de polifenoles, antocianinas y elagitaninos del SPIM, no se puede utilizar el dato de concentración del compuesto de interés como mg/mL de extracto, ya que cada ensayo posee diferentes masas de SPIM en la extracción. Por lo tanto, se calculó un valor de la masa (mg) de compuesto de interés extraídos a partir de 100 g de SPIM. El cálculo realizado se presenta en la Ecuación 6. La masa de extracto corresponde a la obtenida después de la centrifugación y la densidad del extracto fue

obtenida al medir la masa en balanza analítica de un volumen exacto medido con pipeta aforada de 4 mL.

$$Cn_{compuesto} = \frac{Cn_{extracto} \cdot m_{extracto} \cdot \frac{1}{\rho_{extracto}}}{m_{SPIM}} \cdot 100 \quad [6]$$

Donde,

$Cn_{compuesto}$: concentración de compuesto de interés extraído (mg/100 g SPIM)

$Cn_{extracto}$: concentración de compuesto en el extracto (mg/mL extracto)

$m_{extracto}$: masa del extracto líquido obtenido (g)

$\rho_{extracto}$: densidad de extracto (g/mL)

m_{SPIM} : masa del subproducto utilizado en la extracción (g)

El cálculo del porcentaje de polifenoles extraídos del SPIM se realizó según lo indicado en la Ecuación 7. Este dato permite conocer el rendimiento de la extracción realizada.

Extracción de polifenoles

$$E = \frac{Cn_{compuesto}}{Cn_{SPIM}} \cdot 100 \quad [7]$$

Donde,

E: extracción del compuesto de interés (%)

$Cn_{extracto}$: concentración de compuesto de interés extraído (mg/100 g SPIM)

Cn_{SPIM} : concentración de compuesto de interés en el SPIM (mg/100 g SPIM)

4.4.2.4 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos de la optimización de la extracción de polifenoles, se generaron los modelos de las superficies de respuesta utilizando el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA). Con el fin de estimar que los modelos matemáticos generados presentan buen ajuste y son significativos, el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj) obtenidos debían ser mayores a 0,8, la probabilidad del modelo (p) significativa, la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) no

significativa y la distribución de los residuos aleatoria. Para realizar la ecuación del modelo se utilizaron solamente los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos del análisis de varianza, por lo que se volvieron a correr los análisis sin tomar en cuenta los coeficientes no significativos. Para calcular las respuestas predichas por los modelos se utilizaron las ecuaciones matemáticas con solamente los coeficientes que sí fueron significativos.

4.4.2.5 Verificación del modelo

Para verificar que los modelos matemáticos obtenidos del DCCR sí predicen las variables respuesta se llevaron a cabo dos ensayos adicionales, cada uno por duplicado. La metodología utilizada es la misma que la descrita en la sección 4.4.2.2. Los resultados obtenidos por experimentación se compararon con los predichos por los modelos. Para determinar que el modelo del diseño era adecuado se definió que el intervalo de confianza del valor predicho por el modelo debía traslaparse con el intervalo del valor obtenido experimentalmente para cada variable respuesta.

4.4.2.6 Aplicación de la función de deseabilidad

Mediante el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft[®], USA), se aplicó la función de deseabilidad (*desirability function*), con la cual se pueden analizar simultáneamente múltiples respuestas para obtener unas condiciones óptimas de extracción donde se maximen las respuestas analizadas. El valor de deseabilidad varía entre 0 y 1, donde una deseabilidad de 1 indica que la respuesta alcanza el valor óptimo o ideal.

4.5 Análisis físico-químicos

4.5.1. Polifenoles totales

Los polifenoles totales contenidos en los extractos y en el SPIM fueron cuantificados mediante el método del Laboratorio de Química del CITA “Determinación de polifenoles” P-SA-MQ-048 (CITA, 2015a), basado en el método de Georgé & Brat (2005). El método consiste en la cuantificación de los polifenoles presentes en una fruta, jugo o derivados mediante el desarrollo de la reacción redox del reactivo Folin Ciocalteu y los polifenoles

por espectrofotometría UV/Vis. Para el análisis de datos se realizó una curva de ácido gálico ($Abs=0,0096 \cdot C_{\text{ácido gálico}}+0,0418$; $r^2= 0,9995$) y el resultado se obtuvo por interpolación expresado como miligramos de ácido gálico en un litro de extracto (mg AG/L).

En la sección B de la determinación se utilizó un cartucho Oasis[®] HLB de 6cc acoplado a una bomba de vacío Supelco Visiprep 24[®] operada a una presión de -18 kPa, para retener los polifenoles y cuantificar las interferencias, como lo son ácidos o azúcares con capacidad reductora, para luego restarlos del contenido de polifenoles totales obtenido. Dado que el etanol puede variar la afinidad del cartucho para retener los polifenoles, se realizaron las diluciones necesarias para que todos los extractos fueran corridos por el cartucho con un mismo porcentaje de etanol (20%) y se realizó una prueba donde se comprobó que este contenido de etanol no afectaba la retención de los compuestos de interés.

4.5.2. Antocianinas y elagitaninos por HPLC

Las antocianinas y los elagitaninos contenidos en los extractos y en el SPIM fueron determinados mediante el método del CITA “Determinación de polifenoles por HPLC” P-SA-MQ-044 (CITA, 2015b), basado en el método de Mertz *et al.* (2007). Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alto desempeño acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), utilizando un sistema de cromatografía líquida (Shimadzu[®], EAU). En este método, la separación y cuantificación de los polifenoles se realiza mediante las diferencias de afinidad entre una fase móvil y una fase estacionaria. Las fases móviles utilizadas fueron solución A, ácido fórmico al 2% y solución B, acetonitrilo 80% y ácido fórmico 2%. Se utilizó una columna Luna[®] 5 μm C18 100Å (Phenomenex, EUA), tamaño 150 mm x 2 mm, serie 546184-17. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de horno 30 °C, volumen de inyección 20 μL , flujo 0,3 mL/min. El tiempo de proceso fue de 35 min con el siguiente gradiente: 0-20 min de 5-25% B (solvente B), 20-25 min de 25-100% B, 25-30 min de 100-10% B y 30-35 min de 10-5% B.

Las señales fueron identificadas según los espectros UV a 520 nm para antocianinas, reportadas como equivalentes de cianidina 3-glucósido y a 280 nm para elagitaninos,

reportados como equivalentes de ácido elálgico. La cuantificación de los polifenoles se realiza empleando una curva de calibración elaborada con cianidina 3-glucósido y ácido elálgico utilizados como patrones en la determinación. Los espectros de absorción característicos de cada tipo de polifenol analizado permitieron identificar la señal a cuantificar en el espectro. Para preparar el extracto para la inyección, se realizó una filtración con un filtro de microporo de 0,2 μm , y se diluyó el extracto 1:1 con agua destilada grado HPLC.

4.5.3. Acidez titulable

La acidez se determinó mediante el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005), utilizando un titulador automático modelo 905 Titrando (Metrohm[®], Suiza), el cual determinó el volumen consumido de la disolución valorante de NaOH 0,1 M. La acidez se expresa como un porcentaje de acidez, que indica los gramos de ácido málico obtenidos en 100 g de extracto.

4.5.4. Humedad

La humedad de los extractos se determinó mediante el método del CITA “Humedad” P-SA-MQ-002 (CITA, 2015c), basado en el método AOAC 920.151. Para la cuantificación se colocaron las cápsulas vacías 1 hora a 100 °C y luego se pesaron 20 g de los extractos en las cápsulas. Las muestras se pre-secaron durante mínimo 12 horas a 60 °C en estufa de convección y luego se colocaron a 69-70 °C en estufa al vacío por un mínimo de 4 horas hasta alcanzar masa constante.

5. Resultados y discusión

5.1 Cinéticas de extracción de polifenoles del SPIM

5.1.1. Polifenoles totales

Selección del modelo para la extracción de polifenoles totales

Para la evaluación del proceso de extracción de polifenoles totales (PT) del subproducto industrial de mora (SPIM) se realizaron las cinéticas de extracción durante ocho horas mediante un proceso convencional y un proceso asistido por ultrasonido. Para analizar el comportamiento de extracción de polifenoles se aplicaron el modelo de primer orden y el modelo de pseudo primer orden, previamente utilizados en el modelado de la extracción de polifenoles de matrices vegetales (Khan *et al.*, 2010; Sant'Anna *et al.*, 2012). Para la evaluación del ajuste de los modelos se tomaron en cuenta la probabilidad del modelo (p modelo), el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj) y la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}). Los parámetros de ajuste obtenidos para cada modelo se presentan en el Cuadro IX.

Cuadro IX. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer y pseudo primer orden en la extracción convencional y asistida por ultrasonido de polifenoles del SPIM.

Modelo	Extracción	p modelo	R ²	R ² -adj	p _{fa} ¹
Primer orden	Convencional	<0,0001	0,8803	0,8748	0,02*
	Ultrasonido	<0,0001	0,9108	0,9067	0,05
Pseudo primer orden	Convencional	<0,0001	0,9351	0,9289	0,39
	Ultrasonido	<0,0001	0,9436	0,9382	0,43

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa ($p < 0,05$).

En el Cuadro IX se puede observar que ambos modelos resultaron significativos ($p < 0,0001$) lo cual confirma su aplicabilidad en el modelado de la extracción de PT. Para ambos métodos de extracción, el R^2 resultó mayor para el modelo de pseudo primer orden que para

el modelo de primer orden. Esto significa que los valores estimados de PT con la ecuación de pseudo primer orden, se ajustan mejor a los valores obtenidos experimentalmente, comparado con los estimados por el modelo de primer orden. Sin embargo, no es correcto basar la decisión solamente en el valor de R^2 , ya que es posible que modelos con valores altos de R^2 produzcan predicciones pobres de la respuesta media (Montgomery, 2004).

Ante los posibles errores asociados con el dato de R^2 , se utilizan el R^2 -adj y la p_{fa} . El R^2 -adj es un parámetro más estricto, ya que normaliza el valor del coeficiente de determinación al tomar en cuenta el número de coeficientes en el modelo matemático (Montgomery, 2004). En caso que p_{fa} resulte no significativa, indica que hay ajuste entre la respuesta predicha por el modelo y la obtenida experimentalmente. Según estos dos parámetros de ajuste el modelo de pseudo primer orden es el que logra modelar de mejor manera tanto la extracción convencional como la asistida por ultrasonido, al tener mayor valor de R^2 -adj y no mostrar falta de ajuste en ambos métodos de extracción. Estos resultados se pueden observar gráficamente en la Figura 5, donde el modelo de pseudo primer orden se ajusta mejor a los datos experimentales de polifenoles totales que el modelo de primer orden.

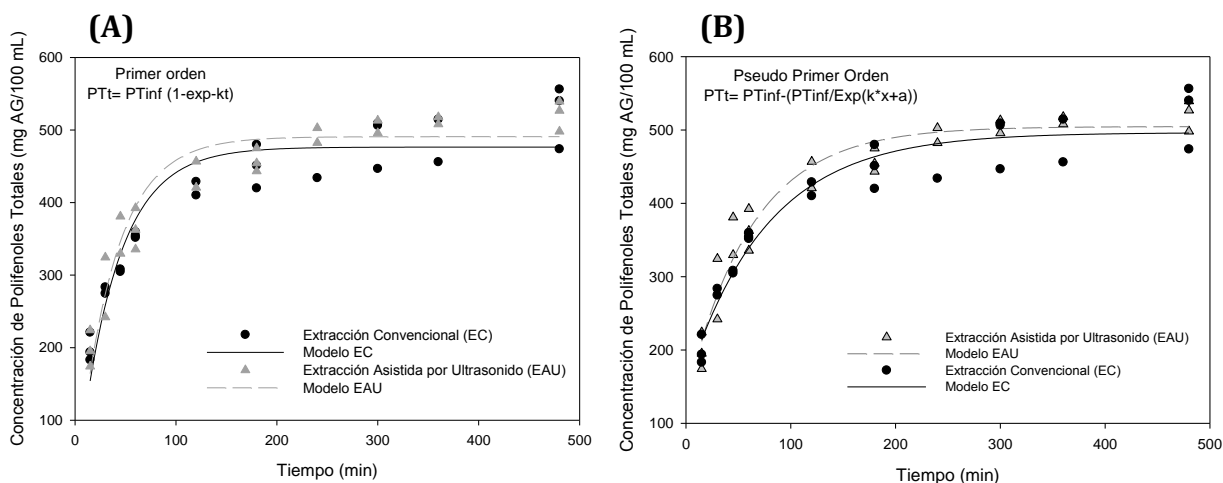


Figura 5. Cinéticas de extracción de polifenoles del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, aplicando el modelo de primer orden (A) y pseudo primer orden (B).

Este resultado obtenido concuerda con lo expuesto por Sant'Anna *et al.* (2012) para la extracción de polifenoles totales de residuo de uva, donde los autores compararon siete modelos no lineales distintos de extracción de polifenoles y obtuvieron mejor coeficiente de determinación y menor error medio estándar al aplicar el modelo de pseudo primer orden.

Evaluación de los procesos de extracción convencional y asistida por ultrasonido

La evaluación de las cinéticas de extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU) se realiza aplicando el modelo de pseudo primer orden porque este predice mejor el comportamiento de la extracción de polifenoles para ambos métodos. En la Figura 5 (A) se presenta el modelo gráficamente, y se puede observar que la extracción aumenta exponencialmente hasta que se alcanza un punto en donde la concentración de PT no varía con el tiempo de extracción, lo que indica que se ha alcanzado un equilibrio entre la concentración de PT en el disolvente y el sustrato. Este efecto se puede observar tanto para la extracción convencional como para la extracción asistida por ultrasonido.

Los parámetros estimados por la regresión no lineal del modelo de pseudo primer orden se presentan en el Cuadro X. Aunque en la representación gráfica el modelo de EAU se muestra por encima del modelo de EC, los parámetros de la regresión son los que permiten analizar estadísticamente si la EAU logró un efecto positivo en la extracción de polifenoles comparado con la EC.

Cuadro X. Parámetros obtenidos mediante el modelo de pseudo primer orden para la extracción de polifenoles totales mediante el método convencional y asistido por ultrasonido¹.

Extracción	PT ∞ (mg AG/100mL)	k (min ⁻¹)	a
Convencional	496 ± 106	0,0130 ± 0,006	0,4 ± 0,2
Ultrasonido	505 ± 20	0,02 ± 0,01	0,3 ± 0,1

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba *t-student* (p<0,05), la falta de asterisco indica que no se obtuvieron diferencias significativas.

El principal valor que se debe tomar en cuenta es la constante *k* expresada en unidades min⁻¹, la cual indica la tasa de velocidad con la que se extraen los polifenoles. Los valores

de k obtenidos para cada método de extracción evaluado resultaron no ser significativamente diferentes al realizar una prueba de *t-student* ($p=0,5827$, $1-\beta=0,0755$).

De acuerdo con resultados obtenidos por otros autores donde el uso del ultrasonido potencia la extracción de polifenoles, se esperaba encontrar diferencias entre los valores k de la EAU y la EC. Por esta razón, este resultado donde el ultrasonido no es más efectivo que la extracción convencional, se puede atribuir al diseño indirecto de sonicación del equipo utilizado y la utilización de una muestra grande (volumen SPIM y disolvente= 500 mL).

Al comparar distintos equipos de ultrasonido utilizados para extracción en alimentos, Chemat *et al.* (2011), indican que los baños ultrasónicos como el utilizado en este estudio, generan ondas de baja intensidad y resultan atenuadas por el agua que contiene el baño de ultrasonido y las paredes del recipiente de vidrio donde se coloca la muestra de extracción. Estos autores resaltan la utilidad de equipos de ultrasonido con sondas que se colocan directamente en el recipiente de extracción o bien equipos de sonicación directa donde el transductor conduce las ondas de ultrasonido directo a la mezcla de extracción, como es el caso del equipo sono-reactor diseñado por REUS[®] en Francia (Chemat *et al.*, 2011).

Khan *et al.* (2010) utilizaron el sono-reactor mencionado de 25 kHz de frecuencia y 150 W de potencia y obtuvieron un aumento en la velocidad de extracción de polifenoles de cáscaras de naranja de $k=0,03 (\pm 0,01) \text{ min}^{-1}$ con extracción convencional, a $k=0,10 (\pm 0,01) \text{ min}^{-1}$ con extracción asistida por ultrasonido aplicando el modelo de primer orden. Da Porto *et al.* (2013) utilizaron un equipo de ultrasonido de sonda (25 kHz/150 W) en la extracción de polifenoles de semilla de uva molida y alcanzaron el máximo de extracción (~110 mg AG/g muestra) a los 15 minutos del proceso.

Otro aspecto importante a tomar en cuenta es lo reportado por Galvan *et al.* (2012) en su trabajo de extracción de polifenoles de arándanos negros (*black chokeberry*) molidos utilizando un equipo de sonicación directa (38,5 kHz/100 W). Estos autores mostraron que el efecto del ultrasonido sobre la extracción de polifenoles se hace menos evidente cuando las otras condiciones de extracción son muy favorables. En ese estudio se obtuvo un aumento máximo de 20% del rendimiento de extracción utilizando ultrasonido a 20°C y

agua como disolvente, las cuales representan las condiciones menos favorables evaluadas en la extracción. Además, se evaluó etanol 50% como disolvente y 60 °C como temperatura de extracción, logrando un aumento de aproximadamente 5% en el rendimiento al utilizar ultrasonido. Estos resultados indican que otro aspecto que pudo afectar el resultado de no obtener diferencias en las velocidades de extracción entre la EC y EAU, es el hecho que las condiciones del punto central utilizadas (60 °C, 57,1 % etanol y 2,5 relación disolvente/SPIM) son muy favorables para la extracción de polifenoles, ya que estas están muy cercanas a las condiciones óptimas de extracción de polifenoles del SPIM obtenidas, los cuales se muestran en la sección 5.2.

Los otros parámetros de regresión obtenidos son el valor de polifenoles totales en el infinito (P_{∞}) que representa el valor estimado por el modelo que se lograría extraer del SPIM con esas condiciones, para cualquier tiempo de extracción mayor a 8 horas. Estos valores de P_{∞} resultaron no ser significativamente diferentes entre la EC y la EAU. En el caso de la constante a , denominada constante de integración, tampoco resultó significativamente diferente. El comportamiento ideal del fenómeno predicho por el modelo es que el valor de a sea cero (Sant'Anna *et al.*, 2012). En este caso se considera que los valores de a para ambos procesos (EC y EAU) son adecuados por ser cercanos a cero.

5.1.2. Antocianinas

Las curvas de las cinéticas de extracción de antocianinas para EC y EAU se presentan en la Figura 6. Como se puede observar en el gráfico, las antocianinas no poseen la misma tendencia en la extracción que los polifenoles, dado que inicia con una extracción exponencial, luego alcanza un equilibrio y por último se inicia un proceso de degradación, mostrado por un descenso en la concentración. Este proceso de degradación de antocianinas es un fenómeno esperado dado que estos compuestos han demostrado ser susceptibles ante diversos factores. Los mecanismos de la degradación de antocianinas incluyen hidrólisis, oxidación y condensación con otros polifenoles, y son potenciados por el calor y el pH (Dai *et al.*, 2009).

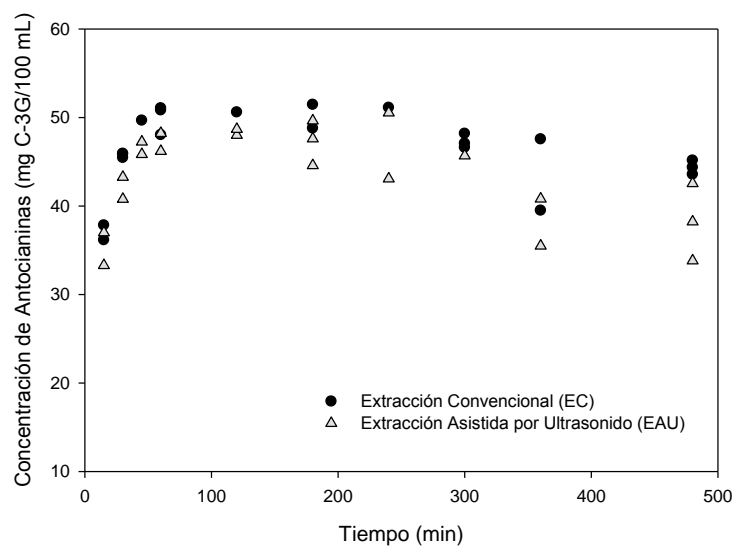


Figura 6. Cinéticas de extracción de antocianinas del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.

En el caso de cianidina 3-glucósido su degradación inicia con la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y la abertura del anillo pirilo al entrar en contacto con temperaturas elevadas; además, puede cooxidarse con otros ácidos fenólicos como ácido clorogénico formando o-quinonas que generan compuestos polimerizados por la reacción quinonas-polifenoles (Dai *et al.*, 2009). Lo anterior demuestra que estos compuestos no pueden ser extraídos durante tiempos largos a temperaturas elevadas.

Dado que el comportamiento de extracción de antocianinas durante ocho horas no puede ser estimado mediante los modelos de primer orden o pseudo primer orden, se analizó la cinética de extracción hasta antes de los 200 min (tiempo donde inicia la degradación de los compuestos) donde el comportamiento si puede ser estimado adecuadamente por los modelos aplicados. Por esta razón, se aplicó el modelado de las cinéticas de EC y EAU hasta 180 minutos de extracción y las curvas se presentan en la Figura 7.

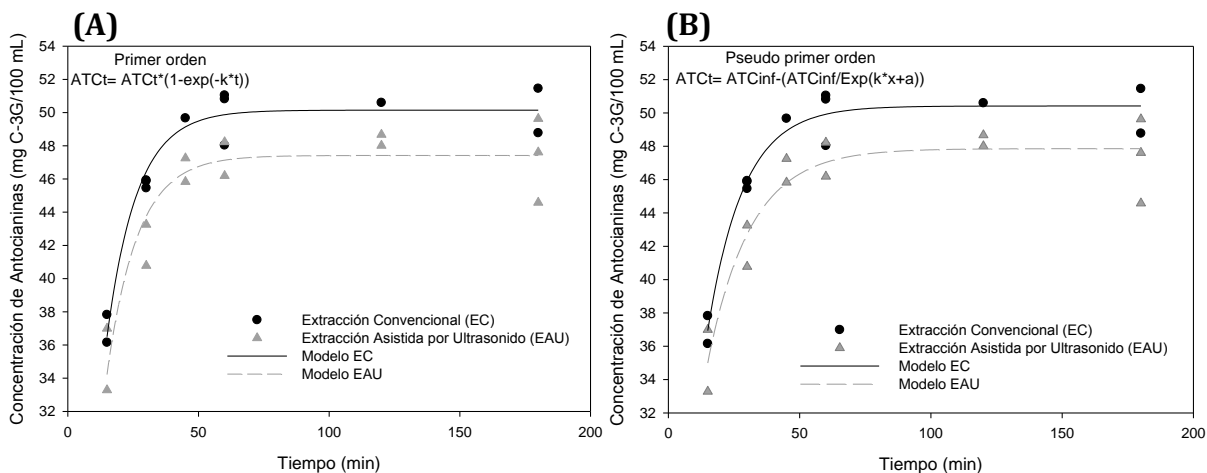


Figura 7. Cinéticas de extracción de antocianinas del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, aplicando el modelo de primer orden (A) y pseudo primer orden (B).

Los valores utilizados para evaluar la efectividad de los modelos en la estimación de la extracción de antocianinas se presentan en el Cuadro XI. Los valores de coeficiente de determinación normal y ajustado y la probabilidad de falta de ajuste resultan ser adecuados y muy similares para ambos modelos, mostrando que tanto el modelo de primer orden como el de pseudo primer orden describen de forma correcta la cinética de la extracción.

Cuadro XI. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de extracción de antocianinas del SPIM analizado hasta los 180 minutos de extracción.

Modelo	Extracción	p modelo	R ²	R ² -adj	pfa
Primer orden	Convencional	<0,0001	0,9533	0,9486	0,8463
	Ultrasonido	<0,0001	0,8766	0,8654	0,6537
Pseudo primer orden	Convencional	<0,0001	0,9587	0,9495	0,9999
	Ultrasonido	<0,0001	0,8966	0,8760	0,9985

Dado que el modelo de pseudo primer orden arroja valores de R², R²-adj y pfa ligeramente más altos, se seleccionó para realizar la comparación de los valores de regresión no lineal obtenidos con la aplicación del modelo, presentados en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Parámetros obtenidos mediante el modelo de pseudo primer orden para la extracción de antocianinas mediante el método convencional y asistido por ultrasonido¹.

Extracción	ATCs ∞ (mg C-3G/100 mL)	k (min ⁻¹)	a
Convencional	50 ± 4	0,09 ± 0,06	-0,2 ± 1,6
Ultrasonido	48 ± 5	0,06 ± 0,08	0,6 ± 1,6

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba *t-student* (p<0,05), la falta de asterisco indica que no se obtuvieron diferencias significativas.

Al igual que en el caso de polifenoles totales, las constantes *k* obtenidas para cada método resultaron no ser significativamente diferentes al realizar la prueba *t-student* (p=0,1392, 1-β=0,2945). El hecho de no obtener diferencias entre la velocidad de extracción para EC y EAU se puede explicar con los mismos criterios descritos en la sección anterior. El valor PT ∞ y la constante *a* resultaron no ser significativamente diferentes entre ambos métodos de extracción. La constante de integración *a* para extracción convencional resulta cercana a cero, comportamiento ideal del modelo según Sant'Anna *et al.* (2012), pero para EAU resulta un poco alejada, lo cual se puede deber a una alta variación entre las repeticiones de las cinéticas de extracción.

5.1.3. Elagitaninos

Los datos para evaluar el ajuste de cada modelo utilizado en la EC y EAU de elagitaninos del SPIM se presentan en el Cuadro XIII. Como se puede observar es claro que el modelo de primer orden no se ajusta de manera adecuada a la extracción de elagitaninos por los bajos valores de R² y R²-adj y por la falta de ajuste mostrada para la EC. En el caso de la extracción de pseudo primer orden no se presenta falta de ajuste lo cual es positivo, pero los valores de R² y R²-adj no son tan altos como para afirmar que el modelo explica adecuadamente la mayoría de las variaciones de los resultados experimentales obtenidos.

Cuadro XIII. Análisis estadístico de los modelos de extracción de elagitaninos del SPIM.

Modelo	Extracción	p modelo	R ²	R ² -adj	pfa ¹
Primer orden	Convencional	0,002	0,4041	0,3727	0,0034*
	Ultrasonido	<0,0001	0,5737	0,5513	0,1515
Pseudo primer orden	Convencional	<0,0001	0,8098	0,7887	0,4873
	Ultrasonido	<0,0001	0,7272	0,6968	0,6768

¹Valores marcados con asterisco indican probabilidad de falta de ajuste significativa (p<0,05).

En la Figura 8 se presenta la representación gráfica de la extracción de elagitaninos, así como las curvas de los modelos. Como se observa, los datos experimentales poseen mucha variabilidad entre sí, aspecto que repercute en los bajos valores obtenidos de R² y R²-adj. La variabilidad obtenida en los valores de elagitaninos se puede atribuir a que estos compuestos generalmente se encuentran unidos a proteínas o pectinas, los cuales forman parte del residuo de los extractos y que pueden ser extraídos solamente en condiciones con alta fuerza iónica o mediante un proceso de hidrólisis ácida (Sant'Anna *et al.*, 2012). Este efecto unido a su característica de ser moléculas condensadas de alto tamaño molecular, provoca que la extracción de elagitaninos de los tejidos vegetales sea más compleja y heterogénea.

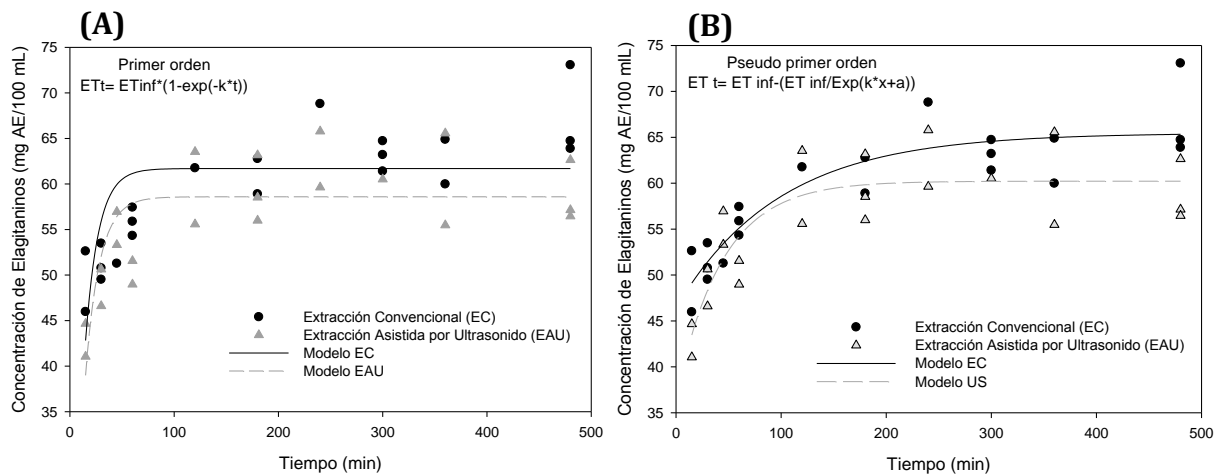


Figura 8. Cinéticas de extracción de elagitaninos del SPIM mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido, aplicando el modelo de primer orden (A) y pseudo primer orden (B).

En la evaluación de los parámetros de regresión lineal, Cuadro XIV, se observa el mismo efecto obtenido para polifenoles totales y antocianinas. Las constantes k obtenidas para cada método resultaron no ser significativamente diferentes al realizar una *prueba t-student* ($p=0,1211$, $1-\beta=0,3261$), para lo cual aplican los mismos criterios expuestos sobre la inefectividad del ultrasonido. Los valores de los parámetros ET_{∞} y a resultaron no ser significativamente diferentes entre ambos métodos de extracción y la constante de integración a sí resulta alejada de cero, comportamiento no esperado por el modelo (Sant'Anna *et al.*, 2012), lo cual se atribuye a la variabilidad obtenida en los valores de elagitaninos y refleja que el modelo no se logra ajustar a la extracción de ETs.

Cuadro XIV. Parámetros obtenidos mediante el modelo de pseudo primer orden para la extracción de elagitaninos mediante el método convencional y asistido por ultrasonido¹.

Extracción	ETs ∞ (mg AE/100 mL)	k (min ⁻¹)	a
Convencional	65 ± 5	0,011 ± 0,007	1,2 ± 0,6
Ultrasonido	61 ± 7	0,03 ± 0,05	0,8 ± 1,4

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba *t-student* ($p<0,05$), la falta de asterisco indica que no se obtuvieron diferencias significativas.

5.1.4. Selección del tiempo de extracción para la optimización

A partir de las cinéticas de extracción elaboradas para polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos se seleccionó un tiempo de extracción para ser utilizado en la optimización de los factores temperatura, concentración de disolvente y relación disolvente SPIM del siguiente apartado. Este tiempo fue escogido como el tiempo donde se alcanza el equilibrio en la extracción de los compuestos, el cual resultó ser de 120 minutos. En el caso de polifenoles totales, a los 120 minutos de extracción se logran extraer el 85 % de los polifenoles obtenidos en el infinito ($PT_{\infty}= 496$ mg AG/100 g SPIM) según el modelo, para antocianinas en este tiempo se recuperan un 99 % del valor máximo obtenido en las cinéticas (ATCs máx= 51 mg C-3G/100 g SPIM) y para los elagitaninos se logra extraer el 96 % del promedio obtenido en la zona de equilibrio (ETs promedio= 64 mg AE/100 g SPIM, entre tiempo 120 y 480 min) de las cinéticas. Este tiempo seleccionado concuerda

con el expuesto por Librán *et al.* (2013) donde en un periodo de 120 minutos se extrajo el 90 % del máximo de polifenoles totales obtenido en las cinéticas de extracción de polifenoles de subproductos de uva.

Las cinéticas de extracción realizadas corresponden a una buena herramienta en la evaluación de procesos de extracción, ya que permiten obtener mayor información sobre el comportamiento de los compuestos, PT, ATCs y ETs en este caso. Si se compara la realización de cinéticas respecto a un diseño experimental donde se evalúa el tiempo como un factor, se sabe que para el diseño experimental se puede obtener el mejor tiempo evaluado según los niveles analizados, pero no se puede identificar lo que sucede antes o después de ese tiempo óptimo. Con la aplicación de cinéticas se logra conocer ese comportamiento general de la extracción a través del tiempo para identificar claramente el tiempo de mejor extracción. Además, con las cinéticas se pueden aplicar modelos como los evaluados en esta investigación, para poder determinar cuál proceso de extracción es más rápido que otro, o bien, para estimar el máximo valor de extracción de los compuestos de interés extrapolado al infinito.

5.2 Optimización de la extracción de polifenoles del SPIM

5.2.1. Resultados de las superficies de respuesta

Los resultados de la optimización de los factores temperatura, relación disolvente/SPIM y concentración de etanol en la extracción de polifenoles del SPIM y otras variables físico-químicas se presentan en el Cuadro XV. La figura de los extractos obtenidos se presenta en Anexos.

Cuadro XV. Valores obtenidos de las variables respuesta analizadas en los extractos, en la optimización de extracción de polifenoles del SPIM¹.

Variables independientes			Variables respuesta						
T (°C)	S/S	E/A (%)	PT/100 g SPIM	ATCs/100 g SPIM	ETs/100 g SPIM	Acidez (%)	PT /g BS	ATCs /g BS	ETs /g BS
51,1 (-1,0)	1,6 (-1,0)	57,1 (-1,0)	884,3	120,4	208,3	0,67	243,7	33,2	57,4
51,1 (-1,0)	1,6 (-1,0)	77,9 (1,0)	917,9	115,7	199,6	0,67	261,4	32,9	56,8
51,1 (-1,0)	3,4 (1,0)	57,1 (-1,0)	1189,5	136,8	245,8	0,38	286,2	32,9	59,1
51,1 (-1,0)	3,4(1,0)	77,9 (1,0)	1119,3	126,5	203,3	0,47	221,5	25,0	40,2
68,9 (1,0)	1,6 (-1,0)	57,1 (-1,0)	1146,8	103,6	216,6	0,68	297,7	26,9	56,2
68,9 (1,0)	1,6 (-1,0)	77,9 (1,0)	1006,0	97,3	147,4	0,67	250,8	24,3	36,8
68,9 (1,0)	3,4 (1,0)	57,1 (-1,0)	1552,4	116,7	242,8	0,38	340,8	25,6	53,3
68,9 (1,0)	3,4 (1,0)	77,9 (1,0)	1308,2	111,1	127,8	0,38	286,3	24,3	28,0
45,0 (-1,68)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	927,7	131,1	148,6	0,46	240,7	34,0	38,6
75,0 (1,68)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	1231,3	106,7	193,1	0,53	279,1	24,2	43,8
60,0 (0,0)	1,0 (-1,68)	67,5 (0,0)	869,5	89,0	159,4	0,95	265,0	27,1	48,6
60,0 (0,0)	4,0 (1,68)	67,5 (0,0)	1256,1	129,8	229,8	0,34	279,6	28,9	51,2
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	50,0 (-1,68)	1223,8	119,0	268,4	0,38	421,7	41,0	92,5
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	85,0 (1,68)	914,5	105,5	88,8	0,46	232,1	26,8	22,5
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	1213,7	123,1	172,3	0,47	288,9	29,3	41,0
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	1168,0	114,9	167,0	0,48	272,4	26,8	38,9
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	1173,4	124,4	171,5	0,47	284,8	30,2	41,6
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	1138,7	122,0	173,1	0,49	264,6	28,4	40,2
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5 (0,0)	1102,4	116,2	169,8	0,47	264,6	27,9	40,8
60,0 (0,0)	2,5 (0,0)	67,5(0,0)	1139,7	126,2	173,3	0,49	271,6	30,1	41,3

¹PT: polifenoles totales, mg ácido gálico (AG)/100 g BH SPIM. ATCs: antocianinas, mg de cianidina 3-glucósido (C-3G)/100 g BH SPIM. ETs: elagitaninos, mg ácido elágico (AE)/100 g BH SPIM. Acidez: g equivalentes de ácido málico/100 g extracto. PT BS: polifenoles totales en base seca (BS), mg AG/g BS de extracto. ATCs BS: antocianinas en base seca, mg C-3G/g BS de extracto. ETs BS: elagitaninos en base seca (BS), mg AE/g BS de extracto. Valores presentados entre paréntesis para las variables independientes corresponden a los niveles codificados evaluados.

Para las variables respuesta polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos, tanto en 100 g de SPIM como por gramo de base seca de extracto, se busca un máximo de estos compuestos en los extractos líquidos y para la variable acidez se requiere obtener un valor

mínimo, ya que esta se considera como impurezas en el extracto. En el caso de la acidez reportada en el SPIM por Soto (2014) como 0,85 g equivalentes de ácido málico/100 g, permite analizar que en los extractos se extrajo gran parte del ácido contenido en el SPIM, lo que indica que el etanol sí es afín a estos compuestos.

5.2.2. Aplicación del modelo de superficie de respuesta

Para la optimización de las condiciones del proceso de extracción de polifenoles del SPIM se aplicó la metodología de superficie de respuesta empleando un diseño central compuesto rotatable (DCCR). Los parámetros de ajuste de los modelos generados para las variables respuesta en estudio, coeficiente de determinación (R^2), coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), probabilidad del modelo, probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y distribución de residuos se presentan en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Parámetros de ajuste y bondad obtenidos para cada variable al aplicar la metodología de superficie de respuesta.

Variable	p del modelo ¹	R^2 *	R^2 -adj*	p de falta de ajuste**	Gráfica residuos
PT/100 g SPIM	<0,0001	0,8978	0,8706	0,1001	Aleatorio
ATCs/100 g SPIM	<0,0001	0,8747	0,8413	0,4808	Aleatorio
ETs/100 g SPIM ^o	0,0090	0,8210	0,6599+	<0,0001+	Aleatorio
Acidez ^o	<0,0001	0,9664	0,9419	0,0013+	Aleatorio
PT/g BS ^o	0,0030	0,7847+	0,6591+	0,0124+	Aleatorio
ATCs/g BS ^o	0,0001	0,7151+	0,6616+	0,0566	Aleatorio
ETs/g BS ^o	0,0016	0,8082	0,6963+	0,0000+	Aleatorio

*Valores marcados con (+) significan un valor de coeficiente de determinación (R^2) o coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj) bajo (<0,80). **Valores marcados con (+) indican falta de ajuste para los factores. ^oVariables que no se toman en cuenta para la optimización. ¹Análisis de varianza presentados en Anexos.

Para seleccionar las variables respuesta que se toman en cuenta en la optimización, cada modelo generado debe ser significativo, tener coeficientes de determinación simple y ajustado mayores a 0,8, presentar una falta de ajuste no significativa y contar con una distribución de residuos aleatoria. Los modelos de ETs/100 g SPIM y ETs/g BS muestran un R^2 mayor a 0,8, pero un R^2 -adj menor a 0,8. En estos casos, se toma en cuenta el valor

de R^2 -adj ya que, un R^2 aumenta siempre que se agrega una variable al modelo, aunque esta no sea estadísticamente significativa, por lo que un R^2 alto puede provocar predicciones erróneas de la variable respuesta. Por su parte, el R^2 -adj no se afecta por agregar variables e incluso puede disminuir si se agregan términos innecesarios al modelo (Montgomery, 2004).

El modelo de acidez resultó con valores de R^2 y R^2 -adj altos pero con una falta de ajuste significativa. La falta de ajuste es una prueba valiosa que indica que las respuestas observadas y las predichas por el modelo se desvían mucho entre sí (Montgomery, 2004). Aunque se puede dar el caso de que la p_{fa} resulte baja cuando el error puro de los datos es muy pequeño, para esta investigación se determinó no tomar en cuenta ningún modelo que presentara una p_{fa} significativa. Los modelos de PT/g BS y ATCs/g BS fueron rechazados por sus bajos R^2 y R^2 -adj, así como la falta de ajuste en el caso de PT/g BS.

Finalmente, como se puede observar en el Cuadro XVI, los modelos que cumplieron los requisitos de los parámetros de bondad resultan ser polifenoles totales (PT) y antocianinas (ATCs) extraídos en 100 g de SPIM. Los modelos generados para estas variables respuesta se presentan en las Ecuaciones 8 y 9, y para su elaboración sólo se tomaron en cuenta los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos ($p < 0,05$). Los valores p de los coeficientes se muestran en el Cuadro XXIV de Anexos.

$$PT = 1124,2 + 103,5 * T + 136,5 * S/S - 69,0 * E/A - 43,6 * T * E/A \quad [8]$$

$$ATCs = 119,0 - 8,2 * T + 9,0 * S/S - 3,3 S/S^2 - 3,6 * E/A \quad [9]$$

Ambos modelos generados poseen pocos factores significativos y comparten la significancia del efecto lineal de la temperatura, relación disolvente/SPIM y concentración etanol/agua, mientras que solo la variable polifenoles totales fue afectada significativamente por la interacción temperatura y etanol/agua, y las antocianinas por el efecto cuadrático de la relación S/S. En el caso de efectos lineales, para los PT el factor relación disolvente/SPIM ejerció el mayor efecto, seguido por temperatura y de último

concentración etanol/agua. Para las ATCs al igual que para los PT, el mayor efecto lo presenta la relación disolvente/SPIM, seguido por temperatura y de último concentración etanol/agua. Tanto los PT como las ATCs obtuvieron un efecto negativo en la concentración E/A, lo cual indica que a mayor concentración de etanol menor la extracción de estos compuestos, de igual manera solamente para las ATCs la temperatura presentó un efecto negativo.

Resulta importante detallar que los factores que presentan mayor efecto sobre PT o ATCs son los que poseen un mayor valor de coeficiente y un menor valor de probabilidad (Cuadro XXIV, Anexos), lo cual indica que son los factores más significativos, donde existe menor probabilidad de cometer un error estadístico tipo I. De igual manera, los factores con menor coeficiente (menor efecto) poseen el valor de probabilidad más alto.

5.2.3. Optimización de extracción de polifenoles totales

En la Figura 9 se muestran los gráficos de la superficie de respuesta para la extracción de polifenoles totales del SPIM. La tendencia descrita por el modelo generado (Ecuación 8) se puede observar gráficamente, ya que el factor concentración de etanol (Figura 9b y 9c) que ejerce el menor efecto sobre PT muestra una zona verde constante a lo largo de sus cinco niveles. Además, el efecto negativo de este factor se aprecia ya que, al relacionarlo con los otros dos factores analizados, la zona roja de máxima extracción se obtiene en los menores valores de concentración de etanol, y su intensidad disminuye a medida que aumenta la concentración de etanol. Además, se puede notar una interacción entre concentración de etanol y la temperatura, en donde a altas temperaturas el efecto de E/A resulta mayor. Por lo tanto, la mayor extracción de polifenoles se obtiene en la región de altas temperaturas y bajos valores de E/A. Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos autores que indican que concentraciones de etanol cercanas a 50% son las más adecuadas para la extracción de polifenoles (Dai *et al.*, 2009; Librán *et al.*, 2013; Da Fonseca *et al.*, 2015) y que disolventes totalmente polares o totalmente no polares no son eficientes en la extracción de compuestos polifenólicos (Da Fonseca *et al.*, 2014). Lo anterior debido a que

los polifenoles presentes en la mora poseen una polaridad moderada o intermedia, y la combinación de agua con solventes orgánicos como etanol generan esa polaridad intermedia adecuada para su extracción (Da Fonseca *et al.*, 2014).

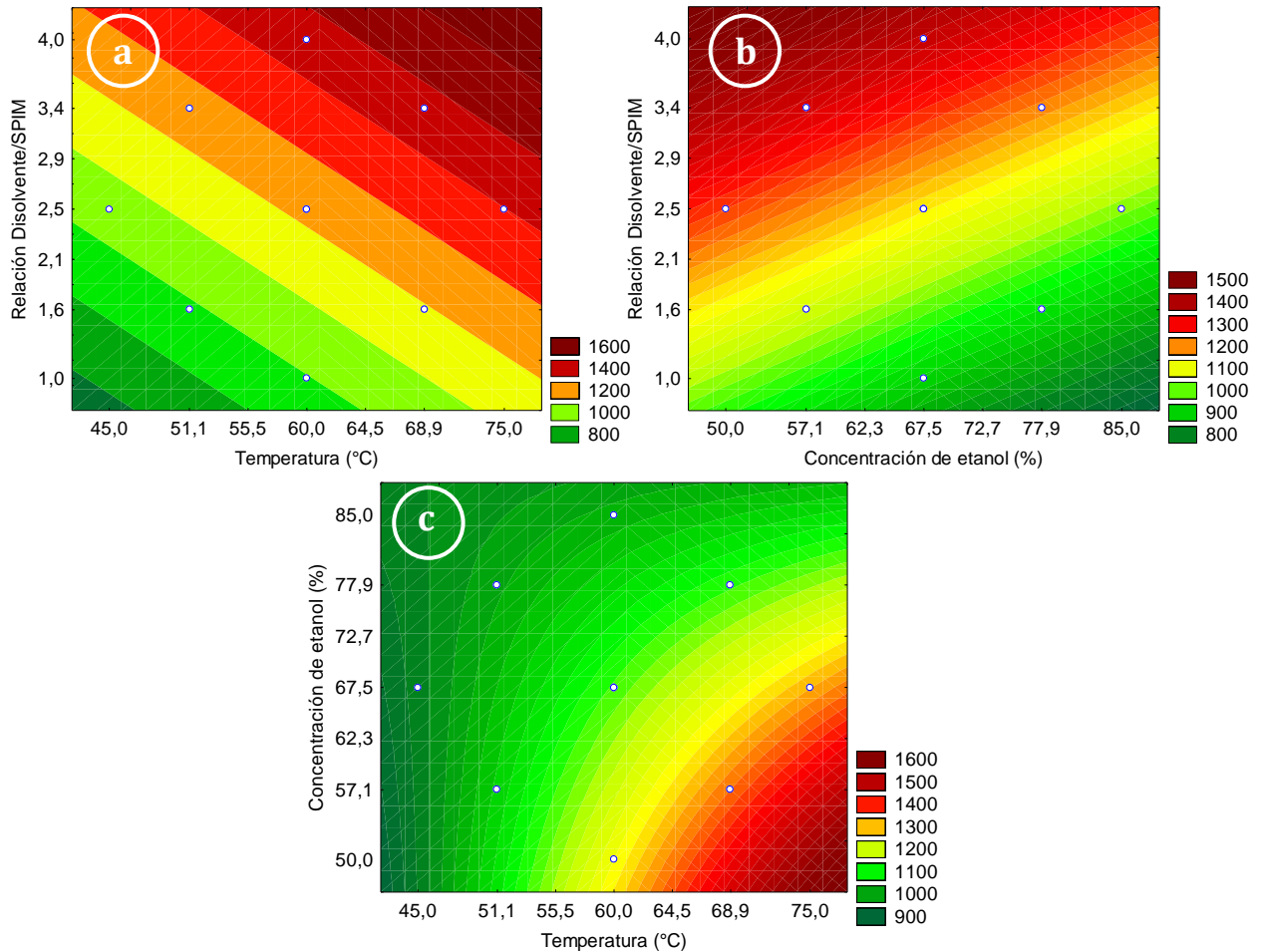


Figura 9. Superficie de respuesta de los factores analizados sobre el contenido extraído de polifenoles totales del SPIM (escala de colores indica mg AG/100 g SPIM. Rojo: mayor concentración, Verde: menor concentración. El tercer factor en cada gráfico se fijó en el valor del punto central).

En el caso de la relación disolvente/SPIM (Figura 9a y 9b), factor que ejerce el mayor efecto, sí se puede observar que a medida que aumenta la relación aumenta la extracción de

polifenoles y que una variación en la relación S/S varía considerablemente la extracción de polifenoles, obteniéndose valores altos de extracción (zona roja) a partir de una relación 2,5:1 y valores bajos de extracción (zona verde) en la relación 1:1. Este resultado establece que utilizar cuatro partes de disolvente respecto a una parte del sustrato sólido mejora la extracción de polifenoles, lo cual confirma el principio de transferencia de masa, que al aumentar la relación disolvente/sólido, el gradiente de concentración obtenido es mayor y por lo tanto se mejora la tasa de difusión del sólido al líquido (Sant'Anna *et al.*, 2012). En la extracción de polifenoles de semillas de uva de igual manera se encontró que los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron con la mayor relación disolvente/sólido 40:1, a diferentes temperaturas (Bucić-Kojić *et al.*, 2007). También, en la extracción de polifenoles del residuo de prensado de arándanos se obtuvo una mayor tasa de extracción al utilizar una relación disolvente/sólido 10:1 respecto a la relación 5:1 (Roopchand *et al.*, 2013).

La temperatura es el segundo factor que posee mayor efecto sobre la extracción de polifenoles. Este comportamiento se puede identificar al observar que al variar los niveles de temperatura varía la intensidad de la extracción de polifenoles, entre verde y rojo (Figura 9a y 9c). Además, se puede notar que el efecto del factor es positivo, ya que al aumentar la temperatura se observan zonas rojas que indican una mayor concentración de PT en el extracto. De acuerdo a lo observado, a mayores temperaturas de extracción el tejido vegetal de las semillas se debilita facilitando la liberación de los polifenoles unidos a polisacáridos o proteínas (Youseff & El-Adawi, 2006). En un estudio de extracción de polifenoles de semilla de uva se obtuvo que aumentar la temperatura de 50 °C a 65 °C incrementó el rendimiento de extracción (Youseff & El-Adawi, 2006). Por otro lado, Pasquel *et al.* (2014) obtuvieron mayor extracción de polifenoles del residuo de prensado de mora al aumentar la temperatura, indicando que estos compuestos se solubilizan más fácilmente a temperaturas elevadas, debido a la disminución de la viscosidad del disolvente.

5.2.4. Optimización de extracción de antocianinas

En la Figura 10 se presentan los gráficos de la superficie de respuesta para la extracción de antocianinas del SPIM, los cuales muestran el comportamiento descrito por el modelo generado (Ecuación 9).

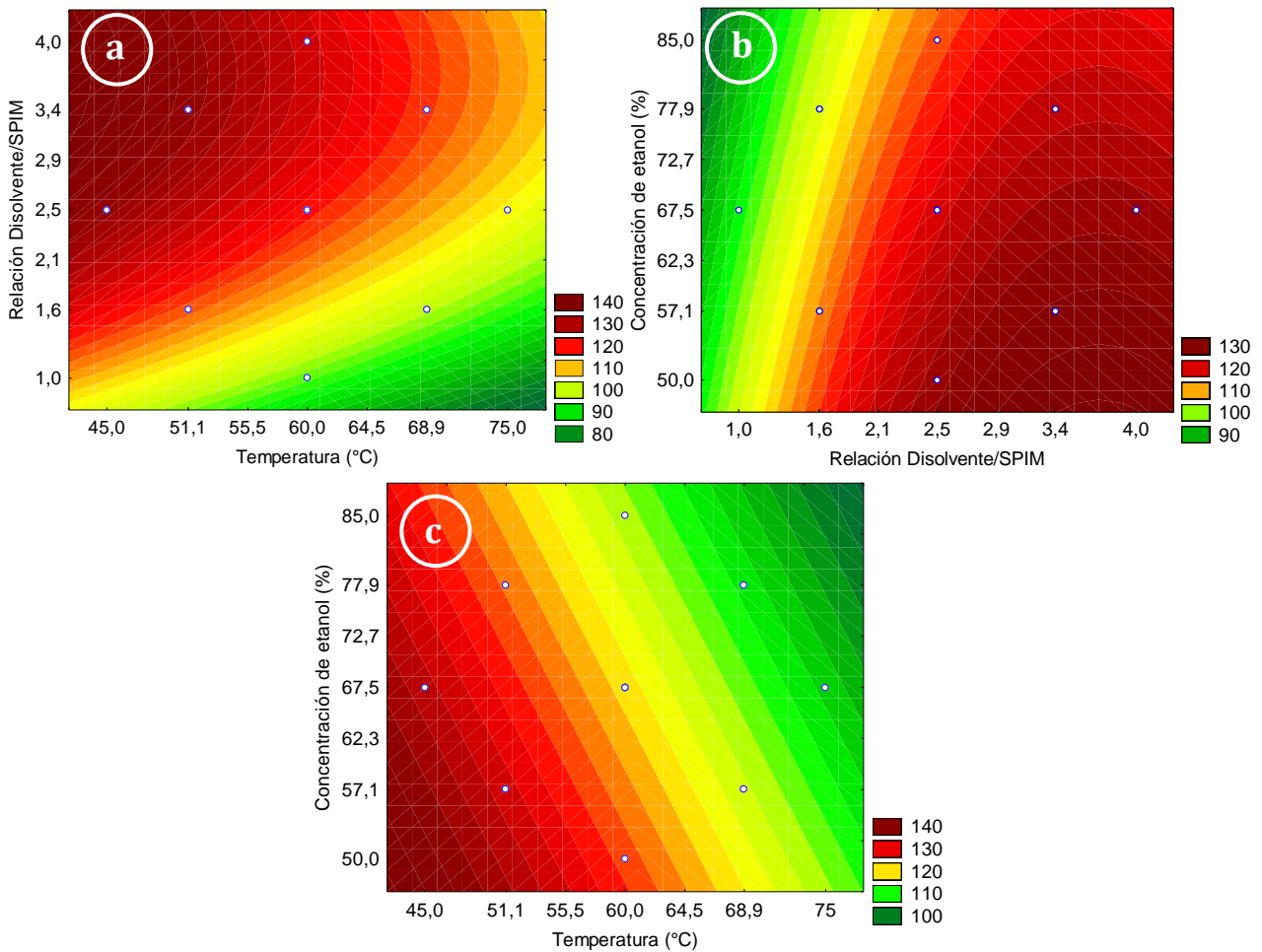


Figura 10. Superficie de respuesta de los factores analizados sobre el contenido extraído de antocianinas del SPIM (escala de colores representa mg C-3G/100 g SPIM. Rojo: mayor concentración, Verde: menor concentración. El tercer factor en cada gráfico se fijó en el valor del punto central).

El factor concentración de etanol (Figura 10b y 10c), es el que ejerce el menor efecto sobre la extracción de antocianinas. Su efecto negativo no resulta tan evidente gráficamente, pero

sí se puede identificar que en cualquier punto del gráfico donde al moverse hacia los niveles altos de E/A disminuye la intensidad del color y por lo tanto la eficiencia de la extracción. Al igual que ocurrió con la extracción de polifenoles el efecto adverso de concentraciones altas de etanol se ha reportado en la extracción de antocianinas, indicando que concentraciones entre 0 y 50% de etanol son preferibles para el proceso (Dai *et al.*, 2009). Este efecto se puede explicar con el hecho de que un disolvente orgánico muy puro puede provocar una deshidratación de las células de los tejidos vegetales, lo cual no permite que el disolvente pueda ingresar efectivamente a las células, dificultando así la difusión de los compuestos bioactivos hacia el disolvente (Sant'Anna *et al.*, 2012).

El mayor efecto sobre la extracción de antocianinas lo presentó el factor relación disolvente/SPIM (término lineal) como un efecto positivo, que se muestra gráficamente en la Figura 10a y 10b. Como se observa en los gráficos, para un nivel dado de relación S/S el color (la intensidad de extracción) se mantiene muy constante al moverse entre los niveles del otro factor graficado (T o E/A). Este comportamiento indica que la influencia de la relación S/S es mucho mayor que la ejercida por temperatura o concentración etanol/agua. Este resultado que establece que al aumentar la relación S/S aumenta la extracción de antocianinas, se explica con el mismo principio indicado para polifenoles, donde un aumento de disolvente en la extracción aumenta el gradiente de concentración que facilita la difusión del sólido al líquido (Sant'Anna *et al.*, 2012). El efecto cuadrático negativo obtenido para el factor S/S hace notar que en los gráficos 10a y 10b, las condiciones de máxima extracción se obtienen dentro de la zona estudiada de la superficie de respuesta, aspecto positivo que, de hecho, permite identificar una zona de máxima extracción al combinar los factores S/S con T y S/S con E/A.

El factor de temperatura resultó como el segundo en tener un mayor efecto en la extracción de antocianinas, pero para este caso resultó tener un efecto negativo (Ecuación 9). Este efecto se observa en la Figura 10a y 10c, donde, con un aumento del valor de la temperatura aparecen colores verdes, indicando que a mayores temperaturas se obtienen menores valores de antocianinas por la degradación de estos compuestos. El efecto negativo de la temperatura sobre las antocianinas ha sido ampliamente reportado por

autores que estudian la extracción de compuestos bioactivos (Dai *et al.*, 2009; Ghafoor *et al.*, 2009; Roopchand *et al.*, 2013; Da Fonseca *et al.*, 2014). Al estar expuestas a altas temperaturas las antocianinas inician su degradación por la hidrólisis de sus enlaces glicosídicos, o bien altas temperaturas pueden potenciar su co-oxidación con otros polifenoles como ácidos fenólicos, formando *o*-quinonas que reaccionan con los polifenoles desencadenando reacciones de polimerización (Dai *et al.*, 2009).

5.2.5. Zonas óptimas de extracción

De acuerdo con las superficies de respuesta presentadas en las Figuras 9 y 10, para polifenoles totales y antocianinas, se establecen las zonas óptimas de los factores donde se logra una mayor extracción de los compuestos. Estos datos se muestran en el Cuadro XVII.

Cuadro XVII. Ámbitos de los factores donde se obtuvo la zona óptima de cada variable respuesta.

Variable	Zona óptima		
	T (°C)	S/S	E/A (%)
PT/100 g SPIM	60,0-75,0	2,9-4,0	50,0-67,5
ATCs/100 g SPIM	45,0-60,0	2,1-4,0	50,0-77,9

Estos datos presentados corroboran el análisis realizado anteriormente para cada variable, donde la mayor extracción se obtiene en concentraciones intermedias de etanol, con altas relaciones disolvente/SPIM y con altas temperaturas para polifenoles y bajas para antocianinas. Al comparar los ámbitos de los factores entre ambas variables respuesta se puede observar que el factor que ejerce un efecto opuesto es la temperatura. Esta diferencia se debe a que los polifenoles totales incluye una gran variedad de compuestos polifenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolizables, ácidos hidroxicinámicos, entre otros (Haminiuk *et al.*, 2012), los cuales varían en su estabilidad a la temperatura. Aunque los grupos termosensibles como las antocianinas están incluidos como polifenoles totales en el SPIM, existen otros compuestos más resistentes a altas temperaturas como lo son los elagitaninos (taninos hidrolizables), que son de los principales tipos de polifenoles

presentes en las semillas de mora (Hager *et al.*, 2008). Específicamente los compuestos lambertianina C y sanguína H-6 son los principales elagitaninos presentes en la semilla de mora (Kaume *et al.*, 2012), los cuales poseen alta masa molecular y han resultado ser estables en procesos de pasteurización a 90 °C (Hager *et al.*, 2010) y a las condiciones de 92 °C por 2 s y a 75°C por 15 s (Azofeifa *et al.*, 2015).

5.2.6. Verificación de los modelos

Para realizar la verificación del modelo de superficie de respuesta se seleccionaron dos puntos dentro de la zona óptima de extracción. Como se muestra en el Figura 12, las condiciones del punto 1 (60,0 °C/3,4/57,1%) y del punto 2 (64,5 °C/3,8/57,1%) seleccionadas para la verificación, se encuentran dentro del intervalo de 95% de confianza del valor óptimo seleccionado por el modelo.

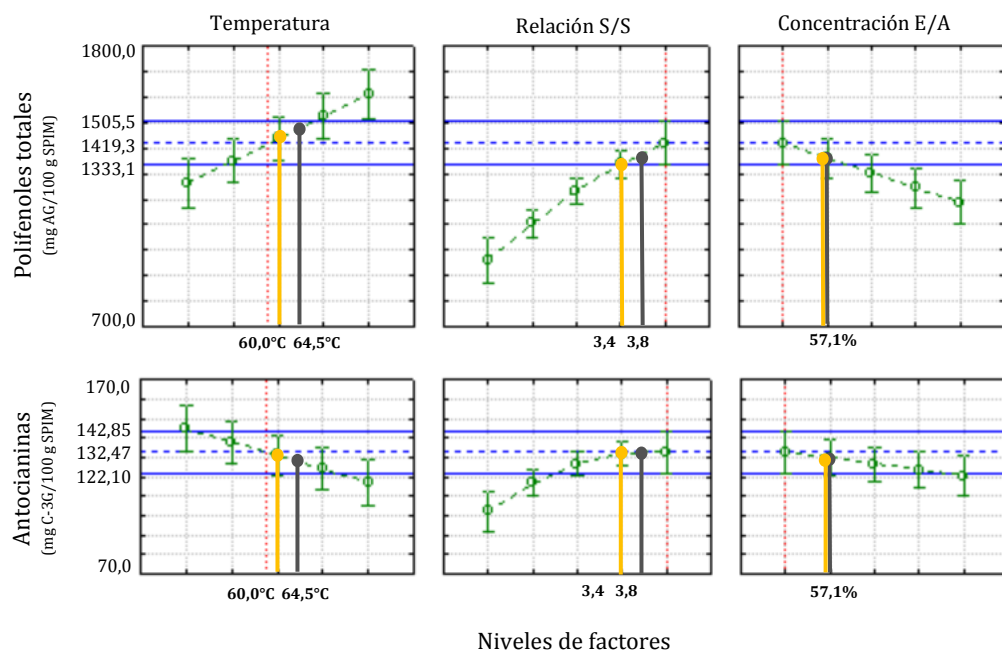


Figura 11. Condiciones de extracción seleccionadas para realizar la verificación de los modelos de superficie de respuesta (las líneas azules sólidas señalan el 95% de confianza del valor óptimo de extracción, las líneas amarillas señalan las condiciones del punto 1 y las líneas grises señalan las condiciones del punto 2).

Los resultados obtenidos de la verificación de los modelos se presentan en el Cuadro XIX. Los valores de la respuesta obtenida al realizar la verificación y los de la respuesta predicha por el modelo, se presentan como intervalos de confianza al 95%. Los valores marcados indican que el rango de confianza obtenido sí se traslapa con el rango de confianza predicho por cada modelo, lo cual es el resultado esperado de la verificación, que exista traslape entre ambas repuestas. Este resultado indica que el modelo generado sí logra predecir el comportamiento de la variable respuesta con un 95% de confianza.

Cuadro XVIII. Valores de variables respuesta predichos según el modelo y obtenidos por experimentación durante la verificación de dos puntos en la zona óptima de la superficie de respuesta.

Variable respuesta	Punto 1 (60 °C/3,4/57,1%)		Punto 2 (64,5 °C/3,8/57,1%)	
	Respuesta predicha*	Respuesta obtenida ($\pm 95\%$ confianza)**	Respuesta predicha*	Respuesta obtenida ($\pm 95\%$ confianza)**
PT/100 g SPIM	1308-1352	1276-1351+	1440-1502	1349-1430++
ATCs/100 g SPIM	122-135	135-138+	111-138	126-129+

*Rangos que presentan traslape entre el rango predicho por el modelo y el obtenido experimentalmente. **Rango con 99% de confianza es de 1315-1464 el cual sí presenta traslape con la repuesta predicha por el modelo. *Intervalo calculado utilizando los coeficientes brindados por el programa estadístico al -95% y al 95%. **Valores experimentales expresados como intervalo al 95% de confianza.

Según los resultados obtenidos, la respuesta que no se traslapa con la predicha es polifenoles totales en el punto 2. En este caso se calculó la respuesta obtenida con intervalos de confianza al 99 %, resultando que con esta condición sí se genera traslape con lo predicho por el modelo, tomando en cuenta que al disminuir el α de 0,05 a 0,01 aumenta el β (error tipo II), con lo que se incrementa la probabilidad de decir que los rangos sí se traslapan cuando en realidad no lo hacen. Dado que existe una variabilidad ligada a los métodos de cuantificación que puede provocar el no traslape de los rangos y que el modelo de polifenoles totales obtenido para el punto 1 sí presenta un buen traslape, se puede establecer el criterio que un $\alpha=0,01$ es aceptable en el análisis de esta investigación, y que por lo tanto, los modelos generados a partir de la metodología de superficie de respuesta sí logran predecir los resultados de la extracción de polifenoles totales y antocianinas.

Al comparar los resultados de la verificación evaluados en la zona óptima, con el óptimo indicado por la función de deseabilidad, el único valor de respuesta promedio que es mayor al de la función es el de la concentración de ATCs en el punto 1, con un valor de 136 mg C-3G/100 g SPIM. Esto puede hacer pensar que las condiciones del punto 1 son más adecuadas en la extracción de polifenoles del SPIM, pero dado que el contenido promedio obtenido de PT en este punto (1314 mg AG/100 g SPIM) sí resulta menor que el indicado por la función, se mantiene la idea que 58,4 °C, 4,0 y 50% son una mejor opción para la extracción de polifenoles que 60 °C, 3,4 y 57,1%, ya que los costos de la extracción serían muy similares, dado que bajo las condiciones del punto 1, se utiliza una menor cantidad de disolvente, pero a una concentración de etanol mayor y se emplea una temperatura muy similar entre ambos. Por lo tanto, se considera que las condiciones de la función de deseabilidad sí son las óptimas para la extracción de polifenoles.

5.2.7. Función de deseabilidad

Mediante el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA), se aplicó la función de deseabilidad, con la cual se pueden analizar simultáneamente las respuestas de polifenoles totales y antocianinas. El valor de deseabilidad varía entre 0 y 1, y representa la cercanía de una respuesta a su valor ideal, donde una deseabilidad de 1 indica que la respuesta alcanza el valor óptimo o ideal. Si alguna de las respuestas analizadas no alcanza su valor ideal, la conveniencia para esa respuesta en específico y la conveniencia total serán menores a 1 (Raissi & Farsani, 2009). Las condiciones de los factores donde se obtienen las extracciones óptimas según la función de deseabilidad con un valor de 0,85, se muestran marcadas con rojo en la Figura 11 y corresponde a una temperatura de 58,4 °C (valor codificado -0,1826), relación S/S 4,0 (valor codificado 1,6818) y concentración de etanol 50% (valor codificado -1,682).

Como se puede observar en los gráficos el comportamiento de extracción entre los niveles de los factores relación S/S y concentración E/A, marcados como intervalos verdes, es muy similar para polifenoles y antocianinas. Sin embargo, en el caso de temperatura no sucede

lo mismo, la extracción de polifenoles aumenta al aumentar la temperatura mientras que la extracción de antocianinas disminuye. Por esta razón, el programa estadístico selecciona una temperatura intermedia (58,4 °C) como el punto donde se optimiza la extracción de ambas variables. Esta diferencia para el factor temperatura es el que repercute en que el valor de deseabilidad sea de 0,85 y no más alto.

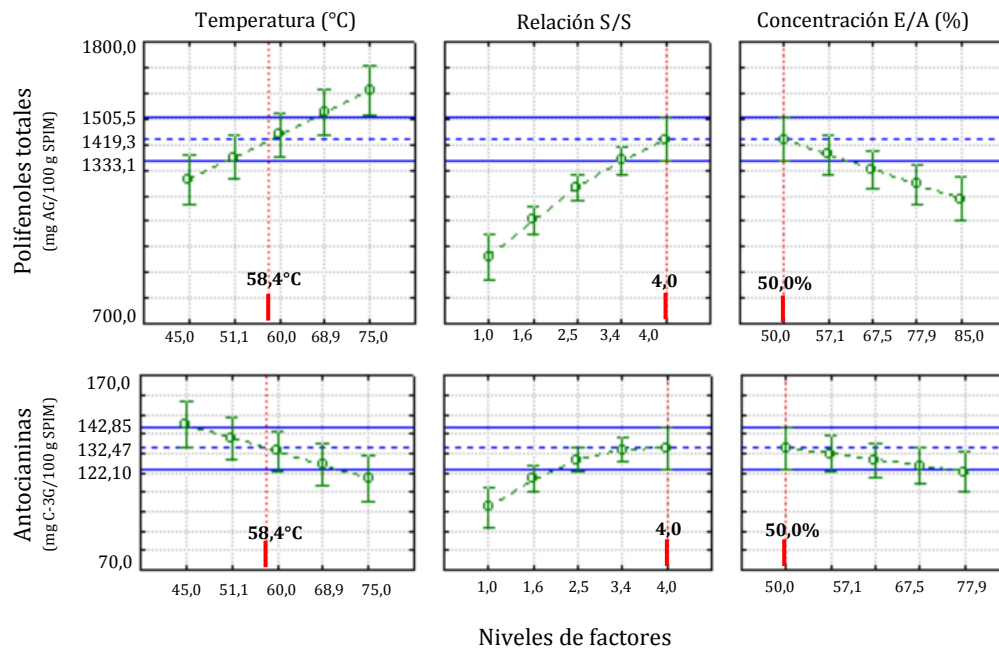


Figura 12. Optimización de las condiciones de extracción mediante la función de deseabilidad de Statistica 7 (la línea azul punteada indica extracción óptima con un valor de deseabilidad de 0,85 y las líneas azules sólidas indican el intervalo de confianza al 95%).

Analizando estos resultados y su influencia en los costos del proceso de extracción, la temperatura obtenida es razonable ya que no es tan alta que implique el incurrir en gastos energéticos importantes. Para el factor S/S se podría utilizar el menor valor que se obtiene todavía dentro del intervalo de confianza del máximo de extracción, como lo es un valor de 3,4 para disminuir el consumo de disolvente, y en el caso de la concentración de etanol, el valor de 50 % corresponde a la concentración más baja, dentro del rango estudiado, lo cual es ideal para disminuir el costo del uso de etanol. Por lo tanto, las condiciones de extracción

seleccionadas por la función de deseabilidad se consideran adecuadas para ser utilizadas en la extracción de polifenoles del SPIM.

En la Figura 11 se puede observar que el valor óptimo de extracción según la función aplicada es de 1419 mg AG/100 g para polifenoles y de 132 mg C-3G/100 g para antocianinas, para un valor de deseabilidad de 0,85. Estos valores óptimos representan una extracción del 82% de los PT y un 87% de las ATCs, según la composición del SPIM reportada en el Cuadro XVIII.

Cuadro XIX. Porcentajes de extracción de polifenoles y antocianinas del SPIM, y composición inicial del SPIM¹.

Variable	Composición inicial del SPIM ²	Extracción óptima ³	Extracción del SPIM (%)
PT/100 g SPIM	1728	1419	82
ATCs/100 g SPIM	152	132	87

¹PT: polifenoles totales, mg ácido gálico (AG)/100 g SPIM. ATCs: antocianinas, mg de cianidina 3-glucósido (C-3G)/100 g SPIM. ²Análisis de laboratorio realizados con los mismos métodos descritos para PT, ATCs y ETs. ³Según la función de deseabilidad.

Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Soto (2014) en una extracción de polifenoles del SPIM, utilizando agua como disolvente y un tratamiento enzimático a 60 °C durante 1 hora, donde obtuvo una extracción máxima de 16 % de ATCs (extracto: 8,8 mg/100 g SPIM, sustrato: 55 mg/100 g SPIM). Este resultado muestra que la utilización de etanol y la optimización de las condiciones evaluadas, permiten aumentar la extracción de ATCs de un 16 % a un 87 %, obteniéndose una cantidad de ATCs 15 veces mayor que la obtenida por Soto (2014). Es importante tomar en cuenta que la extracción con agua requiere una posterior concentración del extracto, mientras que la extracción con etanol una posterior evaporación del disolvente, por lo que se debe evaluar cual proceso resulta más rentable para producir un extracto rico en antocianinas, si la evaporación del disolvente o la del agua. Una ventaja del etanol es que no es un disolvente costoso y permite un mayor aprovechamiento del SPIM al extraer mayor cantidad de antocianinas.

El resultado obtenido se puede comparar también con los obtenidos en otras investigaciones. En el estudio realizado por Da Fonseca *et al.* (2014), se evaluó la

extracción de PT y ATCs de un residuo de prensado de mora (*Rubus fruticosus* L.) fresco y entero al igual que el SPIM. En este estudio se lograron extraer 736 mg AG/100 g residuo fresco de PT utilizando extracción con líquido presurizado (etanol 50%, 100 °C y 7,5 MPa) y 121 mg C-3G/100 g residuo fresco de ATCs (utilizando agua pH 2,5, 80 °C y 7,5 MPa). Estos datos indican que la optimización de la extracción con disolvente evaluada en la presente investigación logró extraer 1,9 veces más de PT y 1,1 vez más de ATCs, que la extracción con disolventes a altas presiones. Este resultado coloca la extracción convencional con etanol como una buena alternativa, ya que no requiere de equipo sofisticado, se usa el mismo tipo de disolvente (etanol 50 %) y el gasto energético es menor que para una extracción a altas presiones y altas temperaturas. Es importante tomar en cuenta que la manera idónea para comparar los resultados de ambos tipos de extracción es utilizando el porcentaje extraído según el contenido inicial del subproducto utilizado. En este caso, no es posible utilizar ese porcentaje por lo que solo se puede comparar la cantidad efectiva de PT y ATCs extraídos en cada tipo de extracción.

Por otro lado, si se eliminan el efecto de las diferencias de humedades en los residuos analizados y se comparan con métodos convencionales de extracción, se puede contrastar el contenido óptimo de extracción de PT y ATCs en 100 g de base seca de SPIM (humedad SPIM 46,5 %; PT 2653 mg AG/100 g BS SPIM y ATCs 248 mg C-3G/100 g BS SPIM), con el obtenido por Roopchand *et al.* (2013) en la extracción de residuo de arándanos rojos, donde se extrajo 1422 mg AG/100 g BS residuo, un 46 % menos de los PT extraídos del SPIM. Por su parte, Sant'Anna *et al.* (2012) lograron extraer 2261 mg AG/100 g BS de residuo del prensado de uva, un 15 % menos que lo extraído del SPIM. En el caso de las ATCs, se logró extraer un 67 % más de estos compuestos del SPIM, que del residuo de frambuesa (*Rubus idaeus*, cv. Meeker) y un 27 % más que de un residuo de mora (*Rubus fruticosus*, cv. Thornfree) (Tumbas-Saponjac *et al.*, 2014). Este resultado muestra que no solo se logró extraer una alta cantidad de polifenoles y antocianinas del SPIM, sino que el SPIM es una fuente rica en polifenoles comparado con los residuos de otras frutas.

5.2.8. Potencial utilización del extracto rico en polifenoles como producto nutraceútico

Como se discutió en secciones anteriores, el extracto etanólico obtenido a partir del SPIM presenta altas cantidades de polifenoles y antocianinas. La extracción utilizada demostró ser un proceso eficiente al compararlo con una extracción con agua o incluso con una extracción con líquido presurizado, y se mostró que el SPIM es una potencial fuente de polifenoles para ser aprovechado comparado con otros residuos. Es por esto, que se deben analizar los procesos posteriores de purificación y concentración que se deben aplicar a este extracto etanólico obtenido a partir del SPIM, para su posterior utilización como suplemento alimenticio.

Como técnica para concentrar los polifenoles se ha evaluado la ultrafiltración tangencial (UF), proceso con el cual logró aumentar la cantidad de ETs de 33 a 78 mg AE/g BS y de PT de 65 a 133 mg AE/g BS, a un extracto acuoso de SPIM (Soto, 2014). También aplicando UF a un jugo de mora donde se lograron retener entre un 60 y 99 % de las ATCs y 100 % de los ETs presentes (Acosta *et al.*, 2014). El extracto óptimo obtenido en el presente estudio resultaría con una cantidad de 50 % etanol, por lo que se requieren posteriores estudios para evaluar que esta técnica de concentración por membranas es adecuada para el procesamiento de un extracto etanólico. El proceso de ultrafiltración tiene la ventaja sobre un proceso de concentración tradicional aplicando calor, que al no utilizar altas temperaturas se evita el daño térmico que pueden sufrir los polifenoles, principalmente antocianinas (Soto, 2014).

Otra alternativa para concentrar el extracto etanólico obtenido es el secado por aspersión. La extracción con etanol acuoso y posterior transformación a un polvo rico en polifenoles, ya se realiza a nivel industrial. La patente creada por Alkayali Ahmad (2009) describe la producción de un extracto rico en ácido elágico a partir de semilla de granada, donde se obtiene el extracto etanólico, que luego se concentra y se seca, para obtener un producto listo para ser vendido en cápsulas de gelatina para el consumo diario (Pittelli *et al.*, 2013). Además, la empresa Iprona[®] elabora el producto Rubini[®], el cual consiste en cápsulas con extracto en polvo rico en antocianinas, obtenido mediante extracción con etanol a partir de

diferentes tipos de bayas. Esta información permite establecer que el secado por aspersion para obtener un polvo rico en polifenoles a partir del extracto etanólico del SPIM representa una manera de transformar el extracto en un suplemento alimenticio.

Sobre los beneficios a la salud de un extracto rico en polifenoles de mora, se han realizado estudios *in vivo* con modelos animales, donde se logró comprobar su efecto hipoglicemiante e hipolipemiante, al suministrar jugo de mora microfiltrado a una concentración del 25 % y un extracto acuoso concentrado por ultrafiltración obtenido a partir del SPIM. Estos estudios permitieron concluir que a partir del subproducto o del jugo, se puede preparar un producto nutracéutico con efectos hipoglicemiante e hipolipemiante que potencialmente puede ser utilizado como coadyuvante para el tratamiento farmacológico de personas diabéticas (Azofeifa, 2013; Alpizar, 2015). Estos resultados indican que la extracción de polifenoles a partir del SPIM corresponde a una buena alternativa para el aprovechamiento del subproducto, que permite utilizar el extracto obtenido como suplemento alimenticio o como nutracéutico con efecto positivo en la salud de las personas diabéticas.

6. Conclusiones

- Para la extracción de polifenoles del SPIM mediante método convencional o asistido por ultrasonido, el modelo de pseudo primer orden explica de mejor forma la variación de los datos experimentales respecto al modelo de primer orden, al tener un mayor R^2 -adj (0,9289 EC y 0,9382 EAU) y no mostrar falta de ajuste.
- El modelo de pseudo primer orden resultó adecuado para modelar la cinética de extracción de antocianinas hasta un tiempo de 180 minutos de extracción.
- Los modelos de primer orden y pseudo primer orden no se ajustaron a las cinéticas de extracción de elagitaninos debido a la alta variación en sus datos.
- La EAU utilizando un baño de sonicación indirecta no logró aumentar la velocidad de extracción (k) de los polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos del SPIM.
- En un periodo aproximado a los 120 minutos de extracción se alcanzó el equilibrio en la extracción evaluada, ya que se logran extraer el 85 % de la máxima extracción de PT según el modelo, el 99 % del valor máximo obtenido en las cinéticas para antocianinas y el 96 % del promedio de elagitaninos obtenidos en la zona de equilibrio de extracción.
- La extracción de polifenoles y antocianinas se maximiza utilizando concentraciones intermedias de etanol (50,0-77,9%), con altas relaciones disolvente/SPIM (2,1-4,0) y con altas temperaturas (60,0-75,0°C) para polifenoles y bajas (45,0-60,0°C) para antocianinas.
- Con un valor de deseabilidad de 0,85, los valores óptimos de extracción son 1419 mg AG/100 g para polifenoles y de 132 mg C-3G/100 g para antocianinas, los cuales representan el 82 % de PT y 87 % de ATCs contenidos en el SPIM, por lo que sí se logra una adecuada extracción de polifenoles del SPIM.

- Los valores óptimos de extracción de polifenoles totales y antocianinas se obtienen a una temperatura de 58,4 °C, relación disolvente/SPIM de 4,0 y concentración etanol de 50 % m/m, condiciones factibles de utilizar en una aplicación industrial.
- Los modelos generados para polifenoles totales y antocianinas mediante la metodología de superficie de respuesta, predicen adecuadamente el comportamiento de las variables respuesta, no así para los ETs.
- La extracción de polifenoles a partir del SPIM constituye una buena alternativa para el aprovechamiento del subproducto, ya que el extracto obtenido puede ser utilizado como suplemento alimenticio o como nutraceutico con potenciales efectos positivos en la salud.

7. Recomendaciones

- Al utilizar el baño de ultrasonido para mejorar la extracción de polifenoles de tejidos vegetales se debe utilizar una menor muestra de extracción (50 g o 100 g) para permitir un mayor efecto de las ondas sobre los tejidos de la muestra.
- Evaluar el comportamiento y la mejora de la extracción asistida con ultrasonido por medio de un equipo de sonicación directa.
- Evaluar el efecto de la extracción asistida con ultrasonido utilizando etanol a bajas concentraciones como disolvente, para establecer si el uso de ultrasonido puede disminuir el consumo de etanol en la extracción de polifenoles.
- Optimizar el tiempo de extracción manteniendo fija la variable concentración de etanol que resultó con el menor efecto en la extracción de polifenoles y antocianinas.

- Evaluar la factibilidad económica de realizar una extracción con agua y tratamiento enzimático versus una extracción con etanol al 50 %, para identificar si el tratamiento de concentración requerido para la extracción con agua resulta más factible que la evaporación del disolvente en la extracción con etanol.
- Evaluar la concentración del extracto etanólico obtenido a partir del SPIM mediante ultrafiltración tangencial como metodología para obtener un extracto líquido con alta cantidad de polifenoles y antocianinas, que pueda ser utilizado como producto nutraceútico.
- Combinar la técnica de concentración mediante membranas del extracto etanólico obtenido a partir del SPIM, con el posterior secado por aspersion, para obtener un producto seco concentrado de polifenoles y antocianinas que pueda ser utilizado como producto nutraceútico.

8. Bibliografía

- ACAN-EFE. 2005. Pequeños productores exportan 130 toneladas de mora orgánica. La Nación, San José. Noviembre 2. INTERNET. http://www.nacion.com/ln_ee/2005/noviembre/02/ultima-ce17.html. Revisado abril del 2015.
- ACOSTA, O.; VAILLANT, F.; PÉREZ, A.M. & DORNIER, M. 2014. Potential of ultrafiltration for separation and purification of ellagitannins in blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) juice. *Separation and Purification Technology* 125: 120-125.
- ACOSTA-MONTOYA, O; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C.; PÉREZ, A.M. & CASTRO, M. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry* 119: 1497-1501.
- AGUSTIN-SALAZAR, S.; MEDINA-JUÁREZ, L.A.; SOTO-VALDEZ, H.; MANZANARES-LÓPEZ, F. & GÁMEZ-MEZA, N. 2014. Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(2): 208-213.
- AHMAD, A. 2013. Ellagic acid food supplement prepared from pomegrante seeds. Patent US 2006/0251753 A1, EP1721532B1.
- ALPÍZAR, A. Y. 2015. Evaluación del efecto hipoglicemiante, hipolipemiante y antioxidante de un extracto rico en elagitaninos a partir de un subproducto de *Rubus adenotrichos* mediante un modelo in vivo de ratas (*Rattus norvegicus*) diabéticas. Licenciatura académica en Farmacia. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis 18^a ed. Methods 920.151, 920.152, 940.26, 942.15, 985.29 y 996.06. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- APAK, R.; TÜTEM, E.; ÖZYÜREK, M., & GÜÇLÜ, K. 2011. Antioxidant Activity/Capacity Assay Methods Applied to Fruit and Cereals. *In Fruit and Cereal Bioactives*. CRC Press. Pp. 361-383.

- AYBASTIER, Ö.; IŞIK, E.; ŞAHİN, S. & DEMİR, C. 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 44: 558-565.
- AZOFEIFA, G.; QUESADA, S.; PÉREZ, A. M.; VAILLANT, F. & MICHEL, A. 2015. Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *Journal of Food Composition and Analysis* 42: 56-62.
- AZOFEIFA, G. 2013. Study of biological activities of the tropical highland blackberry polyphenols and the impact of digestion and pasteurization process. Doctorado académico en Bioquímica, Química y Tecnología de alimentos. Montpellier, Francia, Universidad de Montpellier.
- BRAHIM, M.; GAMBIER, F., & BROSSE, N. 2014. Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products* 52: 18-22.
- BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PLANINIĆ, M.; TOMAS, S.; BILIĆ, M. & VELIĆ, D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81(1): 236-242.
- CHEMAT, F.; ZILL E, H. & KHAN, M. K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18(4): 813-835.
- CHEN, L.; XIN, X.; YUAN, Q.; SU, D. & LIU, W. 2014. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(2): 180-8.
- CITA. 2015a. Determinación de polifenoles, P-SA-MQ-048. Emisión N° 10. San José, Costa Rica.
- CITA. 2015b. Determinación de polifenoles por HPLC, P-SA-MQ-044. Emisión N° 4. San José, Costa Rica.
- CITA. 2015c. Humedad, P-SA-MQ-002. Emisión N° 6. San José, Costa Rica.

- CNP. 2013. Monitoreo de mercados de mora. Sistema de información agroalimentaria. Boletín 01-2013: 01-04.
- DA FONSECA, A.P.M.; PASQUEL-REÁTEGUI, J.L.; FERNÁNDEZ, G.B. & MARTÍNEZ, J. 2014. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International* 77 (3): 675-683.
- DA PORTO, C.; PORRETTO, E. & DECORTI, D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* 20(4): 1076-80.
- DAI, J.; GUPTE, A.; GATES, L. & MUMPER, R.J. 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 837-47.
- DUBA, K. S.; CASAZZA, A. A.; MOHAMED, H. B.; PEREGO, P., & FIORI, L. 2015. Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing* 94: 29-38.
- ELISIA, I.; HU, C.; POPOVICH, D. G. & KITTS, D. D. 2007. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chemistry* 101(3): 1052-1058.
- FELLOWS, P. J., ed. 2009. Separation and concentration of food components. *In Food Processing Technology*. 3 ed. Woodhead Publishing. Pp. 188-228.
- GALVAN, L.; KRİAA, K.; NIKOV, I. & DIMITROV, K. 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology* 93: 42-47.
- GANCEL, A. L.; FENEUIL, A.; ACOSTA, O.; PÉREZ, A. M., & VAILLANT, F. 2011. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International* 44(7): 2243-2251.
- GEORGE, S. & BRAT, P. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 1370-1373.

- 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): 4988-94.
- GHITESCU, R.E.; VOLF, I.; CARAUSU, C.; BUHLMANN, A.M.; GILCA, I.A. & POPA, V.I. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 535-41.
- GODEVAC, D.; TESEVIC, V.; VAJS, V.; MILOSAVLJEVIC, S. & STANKOVIC, M. 2011. Blackberry seed extracts and isolated polyphenolic compounds showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Journal of Food Science* 76(7): 1039-43.
- HAGER, J. T., & HOWARD, R. L. 2007. Berry fruit phytochemicals. *In* Zhao, Y., ed. *Berry Fruit*. CRC Press. Florida. Pp. 73-104.
- HAGER, T. J.; HOWARD, L. R. & PRIOR, R. L. 2010. Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(22): 11749-11754.
- HAGER, T. J.; L. R. HOWARD; LIYANAGE, R.; LAY, J. O.; PRIOR, R. L. 2008. Ellagitannin Composition of Blackberry As Determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3): 661-669.
- HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, M.S.V. & PERALTA, R.M. 2012. Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology* 47(10): 2023-2044.
- HOED, V.V.; CLERCQ., N.D.; ECHIM., C.; ANDJELKOVIC., M.; LEBER., E.; DEWETTINCK., K. & VERHÉ., R. 2009. Berry Seeds: A source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids* 16: 33-49.
- IGNAT, I., VOLF, I. & POPA, V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126(4): 1821-1835.

- IVANOVIC, J.; TADIC, V.; DIMITRIJEVIC, S.; STAMENIC, M.; PETROVIC, S. & ZIZOVIC, I. 2014. Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna”. *Industrial Crops and Products* 53: 274-281.
- KARVELA, E.; MAKRIS, D.P.; KALOGEROPOULOS, N.; KARATHANOS, V.T.; KEFALAS, P. 2009. Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. *European Food Research and Technology* 229(5): 731-742.
- KAUME, L.; HOWARD, L.R. & DEVAREDDY, L. 2012. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(23): 5716-27.
- KHAN, M.K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; DANGLES, O. & CHEMAT, F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119(2): 851-858.
- KOCA, I. & KARADENIZ, B. 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae* 121(4): 447-450.
- LENG, D.E.; KATTI, S.S. & ATIEMO-OBENG, V. 2008. Industrial mixing technology. *In* Albright, L.F. ed. *Albright's Chemical Engineering Handbook*. CRC Press, Florida. Pp. 617-707.
- LIBRÁN, C.M.; MAYOR, L.; GARCIA-CASTELLO, E. & VIDAL-BROTONS, D. 2013. Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. *Agricultural Sciences* 04(09): 56-62.
- MANGANARIS, G.A.; GOULAS, V.; VICENTE, A.R.; TERRY, L.A. 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(5): 825-33.
- MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GÜNATA, Z. & BRAT, P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichos*) by High-Performance Liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8616-8624.

- MONTGOMERY, D. C. 2004. Diseño y análisis de experimentos 2 ed. Limusa, México D. F.
- NAWAZ, H.; SHI, J.; MITTAL, G.S. & KAKUDA, Y. 2006. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 48(2): 176-181.
- OROZCO, R.; FLORES, D. & ARGÜELLO, F. 2011. Efecto de diferentes tipos de propagación en el rendimiento de mora vino (*Rubus adenotrichus*). *Agronomía Mesoamericana* 22(1): 91-97.
- RADOČAJ, O.; VUJASINOVIĆ, V.; DIMIĆ, E.; BASIĆ, Z. 2014. Blackberry (*Rubus fruticosus*L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oils extracted from dried press pomace after longterm frozen storage of berries can be used as functional food ingredients. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116 (8): 1015-1024.
- RAISSI, S & FARSANI, R.-E. 2009. Statistical process optimization through multiresponse surface methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 51: 267-271.
- PARK, M.; CHO, H.; JUNG, H.; LEE, H. & HWANG, K.T. 2013. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Tannin Fraction of the Extract from Black Raspberry Seeds Compared to Grape Seeds. *Journal of Food Biochemistry* 38(3): 259-270.
- PASQUEL, R. J.; DA FONSECA, M. A.; BARBERO, G. F.; REZENDE, C. A., & MARTÍNEZ, J. 2014. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids* 94: 223-233.
- RONALD, E. W., & GRETE, S. 2002. Flavonoids from Berries and Grapes, *In* Functional Foods. CRC Press, Florida.
- ROOPCHAND, D.E.; KRUEGER, C.G.; MOSKAL, K.; FRIDLENDER, B.; LILA, M.A. & RASKIN, I. 2013. Food-compatible method for the efficient extraction and stabilization of cranberry pomace polyphenols. *Food Chemistry* 141(4): 3664-3669.
- PITTELLI, A.; ARAKI, D. & AGUIAR, O. 2013. Polyphenols as supplements in foods and beverages: recent methods, benefits and risks, *In* Ross, R. W., Preedy, V. & Zibadi,

- S., eds. Polyphenols in Human Health and Disease. Academic Press, Estados Unidos. Pp. 71-76.
- SANTHAKUMAR, A.B.; BULMER, A.C. & SINGH, I. 2014. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 27(1): 1-21.
- SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A.; MARCZAK, L.D.F. & TESSARO, I.C. 2012. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology* 100: 82-87.
- SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J.; YOUNG, C.; BRYAN, M. & WU, Y. 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agriculture & Environment* 1(2): 42-47.
- SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E. 2004. Polyphenolic Composition of Marion and Evergreen Blackberries. *Food Chemistry and Toxicology* 69(4): 233-240.
- SOTO, M. 2014. Obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos mediante la aplicación de tecnologías de membranas a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora. Maestría académica en Ciencia de Alimentos. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica.
- TAKEUCHI, T.M.; PEREIRA, C.G.; BRAGA, M.E.; MARÓSTICA, M.R.; LEAL, P.F. & MEIRELES, A.A. 2009. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. *In* Meireles, M.A. ed. 2009. *Extracting bioactive compounds for food products*. CRC Press, Florida. Pp. 138-211.
- TUMBAS-SAPONJAC, V.; GIRONES-VILAPLANA, A.; DJILAS, S.; MENA, P.; CETKOVIC, G.; MORENO, D.A.; CANADANOVIC-BRUNET, J.; VULIC, J.; STAJCIC, S. & KRUNIC, M. 2014. Anthocyanin profiles and biological properties of caneberry (*Rubus* spp.) press residues. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(12): 2393-2400.
- VATAI, T.; ŠKERGET, M. & KNEZ, Ž. 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 90(2): 246-254.

- WANG, Y. S. 2006. Fruits with High Antioxidant Activity as Functional Foods. *In* Shi, J., ed. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals*. CRC Press. Florida. Pp. 371-413.
- WROLSTAD, E. R., & SKREDE, G. 2002. Flavonoids from Berries and Grapes. *In* Mazza, G., Le Manguer, M. & Shi, J., eds. *Functional Foods*. CRC Press. Florida. Pp. 24-63.
- YOUSEEF, D. & EL-ADAWI, H. 2006. Study on Grape Seeds Extraction and Optimization: An Approach. *Journal of Applied Sciences* 6 (14): 2944-2947.
- ZWIETERING, T. N. 1958. Suspending of solid particles in liquid agitators. *Chemical Engineering Science* 4: 244-253.

9. Anexos

Composición SPIM

Cuadro XX. Caracterización de la composición química del SPIM¹.

Compuesto	Valor en base húmeda de SPIM
Humedad (g/100 g)	46,5
Proteína N x 6,25 (g/100 g)	4,22
Grasa (g/100 g)	7,92
Cenizas (g/100 g)	0,84
Polifenoles totales (mg AG/100 g)	1728,5
Fibra (g/100 g)	38,52
Antocianinas (mg C3G/100 g)	152,4
Elagitaninos (mg AE/100 g)	417,7

¹Determinación realizada en el Laboratorio de Química del CITA.

Análisis de varianza de los modelos de superficie de respuesta

Cuadro XXI. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en 100 g de SPIM.

Variable		SS	df	MS	F	p
Polifenoles totales	Regresión	480935,949	4	120233,987	33,0	0,0000003
	Residual	54726,027	15	3648,402		
	Falta de ajuste	47515,8	10	4751,6	3,295	0,1001
	Error puro	7210,2	5	1442,0		
	Total SS	535662,0	19			
	R2	0,90				
Antocianinas	Regresión	2355,972	4	588,993	26,2	0,0000013
	Residual	337,395	15	22,493		
	Falta de ajuste	232,992	10	23,299	1,116	0,4808
	Error puro	104,403	5	20,881		
	Total SS	2693,368	19			
	R2	0,87				
Elagitaninos	Regresión	28929,423	9	3214,380	5,1	0,008963
	Residual	6308,409	10	630,841		
	Falta de ajuste	6280,04	5	1256,01	221,335	0,0000
	Error puro	28,37	5	5,67		
	Total SS	35237,83	19			
	R2	0,82				

Cuadro XXII. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de acidez y sólidos solubles en 100 g de SPIM.

Variable		SS	df	MS	F	p
Acidez	Regresión	0,391	8	0,049	39,5	0,0000005
	Residual	0,014	11	0,001		
	Falta de ajuste	0,013181	6	0,002197	26,243	0,0013
	Error puro	0,000419	5	0,000084		
	Total SS	0,404598	19			
	R2	0,97				
Sólidos solubles	Regresión	15,121	9	1,680	5,0	0,009403
	Residual	3,341	10	0,334		
	Falta de ajuste	3,32661	5	0,665322	224,546	0,0000
	Error puro	0,01481	5	0,002963		
	Total SS	18,46201	19			
	R2	0,82				

Cuadro XXIII. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en base seca de extracto.

Variable		SS	df	MS	F	p
Polifenoles totales	Regresión	27273,149	7	3896,164	6,2	0,00299
	Residual	7484,662	12	623,722		
	Falta de ajuste	6961,22	7	994,46	9,499	0,0124
	Error puro	523,45	5	104,69		
	Total SS	34757,81	19			
	R2	0,78				
Antocianinas	Regresión	239,231	3	79,744	13,4	0,000125
	Residual	95,331	16	5,958		
	Falta de ajuste	86,4404	11	7,8582	4,420	0,0566
	Error puro	8,8903	5	1,7781		
	Total SS	334,5614	19			
	R2	0,72				
Elagitaninos	Regresión	3230,630	7	461,519	7,2	0,00159
	Residual	766,797	12	63,900		
	Falta de ajuste	762,205	7	108,886	118,560	0,0000
	Error puro	4,592	5	0,918		
	Total SS	3997,427	19			
	R2	0,81				

Probabilidad de los coeficientes de regresión

Cuadro XXIV. Probabilidad de los coeficientes de regresión para los modelos generados en la superficie de respuesta para las diferentes variables respuesta.

Variables respuesta	p de los coeficientes de regresión									
	intercepto	T	T ²	S/S	S/S ²	E/A	E/A ²	T*S/S	T*E/A	S/S*E/A
PT/100 g SPIM	0,0000	0,0002	0,3157	0,0000	0,1488	0,0011	0,1989	0,1199	0,0228	0,1116
ATCs/100 g SPIM	0,0000	0,0012	0,9046	0,0008	0,0328	0,0325	0,0916	0,9895	0,8117	0,7135
ETs/100 g SPIM	0,0000	0,0029	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0037	0,0000	0,0001
Acidez (%)	0,0000	0,1972	0,0078	0,0000	0,0000	0,0011	0,0010	0,0100	0,0095	0,0105
PT /g BS	0,0000	0,0018	0,0310	0,0381	0,2363	0,0001	0,0021	0,0470	0,1200	0,0265
ATCs /g BS	0,0000	0,0005	0,3509	0,2502	0,0860	0,0008	0,0128	0,1235	0,3131	0,1529
ETs /g BS	0,0000	0,0003	0,5845	0,0015	0,0001	0,0000	0,0000	0,2950	0,0002	0,0003

Extractos obtenidos de la extracción de polifenoles del SPIM



Figura 13. Extractos obtenidos en la optimización de extracción de polifenoles del SPIM.

Ficha técnica: certificación de alcohol puro de la Fábrica Nacional de Licores

CERTIFICACIÓN ALCOHOL PURO

Se certifica que el alcohol **PURO** vendido el día de hoy: lote P-11-2015 (Tanque 3) tiene las siguientes características:

DETERMINACIÓN	ALCOHOL DE PRIMERAS
TANQUE DE ALMACENAMIENTO No. lote	Tanque 3 P-11-2015
GRADO ALCOHÓLICO (% Vol.)	± 0,2 96,2
DENSIDAD RELATIVA (20°C/20°C)	± 0,005 0,806
TIEMPO AL PERMANGANATO (min.)	± 3 > 50
METANOL (Cromatografía de gases) (ppm)	± 0,5 0,6
ALDEHIDOS (Cromatografía de gases) (ppm)	± 2,0 0,5
FURFURAL (Espectrofotometría Ultravioleta) (ppm)	± 0,12 < 0,12
ENSAYO UV-VIS (200nm a 700nm)	Sin señales
ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA (USP) 200 nm a 400 nm con celda de 1cm	Pasa Prueba
FURFURAL (Espectrofotometría) (ppm)	< 0,12
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS – Olor, Color y Sabor (Prueba sensorial)	Buenas