

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**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**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado
y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos**

MARVIN SOTO RETANA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2014

DEDICATORIA

*A Dios y a mis padres por su apoyo
durante todo este tiempo...*

*a todos los que me apoyaron
y creyeron en mí.*

La tragedia en la vida no es que no puedas alcanzar tus metas.

La tragedia es no tener metas que desees alcanzar.

Benjamin Mays

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), al Programa de Posgrado de Ciencia en Alimentos y a la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica.

Al proyecto “Aplicación de tecnologías innovadoras para contribuir con el desarrollo sostenible del cultivo de higo (*Ficus carica*) y mora (*Rubus spp.*) en Costa Rica” (735-B1-655), con ayuda del fondo para investigación del Consejo Nacional de Rectores (CONARE). Al proyecto “Determinación de alternativas tecnológicas innovadoras para la transformación de frutas tropicales” (735-A2-502), financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y el instituto francés CIRAD-PERSYST.

A mis profesores del proyecto: Fabrice Vaillant, por ofrecerme la oportunidad de seguir investigando y por contribuir con ideas y observaciones significativas; Ana Mercedes Pérez, por ser una investigadora dedicada, crítica y oportuna en sus opiniones, y por su calidez como persona; y Nadia Jiménez, por aportar observaciones valiosas para mejorar el trabajo y por su trato afable.

A las diferentes directoras del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos: Jacqueline Aiello, Patricia Esquivel y María Lourdes Pineda. A Eric Wong, por sus consejos estadísticos que mejoraron el trabajo.

A los compañeros del Laboratorio de Química del CITA: Marielos Torres, Graciela Artavia, Randall Cordero, Alejandro Navarro, Eduardo Calderón y Silvia Quirós. A los compañeros de Planta Piloto: Fernando Camacho, Alonso Contreras y Juan Carlos Cordero.

A Giovanni González, cuya amistad y consejos fueron de gran ayuda; a Luis Morales y Martín Loría. A todo el personal de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA, por colaborar de alguna u otra forma en el desarrollo de este trabajo.

A Catalina (Nena) por todo el apoyo que me dio, por ser esa persona incondicional, por entenderme y estar ahí en todo momento y por todo lo que hemos vivido juntos.

A los compañeros de la Maestría de Ciencia de Alimentos, por todo lo que compartimos.

Un agradecimiento y dedicatoria muy especial a Ignacio.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos”.



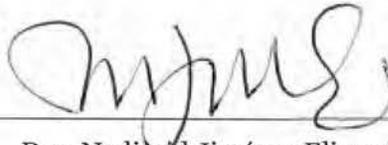
Ph.D. Eric Wong González
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



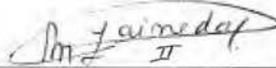
Ph.D. Fabrice Vaillant Barka
Director del Proyecto



Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Asesora del Proyecto



Dra. Nadiarid Jiménez Elizondo
Asesora del Proyecto



M.Sc. María Lourdes Pineda Castro
**Directora Programa de
Posgrado en Ciencia de Alimentos**



Marvin Soto Retana
Candidato

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TRIBUNAL EXAMINADOR.....	iv
ÍNDICE GENERAL	v
RESUMEN	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA.....	xvi
I. JUSTIFICACIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos	7
III. MARCO TEÓRICO.....	8
3.1 Generalidades de la mora.....	9
3.1.1 Situación en Costa Rica	9
3.1.2 Principales compuestos antioxidantes en mora (<i>Rubus adenotrichos</i>)	10
3.1.3 Impacto del procesamiento de mora sobre los compuestos bioactivos	11
3.2 Elagitaninos	13
3.2.1 Estructura química y biodisponibilidad	14
3.2.2 Fuentes de elagitaninos en la dieta.....	17
3.2.3 Elagitaninos en mora.....	18
3.2.4 Propiedades con efectos beneficiosos para la salud	20
3.3 Residuo de mora como subproducto de gran interés	23
3.3.1 Extracción de antocianinas.....	25
3.3.2 Extracción de elagitaninos	26
3.4 Extracción de compuestos fenólicos.....	27
3.4.1 Extracción sólido-solvente	27
3.4.2 Solvente.....	28
3.4.3 Tratamientos enzimáticos.....	30
3.4.4 Optimización mediante la metodología de superficie de respuesta	30
3.5 Fraccionamiento y concentración mediante tecnologías de membranas	33

3.5.1	Tecnologías de membranas	33
3.5.2	Filtración tangencial.....	35
3.5.3	Microfiltración (MF).....	36
3.5.4	Ultrafiltración (UF)	36
3.5.5	Nanofiltración (NF)	36
3.5.6	Variables que afectan los procesos de filtración por membranas.....	37
3.5.7	Parámetros del desempeño de los procesos de filtración por membranas.....	40
IV.	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	43
4.1	Localización del proyecto.....	44
4.2	Subproducto del procesamiento industrial de mora	44
4.3	Tamaño del lote y condiciones de almacenamiento de la materia prima	46
4.4	Metodología	49
4.4.1	Contenido de humedad, proteínas, cenizas, lípidos, fibra dietética, sólidos solubles, acidez titulable y valor de pH	49
4.4.2	Contenido de antocianinas y elagitaninos.....	50
4.4.3	Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC-H).....	51
4.4.4	Contenido de azúcares.....	51
4.5	Resultados.....	51
4.6	Conclusiones y recomendaciones	57
4.6.1	Conclusiones	57
4.6.2	Recomendaciones.....	58
V.	PRUEBAS PRELIMINARES.....	59
5.1	Evaluación de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes preparados enzimáticos comerciales	60
5.1.1	Metodología	61
5.1.2	Resultados	63
5.2	Evaluación del efecto del preparado enzimático sobre la extracción de polifenoles a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora (SPIM)	64
5.2.1	Metodología.....	65
5.2.2	Resultados.....	66
5.3	Selección de la temperatura del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM.....	70
5.3.1	Metodología.....	70
5.3.2	Resultados.....	71
5.4	Selección del tiempo del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM.....	74
5.4.1	Metodología.....	74

5.4.2 Resultados.....	75
5.5 Pruebas para determinar el ámbito de proporción agua/sólido y concentración de enzima para la extracción de polifenoles.....	78
5.5.1 Metodología.....	79
5.5.2 Resultados.....	80
5.6 Conclusiones y recomendaciones.....	84
5.6.1 Conclusiones.....	84
5.6.2 Recomendaciones.....	84
VI. OBJETIVO 1: Optimización del proceso de extracción de polifenoles a nivel de laboratorio	85
6.1 Metodología.....	86
6.1.1 Diseño experimental.....	86
6.1.2 Procedimiento.....	87
6.1.3 Análisis estadístico.....	92
6.2 Resultados.....	92
6.3 Conclusiones y recomendaciones.....	113
6.3.1 Conclusiones.....	113
6.3.2 Recomendaciones.....	114
VII. OBJETIVO 2: Escalamiento del proceso de extracción de polifenoles a nivel de planta piloto y clarificación mediante microfiltración tangencial	115
7.1 Metodología.....	116
7.1.1 Diseño experimental.....	116
7.1.2 Procedimiento.....	117
7.1.3 Análisis estadístico.....	122
7.2 Resultados.....	122
7.3 Conclusiones y recomendaciones.....	135
7.3.1 Conclusiones.....	135
7.3.2 Recomendaciones.....	136
VIII. OBJETIVO 3: Evaluación del proceso de ultrafiltración tangencial para la obtención de un extracto concentrado de polifenoles.....	137
8.1 Metodología.....	138
8.1.1 Diseño experimental.....	138
8.1.2 Procedimiento.....	139
8.1.3 Análisis estadístico.....	142
8.2 Resultados.....	143

8.3	Conclusiones y recomendaciones	159
8.3.1	Conclusiones	159
8.3.2	Recomendaciones.....	160
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
X.	ANEXOS.....	182
10.1	Fichas técnicas de los preparados enzimáticos utilizados.....	183
10.2	Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de la evaluación de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes preparados enzimáticos comerciales.....	188
10.3	Prueba t de Student (t-student) para los resultados de la evaluación del efecto del preparado enzimático sobre la extracción de polifenoles	188
10.4	Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de la selección de la temperatura del proceso de extracción de polifenoles.....	191
10.5	Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de la selección del tiempo del proceso de extracción de polifenoles	194
10.6	Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de las pruebas para determinar el rango de proporción agua/sólido y concentración de enzima para la extracción de polifenoles.....	198
10.7	Síntesis de los análisis de regresión múltiple (Análisis de varianza, ANDEVA) para los modelos generados en las superficies de respuesta	201
10.8	Prueba t de Student (t-student), análisis de varianza (ANDEVA) y prueba F (F-test) para los resultados del escalamiento del proceso de extracción de polifenoles a nivel de planta piloto y clarificación mediante microfiltración.....	205
10.9	Análisis de varianza (ANDEVA) y prueba F (F-test) para los resultados del proceso de concentración y purificación de polifenoles mediante ultrafiltración	213

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el proceso de extracción de polifenoles a partir de un subproducto de mora y aplicar tecnologías de membranas (microfiltración -MF- y ultrafiltración -UF-) para efectuar el fraccionamiento y la purificación de estos compuestos, con el fin de obtener un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos (compuestos con potenciales beneficios para la salud). El desarrollo y la optimización del proceso de obtención de este extracto permitirán ofrecer un producto que traerá beneficios en diferentes ámbitos: económico, ambiental y de gestión integral de desechos, además del área de seguridad alimentaria.

Para el desarrollo de la investigación se utilizó un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora (SPIM) generado durante la elaboración de una pulpa de mora. A partir de este subproducto se evaluó y optimizó el proceso de extracción de polifenoles (elagitaninos -ETs- y antocianinas -ATCs-) acoplado a un tratamiento enzimático a nivel de laboratorio y de planta piloto, utilizando agua destilada como solvente. Los factores optimizados fueron la relación agua/SPIM (A/S) y la concentración de preparado enzimático (Cn enzima). Por otra parte, se aplicaron los procesos de clarificación y concentración a nivel de planta piloto mediante microfiltración (membrana de cerámica con tamaño de poro de 0,2 μm) y ultrafiltración (membranas de cerámica con poder de corte de 1 y 5 kDa), respectivamente. Como resultados se encontró que la extracción con tratamiento enzimático, empleando un preparado comercial con actividad pectinolítica y celulolítica, permitió aumentar el contenido de polifenoles en un 16 % - 19 %, así como disminuir el contenido de sólidos insolubles (SIS) en el extracto. Se obtuvo un punto óptimo con un valor de deseabilidad de 0,8 donde los factores fueron: A/S= 2,4 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y Cn enzima= 263 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Para esto se tomó en cuenta que el extracto obtenido presentara el menor contenido de SIS, turbidez, sólidos solubles y acidez, así como el mayor contenido de ATCs, ETs, polifenoles totales (PT) y capacidad antioxidante (ORAC-H). Durante el proceso de MF se obtuvieron flujos de permeado por encima de 200 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (con valores de factor de reducción volumétrico de FRV= 12,6), y se observó que este proceso permitió eliminar los compuestos insolubles, así como mantener el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante en el extracto clarificado (permeado). Por otra parte, durante el proceso de purificación y concentración mediante UF (membrana de 1 kDa) se obtuvieron flujos de permeado por encima de 15 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (FRV= 7,9); además, se observó que esta membrana permitió retener el 92 % de las ATCs y ETs y el 85 % de los PT en el extracto.

Los resultados obtenidos muestran la factibilidad técnica para la obtención de un extracto natural concentrado de polifenoles mediante MF y UF a partir del SPIM, el cual podría funcionar como ingrediente alimentario o nutracéutico con potenciales beneficios para la salud.

Palabras clave: mora, subproducto, microfiltración, ultrafiltración, polifenoles, elagitaninos.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Contenido de los principales compuestos fenólicos de la mora en tres estados de madurez.	11
Cuadro II. Efectos biológicos beneficiosos para la salud de los ETs, AE y sus metabolitos derivados.....	22
Cuadro III. Compuestos fenólicos presentes en diferentes subproductos agroindustriales.	24
Cuadro IV. Propiedades químicas del subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora, utilizado como materia prima para la obtención del extracto rico en elagitaninos.	52
Cuadro V. Composición de los ácidos grasos (AGs) presentes en la semilla de mora obtenida del SPIM y en las semillas de otros frutos tipo baya.	53
Cuadro VI. Comparación del contenido de polifenoles totales de subproductos obtenidos de diferentes frutas y el subproducto de mora (SPIM).	56
Cuadro VII. Características de los preparados enzimáticos comerciales utilizados para evaluar el efecto de alguna actividad lateral β -glucosidasa de los preparados.	61
Cuadro VIII. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes tratamientos enzimáticos comerciales.	61
Cuadro IX. Evaluación del efecto de la actividad lateral β -glucosidasa sobre el contenido de antocianinas y elagitaninos de jugo de mora clarificado (pH ajustado a 5,0) incubado a 37 °C durante 24 horas.	64
Cuadro X. Diseño experimental para la evaluación del efecto del uso de un preparado enzimático sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industria de mora.	65
Cuadro XI. Evaluación del efecto del uso de un preparado enzimático sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.	67
Cuadro XII. Evaluación del efecto del uso de un preparado enzimático sobre el contenido y extracción de compuestos polifenólicos.....	69
Cuadro XIII. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la temperatura sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.....	70
Cuadro XIV. Evaluación del efecto del uso de la temperatura sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.....	72
Cuadro XV. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el contenido y extracción de compuestos polifenólicos.....	73
Cuadro XVI. Diseño experimental para la evaluación del efecto del tiempo sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.	75

Cuadro XVII. Evaluación del efecto del tiempo sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora... 76	76
Cuadro XVIII. Evaluación del efecto del tiempo sobre el contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.77	77
Cuadro XIX. Tratamientos a estudiar para el ajuste del ámbito de variación entre los parámetros a evaluar para la optimización del proceso de extracción..... 79	79
Cuadro XX. Evaluación del ámbito de proporción agua/sólido y concentración de enzima sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.80	80
Cuadro XXI. Evaluación del ámbito de proporción agua/sólido y concentración de enzima sobre el contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora. 83	83
Cuadro XXII. Variables independientes y los niveles empleados en un diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de elagitaninos a partir de subproducto generado del procesamiento industrial de mora.....86	86
Cuadro XXIII. Diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de elagitaninos a partir de subproducto generado del procesamiento industrial de mora. 87	87
Cuadro XXIV. Masa de subproducto (SPIM) y de agua para obtener un volumen de 600 mL en los frascos utilizados durante los ensayos de extracción.....88	88
Cuadro XXV. Influencia de la concentración del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L (Cn enzima) y de la relación agua/sólido (A/S) en el proceso de extracción (T= 60 °C, t= 60 min) a nivel de laboratorio según el DCCR, sobre algunas características físico-químicas del extracto..... 93	93
Cuadro XXVI. Parámetros de ajuste y adecuación para evaluar los diferentes modelos generados para las diferentes variables respuesta. 95	95
Cuadro XXVII. Coeficientes de correlación (R) entre el contenido y porcentaje de extracción de elagitaninos con respecto al contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del extracto obtenido del SPIM..... 108	108
Cuadro XXVIII. Valores deseados y zona óptima obtenida para cada variable respuesta evaluada en el proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM.110	110
Cuadro XXIX. Valores de las variables respuesta predichas y obtenidas para las condiciones óptimas del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM a nivel de laboratorio. 113	113
Cuadro XXX. Diseño experimental para evaluar el proceso de extracción a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto.....116	116
Cuadro XXXI. Diseño experimental para la evaluación de la presión transmembranaria sobre el proceso de clarificación del extracto de polifenoles mediante MF tangencial. 117	117
Cuadro XXXII. Comparación de las variables respuesta analizadas en el extracto obtenido a partir del SPIM durante el proceso de extracción (T= 60 °C, t= 60 min) a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto.....123	123
Cuadro XXXIII. Comparación del contenido de polifenoles totales de extractos obtenidos de diferentes subproductos de frutas y el extracto obtenido del subproducto de mora (SPIM). 126	126

Cuadro XXXIV. Parámetros físico-químicos de las muestras obtenidas durante el proceso de microfiltración tangencial (FRV=12,6) del extracto obtenido a partir del SPIM.	133
Cuadro XXXV. Diseño experimental para la evaluación del tipo de membrana y la presión transmembranaria sobre la concentración y purificación del extracto de polifenoles.	138
Cuadro XXXVI. Parámetros físico-químicos de las muestras obtenidas durante el proceso de ultrafiltración tangencial (FRV=7,9) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM.	152
Cuadro XXXVII. Porcentaje de retención de algunos parámetros físico-químicos evaluados durante el proceso de ultrafiltración tangencial (FRV=7,9) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM.	155
Cuadro XXXVIII. Evaluación de las diferentes etapas (tratamientos) del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM a nivel de planta piloto, sobre algunos parámetros químicos y pureza del extracto y jugo de mora microfiltrado.	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Impacto del procesamiento para la elaboración de una bebida de mora sobre el contenido de elagi taninos: a) lambertianina C; b) sanguína H-6. Barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$). E+D=escaldado y despulpado; F=formulación (agua, ácidos, azúcar); P+LC=pasteurización y llenado en caliente; A=almacenamiento (35 días a 5 °C) (adaptado de Gancel <i>et al.</i> , 2011).	13
Figura 2. Estructura química de elagitaninos: a) elagitanino; b) HHDP (PM= 338,22 g·mol ⁻¹); c) ácido elágico (PM= 302,2 g·mol ⁻¹).	15
Figura 3. Biodisponibilidad de ETs, ácido elágico y los metabolitos generados por la microbiota. SH-6= sanguína H-6; AE= ácido elágico; HHDP= ácido hexahidroxi-difenólico; EI= estructura intermedia; U-A, U-B, U-C y U-D= urolitinas A, B, C y D.	16
Figura 4. Posibles formas y localizaciones de elagitaninos en la microestructura de los alimentos (adaptado de Gökmen <i>et al.</i> , 2009).	18
Figura 5. Estructura química de la sanguína H-6 (PM= 1870,2 g·mol ⁻¹).	19
Figura 6. Estructura química de la lambertianina C (PM= 2804,2 g·mol ⁻¹).	19
Figura 7. Balance de masas (base seca) del contenido de elagitaninos del jugo/pulpa de mora más el residuo/torta de mora, obtenidos de los diferentes tratamientos: D) Despulpado; PD) Prensado discontinuo; PD+TE) Prensado discontinuo + trat. enzimático previo; PC) Prensado continuo; PC+TE) Prensado continuo + trat. enzimático previo (Fuente: Soto, 2010).	27
Figura 8. Diseños centrales compuestos para a) k = 2 factores y b) k = 3 factores.	32
Figura 9. Esquema de proceso de membranas para obtener extractos de polifenoles (UF, ultrafiltración; NF, nanofiltración; OI, ósmosis inversa) (adaptado de Akin <i>et al.</i> , 2012).	34
Figura 10. Comparación entre la filtración tangencial y la filtración frontal (adaptado de McLellan & Padilla-Zakour, 2005).	35

Figura 11. Características del retenido y permeado que se obtienen de diferentes procesos de membranas: MF, microfiltración; UF, ultrafiltración; NF, nanofiltración.....	37
Figura 12. Flujo de proceso de la elaboración a nivel industrial de una bebida a base de mora (adaptado de Gancel <i>et al.</i> , 2011).	45
Figura 13. Fotografías del subproducto utilizado (40,6 % de humedad), constituido principalmente por semillas: a) subproducto formado por residuos gruesos y semillas; b) semilla (vista en estereoscopio: 40X).	46
Figura 14. Flujo de proceso para la realización de las pruebas preliminares, y optimización y verificación del proceso de extracción a nivel de laboratorio (objetivo 1).	47
Figura 15. Flujo de proceso para la realización de la extracción a nivel de planta piloto y microfiltración del extracto (objetivo 2).	47
Figura 16. Flujo de proceso para la realización de los ensayos de ultra-filtración (objetivo 3).	48
Figura 17. Comparación del contenido de polifenoles totales de 35 frutas tropicales (González <i>et al.</i> , 2011) y el SPIM. AGE= equivalentes de ácido gálico.	55
Figura 18. Esquema del procedimiento para la evaluación del efecto de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes tratamientos enzimáticos comerciales.	63
Figura 19. Comparación de la turbidez de dos extractos obtenidos a partir de subproducto industrial de mora: a) extracción con preparado enzimático; b) extracción sin preparado enzimático.	68
Figura 20. Evaluación del efecto del tratamiento enzimático sobre el porcentaje de extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: T= 50 °C, relación agua/sólido= 1), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) extracción de antocianinas; b) extracción de elagitaninos.....	69
Figura 21. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el porcentaje de extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: Ultrazym®, Cn=250 mg·kg ⁻¹ , relación agua/sólido=1), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) extracción de antocianinas; b) extracción de elagitaninos.	73
Figura 22. Evaluación del efecto del tiempo sobre la extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg ⁻¹ , T= 60 °C, relación agua/sólido= 2,0), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3). Barras con letras mayúsculas (antocianinas) y letras minúsculas (elagitaninos) diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05).....	77
Figura 23. Evaluación del rango de proporción agua/sólido (A/S) y concentración de enzima (Cn= mg·kg ⁻¹) sobre la extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: Ultrazym®, T= 60 °C, t= 60 min), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3). Barras con letras mayúsculas (antocianinas) y letras minúsculas (elagitaninos) diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05).....	82
Figura 24. Esquema del sistema de extracción de elagitaninos, a nivel de laboratorio.	89
Figura 25. Flujo de proceso para la obtención de un extracto clarificado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de laboratorio.	91

Figura 26. Gráfica de residuos (residuos versus valores predichos) de los modelos generados: a) sólidos insolubles en suspensión; b) log de turbidez; c) acidez; d) sólidos solubles; e) contenido de antocianinas (base seca); f) contenido de elagitaninos (base seca).....	96
Figura 27. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) sólidos insolubles en suspensión (SIS); b) turbidez.	99
Figura 28. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) acidez; b) sólidos solubles.....	101
Figura 29. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) contenido de antocianinas (ATCs); b) contenido de elagitaninos (ETs). C ₃ G= cianidina-3-glucósido; AE= ácido elágico; BS= base seca.	102
Figura 30. Comparación de dos extractos obtenidos a partir del suproyecto industrial de mora: a) extracto obtenido del SPIM sin aplicar secado ni molienda; b) extracto obtenido aplicando previamente un secado y una molienda al SPIM.	104
Figura 31. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) extracción de antocianinas (ATCs); b) extracción de elagitaninos (ETs).	106
Figura 32. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) contenido de polifenoles totales (PT); b) capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC-H). AG= ácido gálico; TE= equivalentes de trolox; BS= base seca.	107
Figura 33. Optimización de las condiciones del proceso de extracción (concentración de preparado enzimático -Cn enzima- y relación agua/sólido -A/S-) en función del contenido de ATCs y ETs, extracción de ATCs y ETs (valores máximos) y del contenido de sólidos insolubles, turbidez, acidez y sólidos solubles (valores mínimos).	111
Figura 34. Esquema de las etapas realizadas a nivel de laboratorio para la obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos obtenido a partir de un subproducto industrial de mora.	112
Figura 35. Esquema de la unidad piloto de microfiltración y ultrafiltración tangencial.	119
Figura 36. Flujo de proceso para la obtención de un extracto clarificado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de planta piloto.....	121
Figura 37. Comparación de los equipos y utensilios utilizados para el proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM, a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto.....	124
Figura 38. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria sobre el flujo de permeado durante el proceso de microfiltración tangencial (T= 30 °C; FRV=1,1-1,3; U=6,1 m·s ⁻¹) del extracto obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3).	129
Figura 39. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria sobre el contenido de compuestos polifenólicos durante el proceso de microfiltración tangencial (T= 30 °C; FRV=1,1-1,3; U=6,1 m·s ⁻¹) del extracto obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) contenido de antocianinas; b) contenido de elagitaninos.	130
Figura 40. Evaluación del flujo de permeado y factor de reducción volumétrico durante el proceso de microfiltración tangencial (T= 30,0 °C; P _{tm} = 3,60 bar; U=6,1 m·s ⁻¹) del extracto obtenido a partir del SPIM (n=3).	132

Figura 41. Comparación de las muestras obtenidas durante el proceso de microfiltración tangencial del extracto obtenido a partir del SPIM: a) extracto de alimentación; b) extracto (permeado); c) extracto (retenido, FRV= 12,6).....	134
Figura 42. Flujo de proceso para la obtención de un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de planta piloto mediante ultrafiltración.....	142
Figura 43. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre el flujo de permeado durante el proceso de ultrafiltración tangencial (T= 30 °C; FRV=1,1-1,3; U=5,5-7,1 m·s ⁻¹) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3).....	144
Figura 44. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre la retención de ciertos compuestos durante el proceso de ultrafiltración tangencial (T= 30 °C; FRV=1,1-1,3; U=5,5-7,1 m·s ⁻¹) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) retención de acidez; b) retención de sólidos solubles.	145
Figura 45. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre la retención de compuestos polifenólicos durante el proceso de ultrafiltración tangencial (T= 30 °C; FRV=1,1-1,3; U=5,5-7,1 m·s ⁻¹) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) retención de antocianinas; b) retención de elagitaninos. .	146
Figura 46. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre el consumo de energía durante el proceso de ultrafiltración tangencial (T= 30 °C; FRV=1,1-1,3; U=5,5-7,1 m·s ⁻¹) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3).....	148
Figura 47. Evaluación del flujo de permeado y factor de reducción volumétrico durante el proceso de ultrafiltración tangencial (MWCO=1 kDa; T=30,01 °C; P _{tm} =6,25 bar; U= 7,1 m·s ⁻¹) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (n=2).	151
Figura 48. Comparación de las muestras obtenidas durante el proceso de ultrafiltración tangencial (MWCO= 1 kDa) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM: a) extracto de alimentación; b) extracto (permeado); c) extracto concentrado (retenido, FRV= 7,9).....	153
Figura 49. Esquema del flujo de proceso realizado a nivel de planta piloto para la obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos obtenido a partir de un subproducto industrial de mora, aplicando tecnologías de membranas para su purificación y concentración: microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF).....	158

NOMENCLATURA

AE	Ácido elágico	n	Número de muestras
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales	N	Número total de experimentos
A_t	Área tangencial	NF	Nanofiltración
ATCs	Antocianinas	n_a	Puntos axiales
BH	Base húmeda	n_f	Puntos factoriales
BS	Base seca	n_o	Puntos centrales
C_{icx}	Concentración de elagitaninos o antocianinas en el extracto líquido	NTU	Unidades nefelométricas de turbidez
C_{ip}	Concentración del compuesto de interés en el permeado	OI	Ósmosis inversa
C_{ir}	Concentración del compuesto de interés en el retenido	ORAC-H	Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (hidrofílica)
C_{is}	Concentración de elagitaninos o antocianinas en el subproducto	ρ	Densidad
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos	p	Probabilidad
C_{PTr}	Concentración de polifenoles totales en el retenido	P_{ent}	Presión de entrada
C_{STr}	Concentración de sólidos totales en el retenido	p_{fa}	Probabilidad de falta de ajuste
DCCR	Diseño central compuesto rotatable	PM	Peso molecular
E	Energía de consumo	P_p	Presión de permeado
ED	Electrodialisis	P_{PT}	Pureza del extracto con respecto al contenido de polifenoles totales
E_i	Extracción de elagitaninos o antocianinas	P_{sal}	Presión de salida
E_L	Energía para producir un litro de permeado por hora de UF	PT	Polifenoles totales
ETs	Elagitaninos	P_{tm}	Presión transmembranaria
FRV	Factor de reducción volumétrico	SIS	Sólidos insolubles en suspensión
gluc	Glucósido	SPIM	Subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora
HDPE	Poliétileno de alta densidad	rpm	Revoluciones por minuto
HHDP	Hexahidroxidifenol	R_i	Retención del compuesto de interés
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos	R_t	Resistencia total
J_p	Flujo de permeado	U	Velocidad tangencial
J_r	Flujo de retenido	UF	Ultrafiltración
k	Factores del diseño experimental	μ_p	Viscosidad del producto
m	Masa	V_a	Volumen de alimentación
m_{ex}	Masa del extracto líquido	V_m	Volumen muerto del equipo
MF	Microfiltración	V_p	Volumen de permeado
MIA	Material insoluble en alcohol	V_r	Volumen de retenido
m_s	Masa del subproducto	~	Aproximadamente
msnm	Metros sobre el nivel del mar	>	Mayor que
MWCO	Peso molecular de corte	<	Menor que

I. Justificación



I. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha dado un aumento en el interés de identificar fitoquímicos o compuestos vegetales que tienen efectos positivos en la salud. Se han realizado ensayos *in vitro* para identificar estos compuestos bioactivos, los cuales han cubierto una amplia área de investigación, que incluye estudios sobre la actividad antioxidante, anti cancerígena, la disminución de obesidad y de colesterol, entre otros. Con frecuencia, el éxito de la caracterización de un fitoquímico puede conducir al desarrollo de nuevos alimentos o suplementos con actividades que favorecen a la salud (Boue *et al.*, 2009). Durante la última década, estos alimentos han sido denominados alimentos funcionales, que son generalmente aceptados como aquellos que contienen, de forma natural, cualidades beneficiosas para la salud (Boue *et al.*, 2009).

El interés de los consumidores se ha desplazado hacia lograr y mantener una buena salud; de esta forma ha aumentado de manera importante la demanda por los alimentos funcionales (Katan & De Roos, 2004; Sacchetti *et al.*, 2005). Entre las materias primas con características funcionales disponibles en Costa Rica, la mora es una excelente opción ya que presenta efectos potencialmente beneficiosos para la salud por su alto contenido de antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos (Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Gancel *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos presentes mayoritariamente en las moras de la variedad “vino con espinas” (*Rubus adenotrichos*), que es la más producida en Costa Rica, son elagitaninos (ETs) y antocianinas (Mertz *et al.*, 2007). De estos, los ETs han recibido un gran interés debido a que los compuestos formados a partir de su hidrólisis tienen importantes actividades biológicas tales como actividad antimutagénica, antiviral, anticancerígena, antitumoral, quimioprotectora y antioxidante (Seeram *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Bakkalbaşı *et al.*, 2009). Distintos estudios realizados han encontrado que extractos que contienen elagitaninos mostraron una actividad citotóxica contra células cancerígenas humanas (Barrajón-Catalán *et al.*, 2010). También otros investigadores han observado el efecto de una dieta de elagitaninos y ácido elágico sobre las células cancerígenas del colon, encontrando que estos compuestos inducían la apoptosis de estas células (Larrosa *et al.*, 2006). El estudio realizado por Tavares *et al.* (2012) encontró que extractos de mora (*Rubus* sp.) ricos en metabolitos de ETs exhibieron un efecto neuroprotector a nivel *in vitro*.

La producción nacional de mora creció 42,32% del 2005 al 2009 en cuanto a las toneladas métricas producidas, según cifras de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA), suministradas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) (Vindas, 2011). Las razones de este crecimiento se deben en gran medida a que el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), en conjunto con otras universidades nacionales, han venido investigando el fruto y dando a conocer sus propiedades desde el 2005. También, el incremento se debe a que se han promocionado otras presentaciones para el consumo de mora como las jaleas y concentrados, además de haber aumentado la productividad por hectárea (Vindas, 2011). En Costa Rica, gran parte de la mora es procesada por las industrias locales, para producir y comercializar productos congelados y procesados térmicamente (jaleas, jugos, pulpas, entre otros), de los cuales las bebidas a base de mora están en alta demanda.

Junto con el aumento en la producción y procesamiento de cultivos de frutas, surgen considerablemente una mayor proporción de residuos, los cuales representan un problema importante de manejo que se agrava con las restricciones legales (Zhao, 2007). Los residuos agroindustriales sólidos o líquidos contienen una alta carga orgánica y tradicionalmente han sido removidos del proceso de producción como materiales indeseables. Sin embargo, el término subproducto sería más adecuado puesto que estos materiales pueden ser sustratos para la extracción de compuestos funcionales y el desarrollo de nuevos productos con alto valor de mercado (Galanakis, 2012). Durante la elaboración de jugo o pulpa de mora, se genera un residuo o subproducto que retiene una gran cantidad de polifenoles y que corresponden a compuestos no extraíbles por medios físicos, principalmente elagitaninos, los cuales se encuentran asociados a la fibra dietética y a proteínas (Arranz *et al.*, 2009; Soto, 2010).

El procesamiento de subproductos de frutas como la mora, constituye una importante fuente de compuestos que pueden ser usados para la producción y recuperación de ingredientes de valor agregado, proporcionando beneficios a la industria. La extracción de antocianinas, catequinas, taninos hidrolizables y ácidos fenólicos de residuos de uva y otras frutas tipo baya ha sido estudiada por varios investigadores (Kammerer *et al.*, 2005; Díaz-Reinoso *et al.*, 2009). Específicamente el residuo de mora (incluyendo semillas, cáscara o piel) puede ser un producto de gran interés para la industria alimentaria y farmacéutica debido a los carbohidratos disponibles, fibra dietética, aceites, compuestos

polifenólicos y pigmentos que presenta, los cuales pueden ser utilizados tanto como ingredientes naturales para productos alimenticios así como constituyentes para mejorar la funcionalidad de los mismos productos.

Varios estudios reportan que el procesamiento de las moras puede causar pérdidas importantes de los compuestos antioxidantes hidrosolubles (Hager *et al.*, 2008a; Gancel *et al.*, 2011). Debido a la gran cantidad de causas potenciales de cambios en los compuestos fitoquímicos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, es importante realizar una evaluación exhaustiva de las modificaciones en los compuestos fenólicos y antioxidantes durante estas etapas (Pokorný & Schmidt, 2003; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2003). Es primordial caracterizar y optimizar estos procesos con respecto al impacto sobre los compuestos bioactivos como, por ejemplo, los antioxidantes. La evaluación del efecto del procesamiento de alimentos sobre los antioxidantes naturales es un factor clave en la búsqueda de condiciones tecnológicas necesarias para preservar o mejorar su actividad original y biodisponibilidad (Nicoli *et al.*, 1999). Por lo tanto, es necesario investigar y definir métodos innovadores para extraer mayor cantidad de estos compuestos bioactivos y que a su vez permitan minimizar sus pérdidas debido al procesamiento.

Algunos fitoquímicos en las matrices de las plantas están dispersos en el citoplasma de las células, el cual no es fácilmente accesible en los procesos de extracción con solventes (Gökmen *et al.*, 2009). Ciertos compuestos son retenidos en la red de polisacáridos y lignina en las células vegetales a través de enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno. También pueden estar asociados con los polímeros de la pared celular a través de un enlace éter o éster. Los fitoquímicos enlazados no están disponibles para la extracción con solvente (Wang, 2011). Por esta razón, la aplicación de enzimas antes o durante la extracción que puedan degradar la pared celular como pectinasas, celulasas, proteasas y fosfolipasas, permite la hidrólisis de la pared celular y de los fitoquímicos aumentando la liberación de estos compuestos bioactivos (Wang, 2011).

Con la aplicación de tecnologías de membranas se puede concentrar, fraccionar o purificar fluidos. En forma sencilla, el proceso de filtración con membranas se puede ilustrar como la circulación de fluidos por superficies semipermeables, donde los componentes de dichos fluidos las atraviesan de manera selectiva sin sufrir alteraciones químicas ni físicas (Pabby *et al.*, 2009). Las tecnologías de membranas han dado lugar a una importante innovación

tanto en procesos como en productos y, particularmente, han sido apropiadas para un crecimiento industrial sostenible en las últimas décadas (Girard & Fukumoto, 2000; Drioli & Romano, 2001). Actualmente la ultrafiltración (UF), la microfiltración (MF), la ósmosis inversa (OI) y la nanofiltración (NF) son bien reconocidas como operaciones unitarias básicas (Drioli & Romano, 2001). Además, son muy utilizadas para producir líquidos puros, concentrar suspensiones, recuperar productos de gran valor y para regenerar líquidos de proceso (Vaillant *et al.*, 2001).

El fraccionamiento, así como la posterior purificación y concentración de los compuestos polifenólicos para su uso en la industria de alimentos ha sido de gran interés, no solo por su importancia en cuanto a los beneficios para la salud, sino también por su interés económico. El uso de membranas puede mejorar la selectividad de separación, ya que éstas son capaces de interactuar con algunos compuestos en solución (Díaz-Reinoso *et al.*, 2009). Por ejemplo, la aplicación de NF y UF ha sido utilizada como método alternativo para purificar y fraccionar los extractos de desechos de la vinería con el fin de obtener fracciones de proantocianinas con diferentes grados de polimerización (Santamaría *et al.*, 2002). También, los compuestos fenólicos de uva han sido procesados por UF para su concentración o para el fraccionamiento de antocianinas (Díaz-Reinoso *et al.*, 2009). Recientemente se ha estudiado la aplicación de estas tecnologías para concentrar antocianinas a partir de extractos de flor de Jamaica (Cisse *et al.*, 2011a).

Bajo este contexto, el propósito de este proyecto fue realizar y optimizar la extracción de polifenoles, cuya principal fracción está constituida de elagitaninos (compuestos con potenciales beneficios para la salud), a partir de un residuo industrial de mora. Para ello se evaluó la aplicación de un tratamiento enzimático y la utilización de tecnologías de membranas (microfiltración y ultrafiltración) con el fin de efectuar el fraccionamiento y la purificación de estos compuestos, para así obtener un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos. El desarrollo y la optimización del proceso de obtención de este extracto permitirán ofrecer un producto que traerá beneficios en diferentes ámbitos: económico, ambiental y de gestión integral de desechos, además del área de seguridad alimentaria. Esto porque se podrá valorizar un subproducto agroindustrial, permitiendo ofrecer un concentrado natural que podría funcionar como aditivo o ingrediente alimentario o nutracéutico con potenciales beneficios para la salud.

II. Objetivos



II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el proceso de extracción de polifenoles a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora (SPIM) y aplicar tecnologías de membranas (microfiltración y ultrafiltración) para efectuar el fraccionamiento y la purificación de estos compuestos, con el fin de obtener un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos.

2.2 Objetivos específicos

1. Optimizar el proceso de extracción de polifenoles a escala de laboratorio a partir del SPIM, utilizando agua como solvente y acoplado a un tratamiento enzimático, aplicando la metodología de superficie de respuesta.
2. Realizar el escalamiento del proceso de extracción de polifenoles a nivel de planta piloto a partir del SPIM, para obtener un extracto clarificado de estos compuestos aplicando microfiltración tangencial.
3. Evaluar el proceso de ultrafiltración tangencial para obtener un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos y con alto grado de pureza, analizando diferentes parámetros de proceso.



III. Marco teórico



III. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de la mora

El género *Rubus* de la extensa familia de las Rosáceas, contiene un amplio grupo de especies de pequeños frutos, dentro del cual se encuentra la mora (Vasco *et al.*, 2009). Las moras -también conocidas como zarzamoras- son consideradas, en la actualidad, como una fuente rica de polifenoles. Varios ácidos fenólicos se han detectado en la mora, como el ácido gálico, cafeico, ferúlico, cumárico y eláxico. De estos el ácido eláxico es el principal de los compuestos fenólicos (Heinonen & Meyer, 2002; Mertz *et al.*, 2007).

3.1.1 Situación en Costa Rica

En Costa Rica, el género *Rubus* se extiende en las partes más altas del país (altitudes en torno a los 1 400 a 2 500 msnm), ubicadas principalmente en el Cerro de la Muerte y sus alrededores (Flores *et al.*, 2003). La mayor expansión del área sembrada de mora se ha dado en la zona de Los Santos (Tarrazú, Dota, León Cortés), El Guarco y las partes altas de Pérez Zeledón (Castro & Cerdas, 2005). El ciclo de vida del cultivo de mora es perenne, lo que permite que exista producción casi todo el año. Sin embargo, la mayor producción en Costa Rica ocurre en los meses de febrero a marzo (Leitón, 2008).

La clasificación de las variedades criollas costarricenses no se ha formalizado a nivel de especie, sin embargo, es posible distinguirlas por sus diferencias morfológicas y son marcadas con los nombres con que popularmente son reconocidas en las zonas productoras (Flores *et al.*, 2003). Entre las moras criollas o silvestres, se conocen las siguientes variedades: vino con espinas rojas, vino con espinas blancas, vino sin espinas, negrita, ratón, castilla, enana, dulce y caballo (Flores *et al.*, 2003; Castro & Cerdas, 2005). En Costa Rica, las moras híbridas son originarias de América del Norte, específicamente de Carolina del Norte, Michigan y Texas; siendo las principales variedades comerciales: Brazos, Cherokee y Comanche (Castro & Cerdas, 2005).

La variedad “vino” es la más extendida en el país debido a que presenta mejores niveles de producción, calidad y aceptación general de la fruta (Flores *et al.*, 2003). Esta variedad,

además, cuenta con las mejores características sensoriales (color negro y sabor), físicas (firmeza y tamaño mediano), químicas (acidez y grados Brix), de mercado (tanto nacional como internacional) y biológicas (resistencia a plagas y enfermedades) (Flores *et al.*, 2003).

En el 2005, el cultivo de mora en Costa Rica correspondía a aproximadamente 1 550 ha con una producción de 1 500 toneladas, de la cual menos del 15 % fue exportado, siendo Estados Unidos el principal mercado (Strik *et al.*, 2008). El mercado de mora en el país experimentó una crisis, debido a la falta de organización; además, es un sector muy susceptible a los problemas climatológicos ya que cuando se presentan condiciones lluviosas con viento, las plantaciones se ven afectadas por deshidratación y pérdida de fuerza en la planta. De esta manera en los meses con menos lluvia las cosechas presentan una mayor calidad y cantidad (Leitón, 2008). La mayor parte de la producción en Costa Rica es orgánica, lo cual obedece a que la planta de mora ha crecido y desarrollado en forma silvestre. Cabe destacar también, que el cultivo de este producto es un negocio familiar lo que limita en algunos casos la calidad obtenida ya que la manipulación y falta de capacitación provoca que la fruta se deteriore mucho en el proceso de recolección (Leitón, 2008).

La mora posee usos muy amplios y diferenciados que van desde el consumo de la fruta fresca, hasta su uso en jugos, mermeladas y hasta vinos. Puede ser utilizada tanto como producto de mesa, hasta como materia prima de uso industrial. Sin embargo, se estima que a nivel mundial el 90 % del consumo de la mora es procesada y solo el 10 % restante se comercializa como producto fresco (Leitón, 2008). En Costa Rica, gran parte de la mora es procesada por las industrias locales, para producir y comercializar productos congelados y procesados térmicamente (jaleas, jugos y pulpas, entre otros), de los cuales las bebidas a base de mora están en alta demanda.

3.1.2 Principales compuestos antioxidantes en mora (*Rubus adenotrichos*)

La principal clase de compuestos fenólicos que se encuentra en las especies *Rubus*, son los elagitaninos y en segundo lugar, las antocianinas (Määttä-Riihinen *et al.*, 2004; Mertz *et al.*, 2007). En menor contenido se encuentran flavonoles (quercitina, kaempferol) y formas

conjugadas de ácido elágico, ácido gálico y ácido hidroxicinámico (Mertz *et al.*, 2007). En *Rubus adenotrichos* el contenido de elagitaninos y antocianinas tiene una relación inversa entre ellos con respecto al grado de maduración en la mora (Acosta-Montoya *et al.*, 2010).

El contenido de elagitaninos disminuye de manera constante durante la maduración y, según Acosta-Montoya *et al.* (2010), representa más del 92 % (m/m) de los compuestos fenólicos en las frutas de color rojo claro (grado de madurez 1) y disminuye a casi un 61 % (m/m) en la fruta totalmente madura (grado de madurez 3). Por otra parte, las antocianinas aumentan significativamente en la fruta al pasar del grado de madurez 1 al 3 (Cuadro I).

Cuadro I. Contenido de los principales compuestos fenólicos de la mora en tres estados de madurez*.

Parámetro	Estado de madurez		
	Intermedio (Grado 1)	Tres cuartos (Grado 2)	Maduro (Grado 3)
Elagitaninos (mg ácido elágico/g)			
- Lambertianina C	12,0±1,0 ^a	11,0±1,0 ^a	8,0±0,4 ^b
- Sanguína H-6	10,0±0,5 ^a	9,0±0,4 ^b	6,6±0,3 ^c
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g)			
- Cianidina-3-glucósido	1,03±0,03 ^c	3,10±0,20 ^b	8,30±0,30 ^a
- Cianidina-3-(6'-malonil)	0,111±0,002 ^c	0,391±0,005 ^b	0,660±0,040 ^a
Favonoles (mg quercitina/g)	0,298±0,002 ^a	0,231±0,004 ^b	0,137±0,002 ^c
Derivados del ácido elágico (mg ácido elágico/g)	0,300±0,003 ^a	0,216±0,004 ^b	0,202±0,004 ^c

Fuente: Acosta-Montoya *et al.* (2010). *Datos expresados ± desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$, Tukey). Valores expresados en base seca.

3.1.3 Impacto del procesamiento de mora sobre los compuestos bioactivos

Solo una pequeña cantidad de frutas y vegetales es consumida de forma fresca, mientras que la mayoría debe ser procesada por aspectos de inocuidad, calidad y por razones económicas (Nicoli *et al.*, 1999). Varios estudios reportan que el procesamiento de las moras puede causar pérdidas importantes de los compuestos antioxidantes solubles en agua (especialmente antocianinas), lo que altera el color y la calidad nutricional de los

productos (Hager *et al.*, 2008a; Gancel *et al.*, 2011). Relacionado con esto, Nicoli *et al.* (1999) han reportado que la capacidad antioxidante de los alimentos puede verse afectada de varias maneras por el procesamiento, incluidas las pérdidas de antioxidantes solubles en agua (como compuestos fenólicos), alteraciones en los compuestos que mejoran o reducen la capacidad antioxidante de los componentes de las plantas, las interacciones con otros compuestos que alteran la actividad antioxidante, o la formación de nuevos compuestos por reacción de Maillard o por otras reacciones que afectan la actividad antioxidante.

Diferentes estudios reportan que los tratamientos térmicos como el escaldado y la pasteurización de frutas y vegetales, ya sea a nivel de laboratorio o a escala semi-industrial, reducen considerablemente las cualidades funcionales y nutricionales del producto final (Pokorný & Schmidt, 2003; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2003). Hager *et al.* (2008a) reportaron que el procesamiento de mora (cv. Apalache) causaba importantes pérdidas de antocianinas monoméricas, principalmente, debido a su polimerización. También, se ha encontrado que el proceso térmico no parece degradar apreciablemente el contenido de elagitaninos en la mora; sin embargo, el proceso de extracción de jugo de mora provoca pérdidas significativas de estos compuestos, probablemente debido a la remoción de semillas, las cuales son ricas en elagitaninos (Hager *et al.*, 2010; Soto, 2010). Se han encontrado pérdidas en el contenido de elagitaninos en jugo de mora clarificado y no clarificado de un 82 % y 70 %, respectivamente (Hager *et al.*, 2010). Soto (2010), reportó que el porcentaje de extracción de elagitaninos en jugo de mora fue de 7,6-18 % para jugos con bajo contenido de sólidos insolubles -obtenidos mediante extracción con prensa hidráulica-, y de 36-45 % para jugos pulposos -extracción con prensa de tornillo sin fin-.

El estudio realizado por Soto (2010) también encontró que las antocianinas son extraídas en mayor porcentaje que los elagitaninos, durante la obtención de jugo de mora mediante diferentes tratamientos físicos y enzimáticos. Esto podría indicar que los elagitaninos están más asociados con la fibra de la mora, por lo que se deben buscar alternativas innovadoras para aprovechar el residuo generado durante la extracción de jugo de mora, el cual retiene un alto contenido de compuestos polifenólicos (55 %-92,4 % de retención de ETs).

Durante el proceso de elaboración de una bebida de mora (*Rubus adenotrichos*), pueden presentarse pérdidas de elagitaninos durante las etapas de escaldado y pasteurización

(Gancel *et al.*, 2011). Según estos autores, después del escaldado de mora se presentó una reducción del contenido de lambertianina C y sanguína H-6 en casi un 20 %; asimismo, la remoción de semillas y partículas gruesas durante el despulpado provocó un descenso de un 10 % y 13 % en estos compuestos, respectivamente (ver Figura 1). Además, después de la pasteurización y del llenado en caliente se dieron pérdidas adicionales de hasta 59 % para lambertianina C y 17 % para sanguína H-6. El proceso total para obtener la bebida a base de mora provocó una reducción de lambertianina C y sanguína H-6 de aproximadamente 80 % y 50 %, respectivamente, con respecto al contenido de estos compuestos en la materia prima inicial. Finalmente, durante el almacenamiento del producto (35 días, 5 °C) ocurre una disminución de estos compuestos en un 30 % y 25 %, respectivamente (ver Figura 1); esto significa que la bebida de mora, al final de la vida útil, tendrá una pérdida de 86 % de lambertianina C y 62,5 % de sanguína H-6 con respecto a la materia prima (mora fresca).

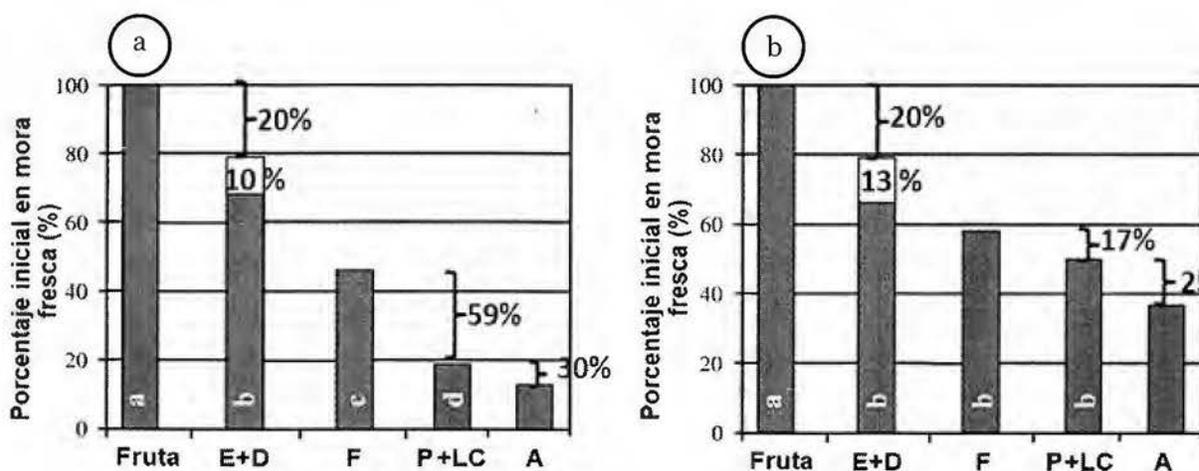


Figura 1. Impacto del procesamiento para la elaboración de una bebida de mora sobre el contenido de elagi taninos: a) lambertianina C; b) sanguína H-6. Barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($\alpha=0,05$). E+D=escaldado y despulpado; F=formulación (agua, ácidos, azúcar); P+LC=pasteurización y llenado en caliente; A=almacenamiento (35 días a 5 °C) (adaptado de Gancel *et al.*, 2011).

3.2 Elagitaninos

Los taninos pueden ser definidos como compuestos fenólicos hidrosolubles, que tienen pesos moleculares entre 500 y 3 000 Da. Contienen suficientes grupos hidroxilos que

permiten la formación de enlaces estables con proteínas. Debido a estos enlaces con proteínas, los alimentos ricos en taninos presentan características astringentes (Bakkalbaşı *et al.*, 2009).

Los taninos se encuentran divididos en dos grupos: los taninos condensados y los hidrolizables. Estos últimos son hidrolizados por ácidos, bases, agua caliente o ciertas enzimas (taninas) (Khanbabaee & Van Ree, 2001). A su vez, esta clase de taninos se divide en dos subclases: los galotaninos y los elagitaninos (ETs). A diferencia de la limitada distribución de los galotaninos en la naturaleza, los ETs son constituyentes típicos de muchas familias de plantas (Niemetz & Gross, 2005). Por otra parte, los taninos condensados, que son mezclas de flavanoles oligoméricos y poliméricos (ejemplo, catequinas), son químicamente más inestables y heterogéneos.

3.2.1 Estructura química y biodisponibilidad

- *Propiedades físico-químicas*

Los elagitaninos son compuestos polifenólicos, que contienen una o más fracciones de grupos hexahidroxidifenol (HHDP) esterificados a un poliol (la mayoría de las veces β -D-glucosa) (Bakkalbaşı *et al.*, 2009) como se observa en la Figura 2.a. Las unidades de HHDP están constituidas por un acoplamiento biarilo oxidativo (C-O) entre residuos galoil orientados convenientemente (Khanbabaee & Van Ree, 2001).

Las estructuras de los ETs varían desde simples monoésteres a poliésteres complejos y tienen un espectro UV característico de máxima absorción cercano a 280 nm (Aaby *et al.*, 2007). Los ETs son generalmente lábiles, y sufren reacciones de hidrólisis y de polimerización. En la hidrólisis de los ETs con ácidos o bases, los enlaces éster son hidrolizados y los grupos HHDP (Figura 2.b) espontáneamente se reacomodan en ácido elágico (AE) el cual tiene una baja solubilidad en agua (Grudhöfer *et al.*, 2001). El AE (Figura 2.c) es un dímero derivado del ácido gálico, y está presente en la vacuola de la planta en su forma libre como AE, como derivados de AE, o como elagitaninos solubles en agua. Por otra parte, los ETs, durante el procesamiento de alimentos, pueden cambiar a AE en forma libre o derivados del AE (Quideau & Feldman, 1996).

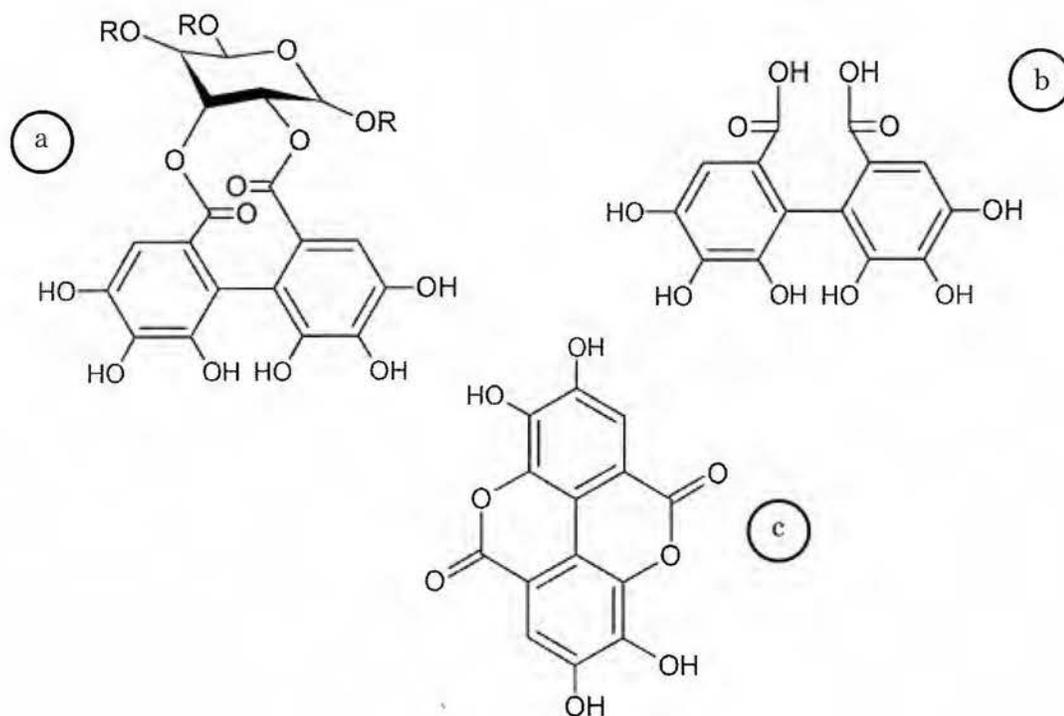


Figura 2. Estructura química de elagitaninos: a) elagitanino; b) HHDP (PM= 338,22 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); c) ácido elágico (PM= 302,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Estudios de diferentes familias de plantas han identificado más de 500 elagitaninos con diversas estructuras. La variación estructural entre monómeros surge principalmente de la modificación metabólica de las unidades de HHDP, así como del número y la ubicación de los grupos polifenólicos en una molécula (Yoshida *et al.*, 2009). La variedad estructural de los metabolitos del grupo HHDP lleva a la formación de muchos subgrupos que componen la familia de los elagitaninos, incluyendo los dehidroelagitaninos, dehidroelagitaninos modificados, elagitaninos C-glicosídicos, y taninos complejos. Además, el acoplamiento oxidativo intermolecular C-O entre el grupo HHDP en un monómero de elagitanino y el grupo galoil en otro monómero, produce variaciones estructurales adicionales que conducen a un gran número de compuestos de ETs oligoméricos (Quideau & Feldman, 1996; Yoshida *et al.*, 2010).

- Biodisponibilidad

Se ha estudiado el metabolismo y la absorción de los ETs, en ensayos con ratones de laboratorio y cerdos ibéricos, con el fin de elucidar el mecanismo de las reacciones metabólicas que sufren estos compuestos dentro del cuerpo humano. Durante el consumo de alimentos que contienen ETs, estos se hidrolizan y liberan AE; sin embargo, son de particular importancia en el colon los metabolitos microbianos como las urolitinas, las cuales son formadas por acción de la microbiota intestinal (Figura 3) (Cerdá *et al.*, 2005; Seeram *et al.*, 2007; Selma *et al.*, 2009), principalmente del género *Eubacterium* y *Clostridium* (Selma *et al.*, 2009).

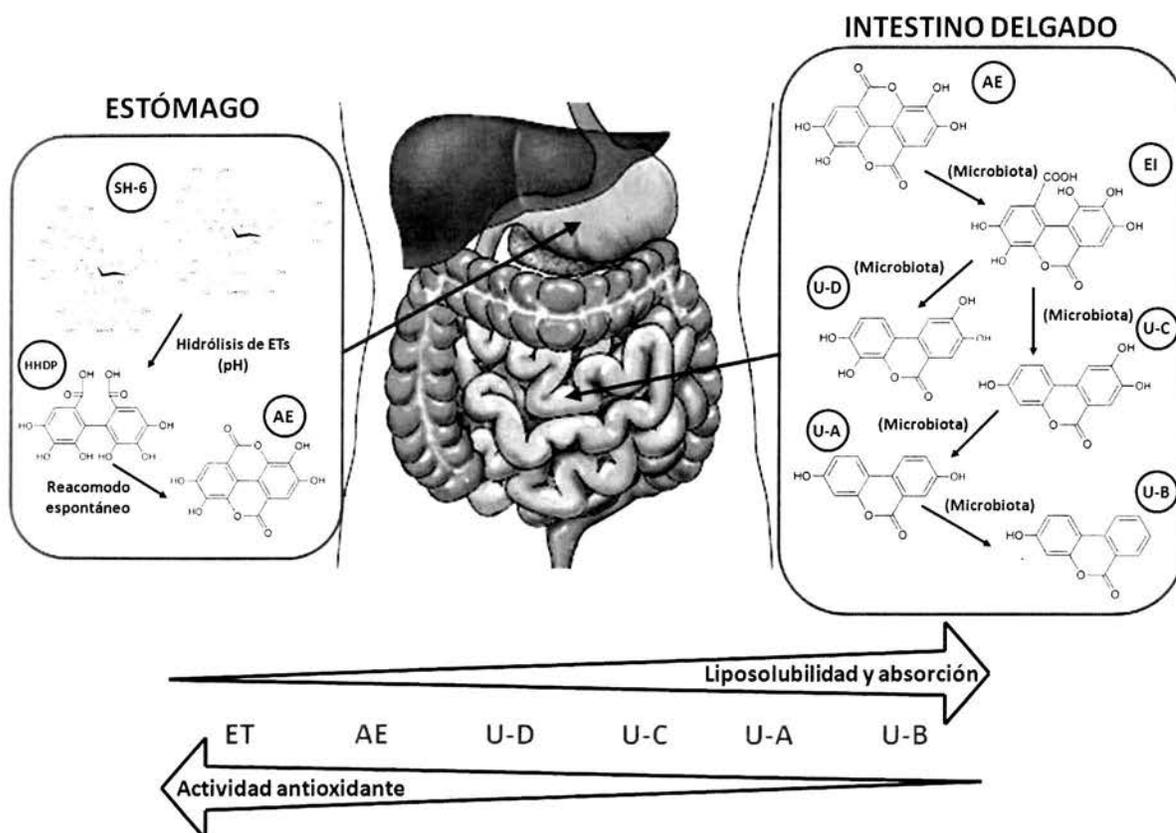


Figura 3. Biodisponibilidad de ETs, ácido elágico y los metabolitos generados por la microbiota. SH-6= sanguína H-6; AE= ácido elágico; HHDP= ácido hexahidroxi-difenólico; EI= estructura intermedia; U-A, U-B, U-C y U-D= urolitinas A, B, C y D.

González-Barrio *et al.* (2011) sugieren que la microbiota involucrada en el metabolismo de los ETs produce dehidroxilasas y descarboxilasas para remover grupos hidroxilos

específicos del ácido elágico. De esta forma, la flora intestinal metaboliza el AE secuencialmente para producir los metabolitos tetrahidroxi- (urolitina D), trihidroxi- (urolitina C), dihidroxi- (urolitina A) y monohidroxi- (urolitina B) dibenzopirán-6-ona, los cuales son absorbidos preferiblemente cuando su liposolubilidad aumenta (ver Figura 3).

3.2.2 Fuentes de elagitaninos en la dieta

- Principales fuentes de elagitaninos en la dieta

Los ETs están presentes en muchas familias de plantas, se encuentran en árboles (roble, castaño), frutas y nueces (Koponen *et al.*, 2007; Bakkalbaşı *et al.*, 2009). Se ha encontrado que altas concentraciones de ETs se localizan principalmente en la cáscara o corteza y semillas de las frutas, aunque también, se pueden encontrar en el receptáculo, y sólo en algunas se encuentran en la parte pulposa (Hager *et al.*, 2008b; Arranz *et al.*, 2009; Bakkalbaşı *et al.*, 2009). Dentro de las frutas, los ETs están de forma abundante en los frutos tipo baya (fresa, mora, frambuesa); estos frutos son ampliamente consumidos en forma fresca, así como en productos alimenticios como jugos, conservas, jaleas, mermeladas, vinos, yogurts y helados. La sanguína H-6 (se compone de cuatro HHDP, dos unidades galoil y dos glucósidos) es el principal elagitanino en las bayas y sus productos (Bakkalbaşı *et al.*, 2009). Sin embargo, los ETs también se encuentran en la granada real, uva muscadina, nuez de nogal y vino añejado. La presencia de estos compuestos en el vino se debe a que una importante cantidad de polifenoles se extraen de la madera de roble de los barriles, que entra en contacto con el vino durante la etapa de añejamiento (Alañón *et al.*, 2011).

- Localización en la matriz de alimentos

Los elagitaninos pueden estar presentes de diferentes formas, en la microestructura de los alimentos, como se muestra en la Figura 4. En cuanto a la localización de estos compuestos en los alimentos se pueden clasificar básicamente en las siguientes categorías:

1. Compuestos de bajo peso molecular, que están libres y no tienen interacciones químicas o físicas con otras macromoléculas (Figura 4.a).
2. Compuestos que están físicamente atrapados dentro de diferentes estructuras celulares (Figura 4.b).

3. Compuestos de bajo peso molecular, los cuales están químicamente unidos a otras macromoléculas (Figura 4.c).
4. Compuestos insolubles (usualmente de alto peso molecular) (Figura 4.d).

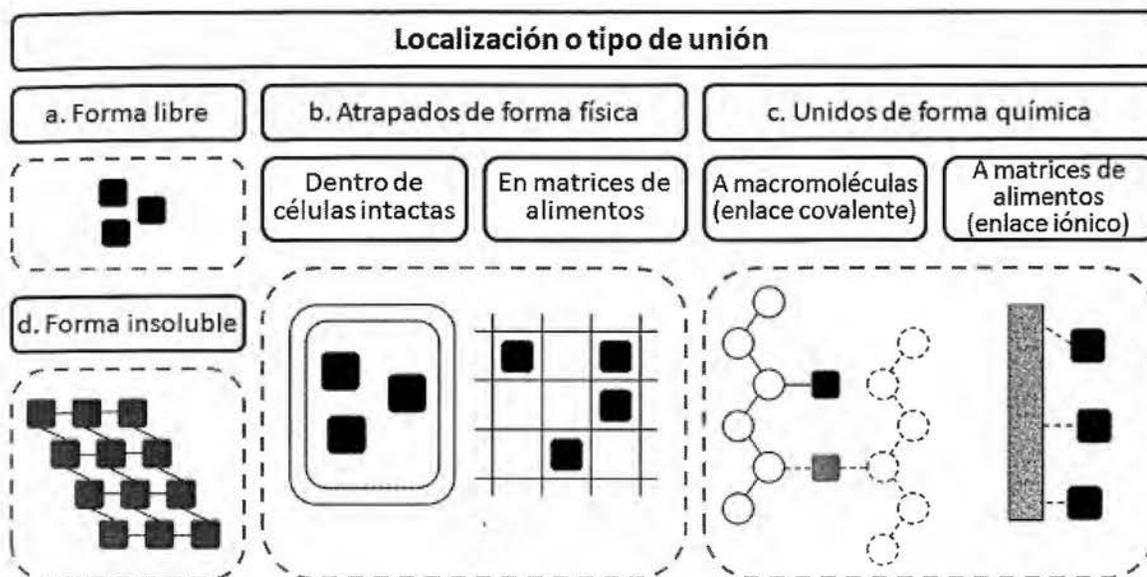


Figura 4. Posibles formas y localizaciones de elagitaninos en la microestructura de los alimentos (adaptado de Gökmen *et al.*, 2009).

3.2.3 Elagitaninos en mora

En la mora, los ETs se encuentran predominantemente en las semillas (Hager *et al.*, 2010). Las moras o zarzamoras contienen una mezcla compleja de elagitaninos que varían en peso molecular desde $302,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ácido elágico) hasta $3738,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (lambertianina D) (Hager *et al.*, 2008b; Gasperotti *et al.*, 2010). Según Mertz *et al.* (2007), en la mora (*Rubus adenotrichos* y *Rubus glaucus*), la sanguína H-6 y la lambertianina C (se compone de seis HHDP, tres unidades galoil y tres glucósidos) son los principales ETs. La lambertianina C es uno de los compuestos de alta masa indentificados en la mora, cuyo peso molecular es de $2804,2 \text{ Da}$; por otra parte la sanguína H-6 tiene un peso de $1870,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Mertz *et al.* (2007) encontraron en *R. adenotrichos* y *R. glaucus* un contenido de lambertianina C de

598 y 520 mg·100 g⁻¹ BS, respectivamente; asimismo, encontraron que la concentración de sanguína H-6 era de 420 y 2450 mg·100 g⁻¹ BS, respectivamente. Las estructuras de estos compuestos se muestran en las Figuras 5 y 6.

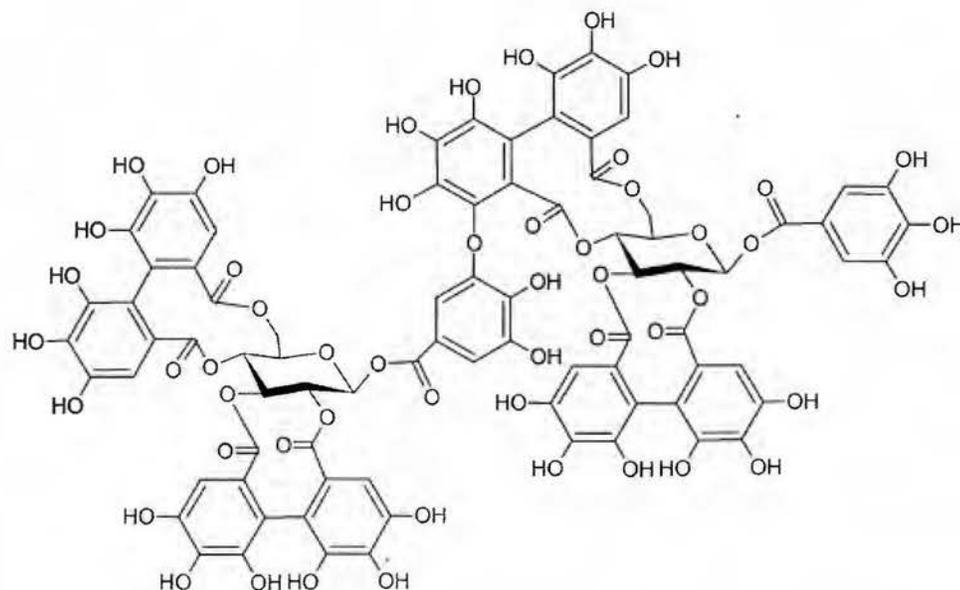


Figura 5. Estructura química de la sanguína H-6 (PM= 1870,2 g·mol⁻¹).

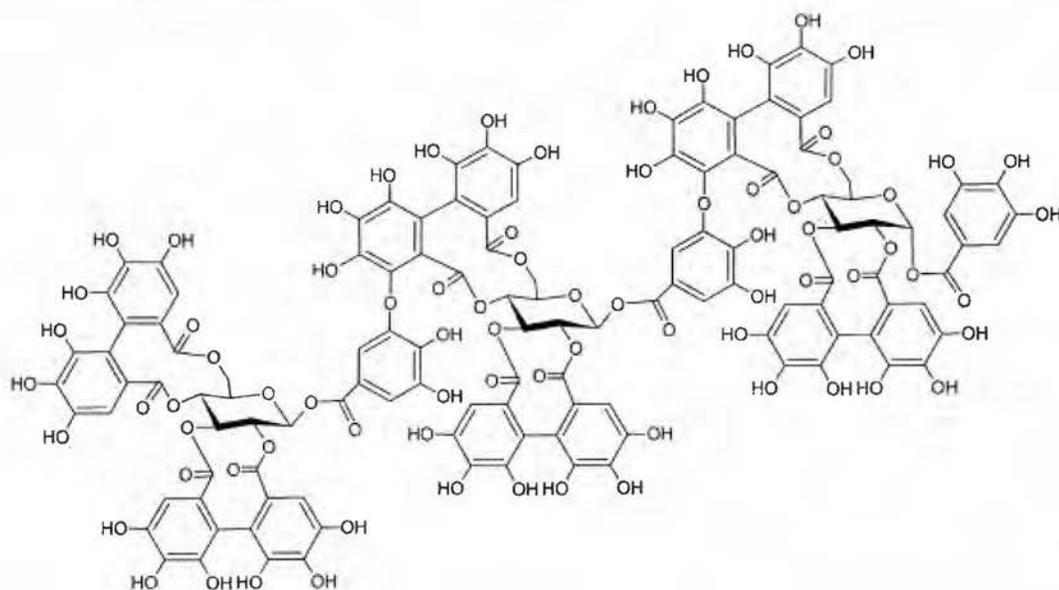


Figura 6. Estructura química de la lambertianina C (PM= 2804,2 g·mol⁻¹).

3.2.4 Propiedades con efectos beneficiosos para la salud

Al igual que otros polifenoles, los ETs, el AE y sus metabolitos derivados, poseen una amplia gama de actividades biológicas con efectos beneficiosos para la salud humana. Estos compuestos tienen funciones antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antiaterogénicas, entre otras.

- *Actividad antioxidante*

La capacidad antioxidante de los ETs, AE y las urolitinas está directamente correlacionada con su grado de hidroxilación y disminuye con la presencia de fracciones de azúcares (Landete, 2011). Se podría decir, que la capacidad antioxidante disminuye al aumentar la liposolubilidad del compuesto derivado de los ETs (Figura 3, sección 3.2.1). Se ha encontrado que extractos de semilla de mora (*Rubus fruticosus* L.) y compuestos polifenólicos, aislados a partir de estas semillas (lambertianina C, sanguína H-6 y ácido 4- α -L-arabinofuranosilelágico), mostraron un efecto protector sobre linfocitos de ADN de humanos debido a su capacidad antióxidante (Gođevac *et al.*, 2011).

- *Actividad anticancerígena*

Durante la ingesta de alimentos ricos en ETs, estos compuestos se hidrolizan y liberan AE; sin embargo, son de particular importancia en el colon los metabolitos microbianos como la urolitina A, la cual es formada por acción de la microbiota intestinal. Estudios revelan que se da una alta disposición de urolitina en tejidos de la próstata, intestinos y del colon de ratones (Larrosa *et al.*, 2006; Seeram *et al.*, 2007). Sharma *et al.* (2010) encontraron que extractos de frutas (fresa, *Fragaria anassa*; mora india, *Eugenia jambolana*; granada real, *Punica granatum*), ricos en ETs, inhibieron la vía de señalización de Wnt (red de proteínas involucradas en la carcinogénesis del colon humano), lo que sugiere que alimentos ricos en ETs tienen un potencial contra el cáncer de colon y que las urolitinas son compuestos bioactivos importantes en el colon.

Seeram *et al.* (2006) evaluaron la habilidad de 6 extractos ricos en ETs, obtenidos de frutos tipo baya (frambuesa roja y negra, arándano azul y rojo, mora y fresa), para inhibir el crecimiento de varias líneas de células humanas causantes de tumores a nivel de próstata (LNCaP), seno (MCF-7), colon (HT-29, HCT 116) y boca (KB, CAL-27). Estos

autores observaron que, al aumentar la concentración de los extractos se aumentaba la inhibición de la proliferación celular en todas las líneas de células. Además, se ha encontrado que extractos de frutos tipo baya, especialmente de la familia *Rubus* (frambuesa, *Rubus idaeus*; zarzamora ártica, *Rubus articus*; mora de pantanos, *Rubus chamaemorus*), y también fresa y arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea*), fueron efectivos en prevenir la proliferación *in vitro* de células humanas causantes de cáncer cervical y de colon (McDougall *et al.*, 2008).

- *Actividad antiinflamatoria*

El AE tiene propiedades antiinflamatorias, debido a su regulación sobre mediadores inflamatorios como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2), el factor- α de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), esto debido a que causó una represión de la NF- κ B (promotor de la génesis tumoral que regula las citocinas proinflamatorias, quimiocinas, proteínas antiapoptóticas y factores de crecimiento) (Umesalma & Sudhandiran, 2010). Por otra parte, la U-A disminuyó los marcadores inflamatorios en la mucosa colónica de ratones modelo con colitis, incluyendo la iNOS, la COX-2, la prostaglandina E sintetasa y la prostaglandina E2 (Larrosa *et al.*, 2010).

- *Actividad antiaterogénica*

Aviram *et al.* (2008) analizaron las propiedades antiaterogénicas *in vivo* (ratones de laboratorio) e *in vitro* (cultivos de macrófagos y lipoproteínas), así como los mecanismos de acción del jugo de granada real y de extractos aislados de todas las partes de esta fruta: cáscara, semillas, flores y arilos (cobertura carnosa de las semillas de ciertas frutas). Estos autores reportaron que todos los extractos presentaron propiedades antioxidantes *in vitro*. Además, después del consumo del jugo de granada, y de los extractos de cáscara, arilos y flores, se presentó una disminución significativa en el área de la lesión aterosclerótica en un 44 %, 39 %, 6 % y 70 %, respectivamente, en los ratones con deficiencia de apolipoproteína (esta deficiencia hace que los ratones desarrollen lesiones ateroscleróticas que se asemejan a las de humanos). El mayor efecto, obtenido del jugo de granada real, podría ser atribuido a los taninos hidrolizados (incluyendo elagitaninos oligoméricos, y otros compuestos fenólicos como punicalagina, punicalina, ácido elágico y ácido gálico) y a los azúcares complejos (Aviram *et al.*, 2008).

El consumo de jugo de mora (*Rubus adenotrichos*), con un alto contenido de antocianinas y elagitaninos, evidenció un efecto significativo sobre algunos indicadores de salud específicos en sujetos sanos, los cuales fueron sometidos a una dieta rica en carbohidratos y grasas (> 4000 kcal/día) (Rojas *et al.*, 2009). Este estudio arrojó que, después de la dieta de reto, el colesterol total, colesterol-LDL/HDL no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre el grupo que consumió jugo de mora y el que consumió una bebida baja en antioxidantes (grupo control). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas para los triglicéridos ($p = 0,003$) y para las actividades enzimáticas superóxido dismutasa ($p = 0,001$) y catalasa ($p = 0,013$) -actividades enzimáticas indicadoras de estrés oxidativo-. Todos los valores fueron menores en el grupo que consumió jugo de mora, en un 20 %, 27 % y 36 %, respectivamente (Rojas *et al.*, 2009). Un resumen de las propiedades de los ETs con efectos beneficiosos para la salud se observan en el Cuadro II.

Cuadro II. Efectos biológicos beneficiosos para la salud de los ETs, AE y sus metabolitos derivados.

Propiedades beneficiosas	Fuente	Autor
Actividad antioxidante	Granada real	Seeram <i>et al.</i> (2005); Mertens-Talcott <i>et al.</i> (2006); Heber <i>et al.</i> (2007); Bianloska <i>et al.</i> (2009a)
	Frambuesa	Zafrilla <i>et al.</i> (2001); Mullen <i>et al.</i> (2002)
Actividad antiaterogénica	Granada real	Aviram <i>et al.</i> (2008); Rosenblat <i>et al.</i> (2006)
	Mora	Rojas <i>et al.</i> (2009)
Actividad anticancerígena	Granada real	Malik <i>et al.</i> (2005); Adams <i>et al.</i> (2006); Larrosa <i>et al.</i> (2006); Seeram <i>et al.</i> (2007); Heber (2008); Dai <i>et al.</i> (2010)
	Frambuesa, arándano, mora y fresa	Seeram <i>et al.</i> (2006); McDougall <i>et al.</i> (2008)
	Fresa, mora india, granada real	Sharma <i>et al.</i> (2010)
Actividad antiinflamatoria	<i>Geranium thunbergii</i>	Ishimoto <i>et al.</i> (2011)
	Granada real	Larrosa <i>et al.</i> (2010)
	Ácido elágico	Umesalma & Sudhandiran (2010)
Actividad antimicrobiana	Granada real	Reddy <i>et al.</i> (2007); Bialonska <i>et al.</i> (2009a)
	<i>Citrus ladanifer</i> , <i>Citrus popilifolius</i>	Barrajón-Catalán <i>et al.</i> (2010)
Efecto probiótico	Granada real	Bialonska <i>et al.</i> (2009b); Bialonska <i>et al.</i> (2010)
Estimulación de biosíntesis de colágeno	<i>Phyllanthus muellerianus</i>	Agyare <i>et al.</i> (2011)
Efecto antimalaria	Granada real	Dell'Agli <i>et al.</i> (2010)
Efecto antiviral	Roble	Vilhelmova <i>et al.</i> (2011a); Vilhelmova <i>et al.</i> (2011b)

3.3 Residuo de mora como subproducto de gran interés

Durante el procesamiento de frutas, para la obtención de jugos, purés y vinos, la parte comestible o “carnosa” del fruto es la que se extrae, y se genera un subproducto importante en las diferentes etapas del proceso. Este subproducto es un residuo formado principalmente por semillas y componentes gruesos insolubles provenientes de la cáscara del fruto, los cuales son ricos en polisacáridos parietales (pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina). Proporciones, considerablemente elevadas, de subproductos surgen del procesamiento de frutas tropicales y subtropicales. Debido al aumento de la producción, la eliminación de estos residuos representa un problema en crecimiento, ya que el material vegetal por lo general es propenso al deterioro microbiológico, lo que limita su explotación. Por otro lado, los costos de secado, almacenamiento y transporte de estos subproductos son factores económicos limitantes (Schieber *et al.*, 2001). De esta forma, los residuos agroindustriales se utilizan a menudo como alimento animal o como fertilizante.

El problema del manejo, tratamiento o eliminación de los subproductos se ve agravado por restricciones legales. Según la Ley para Gestión Integral de Residuos (Nº 15.897), emitida en el 2010 por la Asamblea Legislativa de Costa Rica, se debe fomentar el desarrollo de mercados de subproductos, materiales valorizables y productos reciclados, reciclables y biodegradables, entre otros; en forma tal, que se generen nuevas fuentes de empleo y emprendimientos, se aumente la competitividad y se aprovechen los recursos para incrementar el valor agregado a la producción nacional (Asamblea Legislativa de Costa Rica, 2010). Esto implica una corresponsabilidad social que requiere la participación conjunta de todos los productores, importadores, distribuidores, consumidores y gestores de residuos, tanto públicos como privados. Por lo tanto, la utilización eficiente, económica y amigable con el ambiente de estos materiales es cada vez más importante.

Entre las frutas, vegetales y diferentes hierbas, los residuos agroindustriales son fuentes atractivas de antioxidantes naturales (Moure *et al.*, 2001; Schieber *et al.*, 2001; Ignat *et al.*, 2011). Estos subproductos, que quedan después del procesamiento de frutas y vegetales, todavía contienen un gran cantidad de compuestos fenólicos. Diversos estudios ya se han realizado para evaluar estos subproductos como fuentes potenciales de antioxidantes. El contenido de compuestos polifenólicos de varios subproductos agroindustriales se ilustra en el Cuadro III.

Cuadro III. Compuestos fenólicos presentes en diferentes subproductos agroindustriales.

Subproducto	Proceso industrial	Compuestos fenólicos	Niveles	Referencia
Residuo grueso de mora	Elaboración de pulpa de mora	Lambertianina C	62,3 mg AE/100 BH	Gancel <i>et al.</i> (2011)
		Sanguína H-6	49,1 mg AE/100 BH	
		Cianidina-3-glucósido	41,3 mg C3G/100 BH	
		Cianidina-3-malonilglucósido	3,49 mg C3G/100 g BH	
Residuo de cáscara de uva	Elaboración de vino	Polifenoles totales	11,6±1,0 - 26,7±1,8 mg AGE/g BS	Deng <i>et al.</i> (2011)
		Antocianinas monoméricas	0,29±0,01 - 1,42±0,14 mg M3G/g BS	
		Flavonoles totales	31,0±1,7 - 61,2±5,0 mg CTE/g BS	
Semilla de uva	Elaboración de vino	Proantocianidinas extraíbles	8,0±1,3 - 24,1±3,8 mg/g BS	Karvela <i>et al.</i> (2009)
		Polifenoles totales	9534±1248 - 14679±1888 mg AGE/100 g BS	
		Flavonoles totales	4134±839 - 5679±665 mg CTE/100 g BS	
Cáscara de granada real	Elaboración de jugo de granada real	Proantocianidinas	303,5±47,0 - 604,5±55,3 mg CE/100 g BS	Çam & Hisil (2010)
		Polifenoles totales	264,3±14,7mg ATE/g BS	
		Flavonoides totales	13,0±0,3 mg CTE/g BS	
Cáscara de manzana	Elaboración de puré y conservas de manzana	Taninos hidrolizables	262,7±11,5mg ATE/g BS	Wolfe & Liu (2003)
		Taninos condensados	9,5±0,9 mg CTE/g BS	
		Polifenoles totales	3342±12 mg AGE/100 g BS	
Residuo de manzana	Elaboración de cidra	Flavonoides	2299±52 mg CTE/100 g BS	Diñeiro García <i>et al.</i> (2009)
		Antocianinas	169,7±1,6 mg C3G/100 g BS	
		Polifenoles totales	1045,9 - 4418,9 mg AGE/ L BS	
		Ácido clorogénico	96,1 - 602,4 mg/ kg BS	
Cáscara de limón Yen Ben Cáscara de limón Meyer	Elaboración de jugos de cítricos	Hiperina	112,6 - 232,0 mg QE/ kg BS	Li <i>et al.</i> (2006)
		Epicatequina	167,5 mg/kg BS	
		Procianidina B2	92,1 - 287,1 mg EPE/ kg BS	
		Polifenoles totales	74,34±2,72 - 113,11±0,76 mg AGE/100 g BH	
Residuos sólidos de cebolla	Procesamiento de cebolla en un centro de comidas	Polifenoles totales	34,30±1,12 - 52,89±0,95 mg AGE/100 g BH	Kiassos <i>et al.</i> (2009)
Cáscara de kiwi	Elaboración de jugo de kiwi	Polifenoles totales	9342±1435mg AGE/100 g BS	Sun-Waterhouse <i>et al.</i> (2009)
Residuo de guayaba	Elaboración de puré de guayaba	Polifenoles totales	0,55±0,04 - 1,54±0,15 mg CTE/g BH	Kong <i>et al.</i> (2010)
		Flavonoides totales	324,84±33,49 mg AGE/ 100 g BH	
		Proantocianidinas	316,15±12,77 mg RE/ 100 g BH	
Pulpa de café	Elaboración de café	Ácido cafeoilquinico	20,1±0,7 mg/g BS	Ramirez-Coronel <i>et al.</i> (2004)
		Flavonoles	11,8±0,01 mg/g BS	
		Antocianidinas	0,6±0,02 mg/g BS	
			0,4±0,22 mg/g BS	

AE= ácido elágico. AGE= ácido gálico equivalentes. ATE= ácido tánico equivalente. BS= base seca. BH= base húmeda. C3G= cianidina-3-glucósido. CE= cianidina equivalente. CTE= catequina equivalente. EPE= epicatequina equivalente. M3G= malvidina-3-glucósido. QE= quercetina equivalente. RE= rutina equivalente.

Una amplia gama de productos alimentarios y no alimentarios pueden ser recuperados del residuo de estas frutas. Así pues, la utilización eficiente de estos materiales es cada vez más importante, lo que conlleva beneficios económicos y una disminución en el impacto ambiental (Zhao, 2007). Por esta razón, es de gran importancia buscar alternativas innovadoras para aprovechar el residuo generado durante el procesamiento de mora, subproducto que retiene un alto contenido de compuestos polifenólicos.

3.3.1 Extracción de antocianinas

Una de las aplicaciones más importantes del procesamiento de residuos de frutos tipo baya, es la extracción y recuperación de pigmentos y compuestos polifenólicos. Las antocianinas (ATCs) son pigmentos naturales que pertenecen a la familia de los flavonoides y están ampliamente distribuidos en frutas y especialmente en las bayas (Talavéra *et al.*, 2005; Wu & Prior, 2005; Cisse *et al.*, 2009). Son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares, responsables de colores naranja, rosa, rojo, violeta y azul en las flores y frutos de algunas plantas. Estos compuestos no son tóxicos y son de fácil incorporación en un medio acuoso, lo que los hace de interés como colorantes hidrosolubles (Castañeda-Obando *et al.*, 2009).

Las ATCs son hidrosolubles y, en la mora y en otras bayas, exhiben un intenso color rojo solo en un rango limitado de pH entre 1 y 3. Estos compuestos son permitidos como colorantes naturales en alimentos, tales como bebidas, mermeladas y jaleas, helados, pasteles, y productos de confitería (Zhao, 2007). Además, están implicadas en muchas actividades biológicas que pueden reducir el riesgo de enfermedad coronaria, inhibir la agregación plaquetaria, y prevenir la disfunción endotelial y la insuficiencia vascular. Además, los extractos de antocianinas provenientes de varias especies de mora podrían ejercer actividades anti cancerígenas *in vitro*, reducir la inflamación y también modular la respuesta inmune (Dai *et al.*, 2009).

La extracción con solventes orgánicos ha sido el método más común para extracción de diversos compuestos, incluidos flavonoides. Los compuestos fenólicos son extraídos a partir de frutas secadas, liofilizadas o molidas, o por prensado de las frutas frescas con la posterior extracción con solventes (Castañeda-Obando *et al.*, 2009). Las antocianinas son moléculas polares, por lo que los solventes comunes más utilizados en las extracciones son

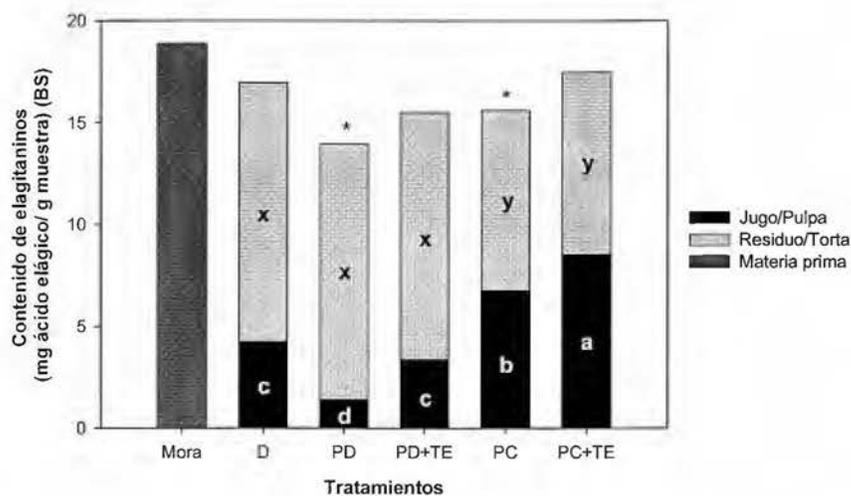
mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona. Estas metodologías implican la co-extracción de otros compuestos no fenólicos como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, por lo que se requiere un proceso posterior de purificación (por ejemplo, extracción en fase sólida). Se utilizan metanol acidificado o etanol como extractantes, siendo el metanol el más eficiente; sin embargo, el etanol es preferido dada la toxicidad del metanol (Kapasakalidis *et al.*, 2006).

3.3.2 Extracción de elagitaninos

El estudio realizado por Soto (2010) encontró que las antocianinas son extraídas en mayor porcentaje que los elagitaninos, durante la extracción de jugo de mora mediante diferentes tratamientos físicos y enzimáticos. Esto podría indicar que los elagitaninos están más asociados a la fibra de la mora. Por lo cual se deben buscar alternativas innovadoras para aprovechar el residuo generado durante la extracción de jugo de mora, el cual retiene un alto contenido de compuestos polifenólicos como se observa en la Figura 7.

También, se ha encontrado que la uva muscadina (*Vitis rotundifolia*) tiene un gran contenido de elagitaninos y ácido elágico tanto en las semillas como en la cáscara o piel del fruto (Bakkalbaşı *et al.*, 2009). El estudio realizado por Kapasakalidis *et al.* (2006) encontró que durante el procesamiento de jugo de grosella negra se liberan eficientemente las antocianinas al jugo; sin embargo, una cantidad considerable de polifenoles quedan retenidos o asociados a los polisacáridos parietales que están presentes en el residuo. La cáscara y semillas de la granada real (*Punica granatum* L.) son también una fuente rica de elagitaninos (principalmente punicalina), y en los jugos comerciales de esta fruta estos elagitaninos son extraídos de la cáscara o piel en cantidades significantes al jugo, esto debido a sus propiedades hidrofílicas (Seeram *et al.*, 2005; He *et al.*, 2010).

Los estudios realizados por Hager *et al.* (2010) y Gancel *et al.* (2011) encontraron que durante la elaboración de jugo de mora, gran porcentaje de elagitaninos quedan retenidos en la parte fibrosa y en las semillas, las cuales son removidas para obtener el jugo. Esto indica que el residuo de mora y principalmente las semillas constituyen una fuente importante de elagitaninos, por lo cual podrían resultar valiosas materias primas para aplicaciones alimentarias y nutraceuticas.



*Hay diferencias significativas con respecto a la materia prima (t-Student, $p < 0,05$). Datos son reportados como promedio ($n=3$). Para los jugos y pulpas, barras con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes, y para los residuos y tortas, barras con letras diferentes (x, y, z) son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 7. Balance de masas (base seca) del contenido de elagitaninos del jugo/pulpa de mora más el residuo/torta de mora, obtenidos de los diferentes tratamientos: D) Despulpado; PD) Prensado discontinuo; PD+TE) Prensado discontinuo + trat. enzimático previo; PC) Prensado continuo; PC+TE) Prensado continuo + trat. enzimático previo (Fuente: Soto, 2010).

3.4 Extracción de compuestos fenólicos

3.4.1 Extracción sólido-solvente

La extracción es un proceso de separación, ampliamente utilizado en la industria de alimentos para diversas aplicaciones, y puede ser un paso fundamental en el procesamiento de muchos productos alimenticios (ejemplo, azúcares, aceites comestibles, etc.). También, el proceso de extracción puede ser utilizado para la recuperación de compuestos activos o para la eliminación de componentes no deseados a partir de una materia prima; además, componentes importantes pueden ser separados de productos naturales con muchas aplicaciones para la industria alimentaria (aromas, antioxidantes, etc.) (Tzia, 2003).

Las técnicas clásicas de extracción sólido-solvente, para la obtención de compuestos nutraceuticos a partir de matrices vegetales, se basan en la elección del disolvente acoplado al uso de calor y/o agitación. Dentro de las técnicas clásicas de extracción sólido-solvente, para extraer estos compuestos, se encuentran la maceración, extracción Soxhlet y la hidrodestilación. La maceración es un método de extracción simple y barato, en el cual el sólido (materiales vegetales) se sumerge en un solvente (ejemplo, agua caliente) con el fin de causar una ruptura en la membrana celular y liberar los compuestos al solvente. El residuo sólido es después filtrado para separarlo de la fase líquida (solvente y extracto). Luego el extracto es generalmente separado del solvente por evaporación (Wang, 2011).

El objetivo de la extracción de compuestos fenólicos es concentrar estos antioxidantes obtenidos de las materias primas (principalmente frutas y vegetales), separarlos de otras sustancias orgánicas e inorgánicas para que el producto de la extracción pueda ser añadido a productos alimenticios o nutraceuticos en cantidades más pequeñas (Oreopoulou, 2003). Durante la extracción de compuestos fenólicos hay que estudiar y tomar en cuenta varios factores tales como la temperatura, el tiempo de extracción, y la proporción de solvente y sólido, además, de otros como agitación ultrasónica, remojo, pH y tipo de agitación mecánica. Sin embargo, los tres primeros son los que tienen la mayor influencia sobre las variables respuestas. La temperatura, el tiempo de extracción y la proporción o cantidad de solvente añadida son fácilmente aplicables, controlables y se pueden modificar, tanto a nivel de laboratorio como en la industria (Çam & Aaby, 2010).

3.4.2 Solvente

El solvente utilizado para la extracción es uno de los factores de mayor importancia para la recuperación de los compuestos antioxidantes de interés, además de la coextracción de sustancias no deseables, y para el rendimiento del proceso. En los procesos de extracción, a partir de matrices de alimentos, usualmente se utilizan solventes orgánicos. El agua ha sido utilizada en menor grado, principalmente para la extracción de antioxidantes de té y para la recuperación de aceites esenciales a través de destilación con vapor. Usualmente, el agua es usada en mezclas con alcoholes (Oreopoulou, 2003).

Antes de tomar una decisión final sobre la elección de un proceso de extracción se deben tomar en cuenta ciertos factores como aspectos del proceso de extracción en materia de

seguridad, efectos de los solventes sobre los operadores así como en el medio ambiente, límites residuales de los solventes utilizados, el reciclaje y la sostenibilidad económica. La extracción, con agua, de analitos orgánicos de matrices alimenticias tiene grandes ventajas. El agua, como solvente de extracción, es muy superior a los disolventes orgánicos en términos de medio ambiente y ventajas para la salud, accesibilidad y precio (Çam & Aaby, 2010). El contenido de agua en los extractos es muy importante, ya que los extractos necesitan ser procesados en una forma adecuada para su subsecuente aplicación y/o almacenamiento (Çam & Aaby, 2010). Cada cantidad de agua añadida resultaría en un incremento en costos de energía y carga de trabajo; por consiguiente, es importante realizar la extracción con la menor cantidad de agua posible.

Después del proceso de extracción con agua, los extractos pueden ser manejados con mayor facilidad que los extractos obtenidos por disolventes orgánicos, que requieren de un proceso adicional de evaporación para eliminar los disolventes orgánicos. La sencillez, aplicabilidad y el costo del procedimiento de extracción con agua sugieren su potencial uso en todas las áreas de gestión de los residuos de alimentos (Çam & Aaby, 2010).

Según Aguilera (2003), la selección del solvente debe basarse en varias propiedades:

1. Solubilidad del compuesto específico (o compuestos) en el solvente.
2. Recuperación, ya que el solvente se reutiliza en las posteriores extracciones. Si la destilación o evaporación es utilizada, el solvente no debería formar azeotropos y el calor latente de vaporización debe ser pequeño.
3. La tensión interfacial y viscosidad. El solvente debe ser capaz de cubrir y humectar la matriz sólida y su viscosidad debe ser lo suficientemente baja de modo que pueda fluir fácilmente. La humectabilidad es también importante si el solvente debe penetrar a través de los poros y capilares de la matriz.
4. Idealmente, el solvente debe ser no tóxico, estable, no reactivo, no inflamable y seguro para el medio ambiente, y también barato.

3.4.3 Tratamientos enzimáticos

Diversas investigaciones han demostrado la capacidad de los tratamientos enzimáticos para aumentar la extracción de jugo en frutas tipo baya, y también mejorar la liberación de compuestos fenólicos de las paredes celulares (Buchert *et al.*, 2005; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2008). Estudios realizados por Bagger-Jørgensen y Meyer (2004) indicaron que hay una correlación positiva entre el grado de degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular y el contenido de compuestos fenólicos liberados en jugo de grosella negra (*Ribes nigrum* L.). Borowska *et al.* (2009) encontraron que el mayor porcentaje de extracción de antocianinas, en jugo de aronia (*Aronia melanocarpa* E., “chokeberry”), se dio con la aplicación de un preparado enzimático comercial con un amplio espectro de actividad pectinolítica, además de actividades celulasa y hemicelulasa. Soto (2010) evaluó diferentes métodos físicos y enzimáticos para aumentar la extracción de compuestos antioxidantes en el jugo de mora, reportando que la aplicación de tratamientos enzimáticos permite obtener un mayor contenido de antocianinas y elagitaninos en el jugo de mora.

La eficacia de la extracción acoplada a un tratamiento enzimático, depende del tipo de tejido o materiales de la planta y del tipo de enzimas utilizadas. Las cáscaras de frutas como manzana, frutos tipo baya y cítricos, el té y el aceite de oliva contienen muchos compuestos fenólicos. Li *et al.* (2006) encontraron que el proceso de extracción con agua acoplado a un tratamiento enzimático con celulasas podía recuperar el 65,5 % de los compuestos fenólicos de las cáscaras de los cítricos, lo cual constituía aproximadamente el 87,9 % del rendimiento obtenido con la extracción tradicional sólido-solvente, utilizando solventes orgánicos. Los principales parámetros que afectan la extracción de compuestos fenólicos incluyen el tipo de estructura o especie del tejido vegetal, la temperatura de extracción, el tipo de enzimas y la concentración de estas (Li *et al.*, 2006).

3.4.4 Optimización mediante la metodología de superficie de respuesta

La extracción es aplicada para recuperar o eliminar componentes y en consecuencia el producto de interés puede ser el material extraído o el extracto. El diseño y la optimización de un proceso de extracción implica el conocimiento y el rol de los parámetros tecnológicos del proceso (Tzia, 2003). La metodología de superficie de respuesta permite optimizar una

variable respuesta que está influenciada por diversas variables o parámetros independientes, e incluso analizar los efectos de interacción entre ellos, representando así el efecto neto de los parámetros evaluados sobre las respuestas de interés. Esto permite determinar, a partir de pocas pruebas experimentales, los niveles de los parámetros diseñados en los cuales la respuesta alcanza el óptimo, el cual será función de los parámetros del diseño (Gacula & Singh, 1984; Raissi & Farsani, 2009; Çam & Aaby, 2010). Esta respuesta óptima puede ser maximizada o minimizada dependiendo de su naturaleza (Gacula & Singh, 1984). Esta metodología puede ser utilizada para modelar u optimizar cualquier variable respuesta que es afectada por los niveles de uno o más factores cuantitativos.

La respuesta tiene que ser una variable cuantitativa continua (por ejemplo, rendimiento, pureza, costo, porcentaje de extracción), y la respuesta promedio es una función desconocida de los niveles de “ k ” factores (por ejemplo, temperatura, presión), y estos niveles tienen que ser aplicables y controlables con precisión. Cuando la respuesta promedio es trazada en función de la combinación de los tratamientos, se genera una superficie en $k+1$ dimensiones, llamada la *superficie de respuesta* (Dean & Voss, 1999).

- *Diseños centrales compuestos (DCCs)*

Estos diseños consisten de un diseño estándar de primer orden con n_f puntos factoriales ortogonales y n_o puntos centrales, aumentado por n_a puntos axiales. Por convención, los niveles de los distintos factores se codifican, así los puntos factoriales tienen los niveles codificados con ± 1 para cada factor (Montgomery, 1992; Dean & Voss, 1999). Los puntos axiales están localizados a una distancia específica α desde el centro del diseño en cada dirección de cada eje definido por los niveles codificados de los factores (Montgomery, 1992). En la Figura 8 se muestran dos diseños centrales compuestos para $k= 2$ y $k= 3$ factores.

Un diseño central compuesto se puede construir fácilmente a partir de un diseño estándar de primer orden, añadiendo puntos axiales y, posiblemente, algunos puntos factoriales y centrales extras. Los puntos axiales, como ya se mencionó, son localizados a una distancia α desde el centro del diseño, y la escogencia de esta distancia α depende de las propiedades requeridas del diseño; frecuentemente se utiliza $\alpha = (n_f)^{1/4}$ (Dean & Voss, 1999).

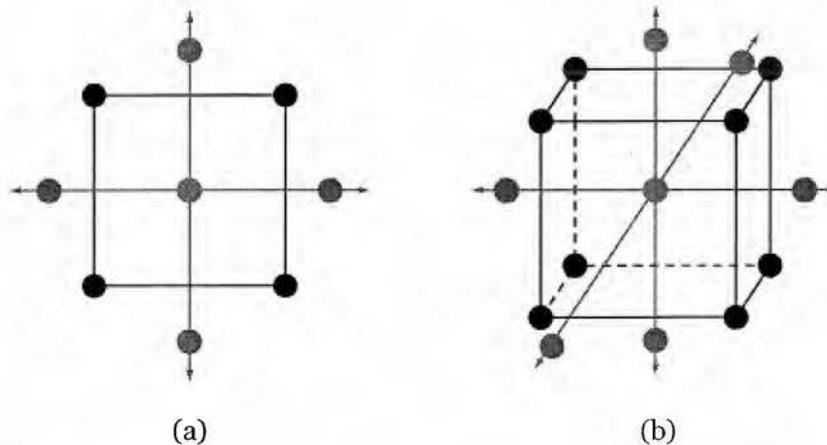


Figura 8. Diseños centrales compuestos para a) $k=2$ factores y b) $k=3$ factores.

- *Características y propiedades de los diseños centrales compuestos*

El ajuste y análisis de superficies de respuesta se facilita mucho al elegir el diseño experimental apropiado. Cuando se selecciona un diseño de superficie de respuesta, algunas de las características deseables son las siguientes:

1. Proporciona una distribución razonable de los puntos de datos en toda la región de interés.
2. Permite la adecuación del modelo, incluyendo la falta de ajuste (*lack of fit*), para ser investigado.
3. Permite que los experimentos se puedan realizar en bloques.
4. Permite diseños de orden superior que se construirán de forma secuencial.
5. Proporciona una estimación interna del error.
6. No requiere un gran número de ensayos.
7. No requiere que las variables independientes tengan muchos niveles.
8. Asegura la simplicidad del cálculo de los parámetros del modelo.

En los DCCs, las propiedades -tales como rotabilidad, formación de bloques ortogonales, y la ortogonalidad- se pueden controlar por una elección adecuada del número de puntos centrales n_0 y la distancia α de los puntos axiales al punto central del diseño. Además, de la rotabilidad, formación de bloques ortogonales y la ortogonalidad, un diseño debería incluir

los suficientes puntos centrales para proporcionar una sensibilidad razonable a la prueba de falta de ajuste (*lack of fit*) (Montgomery, 1992).

3.5 Fraccionamiento y concentración mediante tecnologías de membranas

3.5.1 Tecnologías de membranas

Las tecnologías de membranas pueden ser empleadas para concentrar, fraccionar o purificar fluidos. En estos procesos se da una alimentación del producto -generalmente líquido-, el cual entra en contacto con la membrana gracias a distintas fuerzas motrices (diferencial de presión, potencial eléctrico y gradiente de concentración, entre otras); ciertos componentes no logran atravesar la membrana (retenido), permitiendo el paso de otras sustancias, principalmente solubles en agua (permeado). Esto se debe al tamaño de partícula de los solutos del producto, además, de su afinidad por la membrana (Girard & Fukumoto, 2000; Baruah *et al.*, 2006).

Las principales tecnologías de membranas son: ósmosis inversa (OI), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF), microfiltración (MF), diálisis, electrodiálisis (ED) y pervaporación, las cuales cubren un amplio rango de partículas que pueden separar (Cheryan, 1998). Más recientemente las investigaciones en torno al tema de concentración de líquidos sensibles al calor se refieren a dos nuevas y emergentes tecnologías que son: la destilación membranaria y la evaporación osmótica (Vaillant *et al.*, 2005).

Las tecnologías de membranas son relativamente eficientes en energía porque no involucran cambios de fase para la remoción de agua. Estos procesos se realizan a bajas temperaturas (4 a 50°C), minimizando los daños térmicos del producto (Girard & Fukumoto, 2000). En comparación con los procesos tradicionales de evaporación, mientras éstos requieren invertir 2257 kJ de energía para extraer un kilogramo de agua (1 atm, 100 °C), un proceso membranario requiere aproximadamente 90 kJ de energía (Kumar, 2007). El uso de las tecnologías de membranas requiere solo pequeñas cantidades de energía eléctrica para las bombas y pequeñas cantidades de vapor para la calefacción de soluciones de limpieza, de manera que incluso la OI, que es el más intensivo en energía con

respecto a los procesos de membrana, ofrece ventajas económicas. Además, a diferencia de la mayoría de los procesos de separación, que requieren infraestructuras más costosas, los sistemas de membrana son relativamente compactos y pueden ser a menudo alojados en edificios ya existentes (Marriott & Sorensen, 2003).

El fraccionamiento, la purificación y concentración de los compuestos polifenólicos para su uso en la industria de alimentos ha sido de gran interés no solo por su importancia en cuanto a los beneficios para la salud, sino también por su interés económico (Shi *et al.*, 2005). En un típico proceso de recuperación de polifenoles, los disolventes orgánicos son utilizados para la extracción de los componentes de interés a partir del material vegetal. Posteriormente, se aplica una etapa de tamizado o centrifugación para separar los sólidos insolubles, la MF o UF es aplicada para retener grandes moléculas tales como proteínas y polipéptidos, y otras impurezas. Luego al permeado obtenido del proceso de MF o UF, que contiene los polifenoles, se le aplica OI, NF o UF fina para concentrar y fraccionar este permeado y facilitar la remoción de los solventes orgánicos como se muestra en la Figura 9.

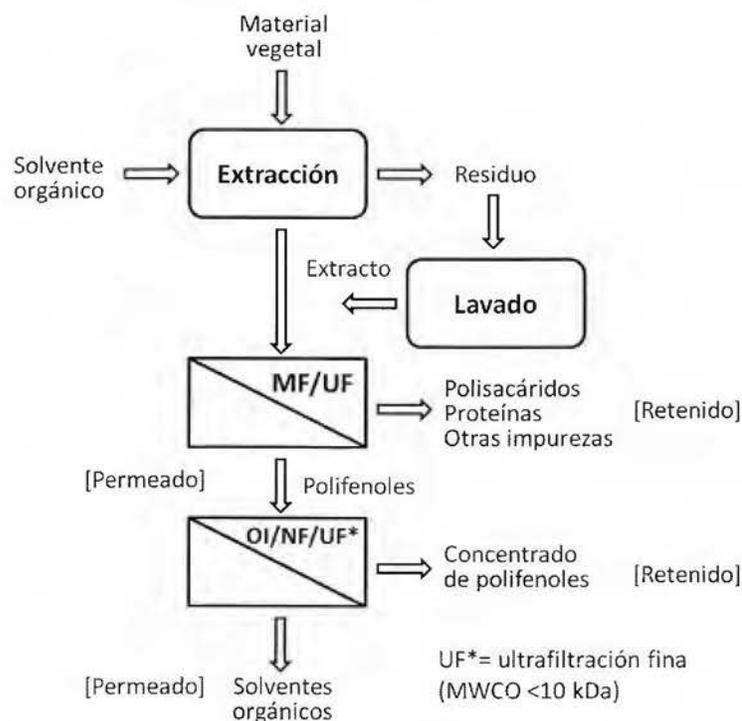


Figura 9. Esquema de proceso de membranas para obtener extractos de polifenoles (MF, microfiltración; UF, ultrafiltración; NF, nanofiltración; OI, ósmosis inversa) (adaptado de Akin *et al.*, 2012).

3.5.2 Filtración tangencial

Hay dos métodos posibles de operación en los procesos de filtración: el proceso frontal de membranas y el proceso tangencial de membranas (ver Figura 10). El método más simple utilizado es el proceso frontal, donde el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana y es forzado a atravesar la misma, lo que causa que las partículas retenidas se acumulen y formen un tipo de torta o capa en la superficie de la membrana (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000). El espesor de la torta se incrementa con el tiempo de operación, provocando un descenso en la tasa de filtración. Sin embargo, para reducir este fenómeno generalmente se utiliza la filtración tangencial, en donde el flujo de alimentación es paralelo a la superficie de la membrana (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000). Según Dobón & Bagger-Jørgensen (2000) este flujo tangencial a la superficie de la membrana presenta una acción de arrastre que reduce la formación de un depósito de solutos sobre la membrana (conocido como torta), lo que permite una mayor filtración, aumentando el rendimiento del proceso.

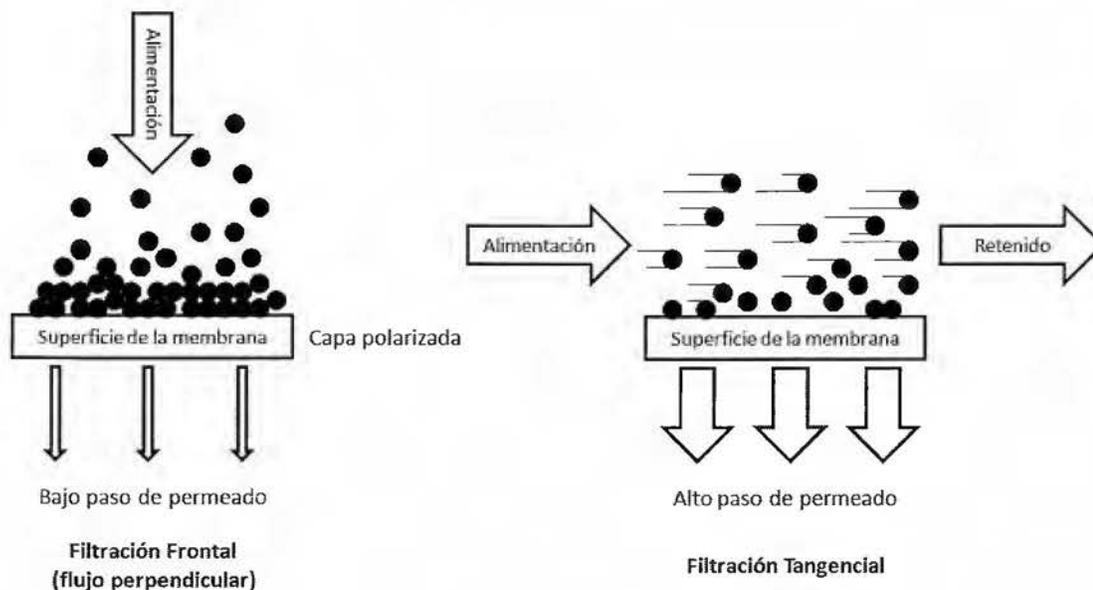


Figura 10. Comparación entre la filtración frontal y la filtración tangencial (adaptado de McLellan & Padilla-Zakour, 2005).

3.5.3 Microfiltración (MF)

La microfiltración es la tecnología de filtración por membranas que se utiliza para separar partículas más grandes o gruesas, comparada con las otras tecnologías de membranas, y se utiliza en muchos casos como operación previa a la UF, NF y OI, entre otras. Entre sus aplicaciones se encuentra la separación de partículas suspendidas en líquidos, por ejemplo moléculas grandes (polisacáridos, glóbulos de grasa), y microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), por lo que su uso principal es para la esterilización de agua y bebidas (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000; Maroulis & Saravacos, 2003; Pabby *et al.*, 2009). Las membranas de MF son clasificadas por el diámetro de poro o de corte, que se refiere al diámetro de las partículas más pequeñas que son retenidas por la membrana; típicamente, el rango de tamaño es de 0,1 a 10 μm . La MF requiere presiones de operación de 10-50 psi (0,7-3,5 bar) (Mannapperuma, 1997).

3.5.4 Ultrafiltración (UF)

La ultrafiltración es un proceso que involucra la separación de macromoléculas y suspensiones coloidales como proteínas y almidones. Es muy utilizada en el fraccionamiento de la leche y el suero, y en el fraccionamiento de proteína (Cheryan, 1998). Las membranas de UF se clasifican por el peso molecular de corte (MWCO, por sus siglas en inglés), que se define como el peso molecular de las moléculas más pequeñas, 90 % de las cuales son retenidas por la membrana. El rango de MWCO en las membranas de UF es de 1000 hasta 500 000 Da y tamaño de poros de 0,001 μm a 0,1 μm (Mannapperuma, 1997; Cheryan, 1998). En este proceso se utilizan presiones superiores a las de MF, usualmente entre 20-200 psi (1,4-14 bar) (Mannapperuma, 1997).

3.5.5 Nanofiltración (NF)

Es una técnica intermedia entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, las membranas de NF retienen moléculas de peso molecular entre 100 y 1000 Da, lo que permite separar aminoácidos, colorantes, ácidos y azúcares; la fuerza motriz de esta tecnología es la alta presión (Mannapperuma, 1997). Al igual que las membranas de UF, las de NF se clasifican

por el corte de peso molecular o por el porcentaje de retención de cloruro de sodio, igual que en las membranas de ósmosis inversa. El proceso de NF involucra presiones altas en un rango de 100-500 psi (7-35 bar) (Mannapperuma, 1997). En la Figura 11 se muestra la comparación de varios procesos de tecnologías de membranas en cuanto a la composición del retenido y permeado, y el tamaño de poro.

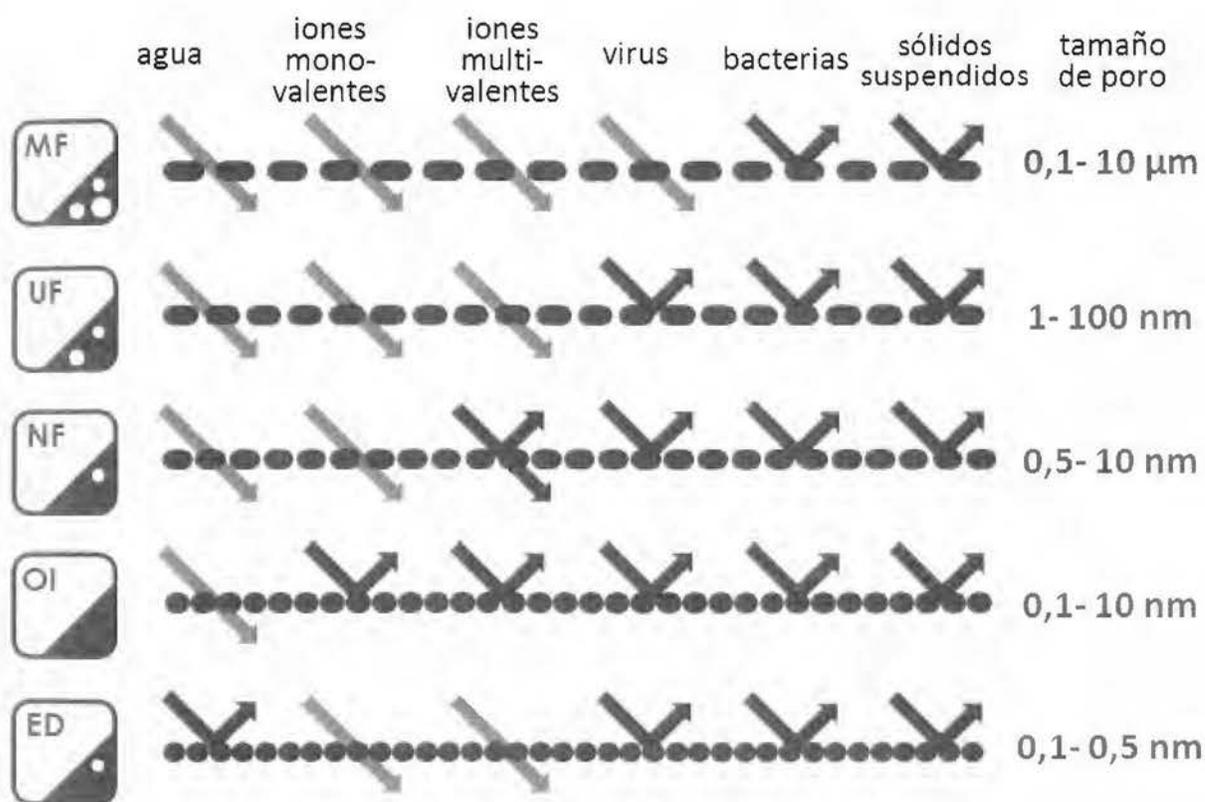


Figura 11. Características del retenido y permeado que se obtienen de diferentes procesos de membranas: MF, microfiltración; UF, ultrafiltración; NF, nanofiltración; OI, ósmosis inversa; ED, electrodiálisis.

3.5.6 Variables que afectan los procesos de filtración por membranas

Los procesos de filtración por membranas como la MF, UF y NF están basados en la teoría de la filtración tradicional descrita por la ley de Darcy (Ortiz *et al.*, 2008), en la cual el flujo de permeado es función de la presión transmembranaria y de una resistencia total:

$$J_p = \frac{P_{tm}}{\mu_p \times R_t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde:

J_p : flujo de permeado

P_{tm} : presión transmembranaria

μ_p : viscosidad del producto

R_t : resistencia total.

Según esta teoría, las condiciones de operación que influyen en el flujo de permeado son: 1) presión transmembranaria, 2) velocidad tangencial promedio de la velocidad axial del fluido y 3) temperatura (Baruah *et al.*, 2006). Las características del producto que se va a filtrar influyen también en el desempeño de la operación; la composición así como la viscosidad y turbidez del producto son factores importantes a tomar en cuenta.

- *Presión transmembranaria (P_{tm})*

La presión transmembranaria es la fuerza motriz en los procesos de membrana y se define como la diferencia de presión entre el lado del retenido y el lado de permeado:

$$P_{tm} = \frac{P_{ent} - P_{sal}}{2} - P_p \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde:

P_{tm} : presión transmembranaria

P_{ent} = presión de entrada

P_{sal} = presión de salida

P_p = presión de permeado

El flujo de permeado aumenta al aumentar la P_{tm} , pero la relación sólo es lineal cuando la alimentación es agua pura. La influencia de esta variable sobre el flujo es imprevisible y depende de las características del soluto a tratar (Vaillant *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2008).

- *Temperatura*

Al incrementar la temperatura, normalmente se incrementa el flujo de permeado. Se produce una disminución en la viscosidad del fluido y en una solución con proteínas se

incrementa la difusividad de las mismas y, por lo tanto, se reduce la resistencia por ensuciamiento o polarización de la concentración, originada por las proteínas (Ortiz *et al.*, 2008). Sin embargo, es esencial no pasar por encima de ciertos límites, porque las altas temperaturas desnaturalizan las proteínas y pueden aumentar el crecimiento microbiano durante el proceso (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000).

- *Velocidad lineal o tangencial (U)*

Es la velocidad lineal promedio que circula por el equipo de filtración del lado del retenido. Para una membrana tubular la velocidad lineal puede ser definida como la relación entre el flujo de alimentación (o velocidad del retenido) y el área tangencial de la membrana (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000):

$$U = \frac{J_r}{A_t} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde:

J_r = flujo del retenido ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)

A_t = área tangencial (m^2)

Una mayor velocidad tangencial tiende a remover el material depositado y en consecuencia reduce la resistencia hidráulica a través de la membrana y, de esta manera, el flujo de permeado es mayor. También, mayores velocidades reducen el fenómeno de polarización de la concentración mediante el incremento del coeficiente de transferencia de masa (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000; Ortiz *et al.*, 2008).

- *Turbidez*

Según Vaillant *et al.* (2008) la turbidez del producto inicial presenta un efecto significativo en los flujos de permeado. La turbidez es una medida de la dispersión de la luz en un medio translúcido, esta dispersión se da cuando la luz choca con partículas en suspensión (sólidos insolubles), las cuales reflejan, absorben o disipan dicha luz (Vaillant *et al.*, 2008). Cuando se aplica la filtración de membranas a líquidos de alta turbidez y con gran cantidad de sólidos insolubles, los poros y conductos de las membranas se colmatan rápidamente, generando flujos y rendimientos bajos (Vaillant *et al.*, 2001).

La medición de la turbidez se utiliza ampliamente en la industria de aguas residuales para monitorear la operación de concentración de materia en suspensión en el sedimento (Pabby *et al.*, 2009). La turbidez de las dispersiones depende principalmente de la forma, tamaño y composición mineral de las partículas. También depende de su índice de refracción relativo y, en cierta medida, del color de la fase líquida (Vaillant *et al.*, 2008).

3.5.7 Parámetros del desempeño de los procesos de filtración por membranas

- *Flujo de permeado*

El flujo del líquido a través de la membrana se debe al gradiente de presión hidráulica. En el caso de la nanofiltración (NF) y la ósmosis inversa (OI), la presión osmótica de la solución se opone a la presión hidráulica. En la ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF) la presión osmótica es despreciable debido al alto peso molecular de los solutos. El flujo de los solutos, a través de la membrana, en NF es llevado a cabo por la difusión impulsado por el gradiente de concentración. Hay algunos modelos que toman en cuenta el transporte de solutos a través de poros de gran tamaño en la membrana. Por otro lado, en la UF y MF, los solutos fluyen a través de la membrana debido al mayor tamaño de los poros (Mannapperuma, 1997).

El rendimiento y desempeño de un sistema de filtración por membranas se mide en términos de su capacidad para producir grandes volúmenes de filtrado o permeado en un período corto de tiempo y en el grado de pureza del filtrado con respecto a la concentración del soluto de interés. El flujo de permeado es definido como el volumen de permeado que fluye a través de una unidad de área de membrana en una unidad de período de tiempo:

$$J_p = \frac{V_p}{A_m \times t} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde:

J_p : flujo de permeado ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)

V_p : volumen de permeado (L)

A_m : área de filtración de la membrana (m^2)

t : tiempo de filtración

Los procesos de filtración como la UF y MF están limitados principalmente por la disminución del flujo de permeado debido a la acumulación de partículas en la superficie de la membrana. Este fenómeno, llamado “colmatación”, es causado por diferentes mecanismos, tales como: 1) polarización de la concentración: a medida que el solvente pasa a través de la membrana, las grandes moléculas o solutos se mueven en dirección a la superficie de la membrana y se van acumulando, de manera que forman una capa o película que reduce la permeabilidad (Carneiro *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2008; Vaillant *et al.*, 2008); 2) bloqueo del poro de la membrana: el tamaño de las partículas es mayor que el del poro de la membrana, por lo que se depositan sobre la superficie de la misma, o el diámetro de las partículas es similar al de los poros provocando que se depositen en el poro o migren hacia su interior; 3) incremento de la viscosidad por aumento del factor de concentración: conforme avanza el tiempo durante el proceso de microfiltración, el retenido que se va obteniendo es cada vez más concentrado (Ortiz *et al.*, 2008).

Algunos autores han relacionado la disminución del flujo de permeado con la colmatación como resultado del incremento de las resistencias al flujo, condiciones de operación, tipo de productos a tratar, tipo de membrana y fenómenos de transporte (Vaillant *et al.*, 2001; Vaillant *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2008).

- *Factor de reducción volumétrico (FRV)*

El FRV en cada tiempo del proceso se define como el cociente entre el volumen total de producto que es alimentado al circuito cerrado y el volumen de retenido (diferencia entre el volumen de alimentación y el volumen de permeado en cada tiempo). El FRV es una forma de expresar la relación entre el flujo de permeado y el flujo original del alimento (Vaillant *et al.*, 2004):

$$FRV = \frac{V_a}{V_r}; \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{V_p}{V_a} = 1 - \frac{1}{FRV} \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde:

FRV: factor de reducción volumétrico (adimensional)

V_a : volumen de alimentación (L)

V_p : volumen de permeado (L)

V_r : volumen de retenido (L)

El factor de reducción volumétrica es un indicador de la viabilidad industrial del proceso ya que permite estimar el rendimiento del retenido y del permeado (Ecuación 6). Es de esperar que el valor sea alto, ya que indicaría mayor rendimiento del permeado y menor de retenido, el cual es considerado un subproducto en algunos procesos de membranas (Vaillant *et al.*, 2001).

- *Retención de solutos o compuestos de interés*

Para realizar el análisis de la retención de solutos o de compuestos de interés (por ejemplo compuestos bioactivos -polifenoles, carotenoides, vitaminas-, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, entre otros) por la membrana, se determina la concentración de cada compuesto tanto en el permeado como en el retenido.

Según el proceso, en ciertas ocasiones el producto de interés es el permeado o el retenido, por lo cual es importante evaluar qué porcentaje de los solutos de interés retiene (en el retenido) o deja pasar (en el permeado) la membrana que se está utilizando. Esta retención dependerá de las características del soluto (tamaño y carga de la molécula) así como de las condiciones de operación durante el proceso de filtración, tales como: tipo de membrana (tamaño de poro, poder de corte, material de la membrana), presión transmembranaria, velocidad tangencial. También, la retención estará en función de la formación de la capa de gel sobre la membrana y resistencia de la membrana, entre otros.

IV. Caracterización de la materia prima



IV. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Con el fin de conocer las características de la matriz con la cual se trabajó, se realizó el análisis químico del subproducto de mora, materia prima utilizada para realizar el proceso de extracción sólido-líquido de los polifenoles presentes en este residuo. Se realizaron los diferentes análisis químicos: contenido de humedad, proteínas, lípidos (totales y perfil de ácidos grasos), fibra dietética, cenizas, sólidos solubles totales, azúcares, acidez, valor de pH, polifenoles (totales, elagitaninos y antocianinas) y capacidad antioxidante (ORAC-H).

4.1 Localización del proyecto

El proceso de extracción de los polifenoles a nivel de laboratorio se realizó en el laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. El escalamiento de la extracción, a nivel de planta piloto, así como los ensayos de ultrafiltración para obtener el extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos se llevaron a cabo en la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA).

Los diferentes análisis físicos y químicos se realizaron en los laboratorios de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA, y en la planta piloto del CITA. Estas instituciones pertenecen a la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, ubicada en San Pedro de Montes de Oca.

4.2 Subproducto del procesamiento industrial de mora

Se utilizó un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora (SPIM) y fue proveído por la empresa Protica S.A., ubicada en San Diego de Tres Ríos, Cartago. Este subproducto está constituido por residuos gruesos, principalmente de semillas (~95 %), que se obtienen del primer despulpado de mora congelada (ver Figura 12) durante el proceso de elaboración de una pulpa o puré de mora. Esta pulpa es un producto intermedio que luego es utilizada para la elaboración de una bebida de mora. Durante la elaboración de la pulpa de mora se genera aproximadamente un 20 % del residuo o subproducto y la empresa usualmente lo desecha generando un impacto al ambiente. La mora que utiliza

Protica S.A. es principalmente de la variedad *Rubus adenotrichos* y es cosechada en las zonas altas de Pérez Zeledón con un grado de madurez 2 ($\frac{3}{4}$ de madurez) y 3 (totalmente madura). En la Figura 13 se muestra el subproducto utilizado como materia prima en este proyecto de investigación.

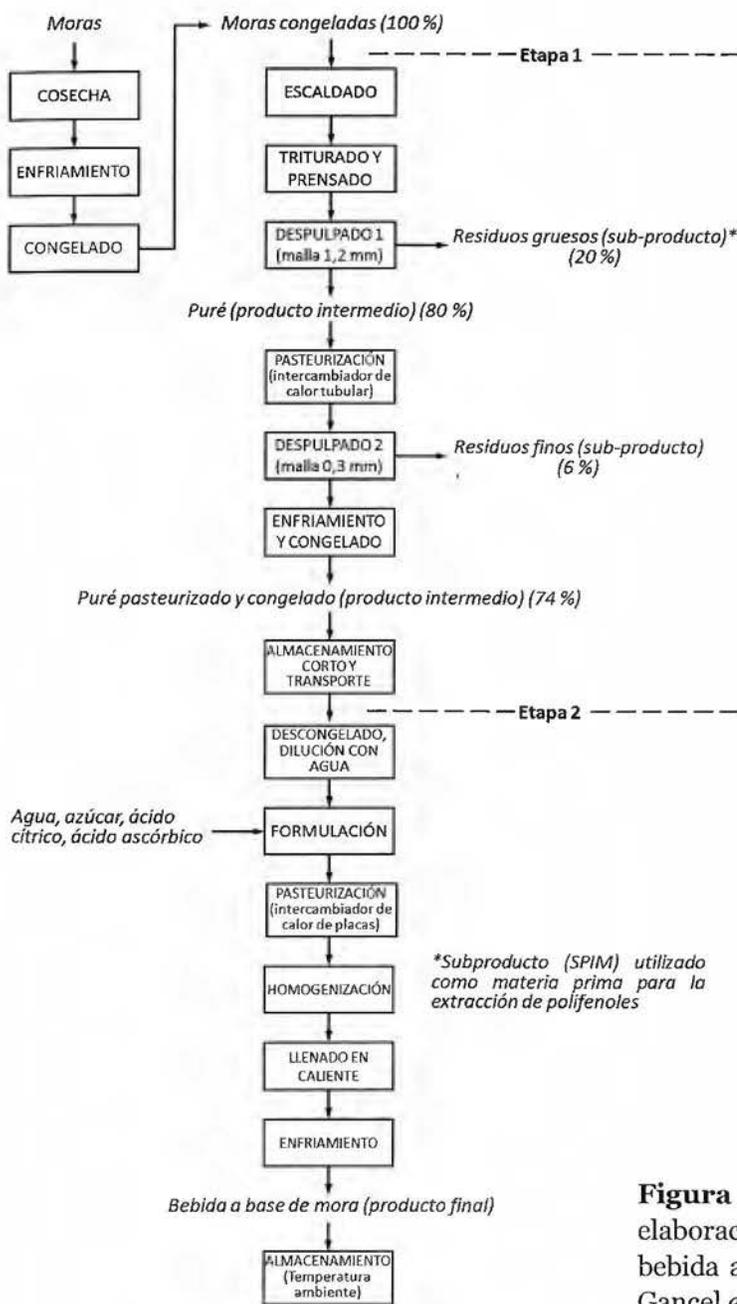


Figura 12. Flujo de proceso de la elaboración a nivel industrial de una bebida a base de mora (adaptado de Gancel *et al.*, 2011).

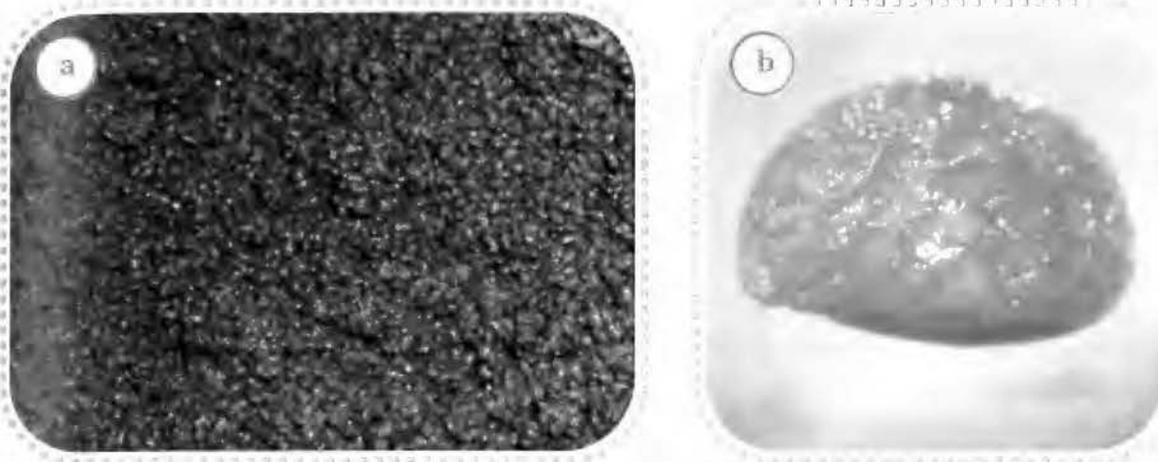


Figura 13. Fotografías del subproducto utilizado (40,6 % de humedad), constituido principalmente por semillas: a) subproducto formado por residuos gruesos y semillas; b) semilla (vista en estereoscopio: 40X).

4.3 Tamaño del lote y condiciones de almacenamiento de la materia prima

Se utilizó un lote inicial de subproducto (constituido principalmente por semillas) de 120 kg, proveído por Protica S.A. Este lote inicial se homogenizó y luego se dividió en tres partes o sub-lotes de 40 kg cada uno. El subproducto de cada sub-lote se empacó en bolsas plásticas de polietileno de alta densidad (HDPE, por sus siglas en inglés) con capacidad de 5 kg. Con el objetivo de caracterizar la materia prima, a cada sub-lote se aplicó por triplicado pruebas químicas (ver sección 4.5). En total se obtuvieron 8 bolsas de subproducto para cada sub-lote. El subproducto de mora se mantuvo en congelación a -20 °C. Todo esto se hizo el mismo día que se generó el subproducto en la planta, tratando de que no pasaran más de 6 horas.

Para las pruebas preliminares, para la optimización y verificación del proceso de extracción de polifenoles a nivel de laboratorio se tomó 1 bolsa de cada sub-lote y se mezclaron de forma homogénea, en total 15 kg (ver Figura 14). Este subproducto se empacó en bolsas metalizadas con una capacidad para 400 g (~38 bolsas). Estas bolsas se mantuvieron en congelación a -20 °C previo a su procesamiento y 24 horas antes de los ensayos, las muestras congeladas se descongelaron en una cámara de almacenamiento a temperatura de refrigeración (5 °C).

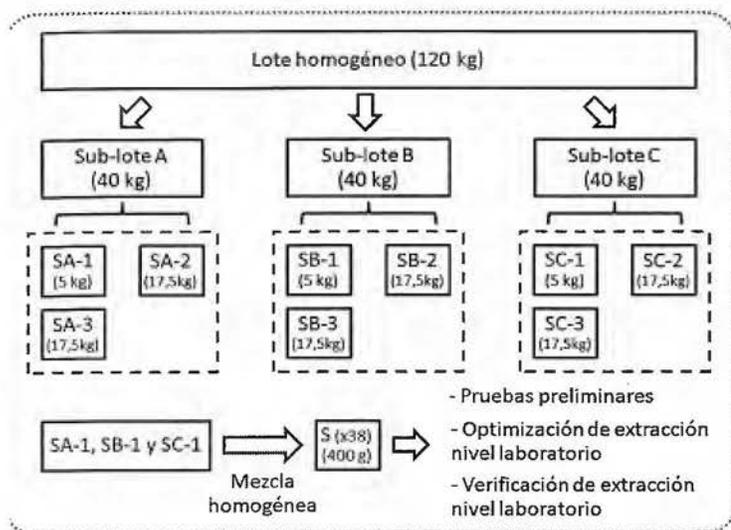


Figura 14. Flujo de proceso para la realización de las pruebas preliminares, y optimización y verificación del proceso de extracción a nivel de laboratorio (objetivo 1).

Para el proceso de extracción a nivel de planta piloto, se tomaron las 7 bolsas restantes de subproducto de cada sub-lote y se realizó el proceso de extracción (se realizaron 2 extracciones por cada sub-lote) para obtener un extracto de polifenoles rico en elagitaninos. Este proceso se repitió para los otros dos sub-lotes (ver Figura 15).

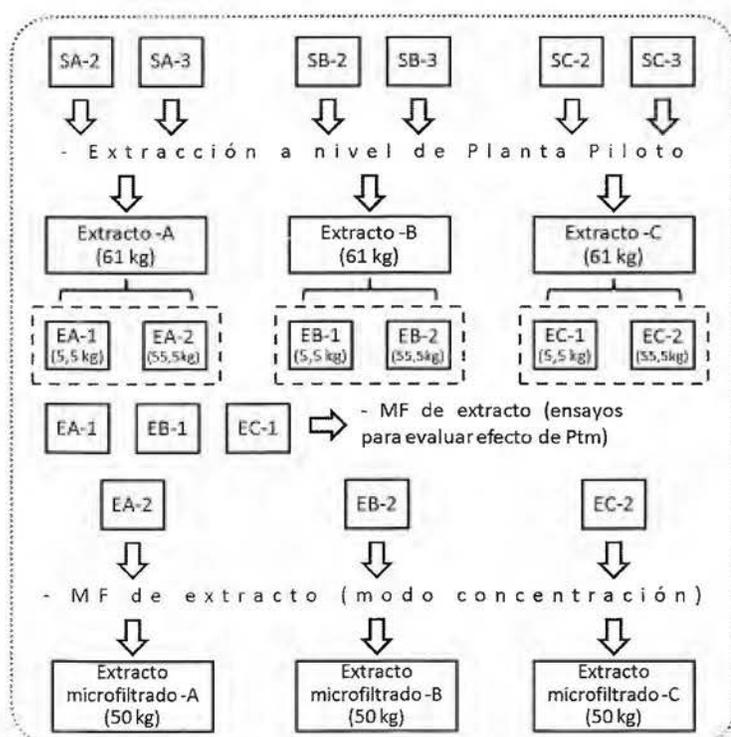


Figura 15. Flujo de proceso para la realización de la extracción a nivel de planta piloto y microfiltración del extracto (objetivo 2).

Posteriormente el extracto obtenido fue dividido para realizar las pruebas de microfiltración: una parte (5,5 kg por sub-lote) fue utilizada en ensayos para evaluar el efecto de la presión transmembranaria (Ptm), y la otra parte (55,5 kg por sub-lote) se utilizó en los ensayos de MF en modo de concentración (ver Figura 15).

Los extractos clarificados obtenidos de cada sub-lote igualmente se empacaron en bolsas plásticas de HDPE y se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ previo a su procesamiento. Estos extractos se dividieron en tres partes para realizar las pruebas de ultrafiltración: ensayos para evaluar el efecto de la Ptm y tipo de membrana, y los ensayos en modo de concentración (ver Figura 16). Veinticuatro horas antes de los ensayos de ultrafiltración, las muestras (los extractos congelados) de los sub-lotes se colocaron en bandejas metálicas para ser descongeladas en una cámara de almacenamiento a temperatura de refrigeración ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

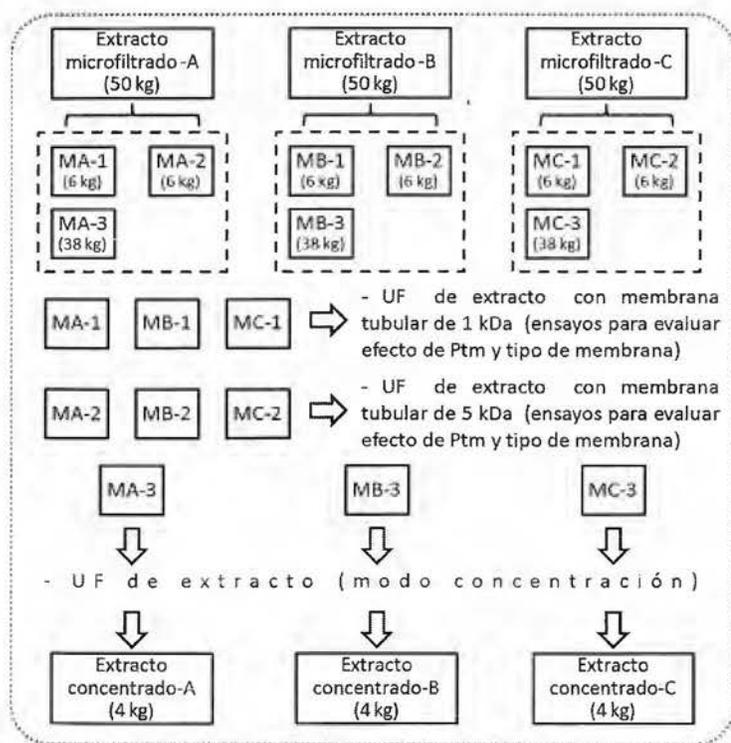


Figura 16. Flujo de proceso para la realización de los ensayos de ultrafiltración (objetivo 3).

4.4 Metodología

Se tomaron muestras de materia prima (750 g) de cada uno de los sub-lotes, tres réplicas por sub-lote. Estas muestras se descongelaron a temperatura de refrigeración (5 °C) para luego realizar los análisis químicos correspondientes. Los diferentes análisis químicos realizados al SPIM se describen a continuación.

4.4.1 Contenido de humedad, proteínas, cenizas, lípidos, fibra dietética, sólidos solubles, acidez titulable y valor de pH

- Humedad: se determinó según el método P-SA-MQ-002, basado en el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005).
- Proteínas: se determinó según el método P-SA-MQ-003, basado en el método AOAC 920.152 (AOAC, 2005).
- Cenizas: fue determinado según el método P-SA-MQ-004, basado en el método AOAC 940.26 (AOAC, 2005).
- Lípidos: se determinó según el método P-SA-MQ-005, basado en el método de Carpenter *et al.* (1993).
- Perfil de ácidos grasos: se identificaron y cuantificaron los diferentes ácidos grasos saturados, insaturados, trans y omega presentes en el aceite extraído del subproducto mediante cromatografía de gases según el método P-SA-MQ-034 basado en los métodos AOAC 996.06 (AOAC, 2005) y AOCS Ce 1e-91 (AOCS, 2000).
- Fibra dietética: Se determinó según el método P-SA-MQ-007, basado en el método AOAC 985.29 (AOAC, 2005).
- Sólidos solubles: la determinación de los sólidos solubles totales (expresados como °Brix) fue realizada utilizando un refractómetro Fisher Scientific Co. (Fisher Scientific Japan Ltd., Tokio, Japón) con control de temperatura
- Acidez titulable: se realizó según el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005) y se expresó como equivalentes de ácido málico.
- pH: fue determinado según el método AOAC 981.12 (AOAC, 1999) usando un pHímetro Metrohm 827 pH lab (Metrohm Ion Analysis, Suiza).

4.4.2 Contenido de antocianinas y elagitaninos

El análisis cuantitativo de antocianinas y elagitaninos totales se basó en el método descrito por 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, el cual se compone de un detector de arreglo de diodos modelo SPD-M20A, un desgasificador modelo DGU-20A5 y una bomba modelo LC-20AT (Shimadzu Manufacturing, Inc., Canby, Oregón, USA). El sistema fue controlado y la información fue procesada con el programa Shimadzu EZStart versión 7.4 SP1. Se usó una columna ACE-3-C18 (125 x 21 mm) con un tamaño de partícula 3 μ m (AIT, Houilles, Francia). Las condiciones fueron: volumen de inyección 20 μ L; temperatura de 30 °C; flujo de solventes constante de 300 μ L \cdot min⁻¹, los cuales consistieron de agua/ácido fórmico, 98:2 v/v (solvente A) y acetonitrilo/agua/ácido fórmico, 80:18:2 v/v/v (solvente B). Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: 0 min: 5% B, 0 - 20 min: gradiente lineal de 5% a 25% B, 20 - 25 min: gradiente lineal de 25 a 100% B, 25 - 30 min: gradiente lineal de 100% a 10% B, 30 - 35 min: gradiente lineal de 10% a 5% B. La cuantificación se realizó a 280 nm y consistió en la comparación del área bajo la curva de cada pico contra el área bajo la curva de soluciones patrón previamente inyectadas de ácido elágico (8 patrones) y de cianidina-3-glucósido (7 patrones) según se tratara de un elagitanino o de una antocianina, respectivamente. La identificación tentativa de los principales compuestos polifenólicos presentes en la mora *Rubus adenotrichos* ya había sido realizado por Mertz *et al.* (2007) mediante un análisis de HPLC-DAD-MSn.

Para los análisis de HPLC, las muestras fueron homogenizadas para reducir su tamaño de partícula. Posteriormente, se realizó la extracción (tres veces) durante 20 min utilizando una solución extractora de acetona (acetona/agua, 70:30). Los extractos se combinaron, filtraron (con embudo y papel Whatman No. 41) y concentraron al vacío a 40 °C para remover la acetona. Antes de la inyección en el equipo de HPLC, las muestras fueron filtradas utilizando un filtro de 0,45 μ m acoplado al extremo de una jeringa. Los extractos filtrados se mantuvieron protegidos de la luz hasta realizar la determinación en el HPLC-DAD.

4.4.3 Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC-H)

- Polifenoles totales: Se determinó según el método AQCITA-M036, basado en un método espectrofotométrico (CITA, 2008a) descrito por Georgé *et al.* (2005).
- Capacidad antioxidante (ORAC-H): Se determinó según el método P-SA-MQ-037 (CITA, 2008b), empleando espectrofotometría de fluorescencia (Ou *et al.*, 2001). La metodología de esta determinación fue detallada por Soto (2010).

4.4.4 Contenido de azúcares

Se determinó utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según el método P-SA-MQ-006 (CITA, 2010). El método consiste en la extracción de los azúcares de la muestra y la inyección del extracto en la columna Alltech Econosphere™ NH₂. La cuantificación e identificación de los azúcares se realizó con un detector de índice de refracción, inyectando patrones de sacarosa, glucosa y fructosa de concentración conocidas, los cuales se utilizaron para calibrar el equipo en cuanto a concentraciones y para la identificación por los tiempos de retención. Las concentraciones de cada azúcar encontrado en la muestra se expresaron como g·100 g⁻¹.

4.5 Resultados

Se realizó la caracterización química del subproducto obtenido del proceso de elaboración de pulpa de mora (*Rubus adenotrichos*, variedad vino con espinas rojas), proporcionado por la empresa Protica S.A. En el Cuadro IV se observan las principales propiedades químicas y el contenido de compuestos polifenólicos del subproducto.

- *Contenido de humedad, sólidos solubles totales, azúcares, cenizas, acidez y valor de pH*

Según los datos expresados en el Cuadro IV, este subproducto de mora presenta una humedad relativamente baja (aproximadamente 40 g·100 g⁻¹) y un bajo contenido de sólidos solubles (menos de 1 °Brix), constituidos principalmente por azúcares como

sacarosa y fructosa; el contenido de glucosa no fue detectable en el SPIM, a diferencia de la mora fresca donde los azúcares presentes son la fructosa y glucosa y más bien la sacarosa está en cantidades no detectables (Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Soto, 2010). El valor de pH fue de 3,14; este valor es mayor al compararlo con el pH de la fruta fresca de la misma variedad (pH= 2,26-2,51) según los datos reportados por Acosta-Montoya *et al.* (2010). Esto concuerda con los valores de acidez, ya que el subproducto presentó una acidez menor a $1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ en contraste con la alta acidez que puede presentar la mora fresca ($2,4\text{-}2,85 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) (Acosta-Montoya *et al.*, 2010). El contenido de cenizas en el SPIM fue de $0,82 \pm 0,07 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ en base fresca, cantidad mayor a la que presenta la fruta de mora ($0,50\text{-}0,60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) según Acosta-Montoya *et al.* (2010).

Cuadro IV. Propiedades químicas del subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora, utilizado como materia prima para la obtención del extracto rico en elagitaninos*.

Variables respuestas	Base húmeda	Base seca
Humedad ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$40,6 \pm 0,3$	NA
pH	$3,14 \pm 0,02$	NA
Sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$)**	$0,787 \pm 0,008$	NA
Acidez, (g ácido málico equivalentes $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,85 \pm 0,03$	NA
Proteína, $\text{N} \times 6,25$ ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$4,3 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,7$
Cenizas ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,82 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,1$
Fibra dietética ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	36 ± 1	60 ± 2
Lípidos ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$9,1 \pm 0,5$	$15,3 \pm 0,8$
Sacarosa ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,45 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,05$
Glucosa ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	ND***	NA
Fructosa ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,28 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,02$
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	55 ± 2	92 ± 4
Elagitaninos (mg ácido elágico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	252 ± 2	423 ± 77
Polifenoles totales (mg ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	959 ± 103	1613 ± 176
ORAC-H (μmol equivalentes de trolox $\cdot \text{g}^{-1}$)	104 ± 7	175 ± 12

*Promedio \pm intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. **Dato corregido por acidez. ***Entre 0,1 y $0,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. NA= no aplica. ND= no detectable.

- *Contenido de proteína y lípidos*

En cuanto al contenido de proteína y lípidos, el subproducto o SPIM presentó valores de $4,3 \pm 0,4$ y $9,1 \pm 0,5$ g·100 g⁻¹ en base húmeda, respectivamente. No hay muchos datos en la literatura que describan la composición química de la semilla o residuos de mora; sin embargo, el estudio realizado por Bushman *et al.* (2004) analizó la composición de las semillas de 5 especies *Rubus* (frambuesa roja y negra, mora Marion y Evergreen, y zarza Boysen). Estos autores encontraron valores de proteína y lípidos de 6-7 g·100 g⁻¹ y 11-18 g·100 g⁻¹, respectivamente, valores cercanos a los encontrados en el SPIM.

En el Cuadro V se muestran los resultados de la identificación y cuantificación de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído del subproducto, analizados mediante cromatografía de gases; además, se comparan con la composición de ácidos grasos presentes en otros frutos tipo baya de acuerdo con varios autores.

Cuadro V. Composición de los ácidos grasos (AGs) presentes en la semilla de mora obtenida del SPIM y en las semillas de otros frutos tipo baya.

Ácidos grasos	% (m/m) del total de AGs				
	SPIM*	Uva**	Mora***	Arándano azul***	Fresa***
AGs Saturados	8,72 ± 0,01	11,64-14,94	6,45	7,8	6,88
AGs Mono-insaturados	6,75 ± 0,09	14,19-21,29	14,81	21,43	25,14
AGs Poli-insaturados	84,5 ± 0,1	63,64-73,53	78,74	70,77	67,98
Ácido linoleico (ω-6)	66,0 ± 0,2	63,0-73,1	61,22	42,51	37,68
Ácido linolénico (ω-3)	18,4 ± 0,1	0,36-0,51	17,6	28,28	30,09

*Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza con un nivel de confianza del 95 % (n=3).

Fuente: Fernandes *et al.* (2013); valores reportados como un rango de porcentaje de ácidos grasos en el aceite de la semilla de 10 variedades de uva. *Fuente: Van Hoed *et al.* (2009); valores reportados como promedio (n=2).

Los ácidos grasos presentes en el SPIM son principalmente poli-insaturados (ácido linoleico -66 %- y ácido linolénico -18,4 %-); en menor cantidad ácidos mono-insaturados (principalmente ácido oleico -6,51 %-) y ácidos saturados (principalmente ácido esteárico -3,88 %- y ácido palmítico -3,87 %-). Al comparar estos datos con la composición de AGs presentes en las semillas de otros frutos como la uva (*Vitis vinifera* L), mora (*Rubus fruticosus*), arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) y fresa (*Fragaria F. x ananassa*) (ver Cuadro V), se observa que el SPIM presenta un mayor contenido de AGs poli-insaturados y

un menor contenido de AGs mono-insaturados; por otra parte el SPIM presenta una relación ácido linoleico (ω -6)/ácido linolénico (ω -3) similar a la mora (*R. fruticosus*), muy inferior a la reportada en uva y superior al arándano azul y fresa. El ácido linoleico y ácido linolénico son esenciales en humanos, ya que el organismo no puede sintetizarlos, por lo que deben obtenerse por medio de la dieta. Según Okuyama (2000) la proporción de ω -6/ ω -3 ha sido propuesta como un método exacto para la predicción de enfermedad coronaria. La mayoría de los aceites vegetales tienen relaciones en exceso de 6/1, mientras que proporciones de 2/1 son consideradas actualmente como beneficiosas. La relación ω -6/ ω -3 en la fracción lipídica del subproducto de mora fue de 3,6/1, por lo cual podría considerarse como una relación adecuada comparada con la de otros productos. En aceite de semilla de mora Marion y Evergreen se han encontrado relaciones de 4,1/1 y 2,7/1, respectivamente (Bushman *et al.*, 2004).

- *Contenido de fibra dietética*

Por otra parte, el SPIM presentó un alto contenido de fibra dietética, $\sim 60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ en base seca, por lo que se podría considerar como una fuente importante de este compuesto. De hecho, los concentrados de fibra dietética de frutas presentan, en general, una mejor calidad nutricional que los obtenidos de cereales debido a la presencia de cantidades significantes de compuestos bioactivos asociados (flavonoides, carotenoides, etc.) y a su composición balanceada (mayor contenido de fibra, proporción de fibra dietética soluble/insoluble, menor valor calórico, mayor capacidad de retención de agua y grasa) con respecto a la fibra de cereales (Saura-Calixto, 1998; Lurrari, 1999). Recientemente se ha investigado específicamente sobre la utilización de fibra dietética obtenida de residuos del procesamiento de frutas para el enriquecimiento de productos como panes y galletas: melocotón (Grigelmo-Miguel *et al.*, 1999), cítricos (Figuerola *et al.*, 2005), mango (Ajila *et al.*, 2007; Vergara-Valencia *et al.*, 2007) y manzana (Rupasinghe *et al.*, 2008). El subproducto de mora podría constituir una fuente importante de *fibra dietética antioxidante* con potenciales aplicaciones en alimentos.

- *Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante*

En el Cuadro IV se muestra el contenido de los compuestos polifenólicos principales encontrados en el subproducto de mora, antocianinas y elagitaninos, siendo los últimos los que se encontraron en mayor cantidad (4,6 veces mayor que las antocianinas). Estos

valores fueron mayores a los reportados por Gancel *et al.* (2011), quienes analizaron un subproducto de mora (residuo grueso obtenido del despulpado de mora) similar al utilizado en este proyecto. Estos autores reportaron valores de antocianinas de 41,3 mg cianidina-3-glucósido·100 g⁻¹ y elagitaninos de 111,4 mg ácido elágico·100 g⁻¹.

Según Siriwoharn y Wrolstad (2004), las semillas de mora contienen las mayores cantidades de ETs y ácido elágico (AE) comparados con otras partes de la fruta como la pulpa o la cáscara. De hecho, el 88 % de los ETs y AE se encuentran en las semillas en comparación al 12 % que se encuentra en la pulpa. En la mora, los derivados de AE pueden estar presentes en cantidades entre 1,2 y 3,0 mg·100 g⁻¹, mientras que los ETs están entre 51,1 y 68,2 mg·100 g⁻¹ (Siriwoharn *et al.*, 2005).

De la misma manera, el contenido de polifenoles totales (PT) y la capacidad antioxidante en el SPIM fueron superiores con respecto a los obtenidos por Gancel *et al.* (2011) en el residuo de mora, los cuales reportaron valores de 598 mg ácido gálico·100 g⁻¹ (Cuadro VII) y 69 μmol equivalentes de trolox·g⁻¹, respectivamente. Además, en la Figura 17 se aprecia que el SPIM presenta un contenido de PT importante e inclusive superior con respecto a una gran cantidad de frutas como la piña, naranja, mango, tomate de árbol, maracuyá, mamón chino, granadilla, carambola, guayaba, cas, marañón y mora, entre otros.

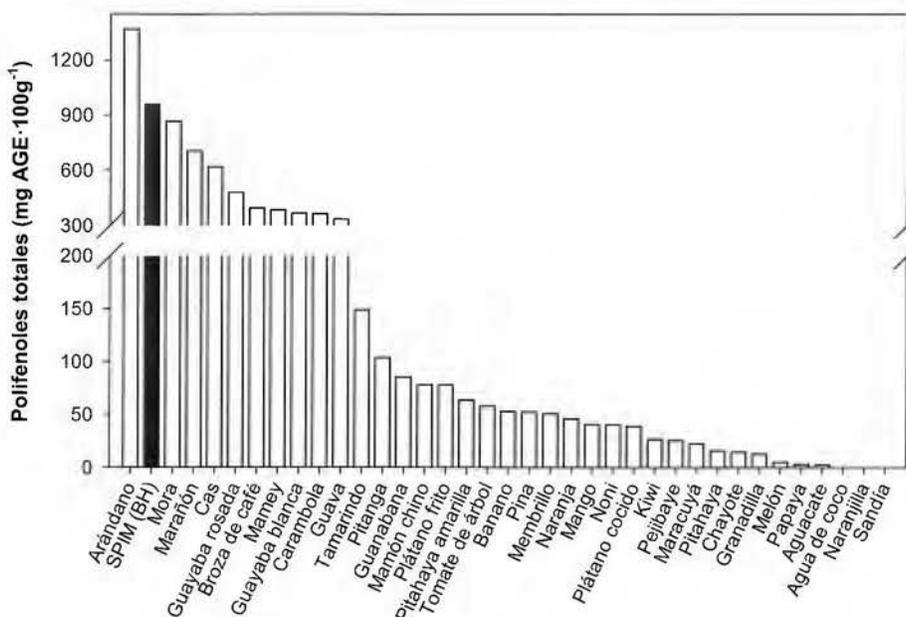


Figura 17. Comparación del contenido de polifenoles totales de 35 frutas tropicales (González *et al.*, 2011) y el SPIM. AGE= equivalentes de ácido gálico.

Por otra parte, en el Cuadro VI se muestra la comparación del contenido total de polifenoles en diferentes subproductos de frutas con respecto al subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora (SPIM).

Cuadro VI. Comparación del contenido de polifenoles totales de subproductos obtenidos de diferentes frutas y el subproducto de mora (SPIM).

Subproducto de frutas	Polifenoles totales (mg AG·100 g ⁻¹)		n	Autor
	Base húmeda	Base seca		
SPIM	959±103*	1613±176*	3	NA
Piña	NR	2787±225**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Acerola	NR	7265±17**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Marañón	NR	6588±370**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Guayaba	NR	1987±8**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Guanabana	NR	1440±22**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Papaya	NR	783±25**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Mango	NR	376±38**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Maracuyá	NR	451±41**	3	Silva <i>et al.</i> (2014)
Uva	NR	1160±100 - 2670±180**	3	Deng <i>et al.</i> (2011)
Mora (<i>R. adenotrichos</i>)	598±60**	NR	3	Gancel <i>et al.</i> (2011)
Granada real	1005±120**	NR	3	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2011)
Grosella negra	1140-8680***	NR	NR	Kapasakalidis <i>et al.</i> (2006)
Manzana	NR	3342±12**	3	Wolfe & Liu (2003)

*Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza con un nivel de confianza del 95 %. **Valores reportados como promedio ± desviación estándar. ***Valores reportados como rango de polifenoles totales. n= número de repeticiones. NA= no aplica. NR= no reportado.

Según la información recopilada en este cuadro, se puede apreciar que el SPIM presenta un contenido inferior de PT con respecto a los subproductos de piña, acerola, marañón, guayaba y manzana (valores reportados en mg AG·100 g⁻¹ de subproducto en base seca) y grosella negra (valor reportado en mg AG·100 g⁻¹ de subproducto en base húmeda). Por otra parte, el SPIM presenta mayor contenido de polifenoles totales que el subproducto de papaya, mango y maracuyá (en base seca) y que el subproducto de mora (base húmeda);

además, muestra valores similares a los reportados en los subproductos de guanabana y uva (en base seca) y granada real (en base húmeda).

Es importante indicar que, en la determinación de polifenoles totales, el reactivo Folin-Ciocalteu no es suficientemente específico para los compuestos fenólicos y puede reaccionar con compuestos no fenólicos como aminoácidos, azúcares reductores y vitamina C (González, 2011). Para la determinación de polifenoles totales en el SPIM se realizó una corrección pasando los extractos obtenidos por medio de un cartucho de extracción OASIS 7 HLB 6cc (Waters Corporation, Milford, MA), de tal manera que el valor de polifenoles totales se reportó eliminando las interferencias (Georgé *et al.*, 2005). Según las referencias utilizadas en el Cuadro VI, excepto en el caso del estudio de Gancel *et al.* (2011), para la determinación de polifenoles totales los autores no indican si fue realizada la corrección por interferencias, por lo que los valores reportados para los subproductos de las diferentes frutas podrían estar sobreestimados.

También hay que tomar en cuenta que el contenido de los polifenoles que quedan retenidos en el subproducto puede variar según el tipo de extracción y los pretratamientos a los que se sometan las frutas durante el procesamiento industrial de las mismas. La información mostrada en la Figura 17 y en el Cuadro VI permite concluir que el SPIM tiene un alto potencial para ser utilizado como materia prima para la extracción de polifenoles.

4.6 Conclusiones y recomendaciones

4.6.1 Conclusiones

- Los ácidos grasos presentes en el subproducto de mora (SPIM) son principalmente ácidos poli-insaturados (84,5 % m/m), siendo rico en ácido linoleico (ω -6) y linolénico (ω -3). Asimismo, la relación ω -6/ ω -3 en la fracción lipídica del SPIM fue de 3,6/1, por lo cual se podría considerar como una relación adecuada comparada con la de otros productos similares.

- El SPIM presentó un alto contenido de fibra dietética, $60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ en base seca, por lo que se podría considerar como una fuente importante de este compuesto, con potenciales aplicaciones en alimentos.
- Los compuestos polifenólicos principales encontrados en el subproducto de mora fueron antocianinas ($55 \text{ mg cianidina-3-glucósido} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y elagitaninos ($252 \text{ mg ácido elágico} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), siendo los últimos los que se encontraron en mayor cantidad (4,6 veces mayor que las antocianinas).
- El subproducto de mora presentó un contenido de polifenoles totales importante ($959 \text{ mg ácido gálico} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e inclusive superior con respecto a una gran cantidad de frutas como la guanabana, piña, naranja, mango, tomate de árbol, maracuyá, mamón chino, granadilla, carambola, guayaba, cas, marañón, mora, entre otros. Esto indica que el SPIM tiene un alto potencial para ser utilizado como materia prima para la extracción de polifenoles.

4.6.2 Recomendaciones

- Caracterizar los compuestos que constituyen la fibra dietética presente en el subproducto de mora para definir el contenido de fibra soluble e insoluble.
- Evaluar el procesamiento industrial del subproducto de mora para obtener otros productos o ingredientes funcionales como la fibra dietética y el aceite rico en ácidos grasos omega 3.



V. Pruebas preliminares



V. PRUEBAS PRELIMINARES

Antes de realizar las actividades correspondientes a los diferentes objetivos planteados en el proyecto de investigación (pruebas definitivas), se realizaron diferentes pruebas preliminares con el fin de definir ciertas condiciones del proceso de extracción de polifenoles. En total se realizaron cinco pruebas preliminares, para cada una de ellas se describe la metodología aplicada; además se muestran y se discuten brevemente los resultados obtenidos. Finalmente, se mencionan las principales conclusiones y recomendaciones derivadas de estas pruebas.

5.1 Evaluación de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes preparados enzimáticos comerciales

Debido a que la mora y principalmente el subproducto -que se obtiene del procesamiento de mora- son ricos en paredes celulares, se eligieron preparados enzimáticos comerciales disponibles en el CITA, con actividad pectinolítica y celulolítica. Esto debido a que las enzimas con actividad pectinolítica son frecuentemente utilizadas en el procesamiento industrial de bayas para facilitar la extracción de jugo y de polifenoles (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Algunos de estos preparados con actividad pectinolítica pueden tener una actividad β -glucosidasa lateral, lo que provoca la deglicosilación de polifenoles con glicósidos (ejemplo, antocianinas, elagitaninos) (Day *et al.*, 1998). Esta enzima ataca los enlaces glicosílicos en posición beta. Durante el proceso de extracción de elagitaninos con el preparado enzimático no se va a aplicar una inactivación debido a la posible degradación térmica de estos compuestos. Por estas razones se evaluó la actividad lateral β -glucosidasa de los diferentes preparados enzimáticos comerciales utilizados.

Se evaluaron tres preparados enzimáticos comerciales: Depol™ 40L, Ultrazym® AFP-L y Enzeco® Pectinase VM, los cuales fueron almacenados en refrigeración (4 °C). En el Cuadro VII se presenta una síntesis de la información disponible sobre las características principales de los distintos preparados enzimáticos, cuyas fichas técnicas se presentan en el Anexo 10.1.

Cuadro VII. Características de los preparados enzimáticos comerciales utilizados para evaluar el efecto de alguna actividad lateral β -glucosidasa de los preparados.

Preparado enzimático	Productor	Actividad declarada*	Actividad principal	Fuente
Depol™ 40L	Biocatalysts	Celulasa= 1 200 U/g PG= 800 U/g	Pectinasas, poligaracturonasas, celulasas y hemicelulasas	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Trichoderma</i> sp
Ultrazym® AFP-L	Novozymes A/S	3 400 FDU20/mL	pectinasa y celulasa	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma reesei</i>
Enzeco® Pectinase VM	Enzyme Development Corporation (EDC)	PG= \geq 1 300 U/g; PE= \geq 400 U/g	poligalacturonasa y pectinesterasa	NS

*U= unidad de actividad enzimática; FDU= *ferment depectinization units*; PG= poligaracturonasa; PE= pectinmetilesterasa. NS= información no suministrada.

5.1.1 Metodología

- Diseño experimental

Se evaluó la actividad lateral β -glucosidasa de tres diferentes preparados enzimáticos comerciales, sobre la concentración de antocianinas y elagitaninos de jugo de mora (*Rubus adenotrichos*) clarificado mediante MF tangencial, el cual se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Soto (2010). Se escogió el jugo de mora ya que es una fuente rica de estos compuestos. Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio, donde los tratamientos correspondían a los diferentes preparados enzimáticos (ver Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes tratamientos enzimáticos comerciales.

Tratamiento	Preparado enzimático
Control	Sin preparado enzimático/ 0 h de incubación (control)
1	Ultrazym® AFP-L/ Cn= 500 mg·kg ⁻¹ / 24 h de incubación
2	Ultrazym® AFP-L/ enzima inactivada/ 24 h de incubación
3	Enzeco® Pectinase VM/ Cn= 500 mg·kg ⁻¹ / 24 h de incubación
4	Enzeco® Pectinase VM / enzima inactivada/ 24 h de incubación
5	Depol™ 40L/ Cn= 500 mg·kg ⁻¹ / 24 h de incubación
6	Depol™ 40L/ enzima inactivada/ 24 h de incubación

Como ya se mencionó, estos preparados se seleccionaron a partir de la información obtenida de las fichas técnicas suministradas por los proveedores y según la caracterización de la materia insoluble en alcohol y agua (MIAA) de pulpa de mora de la misma variedad utilizada en este estudio, realizada por Cozzano (2007). Cada tratamiento se realizó por triplicado.

- *Procedimiento*

En tubos de ensayo de 150 mm x 25 mm se agregaron 20 mL de jugo de mora clarificado cuyo pH fue ajustado a 5,0 (se utilizó NaOH 1 M) ya que éste es el pH óptimo para la actividad de la β -glucosidasa (Gómez-Plaza *et al.*, 2010). Posteriormente, se agregó el preparado enzimático a una concentración de 500 mg·kg⁻¹, se escogió esta concentración para asegurar la acción de la enzima. Además, se aplicaron otros tres tratamientos los cuales consistían en agregar cada uno de los tres preparados ya mencionados, pero inactivándolos previamente. Las enzimas se inactivaron a 90 °C durante 5 min. Una vez inactivadas las enzimas se agregó el mismo volumen añadido en los otros tratamientos a los tubos de ensayo con el jugo de mora clarificado, como se muestra en la Figura 18. Finalmente los tubos de ensayos se taparon con papel parafinado y papel aluminio, y se colocaron en una incubadora con temperatura controlada de 37 °C, que corresponde a la temperatura óptima de la β -glucosidasa (Day *et al.*, 1998). Las muestras se mantuvieron en la cámara de incubación durante 24 horas. Se utilizó una muestra control (sin enzima) que no se colocó en la incubadora, a la cual se le realizaron los análisis de antocianinas y elagitaninos por HPLC, estos análisis se describieron en la sección 4.4.2.

- *Análisis estadístico*

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y los promedios se compararon (para cada tratamiento) con respecto al tratamiento control utilizando la prueba de Dunnett ($p < 0,05$); además, los promedios fueron comparados (para cada tratamiento, sin tomar en cuenta el control) utilizando la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

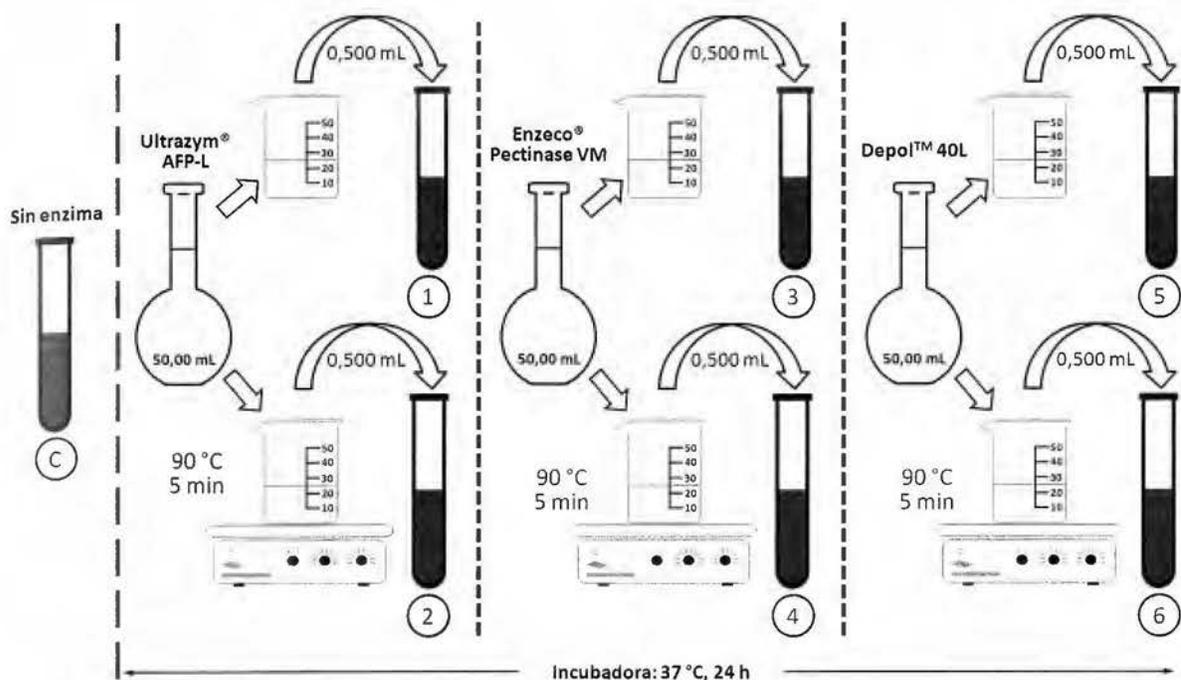


Figura 18. Esquema del procedimiento para la evaluación del efecto de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes tratamientos enzimáticos comerciales.

5.1.2 Resultados

Según los resultados que se muestran en el Cuadro IX, ninguno de los tratamientos en donde se aplicaron los diferentes preparados enzimáticos comerciales, causó una disminución o degradación de los elagitaninos al compararlos con el control. Por lo tanto, se podría decir que no tienen una actividad lateral β -glucosidasa. En cuanto al contenido de antocianinas en todos los tratamientos las muestras de jugo presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento control. Sin embargo, los jugos de los tratamientos en los que se aplicó el mismo preparado enzimático (con enzima y enzima inactivada) no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) en cuanto al contenido de antocianinas. Esto podría indicar que la disminución del contenido de antocianinas se debe a una degradación generada por las condiciones de temperatura y pH, aunque también pudieron ocurrir reacciones de oxidación. Según Patras *et al.* (2010) y Castañeda-Obando *et al.* (2009) la estabilidad de las antocianinas monoméricas en jugos y concentrados dependen de la temperatura, pH y contenido de sólidos. Para seleccionar un

preparado enzimático para las pruebas definitivas se tomó en cuenta los resultados obtenidos por Soto (2010). Este autor encontró que el preparado Ultrazym® AFP-L tiene un buen desempeño en la extracción de antocianinas y elagitaninos de mora entera.

Cuadro IX. Evaluación del efecto de la actividad lateral β -glucosidasa sobre el contenido de antocianinas y elagitaninos de jugo de mora clarificado (pH ajustado a 5,0) incubado a 37 °C durante 24 horas*.

Tratamiento	Elagitaninos (mg ácido elágico·L ⁻¹)	Antocianinas (mg cianidina-3- glucósido·L ⁻¹)
Sin preparado enzimático, 0 h (Control)	506 ± 174	492 ± 61
1- Ultrazym® AFP-L, Cn= 500 mg·kg ⁻¹	515 ± 52 ^b	365 ± 22 ^{a**}
2- Ultrazym® AFP-L, enzima inactivada	492 ± 20 ^{bc}	367 ± 16 ^{a**}
3- Enzeco® Pectinase VM, Cn= 500 mg·kg ⁻¹	646 ± 8 ^a	303 ± 11 ^{b**}
4- Enzeco® Pectinase VM, enzima inactivada	608 ± 22 ^a	343 ± 6 ^{ab**}
5- Depol™ 40L, Cn= 500 mg·kg ⁻¹	465 ± 29 ^{bc}	339 ± 16 ^{ab**}
6- Depol™ 40L, enzima inactivada	433 ± 28 ^c	359 ± 23 ^{a**}

*Datos son reportados como promedio \pm intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05).

**Hay diferencias significativas con respecto al Control (Dunnnett, p<0,05).

5.2 Evaluación del efecto del preparado enzimático sobre la extracción de polifenoles a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora (SPIM)

Diversos estudios realizados han encontrado un efecto positivo del uso de preparados enzimáticos sobre el aumento en el porcentaje de extracción de jugos de frutas y también un aumento en la extracción de compuestos bioactivos (entre ellos, polifenoles). Por esta razón se evaluó el efecto del uso del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L (cuya principal actividad es pectinolítica, aunque contiene también actividad celulolítica) sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora.

5.2.1 Metodología

- *Diseño experimental*

Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio, donde los tratamientos correspondían a la presencia o ausencia del preparado enzimático (ver Cuadro X). Cada tratamiento se realizó con tres repeticiones.

Cuadro X. Diseño experimental para la evaluación del efecto del uso de un preparado enzimático sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industria de mora*.

Tratamiento	Preparado enzimático
1	No enzima
2	Ultrazym® AFP-L, Cn= 250 mg·kg ⁻¹

*La extracción se llevó a cabo a T= 50 °C, relación agua/sólido= 1,0 g·g⁻¹.

- *Procedimiento*

Se siguió el procedimiento que se describe con detalle en la sección 6.1.2 con ciertas modificaciones. En los frascos de vidrio se agregaron 250 g del subproducto (SPIM) y 250 g de agua (relación agua/sólido de 1 g·g⁻¹). La extracción se realizó a 50 °C y después de transcurrir los primeros 5 min de mezclado se añadió el preparado enzimático por lo cual se tomaron muestras a los 5, 20, 35 y 65 min, para determinar la extracción de antocianinas y elagitaninos en los extractos (Ecuación 9, sección 6.1.2). A las muestras obtenidas, después de los 65 min de proceso, se les determinó el contenido de sólidos solubles (°Brix), acidez titulable, el valor de pH, contenido de antocianinas y elagitaninos (estos análisis se describieron en las secciones 4.4.1 y 4.4.2). También a las muestras obtenidas a los 65 min se les determinó el valor de turbidez y el contenido de sólidos insolubles en suspensión. Estos análisis se describen a continuación:

- **Turbidez:** se determinó utilizando el turbidímetro (HACH, modelo 2100 AN, USA). Las muestras (30 mL) se agitan levemente cuatro veces y se toma la lectura a los 30 s. Los valores se expresan en NTU (*Nephelometric Turbidity Units*). El equipo

fue calibrado previamente utilizando seis patrones de formazina con diferentes valores de turbidez: <0.01, 20, 200, 1000, 4000 y 7500 NTU.

- Sólidos insolubles en suspensión: se determinó según el método descrito por Vaillant *et al.* (2008). Se pesaron 40 g de la muestra y se centrifugaron a 3900 x g por 15 min. El resultado se expresó en gramos de sólidos insolubles en suspensión por cada 100 gramos de extracto ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) según la ecuación 7:

$$\text{SIS} = \frac{m_{\text{sis}}}{m_{\text{m}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde:

SIS: sólidos insolubles en suspensión ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)

m_{sis} : masa de los sólidos insolubles (g)

m_{m} : masa de la muestra (g)

- *Análisis estadístico*

Con los resultados obtenidos se realizó una prueba t-Student ($p < 0,05$) para comparar los promedios de los diferentes parámetros analizados en los extractos obtenidos de los dos tratamientos aplicados. Para las curvas de extracción de los polifenoles se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para diseño factorial con el fin de evaluar la interacción de la adición o aplicación del preparado enzimático y el tiempo. Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

5.2.2 Resultados

Según los resultados que se muestran en el Cuadro XI, se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros físico-químicos evaluados, a excepción de los sólidos solubles (°Brix). Se puede observar que la aplicación del preparado enzimático tiene un efecto positivo sobre la turbidez y los SIS (hay una disminución). Es importante tomar en cuenta estos dos últimos parámetros ya que el extracto obtenido posteriormente será sometido, a nivel de planta piloto, a un proceso de microfiltración tangencial (sección 7.2), en donde el contenido de SIS y la turbidez son parámetros que influyen en el desempeño y rendimiento de la operación.

Cuadro XI. Evaluación del efecto del uso de un preparado enzimático sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Parámetro	Tratamiento**	
	Con preparado enzimático	Sin preparado enzimático
Sólidos solubles (°Brix)	2,14 ± 0,01 ^a	2,13 ± 0,06 ^a
pH	3,142 ± 0,001 ^b	3,20 ± 0,01 ^a
Acidez (g · 100 g ⁻¹)	0,678 ± 0,006 ^a	0,631 ± 0,007 ^b
Sólidos insolubles en suspensión, SIS (g·100 g ⁻¹)	0,9 ± 0,1 ^b	1,34 ± 0,09 ^a
Turbidez (NTU)	72 ± 35 ^b	627 ± 69 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (t-Student, p<0,05).

**Condiciones del proceso → Mezclado: T= 50 °C, t= 5 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹. Extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, T= 50 °C, t= 60 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹.

La disminución en el valor de pH así como el aumento de la acidez en el extracto, durante el tratamiento con el preparado enzimático, puede ser el resultado de la formación de ácido galacturónico después de la degradación de las cadenas de pectinas (Demir *et al.*, 2007), ya que durante el tratamiento con enzimas pectinolíticas, la protopectina y la pectina son degradadas en ácido galacturónico, incrementando así el ácido urónico, el contenido de metanol y la acidez total del producto (Demir *et al.*, 2004).

Con respecto a los SIS y a la turbidez, la Figura 19 ilustra mejor el efecto del preparado enzimático sobre estos parámetros y sobre la apariencia del extracto obtenido. La Figura 19.a evidencia cómo la aplicación del tratamiento enzimático permite obtener un extracto más clarificado, con menor contenido de sólidos insolubles y asimismo menor turbidez, con respecto al tratamiento en el cual no se aplicó el preparado enzimático (Figura 19.b). La turbidez de la mayoría de jugos y extractos de frutas es causada principalmente por los polisacáridos presentes en estos productos tales como la pectina. La aplicación de pectinasas -como el preparado enzimático que se aplicó- disminuye el contenido de pectina y por lo tanto se da una reducción de la turbidez (Abdullah *et al.*, 2007).

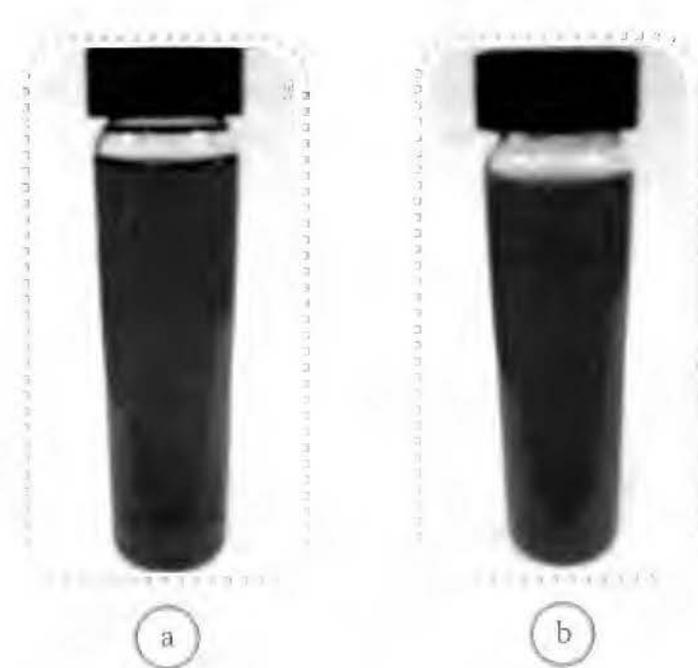


Figura 19. Comparación de la turbidez de dos extractos obtenidos a partir de subproducto industrial de mora: a) extracción con preparado enzimático; b) extracción sin preparado enzimático.

En el Cuadro XII se observa que al aplicar el tratamiento enzimático se da un aumento en la extracción de antocianinas y de elagitaninos. El efecto del tratamiento enzimático sobre la extracción de estos compuestos se debe a la hidrólisis de la pared celular y a la liberación de las antocianinas y elagitaninos desde las vacuolas y apoplastos, además de aquellos que se encuentran asociados a la fibra dietética y a las proteínas, aumentando su disponibilidad en la fase acuosa, ya que son compuestos hidrosolubles (Höhn *et al.*, 2005; Kalt, 2005; Li *et al.*, 2006).

Según las cinéticas que se muestran en las Figuras 20.a y 20.b, conforme aumenta el tiempo de proceso se da un incremento en la extracción de los compuestos fenólicos, tanto antocianinas como elagitaninos ($p < 0,05$). Además, se observó una interacción entre el tiempo y la adición de enzima (Ultrazym® AFP-L), ya que en la curva sin preparado enzimático el aumento de extracción tiende a ser menor con respecto a la curva con tratamiento enzimático (ver Cuadros A-XII y A-XIII, Anexo 10.3). Se observa que en la cinética de extracción de las muestras con adición de enzima, se da un aumento continuo y es significativamente mayor con respecto a las muestras sin enzima ($p < 0,05$), siendo a los

65 min del proceso (60 min de extracción), donde se da la mayor extracción como se muestra en el Cuadro XII (~25 % antocianinas y ~19% elagitaninos).

Cuadro XII. Evaluación del efecto del uso de un preparado enzimático sobre el contenido y extracción de compuestos polifenólicos *.

Parámetro	Tratamiento**	
	Con preparado enzimático	Sin preparado enzimático
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·L ⁻¹)	158 ± 6 ^a	136 ± 4 ^b
Elagitaninos (mg ácido elágico·L ⁻¹)	557 ± 20 ^a	469 ± 27 ^b
Extracción de antocianinas (%)	24,9 ± 0,6 ^a	16,6 ± 0,9 ^b
Extracción de elagitaninos (%)	19,1 ± 0,4 ^a	12,5 ± 0,9 ^b

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (t-Student, p<0,05).

**Condiciones del proceso → Mezclado: T= 50 °C, t= 5 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹. Extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, T= 50 °C, t= 60 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹.

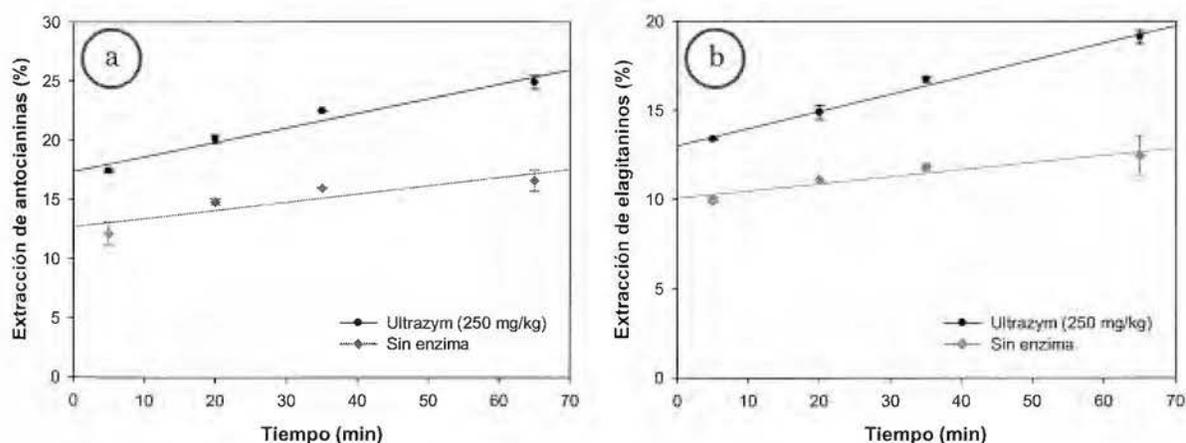


Figura 20. Evaluación del efecto del tratamiento enzimático sobre el porcentaje de extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: T= 50 °C, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) extracción de antocianinas; b) extracción de elagitaninos.

5.3 Selección de la temperatura del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM

Debido a que el preparado enzimático seleccionado, Ultrazym® AFP-L, tiene un rango óptimo de temperatura entre 40 y 60 °C (Novozymes, 2001; Novozymes, 2002), se evaluó el efecto de la temperatura del proceso de extracción acoplado a un tratamiento enzimático.

5.3.1 Metodología

- *Diseño experimental*

Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio, donde los tratamientos correspondían a las diferentes temperaturas (ver Cuadro XIII). La temperatura se evaluó como un factor nominal. Cada tratamiento se realizó con tres repeticiones.

Cuadro XIII. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la temperatura sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Tratamiento	Temperatura (°C)
1	40
2	50
3	60

*La extracción se llevó a cabo con el preparado enzimático comercial Ultrazym® AFP-L, Cn= 250 mg·kg⁻¹, relación agua/sólido= 1,0 g·g⁻¹.

- *Procedimiento*

Igualmente se siguió el procedimiento que se describe con detalle en la sección 6.1.2 con ciertas modificaciones. En los frascos de vidrio se agregaron 250 g del subproducto (SPIM) y 250 g de agua (relación agua/sólido de 1 g·g⁻¹). Después de transcurrir los primeros 5 min

de mezclado se añadió el preparado enzimático por lo cual se tomaron muestras a los 5, 20, 35 y 65 min de proceso para determinar la extracción de antocianinas y elagitaninos en los extractos (Ecuación 9, sección 6.1.2). A las muestras obtenidas después de los 65 min de extracción, se les determinó el contenido de sólidos solubles (°Brix), acidez titulable, el valor de pH, contenido de antocianinas y elagitaninos, sólidos insolubles en suspensión y turbidez (secciones 4.4.1, 4.4.2 y 5.2.1).

- *Análisis estadístico*

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta y los promedios se compararon (para cada tratamiento) utilizando la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Para las curvas de extracción de los polifenoles se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para diseño factorial con el fin de evaluar la interacción de la temperatura y el tiempo. Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

5.3.2 Resultados

Según los resultados que se muestran en el Cuadro XIV, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos con respecto a los promedios de sólidos solubles (°Brix), pH y turbidez. Se puede observar que con el tratamiento a 60 °C se obtuvo un extracto con un mayor contenido de sólidos solubles (°Brix), posiblemente por una hidrólisis térmica de los polisacáridos en azúcares libres; además pudo ocurrir un ablandamiento de las células propiciando la liberación de azúcares y ácidos.

Asimismo, el extracto obtenido a 60 °C presentó una mayor turbidez con respecto a los otros extractos, como se aprecia en el Cuadro XIV. Este aumento de la turbidez puede explicarse debido a la mayor liberación de partículas insolubles provenientes de la superficie de las semillas, debido a una mayor hidrólisis térmica cuando la temperatura del tratamiento se incrementa.

Cuadro XIV. Evaluación del efecto del uso de la temperatura sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Parámetro	Tratamiento**		
	40 °C	50 °C	60 °C
Sólidos solubles (°Brix)	2,18 ± 0,01 ^b	2,14 ± 0,01 ^b	2,32 ± 0,06 ^a
pH	3,09 ± 0,04 ^b	3,142 ± 0,001 ^b	3,173 ± 0,001 ^a
Acidez (g·100 g ⁻¹)	0,65 ± 0,02 ^a	0,678 ± 0,006 ^a	0,67 ± 0,02 ^a
Sólidos insolubles en suspensión, SIS (g·100 g ⁻¹)	0,89 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	0,85 ± 0,09 ^a
Turbidez (NTU)	34 ± 14 ^b	72 ± 35 ^b	141 ± 32 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). **Condiciones del proceso → Mezclado: t= 5 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹. Extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, t= 60 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹.

Al evaluar el efecto de la temperatura sobre la extracción de los compuestos fenólicos, se puede notar en las Figuras 21.a y 21.b que conforme aumenta el tiempo se incrementa el porcentaje de extracción de antocianinas y elagitaninos, respectivamente (p<0,05); sin embargo a 40 °C se da el menor porcentaje de extracción de estos compuestos a lo largo del tiempo (p<0,05). Además, se observó una interacción entre el tiempo y la temperatura (ver Cuadros A-XXIII y A-XXIV, Anexo 10.4) ya que la extracción a 40 °C se mantuvo casi constante a lo largo del tiempo de proceso. Por otra parte, el comportamiento de la cinética de extracción a 60 °C y 50 °C fue muy similar; se observa que a estas temperaturas se da un mayor incremento del porcentaje de extracción de las antocianinas y elagitaninos conforme aumenta el tiempo del proceso, esto con respecto a la extracción a 40 °C.

A los 60 min de extracción, no se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de extracción de elagitaninos y antocianinas, tanto a 50 °C como a 60 °C. Sin embargo, a la temperatura de 60 °C, la concentración de elagitaninos y antocianinas en el extracto fue significativamente mayor (p<0,05) como se muestra en el Cuadro XV. Datos similares fueron encontrados por Ghafoor *et al.* (2009), estos autores determinaron una temperatura óptima para la extracción de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante a partir de semilla de uva (*Vitis vinifera*), de 56,03 °C; 60,65 °C y 55,13 °C,

respectivamente. El estudio realizado por Çam y Aaby (2010) encontró que la temperatura tenía, principalmente, un efecto lineal positivo sobre la extracción de los polifenoles, extraídos a partir de residuo de manzana, cuando la relación de agua/sólido era constante; es decir, al aumentar la temperatura, aumentaba de forma lineal la extracción de los polifenoles totales (Çam & Aaby, 2010).

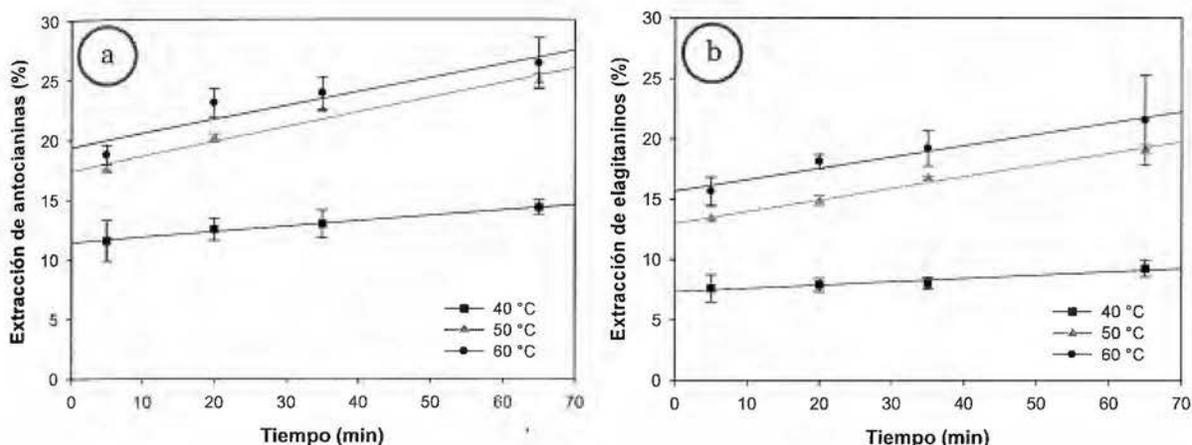


Figura 21. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el porcentaje de extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: Ultrazym®, Cn=250 mg·kg⁻¹, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3): a) extracción de antocianinas; b) extracción de elagitaninos.

Cuadro XV. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el contenido y extracción de compuestos polifenólicos*.

Parámetro	Tratamiento**		
	40 °C	50 °C	60 °C
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·L ⁻¹)	100 ± 2 ^c	158 ± 6 ^b	194 ± 2 ^a
Elagitaninos (mg ácido elágico·L ⁻¹)	296 ± 27 ^c	557 ± 20 ^b	731 ± 123 ^a
Extracción de antocianinas (%)	14,3 ± 0,6 ^b	24,9 ± 0,06 ^a	26 ± 2 ^a
Extracción de elagitaninos (%)	9,2 ± 0,7 ^b	19,1 ± 0,4 ^a	22 ± 4 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). **Condiciones del proceso → Mezclado: t= 5 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹. Extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, t= 60 min, relación agua/sólido= 1 g·g⁻¹.

El alcance de estos procesos de extracción es determinar las condiciones de tratamiento más adecuadas, especialmente el perfil de temperatura (temperatura - tiempo de proceso), de tal forma que se maximice los factores de calidad del producto sometido al tratamiento térmico (ejemplo, retención degradación de los antioxidantes, inactivación microbiológica, entre otros) (Holdsworth & Simpson, 2007). Debido a que el extracto presentó una mayor concentración de elagitaninos al realizar el proceso a 60 °C y esta temperatura está dentro del rango óptimo de acción del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L, se decidió utilizar esta temperatura para realizar los futuros ensayos de extracción.

5.4 Selección del tiempo del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM

Una vez seleccionados el preparado enzimático y la temperatura, se decidió evaluar el efecto del tiempo del proceso de extracción acoplado a un tratamiento enzimático, con el fin de seleccionar un tiempo a utilizar en las pruebas definitivas.

5.4.1 Metodología

- Diseño experimental

Mediante la aplicación de un diseño irrestricto aleatorio, utilizando el preparado Ultrazym® AFP-L a una temperatura de 60 °C y una relación agua/sólido de 2,0 g·g⁻¹ (condiciones del punto central, ver sección 6.1.1), se evaluó el tiempo como un factor nominal con el fin de elegir un tiempo de extracción. Se eligió evaluar tres tiempos para el proceso de extracción, sin tomar en cuenta los primeros 5 min de mezclado (después de los cuales se añade el preparado enzimático): 30 min, 60 min y 120 min, debido a que en las cinéticas se mostró un aumento en el porcentaje de extracción de los compuestos fenólicos al aumentar el tiempo (Figuras 21.a y 21.b). Cada tratamiento se realizó con tres repeticiones. Los distintos tratamientos se muestran en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Diseño experimental para la evaluación del efecto del tiempo sobre la extracción de elagitaninos y antocianinas a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Tratamiento	Tiempo (min)
1	30
2	60
3	120

*La extracción se llevó a cabo con el preparado enzimático comercial Ultrazym® AFP-L, Cn=250 mg·kg⁻¹, T=60 °C, relación agua/sólido= 2,0 g·g⁻¹.

- *Procedimiento*

Se siguió el procedimiento que se describe con detalle en la sección 6.1.2. A los extractos obtenidos en cada tratamiento se les determinó el pH, °Brix, humedad, acidez titulable, concentración de antocianinas y elagitaninos, capacidad antioxidante (ORAC-H) y contenido de polifenoles totales, sólidos insolubles en suspensión y turbidez (secciones 4.4.1 - 4.4.3 y 5.2.1); además se determinó la extracción de antocianinas y elagitaninos (Ecuación 9, sección 6.1.2).

- *Análisis estadístico*

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta y los promedios se compararon (para cada tratamiento) utilizando la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

5.4.2 Resultados

Se evaluaron tres tiempos de extracción con el objetivo de fijar un tiempo para realizar posteriormente la optimización del proceso de extracción con respecto a los factores relación agua/sólido y concentración del preparado enzimático (ver sección 6.2). Como se

muestra en el Cuadro XVII a los 120 min el extracto presentó una mayor acidez con respecto a los otros extractos, y una mayor turbidez, lo cual está asociado a un mayor contenido de SIS extraídos durante el proceso. A un tiempo de 60 min el extracto presentó la menor turbidez y el menor contenido de SIS; además, a este tiempo el extracto obtuvo una mayor concentración de ATCs en base seca y una mayor extracción de estos compuestos como se muestra en el Cuadro XVIII y en la Figura 22, respectivamente. Por otra parte, a pesar de que no se presentaron diferencias significativas en el contenido de ETs entre los diferentes extractos (ver Cuadro XVIII), el porcentaje de extracción de estos compuestos fue significativamente mayor a los 120 min ($p < 0,05$), como se muestra en la Figura 22.

Cuadro XVII. Evaluación del efecto del tiempo sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Parámetro	Tratamiento**		
	30 min	60 min	120 min
Humedad (g·100 g ⁻¹)	98,9 ± 0,0 ^a	98,9 ± 0,0 ^a	98,8 ± 0,0 ^b
Sólidos solubles (°Brix)	1,55 ± 0,08 ^a	1,42 ± 0,09 ^a	1,59 ± 0,09 ^a
pH	3,19 ± 0,02 ^b	3,18 ± 0,01 ^b	3,23 ± 0,01 ^a
Acidez (g·100 g ⁻¹)	0,373 ± 0,004 ^b	0,382 ± 0,001 ^b	0,395 ± 0,006 ^a
Sólidos insolubles en suspensión, SIS (g·100 g ⁻¹)	0,53 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,03 ^b	0,50 ± 0,02 ^{ab}
Turbidez (NTU)	48 ± 9 ^a	32 ± 5 ^b	58 ± 2 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).
 **Condiciones del proceso → Mezclado: t= 5 min, T= 60 °C, relación agua/sólido= 2,0 g·g⁻¹. Extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, T= 60 °C, relación agua/sólido= 2,0 g·g⁻¹.

En cuanto a la capacidad antioxidante, el extracto obtenido a los 30 min presentó el menor valor en base seca; entre los extractos de 60 min y 120 min no se mostraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante ($p > 0,05$). Por otra parte, se observó un aumento significativo en el contenido de polifenoles totales de los extractos conforme aumentaba el tiempo de extracción (ver Cuadro XVIII).

Cuadro XVIII. Evaluación del efecto del tiempo sobre el contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Parámetro	Tratamiento**		
	30 min	60 min	120 min
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·g ⁻¹ , BS)	3,2 ± 0,1 ^b	4,4 ± 0,6 ^a	2,9 ± 0,2 ^b
Elagitaninos (mg ácido elágico·g ⁻¹ , BS)	40 ± 2 ^a	35,7 ± 0,9 ^a	39 ± 3 ^a
Capacidad antioxidante, ORAC-H (μmol equivalentes de trolox·g ⁻¹ , BS)	950 ± 59 ^b	1220 ± 98 ^a	1157 ± 84 ^a
Polifenoles totales (mg ácido gálico·g ⁻¹ , BS)	83 ± 3 ^c	87,3 ± 0,7 ^b	96,8 ± 0,9 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). **Condiciones del proceso → Mezclado: t= 5 min, T= 60 °C, relación agua/sólido= 2,0 g·g⁻¹. Extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, T= 60 °C, relación agua/sólido= 2,0 g·g⁻¹. BS= base seca del extracto.

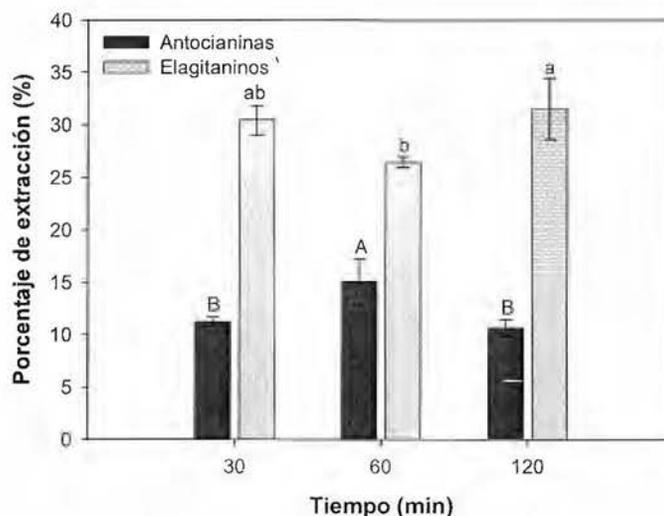


Figura 22. Evaluación del efecto del tiempo sobre la extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: Ultrazym®, Cn= 250 mg·kg⁻¹, T= 60 °C, relación agua/sólido= 2,0 g·g⁻¹), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, n=3). Barras con letras mayúsculas (antocianinas) y letras minúsculas (elagitaninos) diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05).

El estudio realizado por Cisse *et al.* (2012) mostró que el proceso de extracción de antocianinas, a partir de rosa de Jamaica seca, era más eficiente al utilizar temperaturas altas y tiempos cortos de extracción; es decir, la combinación de tiempos bajos y temperaturas altas permitió obtener extractos con una mayor concentración de antocianinas y una mayor capacidad antioxidante (ORAC-H). Al parecer el contenido de antocianinas puede decrecer cuando los tiempos de extracción son prolongados. Un problema común en la optimización de los procesos de extracción es que el tiempo de operación que genere el menor costo difiere del tiempo que proporciona el mejor rendimiento (eficacia). En este caso el tiempo de proceso se convierte en el parámetro independiente cuyo valor determina ambos criterios: costo mínimo y rendimiento máximo. La importancia relativa de los dos criterios contradictorios debe ser juzgada con el fin de obtener un tiempo de extracción factible (Tzia, 2003).

Analizando los resultados obtenidos en el Cuadro XVIII y la Figura 22, se decidió elegir el tiempo de 60 min porque se observa que, a partir de este tiempo, la extracción de los elagitaninos llega a ser constante y más bien se puede dar una degradación de algunos compuestos, como es el caso de las antocianinas, debido a la exposición al calor por un tiempo prolongado como sería 120 min (ver Figura 22). Además, el extracto obtenido a los 60 min presentó el menor contenido de SIS y turbidez (parámetros importantes para el proceso de microfiltración). Aplicar altos tiempos de extracción implica un aumento en el gasto energético y conlleva un mayor tiempo de proceso, por lo cual, de acuerdo con los resultados obtenidos, fijar un tiempo de 1 hora sería lo más recomendable.

5.5 Pruebas para determinar el ámbito de proporción agua/sólido y concentración de enzima para la extracción de polifenoles

Finalmente se evaluaron los puntos axiales del diseño experimental propuesto para el objetivo específico 1, esto con el fin de determinar si el ámbito de variación entre los parámetros a evaluar para la optimización del proceso de extracción producía una diferencia considerable en las principales variables respuestas del estudio. Con estos resultados, se determinó si era posible aplicar la metodología propuesta para el diseño experimental, o por el contrario si ésta requería ser modificada.

5.5.1 Metodología

- *Diseño experimental*

Mediante la aplicación de un diseño irrestricto aleatorio, utilizando el preparado Ultrazym® AFP-L a una temperatura de 60 °C y un tiempo de 60 min, se evaluaron 4 tratamientos (por triplicado), que corresponden a los puntos axiales del diseño experimental propuesto en la sección 6.1.1, cuyas variables son la concentración de preparado enzimático y la proporción de agua/sólido. Los distintos tratamientos se muestran en el Cuadro XIX.

Cuadro XIX. Tratamientos a estudiar para el ajuste del ámbito de variación entre los parámetros a evaluar para la optimización del proceso de extracción.

Tratamiento	Combinaciones de concentración de enzima y proporción agua/sólido
1	Cn= 10 mg·kg ⁻¹ ; agua/sólido= 2,0 g·g ⁻¹
2	Cn= 490 mg·kg ⁻¹ ; agua/sólido= 2,0 g·g ⁻¹
3	Cn= 250 mg·kg ⁻¹ ; agua/sólido= 0,8 g·g ⁻¹
4	Cn= 250 mg·kg ⁻¹ ; agua/sólido= 3,3 g·g ⁻¹

- *Procedimiento*

Se siguió el procedimiento que se describe con detalle en la sección 6.1.2. A los extractos obtenidos en cada tratamiento se les determinó el pH, °Brix, humedad, acidez titulable, concentración de antocianinas y elagitaninos, capacidad antioxidante (ORAC-H) y contenido de polifenoles totales, sólidos insolubles en suspensión y turbidez (secciones 4.4.1 - 4.4.3 y 5.2.1); además se determinó la extracción de antocianinas y elagitaninos (Ecuación 9, sección 6.1.2).

- Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta y los promedios se compararon (para cada tratamiento) utilizando la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

5.5.2 Resultados

Según los resultados que se muestran en los Cuadros XX y XXI y Figura 23, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de todas las variables respuestas analizadas de los extractos obtenidos por los diferentes tratamientos de extracción (puntos axiales), con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro XX. Evaluación del ámbito de proporción agua/sólido y concentración de enzima sobre las propiedades físico-químicas del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Parámetro	Tratamiento**			
	T1: A/S= 2,0 g·g ⁻¹ Cn=490 mg·kg ⁻¹	T2: A/S= 2,0 g·g ⁻¹ Cn=10 mg·kg ⁻¹	T3: A/S= 3,3 g·g ⁻¹ Cn=250 mg·kg ⁻¹	T4: A/S= 0,8 g·g ⁻¹ Cn=250 mg·kg ⁻¹
Humedad (g·100 g ⁻¹)	98,87 ± 0,07 ^b	98,93 ± 0,07 ^b	99,27 ± 0,07 ^a	97,8 ± 0,1 ^c
Sólidos solubles (°Brix)	1,61 ± 0,05 ^b	1,63 ± 0,00 ^b	1,16 ± 0,05 ^c	3,10 ± 0,05 ^a
pH	3,25 ± 0,02 ^b	3,249 ± 0,009 ^b	3,28 ± 0,01 ^a	3,209 ± 0,006 ^c
Acidez (g·100 g ⁻¹)	0,377 ± 0,009 ^b	0,37 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,02 ^c	0,76 ± 0,05 ^a
Sólidos insolubles en suspensión, SIS (g·100 g ⁻¹)	0,59 ± 0,07 ^b	0,70 ± 0,04 ^{ab}	0,56 ± 0,07 ^b	0,83 ± 0,08 ^a
Turbidez (NTU)	32 ± 9 ^c	151 ± 19 ^b	24 ± 1 ^c	196 ± 9 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).

**Condiciones del proceso → Mezclado: t= 5 min, T= 60 °C. Extracción: Ultrazym®, T= 60 °C, t= 60 min.

En cuanto al contenido de sólidos solubles y acidez titulable en los extractos, el tratamiento 3 generó el extracto con menor acidez titulable y °Brix, en contraste con el extracto obtenido del tratamiento 4, el cual presentó el mayor contenido de estos parámetros. Esto

se puede explicar ya que en el T3 la proporción de agua utilizada fue mayor a la de los demás tratamientos, por lo cual se da un efecto de dilución que hace que la concentración de los ácidos y sólidos solubles sea menor. Con respecto a T1 y T2, no se encontraron diferencias significativas en los valores promedio de acidez y °Brix. Estos tratamientos se diferencian en la cantidad de enzima añadida, lo que indica que no hubo un efecto de la concentración de enzima sobre la extracción de estos parámetros.

En cuanto a los parámetros físicos evaluados, los sólidos insolubles en suspensión (SIS) y turbidez, el extracto obtenido mediante T4 presentó la mayor turbidez y el mayor contenido de SIS ($p < 0,05$), seguido del extracto obtenido por el T2. Entre los extractos T1 y T3 no se presentaron diferencias en cuanto a los valores promedios de turbidez y SIS, siendo los que obtuvieron los menores valores de estos parámetros ($p < 0,05$). Los SIS corresponden principalmente a los restos de las paredes de tejidos que contiene el extracto. Estas paredes están principalmente constituidas por polisacáridos parietales como pectinas, celulosa, hemicelulosa, además del compuesto fenólico lignina, y otros constituyentes menores (proteínas estructurales, ácidos fenólicos, taninos, entre otros) (Vaillant *et al.*, 2001; McLellan & Padilla-Zakour, 2005). Con respecto a la turbidez, este parámetro se ha asociado con la cantidad de sólidos insolubles presentes en los jugos y extractos, como lo exponen Vaillant *et al.* (2008). Esta relación se observó en este estudio, ya que los extractos con mayor contenido de SIS presentaron la mayor turbidez y los extractos con menor SIS, la menor turbidez.

En estos parámetros se observó un efecto de la enzima entre T1 y T2, y un efecto de la dilución debido a la proporción de agua añadida entre T3 y T4. En el primer caso, el tratamiento con mayor cantidad de enzima añadida (T1, $C_n = 490 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del preparado Ultrazym® AFP-L) generó un extracto con una turbidez 5 veces menor al de T2. La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular permite que haya una solubilización de los SIS que están en el subproducto de mora y también una disminución de la viscosidad (Höhn *et al.*, 2005). Con respecto al segundo caso, el tratamiento con mayor proporción de agua añadida (T3, A/S= 3,3 agua/1 subproducto) generó un extracto con un contenido de SIS y turbidez 1,5 y 8,1 veces menores al extracto obtenido por T4, respectivamente. Esto se explica por el efecto de dilución ocasionado por la mayor cantidad de agua que se utiliza.

Al evaluar los parámetros de extracción de antocianinas y elagitaninos a partir del SPIM, en la Figura 23 se observa que se extrae una mayor cantidad de polifenoles en el extracto obtenido por T3 y la menor cantidad en el extracto T4. Por otra parte, en el Cuadro XXI se puede observar que T3 generó el extracto con mayor cantidad de polifenoles totales y capacidad antioxidante ($p < 0,05$). El extracto obtenido por T4 presentó el menor contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante. Entre los tratamientos T1 y T2 no hubo diferencias significativas en cuanto a los valores promedio de capacidad antioxidante, polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos ($p > 0,05$).

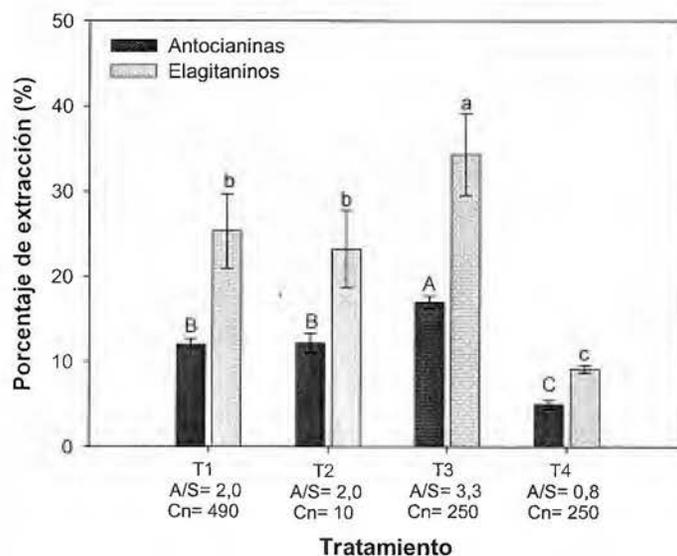


Figura 23. Evaluación del ámbito de proporción agua/sólido ($A/S = g \cdot g^{-1}$) y concentración de enzima ($Cn = mg \cdot kg^{-1}$) sobre la extracción de compuestos polifenólicos (condiciones del proceso de extracción: Ultrazym®, $T = 60 \text{ } ^\circ\text{C}$, $t = 60 \text{ min}$), a partir de subproducto del procesamiento de mora (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n = 3$). Barras con letras mayúsculas (antocianinas) y letras minúsculas (elagitaninos) diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).

Cuadro XXI. Evaluación del ámbito de proporción agua/sólido y concentración de enzima sobre el contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante del extracto clarificado obtenido a partir de un subproducto generado del procesamiento industrial de mora*.

Parámetro	Tratamiento**			
	T1: A/S= 2,0 g·g ⁻¹ Cn=490 mg·kg ⁻¹	T2: A/S= 2,0 g·g ⁻¹ Cn=10 mg·kg ⁻¹	T3: A/S= 3,3 g·g ⁻¹ Cn=250 mg·kg ⁻¹	T4: A/S=0,8 g·g ⁻¹ Cn=250 mg·kg ⁻¹
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·g ⁻¹ , BS)	3,4 ± 0,3 ^{ab}	3,7 ± 0,5 ^a	4,3 ± 0,5 ^a	2,5 ± 0,1 ^b
Elagitaninos (mg ácido elágico·g ⁻¹ , BS)	33 ± 7 ^{ab}	33 ± 7 ^{ab}	40 ± 5 ^a	21 ± 1 ^b
Capacidad antioxidante, ORAC-H (μmol equivalentes de trolox·g ⁻¹ , BS)	1138 ± 25 ^b	1259 ± 56 ^b	1503 ± 89 ^a	936 ± 34 ^c
Polifenoles totales (mg ácido gálico·g ⁻¹ , BS)	85 ± 5 ^b	88 ± 5 ^{ab}	100 ± 8 ^a	63 ± 2 ^c

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05).
**Condiciones del proceso → Mezclado: t= 5 min, T= 60 °C. Extracción: Ultrazym®, T= 60 °C, t= 60 min. BS= base seca del extracto.

Esta prueba permitió analizar los diferentes tratamientos de extracción que corresponden a los puntos axiales del diseño central compuesto (ver sección 6.1.2), en los cuales se aplicaron diferentes combinaciones de concentración del preparado enzimático y distintas proporciones o relaciones de agua/subproducto. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos obtenidos difieren en cuanto a su composición físico-química y a su contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, según el tratamiento aplicado. El extracto T3 presentó bajas concentraciones de sólidos solubles, acidez, sólidos insolubles en suspensión (SIS) y turbidez; el tratamiento T3 permitió obtener un extracto con la mayor concentración de polifenoles y mayor capacidad antioxidante. Los extractos de T1 y T2 presentaron características similares; sin embargo, el primero presentó menor contenido de SIS y turbidez, lo cual es deseable si se realiza posteriormente un proceso de purificación-concentración a través de membranas. Con los resultados obtenidos se decidió mantener los ámbitos de concentración del preparado enzimático y de proporción agua/sólido establecidos, para realizar el objetivo de optimización del proceso de extracción a nivel de laboratorio.

5.6 Conclusiones y recomendaciones

5.6.1 Conclusiones

- La aplicación de un preparado enzimático con actividad pectinolítica y celulolítica permite aumentar la extracción de polifenoles en el extracto así como reducir el contenido de sólidos insolubles en suspensión.
- De acuerdo con el ámbito de temperatura evaluado, se encontró que este parámetro tiene un efecto lineal positivo sobre la extracción de polifenoles, donde la extracción de estos compuestos se ve favorecida cuando la temperatura aumenta.
- De acuerdo con el ámbito de tiempo evaluado, se observó que este parámetro no presentó una tendencia lineal sobre la extracción de polifenoles y otras características físico-químicas evaluadas, siendo 60 min el tiempo de extracción que permitió generar un extracto con las mejores características físico-químicas.

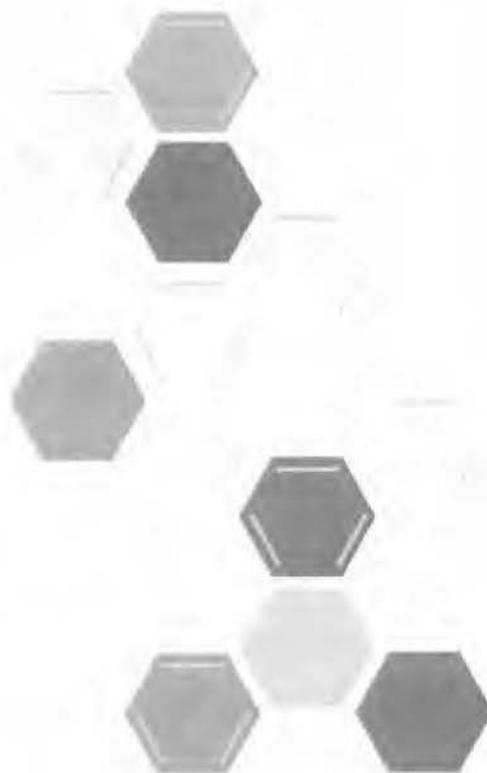
5.6.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar otros parámetros durante la extracción tales como acidificación del medio de extracción, tipo de agitación, uso de mezclas de preparados enzimáticos, entre otros, con el fin de aumentar la extracción de los compuestos polifenólicos.
- Evaluar una etapa u operación previa de ultrasonido para determinar si esta tecnología permite aumentar la extracción de los polifenoles.



VI. Objetivo I

Optimización del proceso de extracción de polifenoles a escala de laboratorio a partir del SPIM, utilizando agua como solvente y acoplado a un tratamiento enzimático, aplicando la metodología de superficie de respuesta



VI. OBJETIVO 1

6.1 Metodología

6.1.1 Diseño experimental

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta, utilizando un diseño central compuesto rotatable (DCCR) de dos factores, con el fin de evaluar el efecto de la concentración del preparado enzimático y de la proporción de agua/sólido, sobre la extracción de elagitaninos y otras características físico-químicas del extracto. Los factores independientes son la concentración del preparado enzimático (10-490 mg·kg⁻¹) y la proporción agua/sólido (0,8-3,3 g agua·g⁻¹ subproducto en base húmeda -BH-), cada uno con cinco niveles codificados como se muestra en el Cuadro XXII.

Cuadro XXII. Variables independientes y los niveles empleados en un diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de elagitaninos a partir de subproducto generado del procesamiento industrial de mora.

Variable independiente	Niveles codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
	Niveles naturales				
Proporción agua/sólido (g agua·g ⁻¹ subproducto, BH)	0,8	1,1	2,0	2,9	3,3
Concentración del preparado enzimático (mg·kg ⁻¹)	10,00	80,29	250,00	419,71	490,00

El número total de los puntos experimentales en un DCCR puede ser calculado utilizando la Ecuación 8:

$$N = 2^k(\text{puntos factoriales}) + 2k(\text{puntos axiales}) + n_0(\text{puntos centrales}) \quad (\text{Ecuación 8})$$

donde:

N: número de los puntos experimentales

k: número de factores independientes del diseño experimental

n₀: número de puntos centrales del diseño experimental

Para este diseño el número de puntos experimentales fue de 12 ($k= 2$; $n_0= 4$). La región de interés, delimitada por el ámbito de proporción agua/subproducto, fue evaluada tomando los puntos axiales del diseño experimental con el fin de observar si el ámbito de variación entre los parámetros producía una diferencia en las principales variables respuestas del estudio (sección 5.5.2). Los experimentos se llevaron a cabo en orden aleatorio para minimizar el efecto de variables no controlables. En el Cuadro XXIII se muestra el diseño experimental de cinco niveles y dos factores.

Cuadro XXIII. Diseño central compuesto rotatable para la optimización del proceso de extracción de elagitaninos a partir de subproducto generado del procesamiento industrial de mora.

Ensayo		Variables	
Orden estándar	Orden aleatorio	Concentración del preparado enzimático ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Proporción agua/sólido ($\text{g agua}\cdot\text{g}^{-1}$ subproducto BH)
1	3	80,29 (-1)	1,1 (-1)
2	1	80,29 (-1)	2,9 (+1)
3	6	419,71 (+1)	1,1 (-1)
4	2	419,71 (+1)	2,9 (+1)
5	4	250 (0)	2,0 (0)
6	5	250 (0)	2,0 (0)
7	11	10 (-1,414)	2,0 (0)
8	9	490 (+1,414)	2,0 (0)
9	10	250 (0)	0,8 (-1,414)
10	8	250 (0)	3,3 (+1,414)
11	7	250 (0)	2,0 (0)
12	12	250 (0)	2,0 (0)

6.1.2 Procedimiento

- Extracción

Para realizar la optimización de la extracción de los polifenoles se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 900 mL, en los cuales se agregó el SPIM y agua (destilada) para

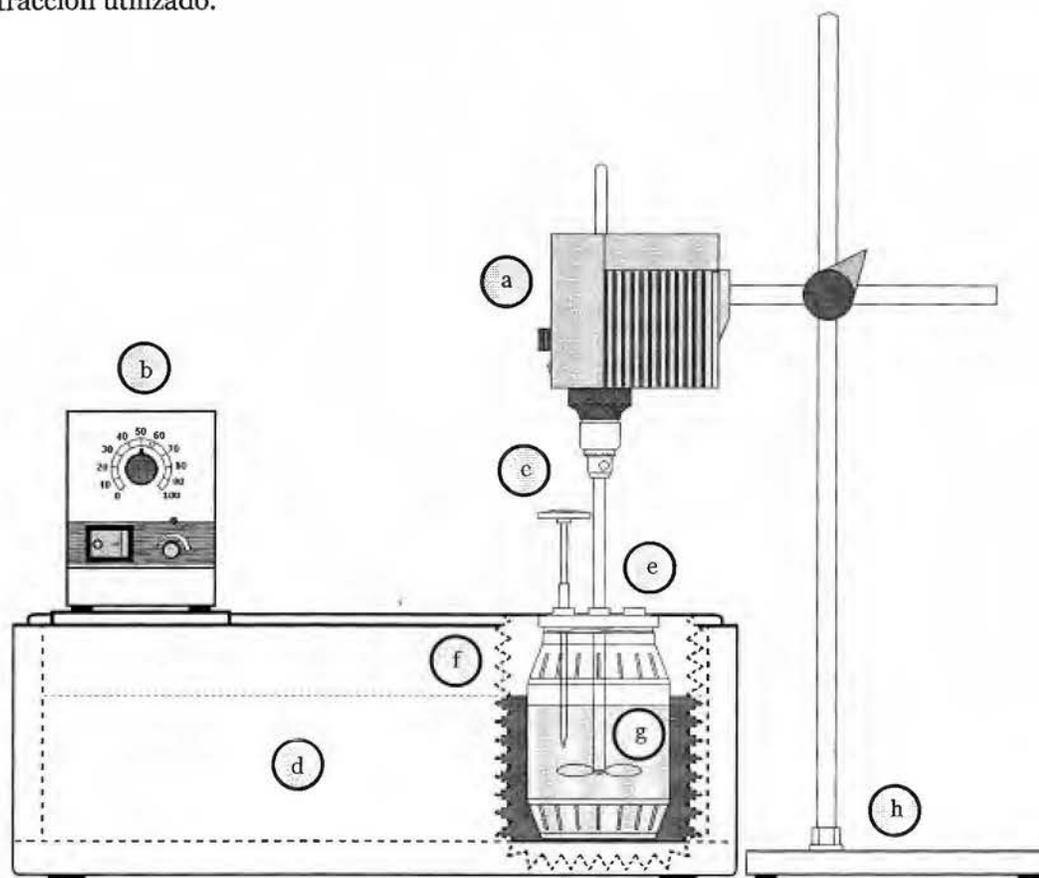
llegar a un volumen de ~600 mL en el frasco (ver Cuadro XXIV). Se utilizó un baño de agua caliente para tener una temperatura constante de 60 °C durante la extracción. Antes de introducir los frascos en el baño de agua caliente se realizó un precalentamiento del subproducto para que alcanzara una temperatura de ~35 °C. Luego se agregó el agua a una temperatura entre 70-80 °C (según la cantidad de agua definida en el diseño). Los frascos se introdujeron en el baño de agua caliente y se realizó un mezclado durante 5 min para que se alcanzara la temperatura de operación de 60 °C. Se eligió esta temperatura de acuerdo con los resultados de las pruebas preliminares (ver sección 5.3.2). Finalizados los 5 min del mezclado se agregó el preparado enzimático Ultrazym® AFP-L (Novozymes, USA) según la concentración correspondiente de cada ensayo (siempre se agregó 1 mL de la solución del preparado enzimático según la concentración, para mantener el mismo volumen).

Cuadro XXIV. Masa de subproducto (SPIM) y de agua para obtener un volumen de 600 mL en los frascos utilizados durante los ensayos de extracción.

Ensayo		Masa de SPIM (base húmeda) (g)	Masa de agua (g)	Volumen total (mL)
Orden estándar	Orden aleatorio			
1	3	298,0	339,9	600
2	1	159,0	460,9	600
3	6	298,0	339,9	600
4	2	159,0	460,9	600
5	4	207,5	419,1	600
6	5	207,5	419,1	600
7	11	207,5	419,1	600
8	9	207,5	419,1	600
9	10	364,5	281,5	600
10	8	145,0	473,7	600
11	7	207,5	419,1	600
12	12	207,5	419,1	600

Los experimentos se llevaron a cabo con agitación constante, utilizando un agitador mecánico con una propela de hélice (IKA, modelo RW 20.n, Alemania) a 200 rpm. El tiempo de extracción se determinó de acuerdo con los resultados de las pruebas

preliminares (60 min, sin tomar en cuenta los primeros 5 min de mezclado inicial, ver sección 5.4.2). En la Figura 24 se muestra un diagrama esquemático del sistema de extracción utilizado.



- | | |
|---|---|
| a. Agitador mecánico con propela de hélice. | e. Frasco de vidrio. |
| b. Controlador de temperatura. | f. Nivel de agua en el baño. |
| c. Termómetro de espiga. | g. Mezcla de subproducto de mora (SPIM) y agua. |
| d. Baño de agua caliente. | h. Soporte del agitador. |

Figura 24. Esquema del sistema de extracción de elagitaninos, a nivel de laboratorio.

- Separación y centrifugación del extracto

Una vez finalizado el tiempo de extracción el producto se enfrió inmediatamente hasta una temperatura de 30 °C en un baño de agua con hielo. Una vez alcanzada la temperatura se procedió a realizar la separación del extracto del SPIM mediante un prensado, para realizar esto la muestra se colocó dentro de una pequeña manta en un recipiente perforado

que facilitó la salida del extracto. Para el prensado se utilizó el analizador de textura (Stable Micro Systems, TA.XT Plus, USA), cuyo sistema funciona por medio del software Texture Exponent. Se utilizó una celda con un diámetro de 100 mm, que comprimía la muestra, simulando las condiciones del prensado, a una fuerza de 50 kg equivalente a una presión de 0,0064 kg·mm⁻² durante 60 s. El extracto obtenido se recolectó en una bandeja de metal y fue pesado para medir la cantidad de extracto obtenido de cada ensayo.

Finalmente el extracto se centrifugó a 3900 x g por 20 min a una temperatura de 30 °C, utilizando una centrífuga (Hermle, modelo Z-300, Alemania). La centrifugación simuló el efecto de la microfiltración tangencial, al eliminar los sólidos en suspensión, pudiendo obtener las concentraciones de los compuestos de interés en los productos que simulan un permeado obtenido a partir de la MF tangencial. Las muestras centrifugadas se empacaron en bolsas laminadas, las cuales de inmediato se sellaron y almacenaron a -20 °C hasta sus análisis químicos. Las muestras luego se descongelaron a temperatura de refrigeración (5 °C) para determinar la humedad, pH, sólidos solubles, acidez titulable, concentración de elagitaninos totales y antocianinas totales por HPLC-DAD, ORAC-H y polifenoles totales (ver secciones 4.4.1 - 4.4.3). La turbidez de las muestras se midió antes de congelarlas (ver sección 5.2.1). La Figura 25 muestra el flujo de proceso para el proceso de extracción.

- Extracción de elagitaninos y antocianinas

Para determinar el porcentaje de extracción de elagitaninos y antocianinas durante el proceso de extracción se estimó la concentración de los componentes tanto en el subproducto (materia prima) como en el extracto líquido. Para calcular el porcentaje de extracción se utilizó la Ecuación 9:

$$E_i = \left(\frac{C_{iex} \times \frac{m_{ex}}{m_s}}{C_{is}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

donde:

E_i = extracción del compuesto de interés (elagitaninos, antocianinas) (%)

C_{iex} = concentración del compuesto de interés en el extracto líquido (mg del compuesto·g⁻¹ de extracto líquido, BH)

C_{is} = concentración del compuesto de interés en el subproducto (mg del compuesto·g⁻¹ de subproducto, BH). Se obtiene analíticamente mediante una extracción acetona:agua (70:30)

m_{ex} = masa del extracto líquido obtenido

m_s = masa del subproducto utilizado en la extracción (en el punto experimental)

Subproducto del procesamiento industrial de mora (SPIM)

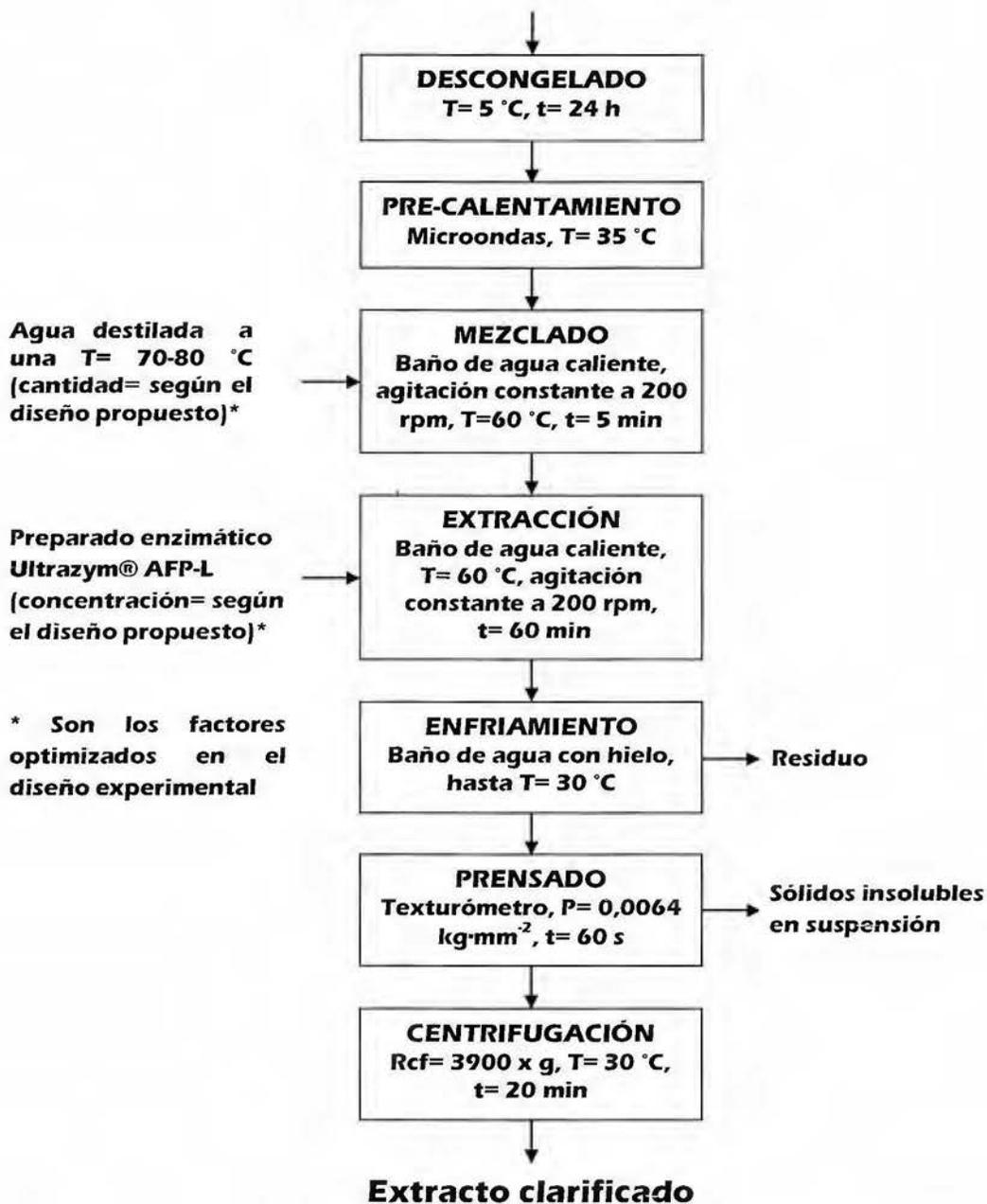


Figura 25. Flujo de proceso para la obtención de un extracto clarificado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de laboratorio.

- *Verificación de las condiciones óptimas de extracción obtenidas del modelo*

Para verificar las condiciones del punto óptimo de los modelos matemáticos obtenidos del DCCR, se llevaron a cabo tres ensayos adicionales en este punto. Se siguió la misma metodología de extracción-prensado-centrifugado anteriormente mencionada. Se compararon los resultados obtenidos experimentalmente con los predichos por los modelos matemáticos generados. El criterio principal fue el porcentaje de extracción y contenido de elagitaninos y antocianinas; sin embargo, se tomaron en cuenta las características físico-químicas determinadas para el producto (°Brix, acidez, polifenoles totales, capacidad antioxidante, turbidez y sólidos insolubles en suspensión).

6.1.3 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos de la optimización de la extracción de polifenoles se generaron las superficies de respuesta utilizando el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA), con el fin de estimar el modelo que mejor se ajustara a los datos obtenidos. La designación de los puntos experimentales, aleatorización, análisis de varianza, y las representaciones gráficas fueron llevadas a cabo por el programa Statistica 7 (Statsoft®, USA). Para determinar si los modelos matemáticos generados para cada variable respuesta tenían un buen ajuste y eran significativos se tomó en cuenta el coeficiente de determinación (R^2), R^2 ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y la distribución de residuos. Con respecto a la verificación, para determinar que el modelo del diseño era adecuado, el valor predicho por el modelo debía encontrarse dentro del intervalo de confianza de los valores promedios obtenidos experimentalmente en el punto óptimo, según cada variable respuesta.

6.2 Resultados

Una vez seleccionadas las condiciones de temperatura y tiempo de extracción, además del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L como el más adecuado para el proceso de extracción de polifenoles a partir del subproducto de mora, se optimizó este proceso con respecto a las dos variables independientes o factores, concentración del preparado y relación agua/sólido. Para esto se aplicó la metodología de superficie de respuesta

empleando un diseño central compuesto rotatable (DCCR). Las condiciones del proceso de extracción fueron optimizadas en función del contenido de elagitaninos (ETs) y antocianinas (ATCs), extracción de ETs y ATCs, sólidos insolubles en suspensión, turbidez, sólidos solubles y acidez titulable. También se evaluaron otras características como contenido de humedad, pH, capacidad antioxidante (ORAC-H) y polifenoles totales.

Al aplicar el DCCR se obtiene un polinomio de segundo orden de la forma $Y = \beta_0 + \beta_1 * Cn + \beta_{11} * Cn^2 + \beta_2 * A/S + \beta_{22} * A/S^2 + \beta_{12} * Cn * A/S$ que fue ajustado a los datos obtenidos de las diferentes variables respuesta evaluadas, donde Y representa el valor de cada uno de los diferentes parámetros evaluados como respuesta, β_k los coeficientes de regresión del modelo, y Cn y A/S la concentración del preparado enzimático y la relación agua/sólido, respectivamente, como variables independientes. Los resultados obtenidos de los diferentes parámetros evaluados se muestran en el Cuadro XXV.

Cuadro XXV. Influencia de la concentración del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L (Cn enzima) y de la relación agua/sólido (A/S) en el proceso de extracción (T= 60 °C, t= 60 min) a nivel de laboratorio según el DCCR, sobre algunas características físico-químicas del extracto.

Variables independientes*		Variables respuesta**					
x ₁ = Cn enzima	x ₂ = Relación A/S	y ₁ = SIS	y ₂ =Turbidez/ y ₂ transf.= log turbidez	y ₃ = Acidez	y ₄ = Sólidos solubles	y ₅ = ATCs (BS)	y ₆ = ETs (BS)
80,29 (-1)	1,1 (-1)	0,86	191,67 / 2,28	0,566	2,04	2,4	21,9
80,29 (-1)	2,9 (+1)	0,58	40,30 / 1,61	0,289	0,90	4,1	45,2
419,71 (+1)	1,1 (-1)	0,68	56,23 / 1,75	0,574	2,00	2,3	25,0
419,71 (+1)	2,9 (+1)	0,56	17,30 / 1,24	0,286	1,13	4,8	44,3
10 (-1,414)	2,0 (0)	0,66	154,33 / 2,19	0,359	1,63	3,7	32,5
490 (+1,414)	2,0 (0)	0,52	33,33 / 1,52	0,383	1,65	3,4	32,5
250 (0)	0,8 (-1,414)	0,84	206,00 / 2,31	0,746	3,13	2,5	21,5
250 (0)	3,3 (+1,414)	0,50	22,77 / 1,36	0,256	1,21	4,3	39,6
250 (0)	2,0 (0)	0,54	27,33 / 1,44	0,379	1,40	4,3	34,1
250 (0)	2,0 (0)	0,48	27,27 / 1,44	0,382	1,33	4,8	34,6
250 (0)	2,0 (0)	0,48	36,80 / 1,57	0,382	1,50	4,6	35,4
250 (0)	2,0 (0)	0,46	31,17 / 1,49	0,380	1,44	4,9	34,2

*Cn enzima= mg.kg⁻¹; Relación A/S= g.g⁻¹. **Variables respuesta: SIS (sólidos insolubles en suspensión)= g.100 g⁻¹; Turbidez= NTU; log turbidez (logaritmo de turbidez)= NTU; Acidez= g.100 g⁻¹; Sólidos solubles= °Brix; ATCs (contenido de antocianinas)= mg cianidina-3-glucósido.g⁻¹ en base seca; ETs (contenido de elagitaninos)= mg ácido elágico.g⁻¹ en base seca. BS= base seca del extracto.

Cuadro XXV. Influencia de la concentración del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L (Cn enzima) y de la relación agua/sólido (A/S) en el proceso de extracción (T= 60 °C, t= 60 min) a nivel de laboratorio según el DCCR, sobre algunas características físico-químicas del extracto (*continuación*).

Variables independientes*		Variables respuesta**				
x ₁ = Cn enzima	x ₂ = Relación A/S	y ₇ = Extracción de ATCs	y ₈ = Extracción de ETs	y ₉ = ORAC-H (BS)	y ₁₀ = PT (BS)	y ₁₁ = pH
80,29 (-1)	1,1 (-1)	6,2	12,2	921	74,2	3,19
80,29 (-1)	2,9 (+1)	15,6	37,2	1515	100,3	3,23
419,71 (+1)	1,1 (-1)	5,9	14,0	918	71,2	3,15
419,71 (+1)	2,9 (+1)	17,9	36,0	1369	97,9	3,19
10 (-1,414)	2,0 (0)	12,2	23,2	1261	87,6	3,25
490 (+1,414)	2,0 (0)	12,0	25,3	1139	85,0	3,24
250 (0)	0,8 (-1,414)	5,0	9,2	935	63,0	3,21
250 (0)	3,3 (+1,414)	17,0	34,4	1499	99,9	3,27
250 (0)	2,0 (0)	14,7	25,6	1054	87,7	3,19
250 (0)	2,0 (0)	16,5	25,6	1160	86,5	3,18
250 (0)	2,0 (0)	15,7	26,2	1183	87,6	3,18
250 (0)	2,0 (0)	16,7	25,5	1322	86,8	3,19

*Cn enzima= mg·kg⁻¹; Relación A/S= g·g⁻¹. **Variables respuesta: Extracción de ATCs (antocianinas)= %; Extracción de ETs (elagitaninos)= %; ORAC-H (capacidad antioxidante hidrofílica)= μmol equivalentes de trolox ·g⁻¹ en base seca; PT (contenido de polifenoles totales)= mg ácido gálico·g⁻¹ en base seca. BS= base seca del extracto.

El Cuadro XXV muestra los niveles codificados y sin codificar de los factores experimentales. La variable turbidez fue transformada aplicando el logaritmo a los datos crudos obtenidos, con el fin de generar un modelo con mejor ajuste. Los datos de contenido de antocianinas, elagitaninos, polifenoles totales y capacidad antioxidante se reportaron en base seca, las otras variables respuesta se reportaron en base húmeda.

Los parámetros de ajuste y adecuación, coeficiente de determinación (R²) y coeficiente de determinación ajustado (R²-adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y la distribución de residuos se observan en el Cuadro XXVI, para los modelos generados para las variables respuesta analizadas. En los Cuadros A-XLIX al A-LIV (Anexo 10.7) se presenta un resumen del análisis de varianza de los diferentes modelos generados.

A excepción del pH, todos los modelos generados para las variables respuesta presentaron valores de R² y R²-adj cercanos a 0,9; el rango fue de 0,87-0,99 y 0,85-0,99 respectivamente. Los valores R² y R²-adj estuvieron cercanos entre sí, lo que indica que

todos los términos utilizados en los modelos fueron necesarios para construir los modelos correctos. Valores de R^2 mayores a 0,9 o cercanos a este valor indican que los modelos son capaces de explicar un alto porcentaje de las variaciones de los resultados experimentales obtenidos (Çam & Aaby, 2010).

Cuadro XXVI. Parámetros de ajuste y adecuación para evaluar los diferentes modelos generados para las diferentes variables respuesta.

Variabes respuesta*	R^2	R^2 -adj	p del modelo	p de falta de ajuste	Gráfica de residuos
y_1 = SIS	0,93	0,90	0,0003	0,3250	aleatorio
y_2 transformada= log turbidez	0,96	0,94	<0,0001	0,2118	aleatorio
y_3 = Acidez	0,99	0,98	<0,0001	0,0680	aleatorio
y_4 = Sólidos solubles	0,89	0,87	<0,0001	0,0319	aleatorio
y_5 = ATCs (BS)	0,91	0,88	0,0001	0,3540	aleatorio
y_6 = ETs (BS)	0,91	0,89	0,0002	0,2293	aleatorio
y_7 = Extracción de ATCs	0,97	0,96	<0,0001	0,4429	aleatorio
y_8 = Extracción de ETs	0,97	0,96	<0,0001	0,1737	aleatorio
y_9 = ORAC-H (BS)	0,87	0,85	<0,0001	0,8963	aleatorio
y_{10} = PT (BS)	0,99	0,99	<0,0001	0,1082	aleatorio
y_{11} = pH	0,54	0,28	0,1889	0,0023	aleatorio

*Variables respuesta: SIS= sólidos insolubles en suspensión; log turbidez= logaritmo de turbidez; ATCs= contenido de antocianinas; ETs= contenido de elagitaninos; Extracción de ATCs= extracción de antocianinas; Extracción de ETs= extracción de elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= contenido de polifenoles totales. BS= base seca del extracto.

Con respecto a la probabilidad del modelo, solamente el modelo generado para la variable pH no fue significativo ($p > 0,05$). La falta de ajuste para los 11 modelos generados fue insignificante ($p > 0,05$) para SIS, logaritmo de turbidez, acidez, contenido y extracción de ATCs, contenido y extracción de ETs, ORAC-H y PT; esto implica que los modelos podrían describir la variación de los datos experimentales. Los modelos generados para sólidos solubles y pH presentaron una falta de ajuste ($p < 0,05$), por lo cual fue importante analizar en conjunto los otros parámetros (R^2 , R^2 -adj, p y residuos) para evaluar la adecuación de estos modelos. Las gráficas de residuos versus los valores predichos de todas las diferentes variables respuesta (Figura 26) mostraron que los residuos estaban dispersos aleatoriamente, lo que indica la adecuación de los modelos (Myers *et al.*, 2009).

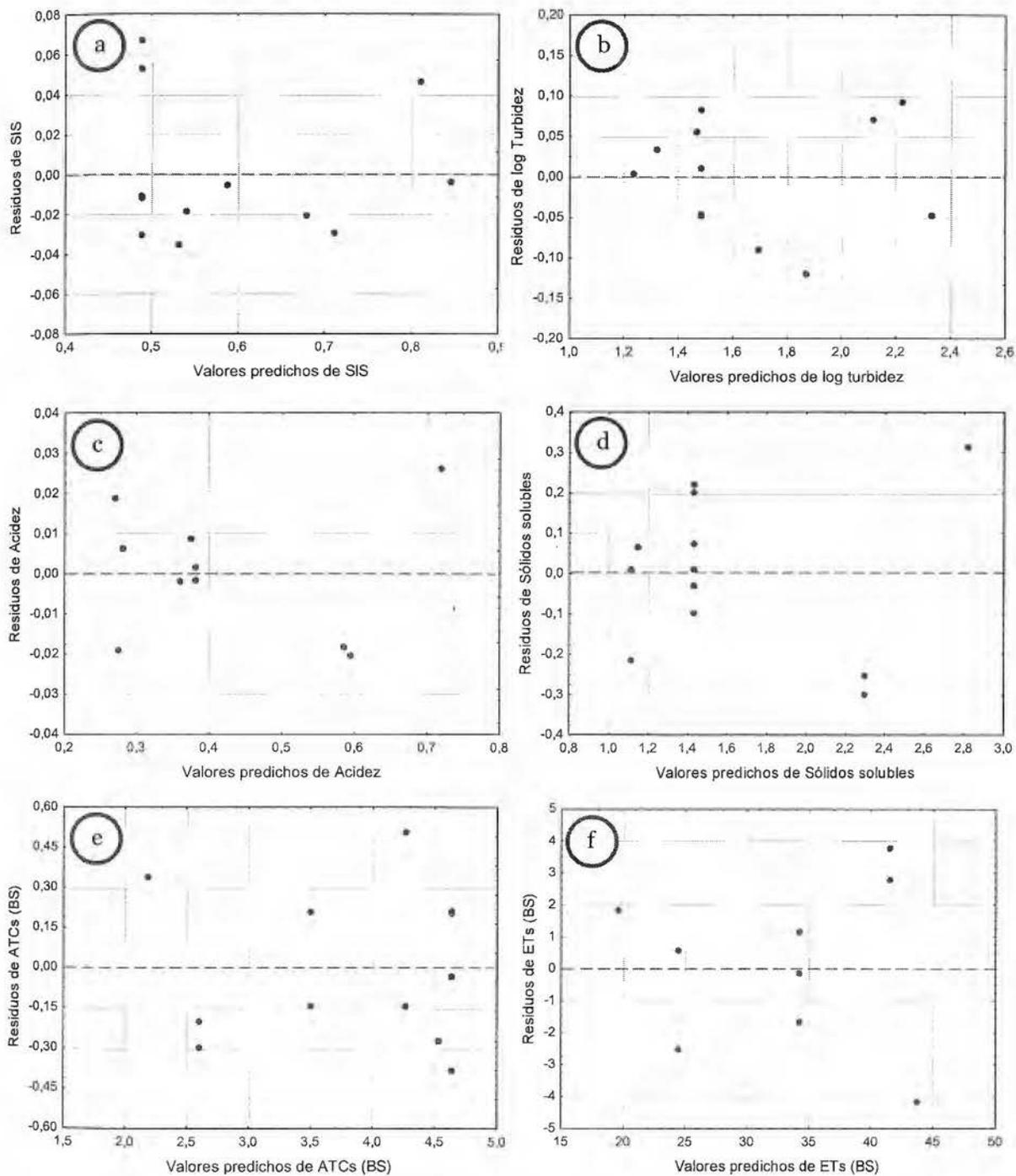


Figura 26. Gráfica de residuos (residuos versus valores predichos) de los modelos generados: a) sólidos insolubles en suspensión; b) log de turbidez; c) acidez; d) sólidos solubles; e) contenido de antocianinas (base seca); f) contenido de elagitaninos (base seca).

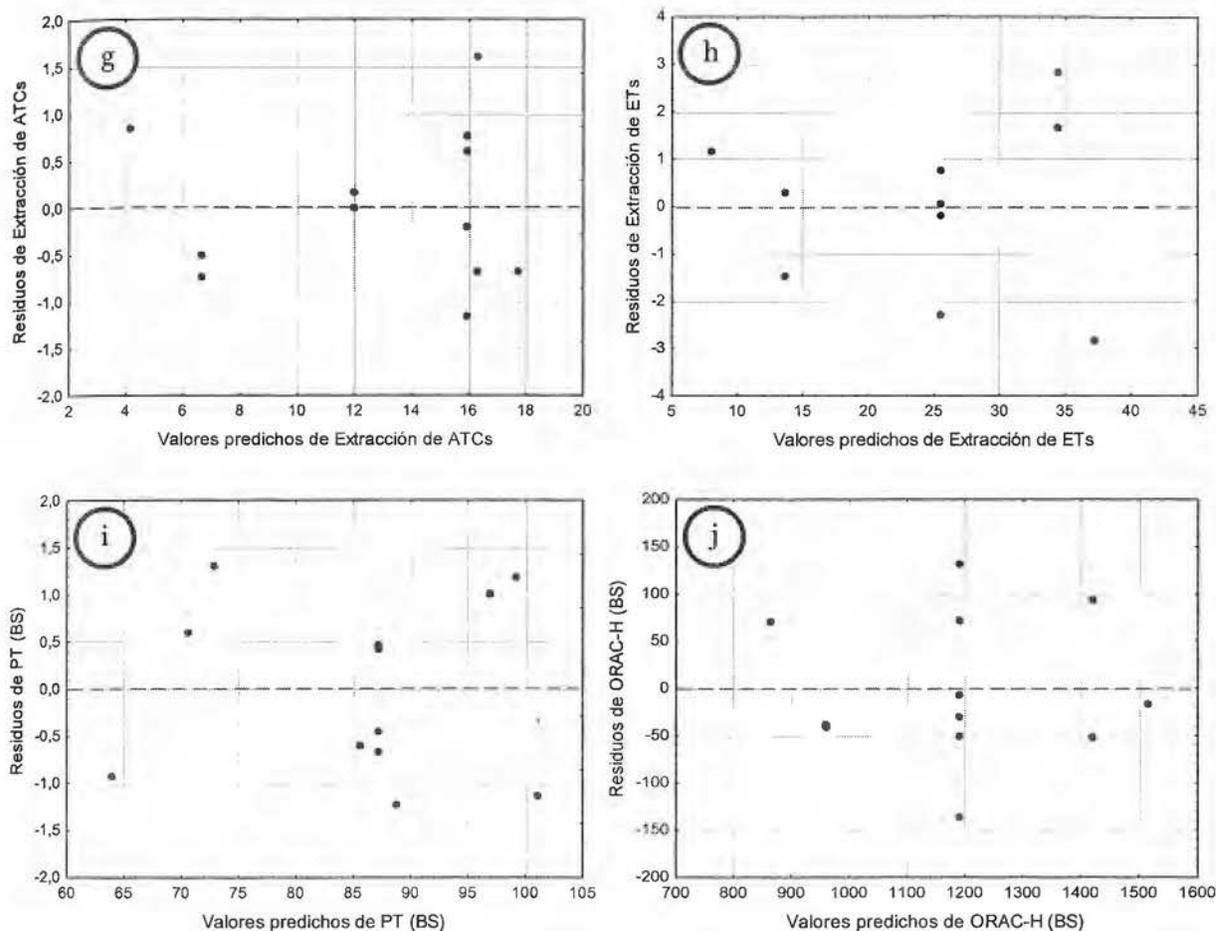


Figura 26. Gráfica de residuos (residuos versus valores predichos) de los modelos generados (*continuación*): g) extracción de antocianinas; h) extracción de elagitaninos; i) polifenoles totales (base seca); j) capacidad antioxidante hidrofílica (base seca).

- *Sólidos insolubles en suspensión y turbidez*

De acuerdo con los datos del Cuadro XXV se observó una diferencia de 0,38 g·100 g⁻¹ de muestra en el contenido de SIS y de 1,07 unidades en el log de turbidez (que corresponde a una diferencia en la turbidez de 188,7 NTU) entre los extractos obtenidos de los diferentes puntos experimentales. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron de 93 % y 96 % para los modelos de regresión de SIS y log turbidez, respectivamente (Cuadro XXVI). Para ambos modelos la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) y la regresión sí lo fue, $p = 0,0003$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

Cuanto más cercano sea el valor de R^2 a 1, el modelo obtenido se ajusta mejor a los datos experimentales; por el contrario, entre más pequeño sea éste, menos relevancia tienen las variables independientes en la explicación del comportamiento de la variación en la respuesta (Sin *et al.*, 2006). En el presente estudio, se consideró aceptable un R^2 mayor a 85 %, indicando que el modelo de la regresión explicó bien los cambios observados. A continuación se muestran las ecuaciones de los modelos generados para estas variables respuesta (Ecuaciones 10 y 11), para lo cual solo se tomaron en cuenta los coeficientes de los parámetros que fueron significativos ($p < 0,05$). En el Cuadro A-LV (Anexo 10.7) se detalla la probabilidad de los coeficientes de regresión obtenidos para cada modelo, según la variable respuesta.

$$\text{SIS} = 0,4894 - 0,0491 * C_n + 0,0605 * C_n^2 - 0,1111 * A/S + 0,0996 * A/S^2 \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$\log \text{ turbidez} = 1,4830 - 0,2301 * C_n + 0,1547 * C_n^2 - 0,3177 * A/S + 0,1446 * A/S^2$$

(Ecuación 11)

Los factores concentración del preparado enzimático y la relación agua/sólido afectaron significativamente el contenido de SIS y la turbidez de los extractos obtenidos en términos lineales y cuadráticos; además, no se presentó una interacción de los efectos lineales de los dos factores en ambas variables respuesta. Como se muestran en las Ecuaciones 10 y 11, los términos lineales fueron negativos y los términos cuadráticos fueron positivos para ambos factores. En el caso de los términos lineales, la relación agua/sólido fue el factor que ejerció el mayor efecto. Por otra parte, en los términos cuadráticos, la concentración de enzima y la relación agua/sólido tuvieron un mayor efecto sobre el log de turbidez y los SIS, respectivamente.

En las Figuras 27.a y 27.b se observa el efecto de las condiciones del proceso de extracción sobre el contenido de SIS y turbidez del extracto obtenido a partir del SPIM, respectivamente, donde se aprecia que ambas variables disminuyeron al aumentar la relación A/S. También se nota, principalmente en la variable turbidez, que el aumento de la concentración del preparado enzimático provoca una reducción en este parámetro.

En los jugos y extractos de mora y de otros frutos tipo baya, la turbidez y el contenido de SIS se deben principalmente a los polisacáridos parietales (pectina, celulosa, hemicelulosa), partículas proteicas y otros polímeros y restos celulares que se encuentran

suspendidos en la matriz líquida (Landbo & Meyer, 2004; Wang *et al.*, 2009). El aumento de la relación A/S implica una mayor cantidad de agua que se utiliza durante la extracción por lo que se da un efecto de dilución de la turbidez y los SIS. Por otra parte, durante el proceso de extracción se da una liberación de partículas de las paredes celulares y la lamela media presentes en el SPIM que provoca la turbidez en el extracto; sin embargo, la aplicación de un preparado enzimático como el Ultrazym® AFP-L, con actividad pectinolítica y celulolítica, ocasiona una hidrólisis de la pectina y celulosa y una consecuente depolimerización, es decir, una disminución del tamaño de las partículas gruesas e insolubles, formándose sólidos de menor tamaño y solubles. Además, se da una repulsión entre las cargas de las partículas de las moléculas generadas evitando que se de una aglomeración (Pinelo *et al.*, 2010).

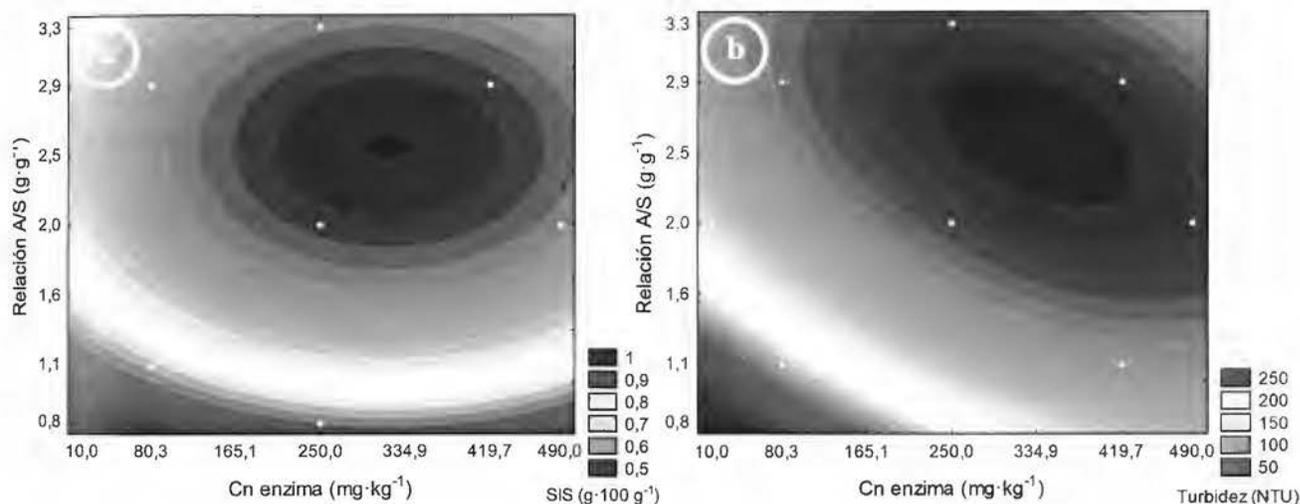


Figura 27. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) sólidos insolubles en suspensión (SIS); b) turbidez.

En el caso de estas dos variables respuesta se puede encontrar una zona óptima donde se combinan los niveles de los factores relación A/S y concentración de enzima, en este caso fueron entre 2,0-3,3 g·g⁻¹ y 250-420 mg·kg⁻¹, respectivamente. En esta zona óptima se minimiza el contenido de SIS y los valores de turbidez en el extracto, características que son deseables ya que el extracto posteriormente es clarificado, a nivel de planta piloto, mediante microfiltración tangencial (ver sección 7.1.2).

- *Acidez y sólidos solubles*

Se observó una diferencia de 0,49 g·100 g⁻¹ de muestra en el contenido de acidez titulable y de 2,23 °Brix de sólidos solubles entre los extractos obtenidos de los diferentes puntos experimentales. Según el Cuadro XXVI, los coeficientes de determinación (R²) fueron de 99 % y 89 % para los modelos de regresión de acidez y sólidos solubles, respectivamente. Para el modelo de acidez titulable la falta de ajuste no fue significativa (p>0,05); por el contrario, sí fue significativa para el de sólidos solubles (p=0,0319). Por otra parte, la regresión de los modelos sí fue significativa, con una p<0,0001 para ambos.

En las ecuaciones 12 y 13 se muestran los modelos generados para estas variables respuestas. Para el modelo de sólidos solubles se tomaron en cuenta sólo los coeficientes de los parámetros que fueron significativos (p<0,05); con respecto al modelo de acidez se incluyeron los parámetros que tuvieron una significancia menor al 10 % (p<0,1). En el Cuadro A-LV (Anexo 10.7) se detalla la probabilidad de los coeficientes de regresión obtenidos para cada modelo.

$$\text{Acidez} = 0,3807 + 0,0050 * C_n - 0,0066 * C_n^2 - 0,1572 * A/S + 0,0583 * A/S^2$$

(Ecuación 12)

$$\text{Sólidos solubles} = 1,4292 - 0,5905 * A/S + 0,276 * A/S^2$$

(Ecuación 13)

El factor relación agua/sólido afectó significativamente el contenido de acidez y sólidos solubles de los extractos obtenidos en términos lineales y cuadráticos; mientras que la concentración de enzima solamente afectó significativamente el contenido de acidez (p<0,1) en términos lineales y cuadráticos. Como se muestran en las Ecuaciones 12 y 13, para el factor relación A/S, los términos lineales fueron negativos y los términos cuadráticos fueron positivos para ambas variables respuesta. Para ambos modelos los términos lineales de relación A/S ejercieron el mayor efecto.

En las Figuras 28.a y 28.b se observa que la acidez y los sólidos solubles (°Brix) del extracto, respectivamente, disminuyeron al aumentar la relación A/S. En el caso de estas dos variables respuesta no se puede encontrar una zona óptima donde se combinen los niveles de los factores relación A/S y concentración de enzima. Sin embargo, para el factor

de relación A/S la región entre los niveles 2,4 y 3,3 g·g⁻¹ fue la zona del diseño experimental en donde el extracto presentó tanto el menor valor de acidez como de °Brix.

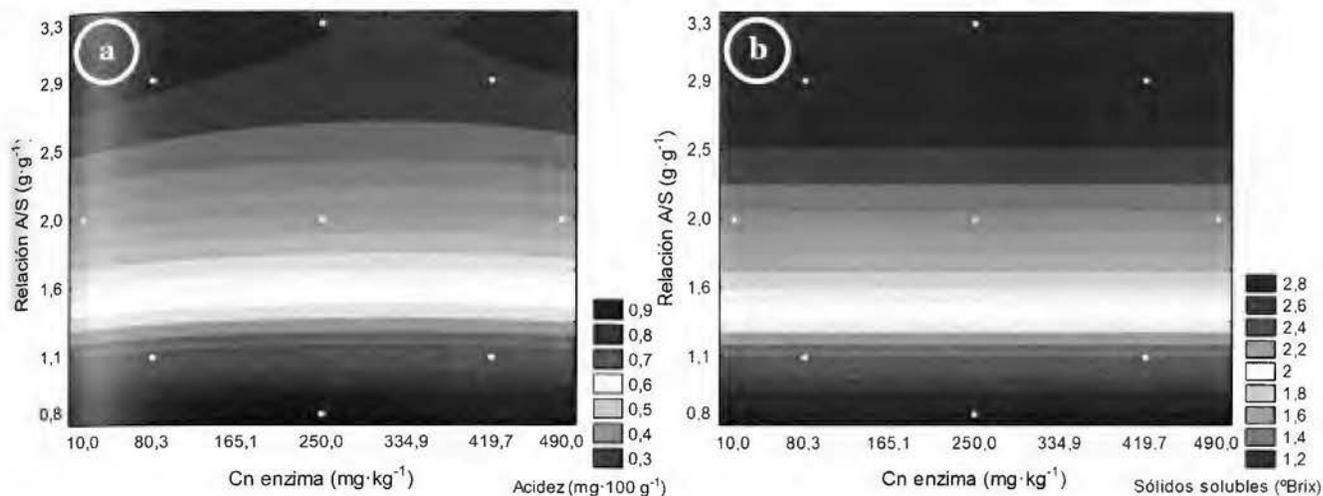


Figura 28. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) acidez; b) sólidos solubles.

- *Contenido de antocianinas y elagitaninos*

De acuerdo con los datos mostrados en el Cuadro XXV, se observó una diferencia de 2,5 mg cianidina-3-glucósido·g⁻¹ de muestra (base seca) en el contenido de antocianinas y de 23,3 mg ácido elágico·g⁻¹ de muestra (base seca) en el contenido de elagitaninos entre los extractos obtenidos de los diferentes puntos experimentales. Según el Cuadro XXVI, los coeficientes de determinación (R²) fueron de 91 % para los modelos de regresión en ambas variables respuesta. Para ambos modelos la falta de ajuste no fue significativa (p>0,05) y la regresión sí lo fue, p=0,0001 y p=0,0002, respectivamente. A continuación se muestran las ecuaciones de los modelos generados para estas variables respuestas (Ecuaciones 14 y 15), para lo cual solo se tomaron en cuenta los coeficientes de los parámetros que fueron significativos (p<0,05).

$$\text{ATCs (BS)} = 4,6399 - 0,5694 * \text{Cn}^2 + 0,8289 * \text{A/S} - 0,6404 * \text{A/S}^2 \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$\text{ETs (BS)} = 34,2024 + 8,5347 * \text{A/S} - 1,2590 * \text{A/S}^2 \quad (\text{Ecuación 15})$$

El factor concentración del preparado enzimático afectó de forma cuadrática el contenido de ATCs en los extractos obtenidos; por otra parte, el factor relación A/S afectó de forma lineal y cuadrática el contenido de ATCs y ETs en el extracto. Además, no se presentó una interacción de los efectos lineales de los dos factores en ambas variables respuesta. Como se muestran en las Ecuaciones 14 y 15, el término lineal para el factor relación A/S fue positivo y los términos cuadráticos fueron negativos para ambos factores. Para ambas variables respuesta la relación agua/sólido (término lineal) fue el factor que ejerció el mayor efecto. Por otra parte, en los términos cuadráticos para el contenido de ATCs, la relación agua/sólido tuvo un mayor efecto sobre este parámetro.

En las Figuras 29.a y 29.b se observa el efecto de las condiciones del proceso de extracción sobre el contenido de ATCs y ETs en el extracto, respectivamente. En ambos casos se aprecia que se da un incremento en el contenido de estos compuestos (en base seca) al aumentar la relación A/S. En el caso del contenido de ATCs se puede encontrar una zona óptima donde se combinan los niveles de los factores relación A/S y concentración de enzima, en este caso fueron entre 2,0-3,1 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 165-335 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente; por otra parte al no haber efecto de la concentración de enzima para los ETs no se genera un punto o zona óptima, sin embargo el extracto presentó el mayor contenido de estos compuestos en la región comprendida entre los niveles 2,4- 3,3 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ con respecto al factor relación A/S.

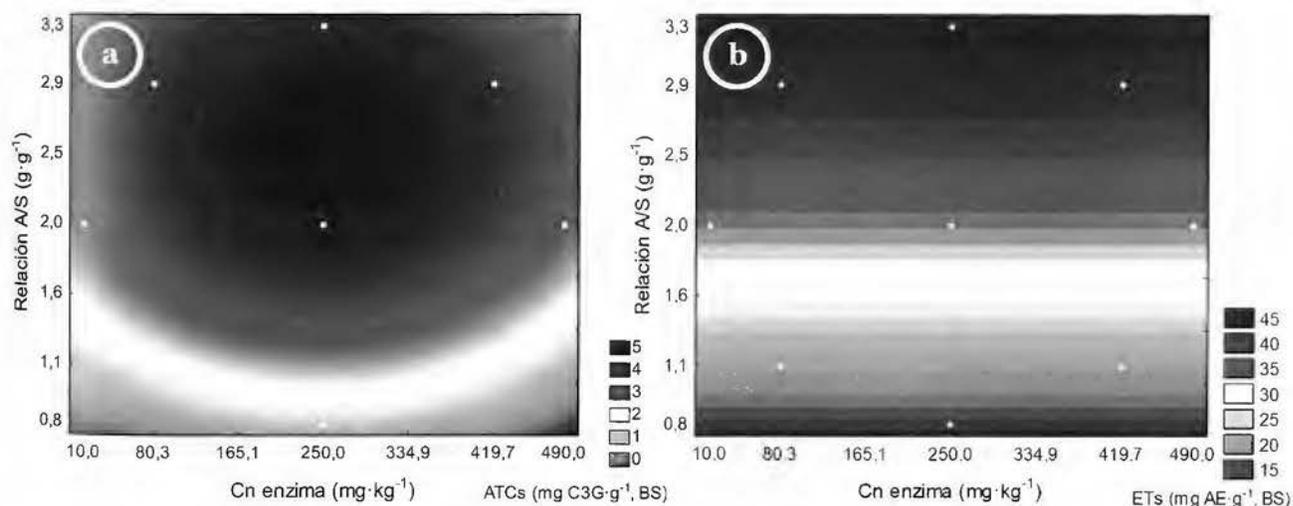


Figura 29. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) contenido de antocianinas (ATCs); b) contenido de elagitaninos (ETs). C3G= cianidina-3-glucósido; AE= ácido elágico; BS= base seca del extracto.

Las antocianinas son moléculas polares, por lo que los solventes comunes más utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona (Kapasakalidis *et al.*, 2006). En este caso el uso de agua como solvente de extracción acoplado a un tratamiento enzimático permitió encontrar una zona óptima de extracción. Las antocianinas se encuentran principalmente en la superficie del fruto, en la cáscara o piel de la planta (dentro de vacuolas) y al estar el SPIM constituido principalmente de semillas, era de esperarse obtener un extracto con un menor contenido de ATCs con respecto a los ETs como se aprecia en la Figura 29.

Con respecto a los elagitaninos, las estructuras de estos compuestos varían desde simples monoésteres a poliésteres complejos. Según Arranz *et al.* (2009), hay una cantidad de polifenoles que permanece en las semillas y residuos gruesos y que corresponden a polifenoles no extraíbles (PNE). Estos PNE son principalmente taninos hidrolizables (ejemplo, elagitaninos) y proantocianidinas, los cuales se encuentran asociados a la fibra dietética y a proteínas; de hecho, se ha informado que algunos elagitaninos podrían estar asociados a los componentes de la pared celular en los tejidos de la madera (Puech *et al.* 1996; Alañón *et al.*, 2011).

En el caso de la mora *R. adenotrichos*, la cianidina-3-glucósido es la antocianina mayoritaria (Mertz *et al.*, 2007; Patras *et al.*, 2010) con un peso molecular bajo ($PM = 449 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) que se encuentra en su forma glucósida (unido a una molécula de azúcar); por otro lado, la lambertianina C ($PM = 2804,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y la sanguíina H-6 ($PM = 1870,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) son los principales ETs y como se aprecia en las Figuras 5 y 6 (sección 3.2.3) presentan estructuras oligoméricas de alto peso molecular. Las características de las antocianinas permiten que estos compuestos sean extraídos más fácilmente y con una menor cantidad de solvente comparado con los ETs, como se aprecia en la Figura 31 (el mayor contenido de ATCs y ETs en el extracto se obtuvo a una relación de A/S de 2,0 y 2,9 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente). Asimismo, la localización de las antocianinas en los tejidos del SPIM posiblemente puede ser más accesible a la acción de las pectinasas presentes en el preparado enzimático utilizado, lo que permite que se haya apreciado el efecto del factor concentración de enzima.

Diferentes estudios han demostrado que las pectinasas aparentemente pueden aumentar la extracción de otros compuestos fenólicos, incluyendo taninos (Sacchi *et al.* 2005); sin embargo, posiblemente sea necesario generar una mayor ruptura del material de las semillas que forman el SPIM para aumentar el área superficial y así exponer los polifenoles que están atrapados en la red de la pared celular o enlazados a otros compuestos poliméricos. Cabe indicar que en esta investigación se evaluó de forma preliminar la molienda del SPIM para aumentar el área superficial pero, debido al contenido significativo de lípidos ($15,3 \pm 0,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ del SPIM, BS), durante la extracción se obtenía un extracto de apariencia lechosa (Figura 30) cuyas características de composición podrían hacer más complejo el proceso de purificación y concentración de los polifenoles.



Figura 30. Comparación de dos extractos obtenidos a partir del suprodueto industrial de mora: a) extracto obtenido del SPIM sin aplicar secado ni molienda; b) extracto obtenido aplicando previamente un secado y una molienda al SPIM.

- *Extracción de antocianinas y elagitaninos*

Los datos del Cuadro XXV indican que se presentó una diferencia de 12,9 % y 26,8 % de extracción de antocianinas y elagitaninos entre los extractos obtenidos de los diferentes puntos experimentales. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron de 97 % para los modelos de regresión de ambas variables respuesta. Para ambos modelos la falta de ajuste

no fue significativa ($p > 0,05$) y la regresión sí lo fue ($p < 0,0001$ en ambas variables respuesta).

Las Ecuaciones 16 y 17 muestran los modelos generados para estas variables respuesta. En el modelo de extracción de ATCs se tomó en cuenta sólo los coeficientes de los parámetros que fueron significativos ($p < 0,05$); para el modelo de extracción de ETs se incluyeron los parámetros con una significancia menor del 10 % ($p < 0,1$). En el Cuadro A-LV (Anexo 10.7) se detalla la probabilidad de los coeficientes de regresión de todos los efectos para cada modelo.

$$\text{Extracción de ATCs} = 15,9088 - 1,9523 * Cn^2 + 4,8024 * A/S - 2,4937 * A/S^2 \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$\text{Extracción de ETs} = 25,4502 + 10,3445 * A/S - 1,4164 * A/S^2 \quad (\text{Ecuación 17})$$

El factor concentración del preparado enzimático afectó significativamente la extracción de ATCs a partir del SPIM de forma cuadrática; por otra parte, el factor relación A/S afectó de forma lineal y cuadrática la extracción de ATCs y ETs. Además, no se presentó una interacción de los efectos lineales de los dos factores sobre ambas variables respuesta. Igual que en las variables anteriores (contenido ATCs y ETs) el término lineal para el factor relación A/S fue positivo y ejerció el mayor efecto, y los términos cuadráticos fueron negativos para ambos factores. Por otra parte, en los términos cuadráticos la relación agua/sólido tuvo un mayor efecto sobre la extracción de ATCs con respecto a la extracción de ETs.

Las Figuras 31.a y 31.b muestran el efecto de los factores Cn de enzima y relación A/S sobre la extracción de ATCs y ETs, respectivamente. Se puede observar en ambas figuras que se da un incremento en la extracción de estos compuestos al aumentar la relación A/S. La combinación de los niveles de los factores relación A/S ($2,4-3,3 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) y concentración de enzima ($123-377 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) permitieron obtener una zona óptima para la extracción de ATCs; por otra parte la región comprendida entre los niveles $2,4$ y $3,3 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ con respecto al factor relación A/S fue la zona donde se dio la mayor extracción de ETs; no se encontró una zona óptima para esta variable ya que el factor concentración de enzima (término lineal y cuadrático) no fue significativo.

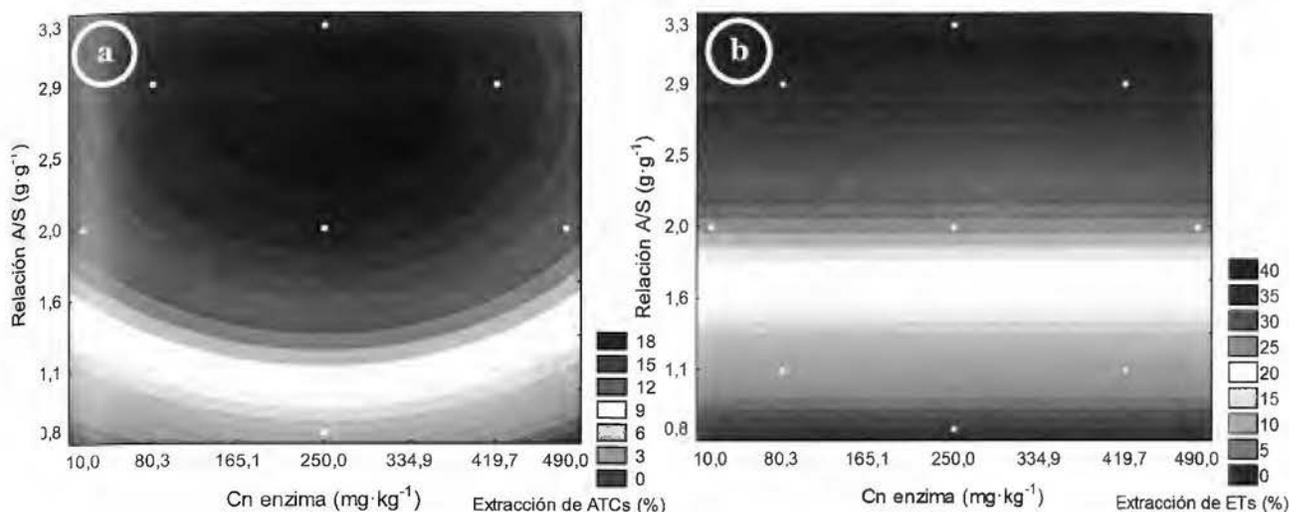


Figura 31. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) extracción de antocianinas (ATCs); b) extracción de elagitaninos (ETs).

- *Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales*

Se observó una diferencia de 597 μmol de equivalentes de trolox- g^{-1} de muestra (base seca) en la capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC-H) y de 37,3 mg de ácido gálico- g^{-1} de muestra (base seca) en el contenido de polifenoles totales, entre los extractos obtenidos de los diferentes puntos experimentales. De acuerdo con los resultados mostrados en el Cuadro XXVI, los coeficientes de determinación (R^2) fueron de 87 % y 99 % para los modelos de regresión de ORAC-H y polifenoles totales (PT), respectivamente. Para ambos modelos la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$); además, la regresión de los modelos sí fue significativa, con una $p < 0,0001$ para ambos.

Las Ecuaciones 18 y 19 muestran los modelos generados para estas variables respuesta. En los modelos del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante del extracto se tomó en cuenta sólo los coeficientes de los parámetros que fueron significativos ($p < 0,05$); en el Cuadro A-LV (Anexo 10.7) se detalla la probabilidad de los coeficientes de regresión obtenidos para cada modelo. El factor concentración del preparado enzimático afectó significativamente el contenido de PT en el extracto de forma lineal; por otra parte, el factor relación A/S afectó de forma lineal y cuadrática el contenido de PT. Con respecto a la capacidad antioxidante, esta variable solo fue afectada de forma lineal por la relación A/S

($p=0,0096$). Además, no se presentó una interacción de los efectos lineales de los dos factores en ambas variables respuesta. Al igual que en las variables anteriores (contenido de ATCs y ETs, extracción de ATCs y ETs), el término lineal para el factor relación A/S fue positivo y ejerció el mayor efecto. Por otra parte, para el contenido de PT en el extracto el término cuadrático de la relación agua/sólido fue negativo.

$$PT (BS) = 87,2121 - 1,1181 * Cn + 13,1210 * A/S - 2,3498 * A/S^2 \quad (\text{Ecuación 18})$$

$$ORAC - H (BS) = 1189,864 + 230,243 * A/S \quad (\text{Ecuación 19})$$

Las Figuras 32.a y 32.b muestran el efecto de los factores Cn de enzima y relación A/S sobre el contenido de PT y capacidad antioxidante (ORAC-H) en el extracto, respectivamente. Al aumentar la relación A/S se da un incremento de ambas variables respuesta. La región comprendida entre los niveles 2,4 y 3,3 $g \cdot g^{-1}$ con respecto al factor relación A/S fue la zona donde se dieron los mayores valores de estas variables respuesta en los extractos, siguiendo un comportamiento similar al contenido y al porcentaje de extracción de ETs (Figuras 29.b y 31.b). Por esta razón se analizó la correlación entre estas variables respuesta, como se muestra en el Cuadro XXVII.

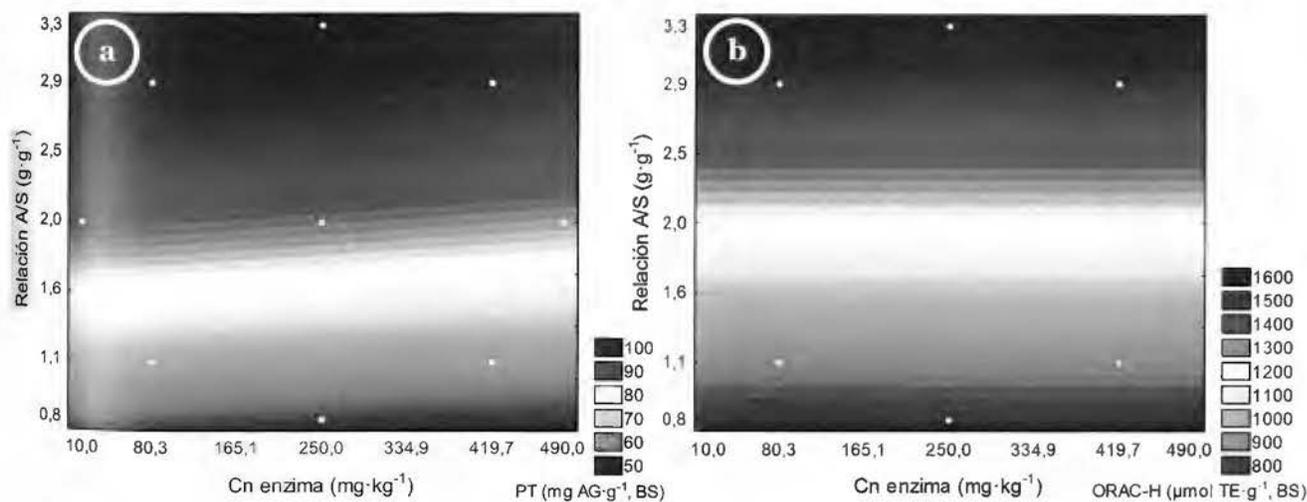


Figura 32. Superficie de respuesta de los efectos de la concentración de preparado enzimático (Cn enzima) y relación agua/sólido (A/S) sobre: a) contenido de polifenoles totales (PT); b) capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC-H). AG= ácido gálico; TE= equivalentes de trolox; BS= base seca del extracto.

La relación A/S ejerció un efecto importante sobre las variables relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos (contenido de ATCs y ETs, extracción de ATCs y ETs, polifenoles totales y capacidad antioxidante). Este mismo comportamiento también fue visto por Çam y Abby (2010); estos autores encontraron que la relación agua/sólido fue un factor que ejerció un efecto significativo en los términos lineal (positivo) y cuadrático (negativo) sobre la extracción de polifenoles totales a partir de un subproducto obtenido de la extracción de jugo de manzana.

Cuadro XXVII. Coeficientes de correlación (R) entre el contenido y porcentaje de extracción de elagitaninos con respecto al contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del extracto obtenido del SPIM.

Variable respuesta	Coeficiente de correlación de Pearson (R)	
	ETs (BS)	% ETs
PT (BS)	0,96	0,98
ORAC-H (BS)	0,90	0,91

ETs= contenido de elagitaninos; % ETs= extracción de elagitaninos; PT= contenido de polifenoles totales; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica. BS= base seca del extracto.

En el Cuadro XXVII se aprecia la correlación presentada entre las variables respuesta analizadas en los extractos obtenidos en los diferentes puntos experimentales (n= 12). Cada variable respuesta, contenido de elagitaninos y la extracción de ETs, se correlaciona de forma significativa con la capacidad antioxidante ($p < 0,05$). Los valores de R fueron mayores o iguales a 0,90, lo que indica la fuerte correlación entre los ETs y la capacidad antioxidante. Las estructuras de los ETs (polifenoles de alto peso molecular) están caracterizadas por la presencia de varios grupos hidroxilo en posición orto, que presentan una alta capacidad de donar un átomo de hidrógeno y aportar el electrón no emparejado, en comparación con los polifenoles de bajo peso molecular (Nicoli *et al.*, 1999; Schwedhelm *et al.*, 2003; Bakkalbaşı *et al.*, 2009).

Igualmente, el contenido de elagitaninos y la extracción de ETs presentaron una fuerte correlación positiva con el contenido de polifenoles totales (valores de R iguales a 0,96 y 0,98, respectivamente, $p < 0,05$). Con estos resultados podría interpretarse que los ETs

constituyen la mayor fracción de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto obtenido a partir del SPIM; por tal razón se da un patrón similar de extracción. Este resultado era esperado ya que en la mora *R. adenotrichos* los compuestos mayoritarios son los elagitaninos (Mertz *et al.*, 2007; Acosta-Montoya *et al.*, 2010) y además las semillas constituyen el tejido que contienen las mayores cantidades de ETs y ácido elágico comparadas con otras partes de la mora como la pulpa o la cáscara (Siriwoharn & Wrolstad, 2004).

El estudio realizado por Bucić-Kojić *et al.* (2009) demostró que las proantocianidinas extraíbles (taninos condensados) presentaron una buena correlación con el contenido de polifenoles totales ($R > 0,98$) durante la extracción de polifenoles a partir de semilla de uva (*Vitis vinifera* L. cv. 'Frankovka'). Según estos autores, las proantocianidinas totales extraíbles representan un grupo importante de los compuestos fenólicos totales, que contribuyen significativamente a la actividad antioxidante total del extracto de semilla de uva (Bucić-Kojić *et al.*, 2009).

- *Punto óptimo*

Tomando en cuenta los modelos que presentaron buenos parámetros de bondad y de ajuste se procedió a seleccionar un punto óptimo del diseño realizado; en este caso se decidió seleccionar los modelos generados para la predicción del contenido de sólidos insolubles en suspensión, turbidez, sólidos solubles, acidez, contenido de ATCs y ETs, y porcentaje de extracción de ATCs y ETs del extracto obtenido a partir del SPIM (ver Cuadro XXVIII). Por medio de las superficies de respuesta y los gráficos de contorno, la combinación óptima de las condiciones de operación puede ser obtenida gráficamente, con el fin de alcanzar los niveles de los factores deseados para el proceso (Abdullah *et al.*, 2007).

La función de deseabilidad (*desirability function*) fue desarrollada para optimizar simultáneamente múltiples respuestas, y es considerado como el parámetro utilizado más frecuentemente en la práctica. El valor de deseabilidad varía entre 0 y 1, y representa la cercanía de una respuesta a su valor ideal (Kopper, 2012). Si la respuesta alcanza el valor óptimo o ideal, la deseabilidad es igual a 1; si alguna de las respuestas no alcanza su valor ideal, la conveniencia para esa respuesta en específico y la conveniencia total serán menores a 1 (Raissi & Farsani, 2009).

Cuadro XXVIII. Valores deseados y zona óptima obtenida para cada variable respuesta evaluada en el proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM.

Variable respuesta	Valor deseado*	Zona óptima	
		Relación A/S (g·g ⁻¹)	Cn enzima (mg·kg ⁻¹)
y ₁ = Sólidos insolubles en suspensión	mínimo	2,0-3,3	250-420
y ₂ = Turbidez	mínimo	2,0-3,3	250-420
y ₃ = Acidez	mínimo	2,4-3,3	NE
y ₄ = Sólidos solubles	mínimo	2,4-3,3	NE
y ₅ = ATCs (BS)	máximo	2,0-3,1	165-335
y ₆ = ETs (BS)	máximo	2,4-3,3	NE
y ₇ = Extracción de ATCs	máximo	2,4-3,3	123-377
y ₈ = Extracción de ETs	máximo	2,4-3,3	NE
y ₉ = ORAC-H (BS)**	máximo	2,4-3,3	NE
y ₁₀ = PT (BS)**	máximo	2,4-3,3	NE

*Hace referencia a las características deseadas en el extracto: contenido mínimo o máximo de la variable respuesta en el extracto obtenido del SPIM. **Estas variables no fueron tomadas en cuenta para la optimización utilizando la función de deseabilidad. ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= polifenoles totales. BS= base seca del extracto. NE= no se encontró una zona óptima.

En la Figura 33 se muestra la representación gráfica de la optimización de los factores de proceso en función de las ocho variables de interés seleccionadas; este gráfico fue generado utilizando el programa Statistica 7 con base en la función de deseabilidad (Statsoft®, USA). No se tomaron en cuenta el contenido de PT ni la capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC-H) ya que en el momento del análisis del punto óptimo y ejecución de la verificación de las condiciones óptimas todavía no se contaba con los resultados de estas variables. Aunque como se observa en el Cuadro XXVIII, la inclusión de estas variables no hubiera afectado el resultado ya que tuvieron un comportamiento o tendencia similar al mostrado por los modelos de contenido de ETs y extracción de ETs.

El contenido de agua del extracto es muy importante ya que, según la cantidad de agua a utilizar, el procesamiento subsecuente requerirá más o menos energía para las etapas de purificación y concentración. En otras palabras cada cantidad adicional de agua daría lugar a incrementos en los costos de energía y carga de trabajo. Por lo tanto, es de suma

importancia llevar a cabo la extracción con la menor cantidad de agua posible. Asimismo, la concentración del preparado enzimático tiene un efecto en los costos del proceso; se busca utilizar la cantidad mínima necesaria de enzima, ya que un exceso resulta en pérdidas y gastos económicos innecesarios. Bajo este razonamiento y con los resultados obtenidos en la Figura 33, se puede observar que la zona con la mayor deseabilidad (0,8) está comprendida entre 1,7-2,9 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (relación A/S) y 165-420 (concentración de enzima). Esta zona coincide con la parte central de la superficie de respuesta. Para la verificación de las condiciones óptimas de extracción obtenidas del modelo se seleccionó el punto óptimo que indicó el programa Statistica 7, el cual fue 2,4 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para la relación agua/sólido (valor codificado= 0,41485) y 263 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para la concentración del preparado enzimático (valor codificado= 0,07497), en donde el valor de deseabilidad fue de 0,8.

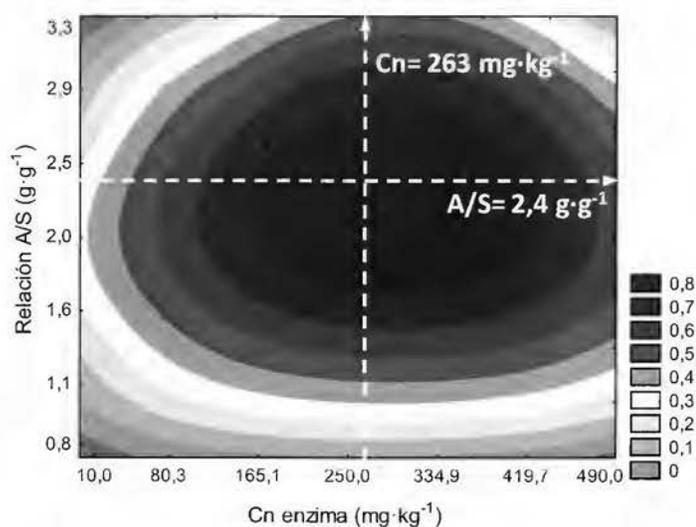


Figura 33. Optimización de las condiciones del proceso de extracción (concentración de preparado enzimático -Cn enzima- y relación agua/sólido -A/S-) en función del contenido de ATCs y ETs, extracción de ATCs y ETs (valores máximos) y del contenido de sólidos insolubles, turbidez, acidez y sólidos solubles (valores mínimos).

- *Verificación de las condiciones óptimas de extracción obtenidas del modelo*

Se realizaron tres ensayos adicionales (tres repeticiones) con el fin de realizar la verificación de los resultados obtenidos por el modelo de superficie de respuesta para la predicción de las respuestas de interés. Como ya se mencionó, los modelos fueron verificados llevando a cabo experimentos en un punto óptimo (indicado por el programa

estadístico), el cual fue $2,4 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ para la relación agua/sólido y $263 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para la concentración del preparado enzimático. Un esquema de las etapas realizadas a nivel de laboratorio para la obtención del extracto de polifenoles rico en elagitaninos, desde la evaluación de las condiciones de extracción (pruebas preliminares) hasta la verificación del punto óptimo, se detalla en la Figura 34.

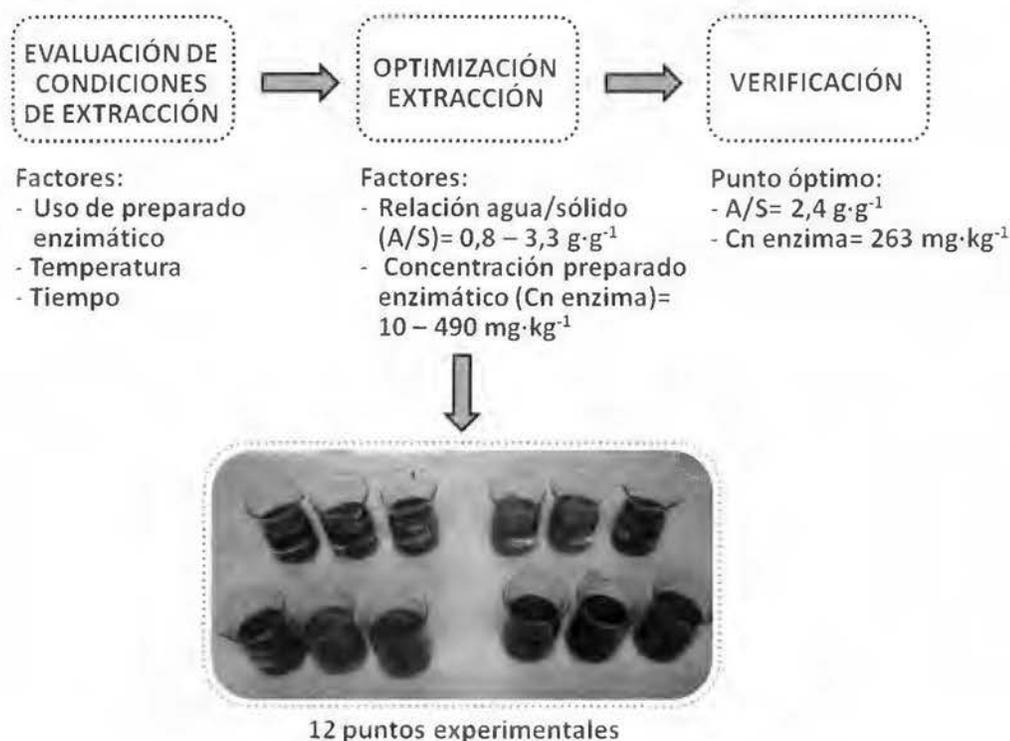


Figura 34. Esquema de las etapas realizadas a nivel de laboratorio para la obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos obtenido a partir de un subproducto industrial de mora.

En el Cuadro XXIX se muestran los valores de las variables respuesta predichas por el modelo y los valores obtenidos experimentalmente a nivel de laboratorio para las condiciones óptimas del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM. Con base en la información mostrada en este cuadro, se observa que los resultados experimentales para las variables respuesta sólidos insolubles, turbidez (logaritmo), acidez, sólidos solubles, contenido y extracción de antocianinas, contenido de elagitaninos, capacidad antioxidante y polifenoles totales se traslaparon o se encontraron dentro de los intervalos

de los valores predichos por los modelos generados. Solamente se presentó una desviación para los valores de extracción de ETs. Estos resultados indican que se pudo modelar u optimizar los factores evaluados (relación agua/sólido y concentración de enzima) ya que los modelos generados cumplieron positivamente con lo esperado en cuanto a la predicción de las diferentes variables respuesta.

Cuadro XXIX. Valores de las variables respuesta predichas y obtenidas para las condiciones óptimas del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM a nivel de laboratorio*.

Variables respuesta	Respuesta predicha**	Respuesta obtenida***
y_1 = Sólidos insolubles en suspensión ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,37-0,54	0,43-0,46
y_2 transformada= log Turbidez (NTU)	1,21-1,51	1,47-1,53
y_3 = Acidez ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	0,299-0,352	0,338-0,346
y_4 = Sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix)	1,09-1,37	1,19-1,30
y_5 = ATCs (mg cianidina-3-glucósido $\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	4,2-5,5	3,5-4,9
y_6 = ETs (mg ácido elágico $\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	30-46	46-50
y_7 = Extracción de ATCs (%)	15-19	14-18
y_8 = Extracción de ETs (%)	25-34	39-41
y_9 = ORAC-H (μmol equivalentes de trolox $\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	1049-1502	1015-1186
y_{10} = PT (mg ácido gálico $\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	91-93	93-107

*Condiciones óptimas: concentración de preparado enzimático (Cn enzima)= 263 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y relación agua/sólido (A/S)= 2,4 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. **Valores expresados como intervalo de confianza calculado por el modelo con un nivel de confianza del 95 %. ***Valores expresados como intervalo de confianza, obtenidos experimentalmente (n=3) con un nivel de confianza del 95 %. ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= polifenoles totales. BS= base seca del extracto.

6.3 Conclusiones y recomendaciones

6.3.1 Conclusiones

- Las condiciones óptimas de tratamiento están dadas por un valor de 2,4 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para la relación agua/sólido y 263 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para la concentración del preparado enzimático.

- La concentración de enzima (del preparado enzimático Ultrazym® AFP-L) tuvo un efecto sobre los parámetros físicos del extracto (turbidez y sólidos insolubles en suspensión), así como sobre el contenido y extracción de antocianinas.
- La relación agua/sólido fue el factor que ejerció el mayor efecto sobre las variables relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos (contenido de ATCs y ETs, extracción de ATCs y ETs, polifenoles totales y capacidad antioxidante).
- El comportamiento de extracción de los ETs fue similar al de los polifenoles totales, lo que podría confirmar que los ETs constituyen la mayor fracción de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto obtenido.
- Se pudo modelar u optimizar los factores evaluados (relación agua/sólido y concentración de enzima) ya que los modelos generados cumplieron positivamente con lo esperado en cuanto a la predicción de las diferentes variables respuesta.

6.3.2 Recomendaciones

- Se recomienda determinar la cinética de degradación de los ETs y ATCs y el coeficiente de difusión de los mismos compuestos para así hacer un balance entre la cantidad que se extrae y la que se degrada, según las condiciones definidas de extracción.
- Evaluar el tiempo como un factor a optimizar durante el proceso de extracción, para estudiar y observar de forma más clara su efecto sobre la recuperación de polifenoles en el extracto y establecer si presenta interacción con otros factores.
- Evaluar si es factible realizar varias extracciones consecutivas al subproducto (SPIM) con el fin de extraer al máximo los polifenoles que contiene.



VII. Objetivo 2

Escalamiento del proceso de extracción de polifenoles a nivel de planta piloto a partir del SPIM, para obtener un extracto clarificado de estos compuestos aplicando microfiltración tangencial

VII. OBJETIVO 2

7.1 Metodología

7.1.1 Diseño experimental

- *Proceso de extracción*

Una vez que se definieron las condiciones óptimas de concentración del preparado enzimático y proporción de agua/sólido obtenidas a nivel de laboratorio, se procedió a realizar el escalamiento a nivel de planta piloto. Para esto se partió de 6 muestras (sub-lotes, que correspondían cada uno a las repeticiones del experimento) de aproximadamente 17 kg de materia prima. Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio para comparar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio (sección 6.2) y los obtenidos a nivel de planta piloto. En el Cuadro XXX se muestra el diseño aplicado.

Cuadro XXX. Diseño experimental para evaluar el proceso de extracción a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto.

Tratamiento	Nivel de escalamiento
1	Laboratorio
2	Planta Piloto

- *Proceso de microfiltración*

Para el proceso de microfiltración (MF) tangencial se aplicó un diseño irrestricto aleatorio (Cuadro XXXI) para evaluar la presión transmembranaria (P_{tm}), la cual es controlada con la presión de aire comprimido que permite el funcionamiento de la bomba neumática (14, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 psi). La presión transmembranaria se evaluó como un factor continuo. Para cada ensayo de MF tangencial se partió de 5,5 kg de extracto (obtenido por medio del prensado) y para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones.

Cuadro XXXI. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la presión transmembranaria sobre el proceso de clarificación del extracto de polifenoles mediante MF tangencial.

Tratamiento	Presión aire comprimido (psi)	Presión transmembranaria (bar)
1	14	2,58
2	20	2,92
3	30	3,60
4	40	4,22
5	50	4,86
6	60	5,54
7	70	6,22

7.1.2 Procedimiento

- *Proceso de extracción*

- *Extracción*

Para realizar la extracción de los polifenoles (cuya principal fracción son ETs) se utilizó una marmita de acero inoxidable con capacidad de 90 L. Se agregó una cantidad de 17 kg del subproducto del procesamiento industrial de mora (SPIM) y 40,8 kg de agua (destilada) a 60 °C para obtener una relación agua/sólido (A/S) de 2,4 g·g⁻¹ según la condición óptima obtenida del proceso de optimización (sección 6.2). Se mantuvo una temperatura de operación de 60 °C durante la extracción con agitación constante (200 rpm) utilizando el agitador mecánico que estaba acoplado a la marmita, de manera que se mantuvo un sistema cerrado. Cuando se alcanzó la temperatura de operación (~5 min) se añadió el preparado enzimático Ultrazym® AFP-L (Novozymes, USA) a la concentración óptima (263 mg·kg⁻¹) que se obtuvo del proceso de optimización (sección 6.2). El tiempo de extracción que se aplicó, al igual que a nivel de laboratorio, fue de 60 min.

- *Separación del extracto del SPIM*

Una vez finalizado el tiempo de extracción, se retiró el producto de la marmita y se colocó en baldes plásticos para enfriarlo hasta una temperatura de 30 °C en un baño de agua con

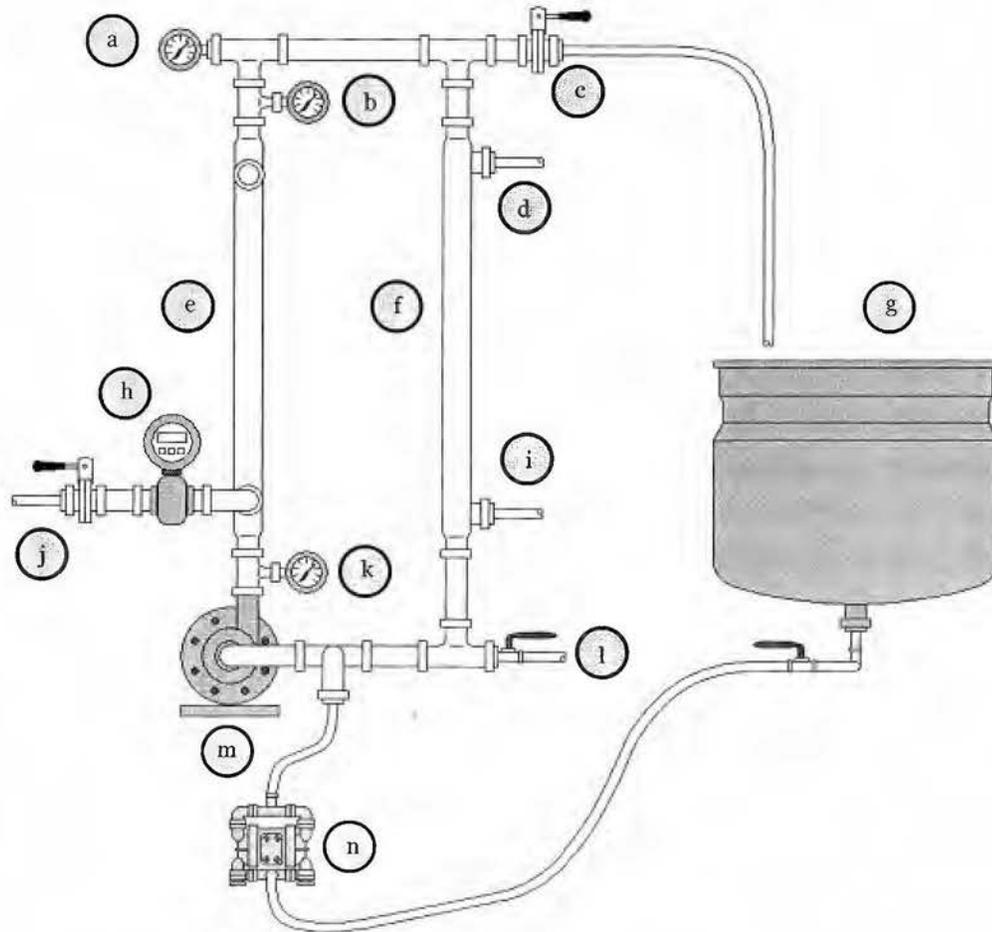
hielo. Alcanzada esta temperatura se procedió a realizar la separación del extracto del SPIM mediante prensado; para esto, el producto se colocó en tandas de 5 kg dentro de una bolsa de doble manta de tamaño de poro de 1 mm, y se prensó utilizando una prensa hidráulica (Hydraulic Shop Press OTC 25 Ton, Owatonna, USA) a una presión de 10 000 kPa por 10 min. El extracto obtenido se recolectó en baldes, los cuales fueron pesados para determinar la cantidad de extracto obtenido durante el prensado.

- *Centrifugación del extracto*

Finalmente el extracto se centrifugó a 3900 x g por 20 min a una temperatura de 30 °C, utilizando una centrífuga (Hermle, modelo Z-300, Alemania). La centrifugación simuló el efecto de la microfiltración tangencial, al eliminar los sólidos en suspensión, pudiendo obtener las concentraciones de los compuestos de interés en los productos que simulan un permeado obtenido a partir de la MF tangencial. Las muestras centrifugadas se empacaron en bolsas laminadas, las cuales de inmediato se sellaron y almacenaron a -20 °C hasta sus análisis químicos. Las muestras luego se descongelaron a temperatura de refrigeración (5 °C) para determinar la humedad, sólidos solubles, acidez titulable, concentración de elagitaninos totales y antocianinas totales por HPLC-DAD, ORAC-H y polifenoles totales (ver secciones 4.4.1 - 4.4.3); además, se determinó la extracción de antocianinas y elagitaninos (Ecuación 9, sección 6.1.2). La turbidez de las muestras se midió antes de congelarlas (ver sección 5.2.1).

- *Proceso de microfiltración*

Para evaluar el efecto de la microfiltración, el extracto obtenido del prensado se clarificó utilizando una unidad piloto de MF-UF tangencial que se compone de un módulo tubular donde se coloca la membrana de cerámica de alúmina (Al_2O_3) Membralox® (Pall Corporation, Francia) con un tamaño de poro de 0,2 μm y un área efectiva de filtración de 0,22 m^2 . El equipo comprende también una bomba centrífuga que provee el flujo tangencial, una bomba neumática que otorga la alimentación y presión, y un intercambiador de calor para controlar la temperatura. Se utilizaron las condiciones empleadas por Soto (2010), donde se mantuvo una velocidad tangencial (U) de $6,1 \pm 0,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 30 °C. El esquema de la unidad piloto para realizar la MF tangencial del extracto se presenta en la Figura 35.



- | | |
|--|---|
| a. Termómetro/sensor de temperatura. | h. Medidor de flujo de permeado. |
| b. Manómetro/ sensor de presión de salida. | i. Entrada de agua de enfriamiento. |
| c. Salida de recirculado. | j. Salida de permeado. |
| d. Salida de agua de enfriamiento. | k. Manómetro/ sensor de presión de entrada. |
| e. Membrana. | l. Salida de retenido. |
| f. Intercambiador de calor. | m. Bomba centrífuga. |
| g. Tanque de alimentación. | n. Bomba neumática de alimentación. |

Figura 35. Esquema de la unidad piloto de microfiltración y ultrafiltración tangencial.

- *Evaluación del efecto de la presión transmembranaria*

Para la evaluación del efecto de la presión transmembranaria se probaron 7 presiones transmembranarias: 2,58; 2,92; 3,60; 4,22; 4,86; 5,54 y 6,22 bar. La recopilación de datos de flujo de permeado ($L \cdot h^{-1}$), temperatura del retenido ($^{\circ}C$), presión de entrada y de salida (bar), se realizaron de forma manual. El permeado y el retenido fueron reciclados de nuevo

al tanque de alimentación con el fin de mantener una concentración de alimentación constante (todos los experimentos se realizaron a un valor de FRV entre 1,1-1,3).

- *Ensayos de microfiltración tangencial en modo de concentración*

Una vez seleccionada la presión transmembranaria más adecuada para la MF con base en los resultados de concentración de elagitaninos, concentración de antocianinas y los flujos de permeado, se procedió a realizar los ensayos de MF en modo de concentración. Se elaboraron las gráficas correspondientes de acuerdo con los datos recopilados, con el objetivo de estudiar el comportamiento del flujo de permeado ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$; ver Ecuación 4, sección 3.5.7) y el factor de reducción volumétrico (FRV, ver Ecuación 20) en función del tiempo de proceso. Además, se determinó la concentración de elagitaninos y antocianinas, así como la concentración de los otros parámetros (sólidos solubles, acidez titulable, polifenoles totales, capacidad antioxidante) en el extracto de alimentación, permeado y retenido.

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} = \frac{V_m + V_p}{V_m} \quad (\text{Ecuación 20})$$

donde:

FRV: factor de reducción volumétrico (adimensional)

V_a : volumen de alimentación (L)

V_r : volumen de retenido (L)

V_p : volumen de permeado (L)

V_m : volumen muerto del equipo -este volumen se tiene que medir en el equipo- (L)

Se obtuvieron muestras del extracto de alimentación, permeado y retenido a un FRV= 12,6. Todas las muestras se empacaron en bolsas laminadas, las cuales de inmediato se sellaron y almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Las muestras luego se descongelaron a temperatura de refrigeración ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) para determinar la humedad, pH, sólidos solubles, acidez titulable, concentración de elagitaninos totales y antocianinas totales por HPLC-DAD, ORAC-H y polifenoles totales (ver secciones 4.4.1 - 4.4.3). La turbidez y contenido de SIS de las muestras se determinaron antes de congelarlas (ver sección 5.2.1). En la Figura

36 se muestra el flujo de proceso que se siguió para la obtención del extracto clarificado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de planta piloto.

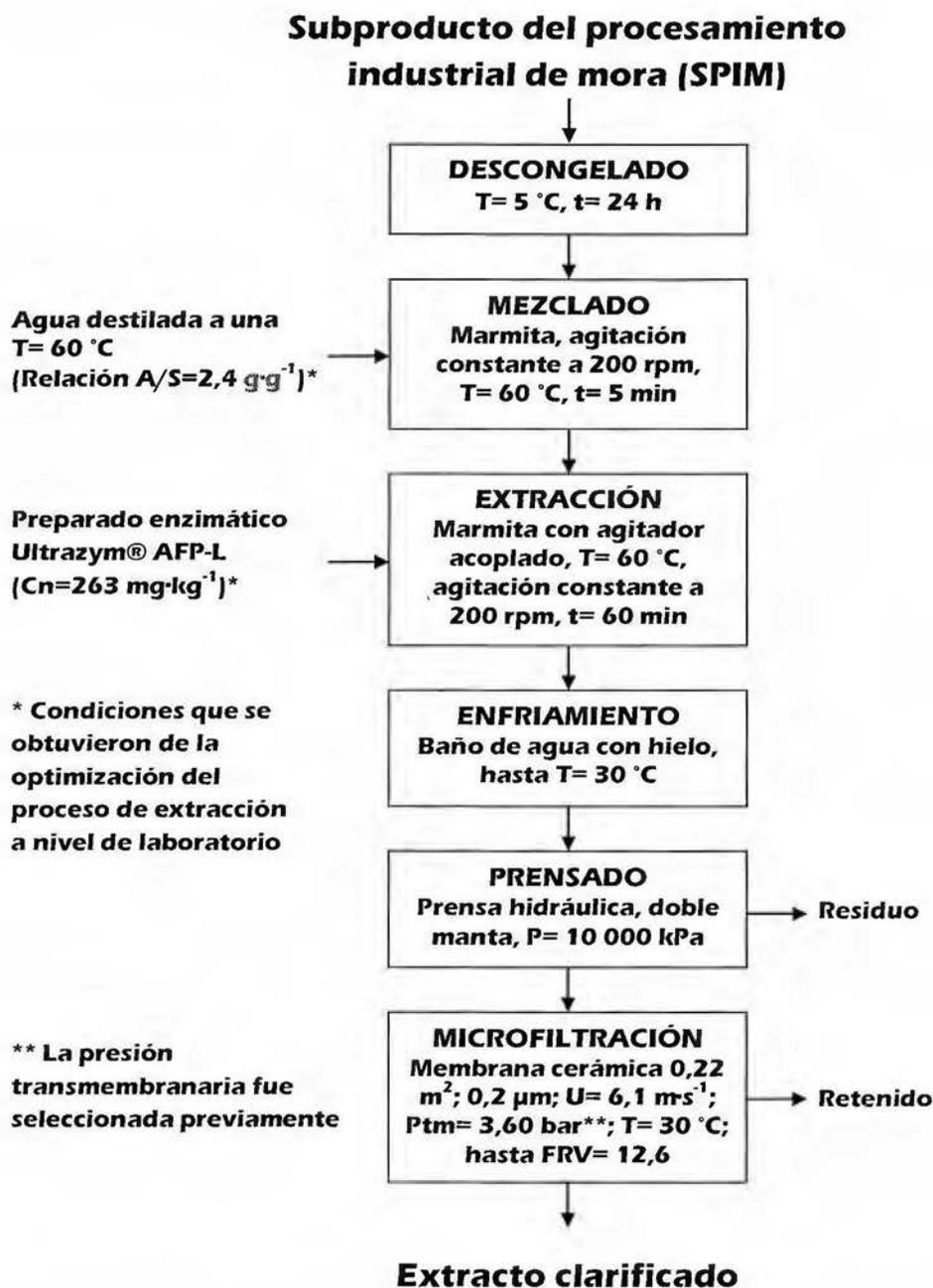


Figura 36. Flujo de proceso para la obtención de un extracto clarificado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de planta piloto.

7.1.3 Análisis estadístico

Se realizó una prueba t-Student para comparar los promedios de extracción de elagitaninos y antocianinas, además de otras características físico-químicas, entre el extracto obtenido en las condiciones óptimas a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto. Para evaluar el efecto de la presión transmembranaria y comparar las muestras obtenidas durante el proceso de MF (FRV= 12,6) se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta. Para evaluar la repetibilidad de los ensayos de MF tangencial (modo de concentración) se realizó una prueba F (F-test); además, se realizó una comparación de gráficas del proceso de microfiltración con el fin de evaluar el flujo de permeado y FRV en función del tiempo. Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

7.2 Resultados

Con el propósito de realizar el escalamiento del proceso de extracción de polifenoles (cuya principal fracción son los ETs) con las condiciones óptimas de extracción evaluadas a nivel de laboratorio (se optimizaron los factores relación A/S y Cn de enzima) se ejecutaron los ensayos a nivel de planta piloto realizando las modificaciones pertinentes en cuanto a los equipos, volúmenes de extracción, entre otros (ver Figura 37). Posteriormente se realizó el proceso de clarificación del extracto mediante microfiltración tangencial, obteniéndose así un extracto estable microbiológicamente y apto para el proceso de concentración mediante ultrafiltración (sección 8.1.2).

Este objetivo fue importante ya que es necesario realizar pruebas a mayor escala para evaluar la factibilidad técnica y económica del proceso y verificar si ocurren desviaciones con respecto a lo observado a nivel de laboratorio. Al ser los alimentos una mezcla de sistemas físicos y químicos en interacción, está establecido que los lotes de productos escalados no van a ser iguales a los originales o de laboratorio (Scott *et al.*, 2005).

- *Proceso de extracción*

En el Cuadro XXXII se presentan los resultados de las características del extracto obtenido a nivel de planta piloto aplicando las condiciones óptimas (Cn enzima= 263 mg·kg⁻¹ y relación A/S= 2,4 g·g⁻¹); además, estos resultados se compararon con los generados a nivel

de laboratorio. En este caso se realizaron 6 ensayos de extracción utilizando un volumen 100 veces mayor al que se utilizó a nivel de laboratorio (se pasó de un volumen de 600 mL a 60 L). Para lograr esto se utilizó una marmita de 90 L con un agitador mecánico acoplado y una prensa hidráulica para realizar la extracción y el prensado (separación del extracto líquido del residuo sólido), respectivamente.

Cuadro XXXII. Comparación de las variables respuesta analizadas en el extracto obtenido a partir del SPIM durante el proceso de extracción (T= 60 °C, t= 60 min) a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto*.

VARIABLES RESPUESTA	Laboratorio**	Planta piloto***
y ₁ = Sólidos insolubles en suspensión (g·100 g ⁻¹)	0,45 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,02 ^a
y ₂ = Turbidez (NTU)	32 ± 2 ^a	21 ± 3 ^b
y ₃ = Acidez (g·100 g ⁻¹)	0,342 ± 0,004 ^a	0,353 ± 0,006 ^a
y ₄ = Sólidos solubles (°Brix)	1,24 ± 0,05 ^a	1,25 ± 0,03 ^a
y ₅ = ATCs (mg cianidina-3-glucósido·g ⁻¹ , BS)	4,2 ± 0,7 ^a	4,2 ± 0,3 ^a
y ₆ = ETs (mg ácido elágico·g ⁻¹ , BS)	48 ± 2 ^a	45 ± 3 ^a
y ₇ = Extracción de ATCs (%)	16 ± 2 ^a	14,5 ± 0,9 ^a
y ₈ = Extracción de ETs (%)	40 ± 1 ^a	34 ± 2 ^b
y ₉ = ORAC-H (μmol equivalentes de trolox ·g ⁻¹ , BS)	1100 ± 85 ^a	1179 ± 21 ^a
y ₁₀ = PT (mg ácido gálico·g ⁻¹ , BS)	100 ± 7 ^a	69 ± 1 ^b

*Condiciones óptimas: concentración de preparado enzimático (Cn enzima)= 263 mg·kg⁻¹ y relación agua/sólido (A/S)= 2,4 g·g⁻¹. Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza con un nivel de confianza del 95 % (**n=3, ***n=6). Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (t-Student, p<0,05). ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= polifenoles totales. BS= base seca del extracto.

Como se muestra en el Cuadro XXXII, solo tres variables analizadas en el extracto obtenido a nivel de planta piloto (EPP) presentaron desviación con respecto al extracto que se obtuvo a nivel de laboratorio (EL). Los valores de turbidez en el EPP fueron significativamente menores (p<0,05); esto podría explicarse debido al mayor tiempo que transcurrió durante las etapas de enfriamiento y prensado, ya que se manejó una mayor cantidad o volumen de producto a nivel de planta piloto (ver Figura 37). También hay que indicar que los tiempos para extraer el producto de la marmita así como para trasegarlo de un equipo a otro dentro de la planta fueron mucho mayores en comparación con los tiempos que se manejaron a nivel de laboratorio.

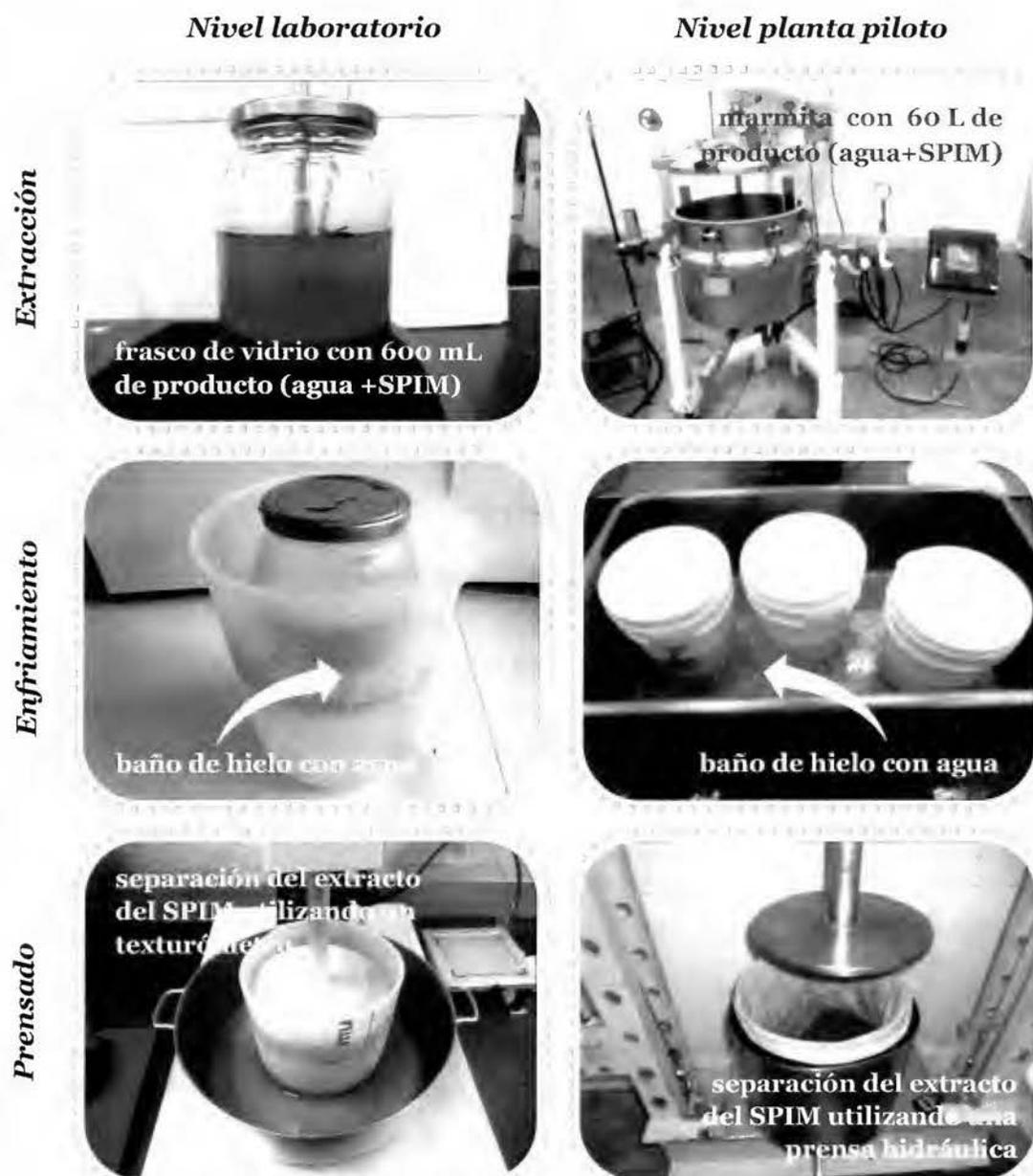


Figura 37. Comparación de los equipos y utensilios utilizados para el proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM, a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto.

Un mayor tiempo de proceso permite a las enzimas seguir actuando sobre el sustrato. Como ya se observó anteriormente, las enzimas del preparado enzimático utilizado (Ultrazym® AFP-L) actúan principalmente sobre los sólidos insolubles en suspensión (polisacáridos parietales), por lo que, al presentarse un mayor tiempo de proceso, esto posiblemente provocó una mayor disminución de la turbidez debido a la actividad

enzimática residual. El uso de pectinasas -como el preparado enzimático que se aplicó- disminuye el contenido de pectina y, por lo tanto, se da una reducción de la turbidez (Abdullah *et al.*, 2007).

Con respecto al porcentaje de extracción de ETs y contenido de PTs, se puede mencionar que una disminución en la extracción de los elagitaninos en el extracto va a incidir directamente en la extracción de los polifenoles y, por ende, en el contenido total de los polifenoles. Como ya se analizó en la sección 6.2, se observó una fuerte correlación entre el porcentaje de extracción de ETs y el contenido de polifenoles totales ($R=0,98$, $p<0,05$), por lo que la disminución de los polifenoles totales en el extracto es justificable por la reducción en la extracción de ETs.

A nivel de planta piloto se utilizó un agitador mecánico de pala diferente al que se utilizó a nivel de laboratorio (agitador de hélice); también, aunque se utilizó la misma velocidad angular en los dos tipos de ensayos (200 rpm), la potencia aplicada por los agitadores durante el mezclado y la extracción no fue la misma (fue menor en los ensayos a nivel de planta piloto y, aunque no se midió, se observó que el movimiento era más turbulento con el agitador utilizado a nivel de laboratorio). La potencia absorbida es una variable muy importante en los bioprocesos y se define como la cantidad de energía necesaria en un período de tiempo, con el fin de generar el movimiento del fluido dentro de un recipiente (por ejemplo, biorreactor, el tanque de mezcla, reactor químico, etc.) por medio de agitación mecánica o neumática (Ascanio *et al.*, 2004).

La disminución en la potencia aplicada durante el mezclado pudo afectar la extracción de los ETs. A diferencia de las antocianinas, los elagitaninos están más asociados a la fibra o a las semillas de la mora. El estudio realizado por Soto (2010) encontró que las ATCs eran más fácilmente extraíbles durante la extracción de jugo de mora en comparación con los ETs, debido probablemente a las diferencias en solubilidad, grado de asociación con otras macromoléculas y locación de estos compuestos en los tejidos de la planta. De esta forma, la reducción en la potencia del agitador mecánico pudo afectar o disminuir la difusión de los ETs desde los tejidos de la semilla y residuos gruesos del SPIM hacia el extracto líquido.

En el Cuadro XXXIII se muestran los valores de polifenoles totales de extractos obtenidos mediante diversos métodos, a partir de diferentes subproductos de frutas y se comparan con los valores obtenidos para el extracto del subproducto de mora (SPIM).

Cuadro XXXIII. Comparación del contenido de polifenoles totales de extractos obtenidos de diferentes subproductos de frutas y el extracto obtenido del subproducto de mora (SPIM).

Subproducto de fruta	Polifenoles totales (mg AG·100 g ⁻¹)		n	Solvente utilizado	Método de extracción	Autor
	Base húmeda	Base seca				
SPIM ^{PP}	62,1±0,9*	6898±102*	6	agua destilada	agitación mecánica + tratamiento enzimático	NA
Semillas de uva ^L	NR	8300	NR	agua destilada	descarga eléctrica de alto voltaje	Liu <i>et al.</i> (2011)
Residuo de manzana ^L	NR	580±20 - 520±10**	3	agua bidestilada	agitación magnética	Cam & Aaby (2010)
Cáscaras de naranja ^L	121,26 - 233,46***	NR	20	etanol (20-80 %)	agitación magnética + ultrasonido	Khan <i>et al.</i> (2010)
Subproducto obtenido de la elaboración de puré de guayaba ^L	133,58 - 265,00***	NR	20	etanol (80 %)	agitación mecánica	Kong <i>et al.</i> (2010)
Residuo de uva roja ^L	5,41±0,15 mg AG·100 mL ⁻¹ **	NR ^L	3	etanol (53 %)	agitación magnética + ultrasonido	Ghafoor <i>et al.</i> (2009)
Semillas desengrasadas de uva ^L	NR	4,370 - 13,992***	48	etanol (40-60 %)	agitación magnética	Karvela <i>et al.</i> (2009)
Residuo de cebolla ^L	NR	2125 - 9300***	16	etanol (40-60 %)	agitación magnética	Kiassos <i>et al.</i> (2009)
Residuo de manzana ^L	NR	1442±58**	3	etanol (60 %)	extracción con líquido presurizado	Wijngaard & Brunton (2009)
Residuo de uvas obtenido del proceso de elaboración de vino blanco ^L	NR	1472 - 6681***	30	etanol (50 %)	agitación mecánica	Bucić-Kojić <i>et al.</i> (2007)
Cáscara de limón Yen Ben ^L	76,84±0,51-113,11±0,76**	NR	21	agua bidestilada	tratamiento enzimático	Li <i>et al.</i> (2006)
Cáscara de limón Meyer ^L	33,86±1,28-52,89±0,95**	NR	21	agua bidestilada	tratamiento enzimático	Li <i>et al.</i> (2006)
Residuo de grosella negra ^L	6,2 - 38,3 mg AG·100 mL ⁻¹ ****	NR	19	metanol (60 %)	tratamiento enzimático	Landbo & Meyer (2001)
	5,8 - 24,7 mg AG·100 mL ⁻¹ ****	NR	19	agua bidestilada	tratamiento enzimático	Landbo & Meyer (2001)

*Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza con un nivel de confianza del 95 %. **Valores reportados como promedio ± desviación estándar. ***Valores reportados como un rango (obtenidos de un Diseño de superficie de respuesta). ****Valores reportados como rango de polifenoles totales. n= número de ensayos. NA= no aplica. NR= no reportado.

^{PP}Proceso de extracción realizado a nivel de planta piloto. ^LProceso de extracción realizado a nivel de laboratorio.

Según los resultados mostrados en el cuadro anterior, el contenido de polifenoles varía de acuerdo con el método de extracción, en donde hay que tomar en cuenta varios factores: tipo de agitación, tipo de solvente, temperatura, tiempo, relación solvente/sólido, pH, tamaño de partícula, entre otros. Por estas razones realizar una comparación de los diferentes extractos mostrados en el Cuadro XXXII puede ser no objetiva ya que las condiciones de extracción son muy diferentes; sin embargo, es interesante evaluar el potencial del extracto del SPIM analizando extractos obtenidos en otros estudios.

En el Cuadro XXXIII se puede apreciar que los solventes más utilizados en estos estudios fueron el etanol (a diferentes concentraciones) y el agua (usualmente purificada mediante destilación). El uso de etanol aumenta la recuperación de los solutos de interés (en este caso de los polifenoles) debido al aumento de la afinidad molecular; sin embargo, el uso de este solvente aumenta el costo del proceso y, según el uso del extracto, podría requerir operaciones posteriores de eliminación del solvente (Wang, 2011).

Según la información recopilada (Cuadro XXXIII), el extracto del SPIM presenta un contenido inferior de PT con respecto a los extractos obtenidos de semillas de uva (valor reportado en $\text{mg AG}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de extracto en base seca), cáscaras de naranja, subproducto de guayaba y cáscaras de limón Yen Ben (valores reportados en $\text{mg AG}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de extracto en base húmeda). Por otra parte, el SPIM presenta mayor contenido de polifenoles totales que los extractos de residuos de uvas obtenidos de la elaboración de vino blanco, semillas desengrasadas de uva, residuo de manzana (extracción con agitación magnética y con líquido presurizado) (en base seca) y que los extractos de residuo de uva roja, de residuo de grosella negra (extracción con agua y con metanol 60%), y de cáscara de limón Meyer (base húmeda); además, muestra valores dentro del rango reportado para el extracto de residuo de cebolla (en base seca).

Es necesario anotar que la información del Cuadro XXXIII muestra extractos de polifenoles obtenidos mediante diversos métodos de extracción a nivel de laboratorio (además los autores no mencionan que hayan realizado, en la determinación de polifenoles totales, la corrección por interferencias), a diferencia del proceso de extracción realizado a nivel de planta piloto para obtener el extracto de polifenoles a partir del SPIM. Esto da mayor valor al proceso establecido en el presente estudio ya que, además de realizar la extracción a nivel de laboratorio, dicho proceso se escaló a nivel de planta piloto, lo que

podría permitir una valoración más realista de la factibilidad técnica y económica del proceso a nivel industrial.

- *Proceso de microfiltración*

Después de realizar el proceso de extracción se procedió a clarificar el extracto de polifenoles rico en ETs mediante microfiltración tangencial. Esta tecnología permite obtener un líquido (permeado) estable microbiológicamente debido al uso de una membrana de cerámica de tamaño de poro de 0,2 μm y, además, se puede disminuir o prácticamente eliminar el contenido de sólidos insolubles en suspensión, lo que facilita el proceso posterior de concentración utilizando membranas de ultrafiltración (sección 8).

• *Evaluación del efecto de la presión transmembranaria*

Primero se evaluó el efecto de la presión transmembranaria (P_{tm}) sobre el flujo de permeado y contenido de compuestos polifenólicos en el extracto. Para esta parte, los ensayos se realizaron a un FRV entre 1,1 y 1,3; para lograr esto se mantuvo un volumen de alimentación cercano al volumen muerto del equipo, y se recircularon el permeado y retenido al tanque de alimentación. Para comprobar que se mantenía el FRV constante a las diferentes presiones evaluadas se midió la turbidez en las muestras de retenido para cada repetición (ver Cuadro A-LXVI, Anexo 10.8), confirmando que los valores de turbidez en los retenidos se mantuvieron prácticamente constantes en cada ensayo.

En la Figura 38 se puede observar el comportamiento del flujo de permeado con respecto a la aplicación de diferentes presiones transmembranarias. De acuerdo con Sotto (2008), es posible que con algunos productos el aumento de la P_{tm} genere un aumento en los flujos de permeado, ya que se incrementa la fuerza motriz, venciendo la resistencia ejercida por la membrana. Esta tendencia fue observada durante el proceso de microfiltración del extracto de polifenoles obtenido del SPIM.

Se observó un efecto significativo de la P_{tm} sobre el flujo de permeado del extracto ($p < 0,05$). Se pasó de un flujo de 282 a 418 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ al aumentar la presión de 2,58 a 6,22 bar, respectivamente. Como se muestra en la Figura 38, cuando se evaluaron las presiones más bajas (de 2,58 a 4,22 bar) se presentó un mayor cambio en el aumento del flujo (el flujo aumentó $\sim 98 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), el cual llegó a estabilizarse cuando se evaluaron las presiones más altas (de 4,86 a 6,22 bar), ya que el flujo aumentó $\sim 23 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

Según varios autores, durante procesos de MF tangencial se presenta un rango de presión controlada, donde el flujo de permeado es directamente proporcional a la presión transmembranaria utilizada, y esto ocurre cuando se procesa a bajas presiones, bajas concentraciones de sólidos y altas velocidades tangenciales. Posteriormente, a mayores presiones de trabajo se presenta una disminución en el cambio de los flujos (formación de una torta o capa gel sobre la membrana) y se conoce como región de *transferencia de masa controlada*, donde los flujos son independientes de las presiones (Dobón & Bagger-Jørgensen, 2000; Baruah & Belfort, 2003; Ortiz *et al.*, 2008; Echavarría *et al.*, 2011; Laorko *et al.*, 2013). Este fenómeno se observó cuando se trabajó con altas presiones, como se muestra en la Figura 38.

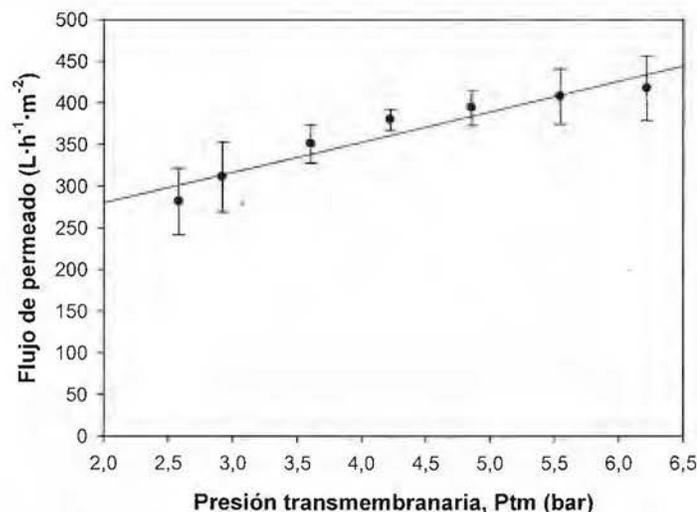


Figura 38. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria sobre el flujo de permeado durante el proceso de microfiltración tangencial ($T= 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{FRV}=1,1-1,3$; $U=6,1\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) del extracto obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n=3$).

Cisse *et al.* (2011b) observaron un comportamiento similar al encontrado en esta investigación. Estos autores evaluaron presiones entre 1,2 y 3,7 bar ($T= 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $U= 6\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) para clarificar un extracto de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) a un FRV de 1, encontrando que el flujo de permeado variaba ligeramente en el rango de P_{tm} evaluado; de esta forma, el mayor flujo se obtuvo a una presión transmembranaria intermedia dentro del rango evaluado. Los autores indican que es poco probable que el colmataje observado

esté ligado al aumento de la polarización de la concentración, y más bien estaría relacionado con el aumento de la resistencia hidráulica de la capa gel o torta que puede ser compresible (Cisse *et al.*, 2011b).

Por otra parte, en la Figura 39 se muestra el comportamiento del contenido de los principales compuestos polifenólicos presentes en el extracto, durante el proceso de microfiltración a las diferentes presiones evaluadas. Según el ANDEVA realizado, la Ptm no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de antocianinas ($p > 0,05$) pero sí sobre el contenido de elagitaninos ($p < 0,05$). El contenido de ATCs se mantuvo en un promedio de $18,7 \pm 0,5$ mg cianidina-3-glucósido·L⁻¹. Por otra parte, el contenido de ETs disminuyó de 342 ± 4 a 263 ± 37 mg ácido elágico·L⁻¹ (-23 %) al aumentar la presión de 2,58 a 6,22 bar.

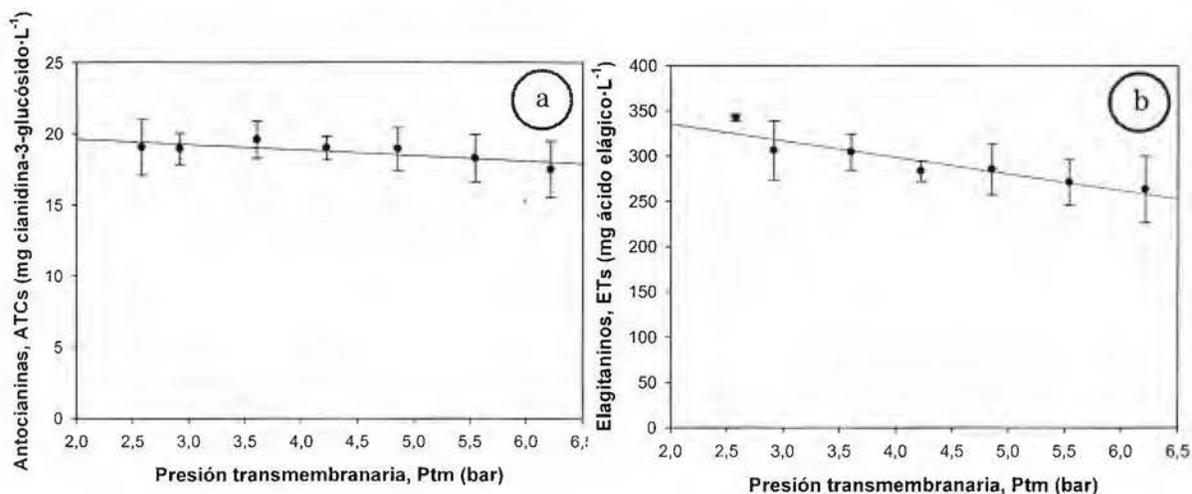


Figura 39. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria sobre el contenido de compuestos polifenólicos durante el proceso de microfiltración tangencial ($T = 30$ °C; $FRV = 1,1-1,3$; $U = 6,1$ m·s⁻¹) del extracto obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n = 3$): a) contenido de antocianinas; b) contenido de elagitaninos.

El comportamiento de la disminución de los ETs en el permeado en función de la presión se puede atribuir a la formación de una capa de solutos sobre la superficie de la membrana, la cual fue aumentando su resistencia conforme se incrementaba la presión y finalmente retuvo un mayor número de solutos de alto peso molecular (Carvalho *et al.*, 2008). Mannapperuma (1997) indica que el aumento de la Ptm provoca un incremento en el tamaño de la capa gel, por lo que la concentración de solutos retenidos en la superficie de

la membrana aumenta, en este caso la concentración de ETs en la capa gel crece. Una vez formada la capa gel, cualquier incremento adicional de la presión simplemente aumenta el espesor de la capa y su resistencia hidráulica (Mannapperuma, 1997); de esta manera aumenta la retención de los ETs, en otras palabras, se da una disminución del contenido de estos compuestos en el extracto clarificado (permeado).

Comparando los resultados obtenidos en las Figuras 38 y 39 se analizó cuál sería la P_{tm} más adecuada para realizar el proceso de MF en modo de concentración (ensayos de larga duración). Es importante encontrar un balance entre el flujo de permeado y la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto clarificado; se desea el mayor flujo posible durante la MF y la mayor recuperación de polifenoles (ATCs y ETs) en el producto de interés (permeado). En este caso, el contenido de ATCs no fue afectado por la P_{tm}, pero se observó un comportamiento opuesto con respecto al flujo de permeado y al contenido de ETs ya que, al aumentar la P_{tm}, aumentaba el flujo pero disminuían los ETs en el permeado. Se realizó una prueba de Tukey, tomando la P_{tm} como un factor nominal, para escoger la presión más conveniente (Cuadro A-LXX, Anexo 10.8) y se encontró que a una P_{tm} de 3,60 bar se obtenían altos flujos y un alto contenido de ETs en el extracto clarificado.

- *Ensayos de microfiltración tangencial en modo de concentración*

Se realizaron tres ensayos de MF tangencial en modo de concentración (hasta FRV= 12,6), utilizando el extracto obtenido del proceso de extracción a nivel de planta piloto el cual presentaba una turbidez baja (~250 NTU). Para estas pruebas se aplicó la presión transmembranaria que generó los mejores resultados en cuanto al flujo de permeado y a los contenidos de ATCs y ETs, como ya se mencionó en la sección anterior. Las condiciones de operación para estos ensayos fueron las siguientes: P_{tm}= 3,60 ± 0,02 bar; T= 30,0 ± 0,1 °C y U= 6,1 ± 0,2 m·s⁻¹. Para evaluar la repetibilidad de los tres ensayos de MF tangencial se realizó una prueba F (F-test), la cual indicó que no había diferencias significativas (p>0,05) entre las tres curvas de MF del extracto (flujo versus tiempo), es decir, la prueba de MF del extracto obtenido del SPIM fue repetible a las condiciones aplicadas durante el proceso (ver Cuadro A-LXXI, Anexo 10.8).

En la Figura 40 se observa que para los tres ensayos se presentó el comportamiento típico de la microfiltración de extractos y jugos de frutas caracterizado por una primera etapa,

durante los primeros 10 min de operación, en la que ocurre una caída severa del flujo de permeado debido a la formación de la capa de gel sobre la superficie de la membrana. Esta formación de la capa depende del tiempo y de la presión transmembranaria (Carneiro *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2008; Vaillant *et al.*, 2008). La segunda etapa está caracterizada por una disminución gradual del flujo y depende principalmente del aumento de la concentración de partículas en la superficie de la membrana y la subsecuente deposición de ellas sobre la membrana (Vaillant *et al.*, 2008). Resultados similares han sido reportados en la literatura para la clarificación de productos similares al extracto de polifenoles obtenido a partir del SPIM en cuanto a la turbidez, tales como jugo de manzana (Mondor *et al.*, 2000), jugo de limón (Espamer *et al.*, 2006), jugo de piña (Laorko *et al.*, 2010) y extracto de flor de Jamaica -*Hibicus sabdariffa* L.- (Cisse *et al.*, 2011b).

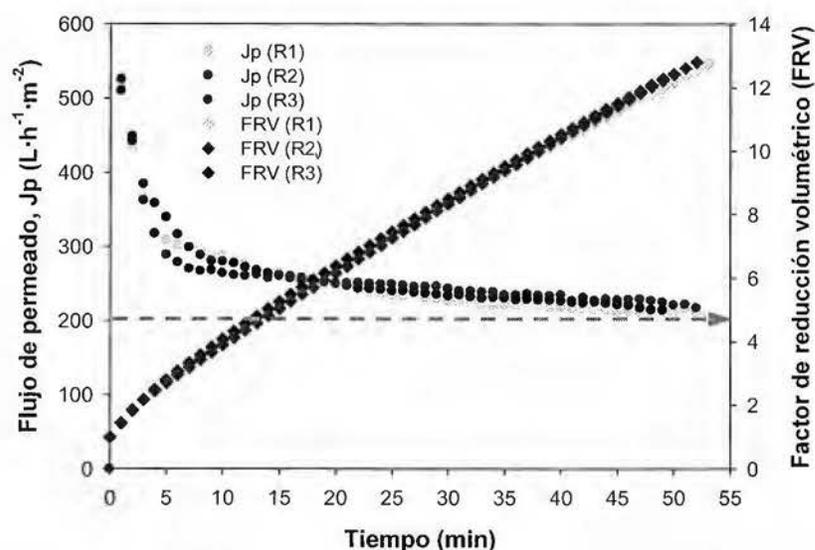


Figura 40. Evaluación del flujo de permeado y factor de reducción volumétrica durante el proceso de microfiltración tangencial ($T= 30,0$ °C; $P_{tm}= 3,60$ bar; $U=6,1$ $m \cdot s^{-1}$) del extracto obtenido a partir del SPIM ($n=3$).

Como era de esperarse, un producto con baja turbidez como el extracto presenta flujos de permeado altos; en la Figura 40 se puede observar que se dio una disminución de 252 a 217 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ a factores de reducción volumétricos de 6 y 12, respectivamente. Los flujos de permeado estuvieron por encima de 200 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$, valores altos para el FRV alcanzado, lo que constituye un alto rendimiento (92 %). No hay referencias sobre cuál debe ser el flujo

de permeado mínimo o el ideal, ya que depende del producto y de las condiciones de operación; sin embargo, Vaillant *et al.* (2004) reportan que $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ es el flujo mínimo que se debe presentar para que sea factible técnicamente la MF para el procesamiento de jugos de frutas.

En el Cuadro XXXIV se muestran los parámetros evaluados en las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de microfiltración del extracto de polifenoles a un FRV de 12,6: alimentación, permeado y retenido. Los resultados del ANDEVA realizado indican que se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para seis de las nueve variables-respuesta analizadas, sólidos insolubles en suspensión (SIS), turbidez, acidez, sólidos solubles, contenido de antocianinas y capacidad antioxidante (ORAC-H).

Cuadro XXXIV. Parámetros físico-químicos de las muestras obtenidas durante el proceso de microfiltración tangencial (FRV=12,6) del extracto obtenido a partir del SPIM*.

Parámetro	Muestras del proceso de MF**		
	Alimentación	Permeado	Retenido
Sólidos insolubles en suspensión ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,70 \pm 0,07^b$	$0,08 \pm 0,00^c$	$1,53 \pm 0,06^a$
Turbidez (NTU)	249 ± 24^b	$0,5 \pm 0,1^c$	6604 ± 371^a
Acidez ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$0,372 \pm 0,004^b$	$0,35 \pm 0,01^c$	$0,397 \pm 0,008^a$
Sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$)	$1,28 \pm 0,04^b$	$1,24 \pm 0,05^b$	$1,74 \pm 0,05^a$
pH	$3,30 \pm 0,03^a$	$3,31 \pm 0,03^a$	$3,28 \pm 0,04^a$
ATCs ($\text{mg cianidina-3-glucósido}\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	$2,0 \pm 0,2^a$	$2,3 \pm 0,2^a$	$1,4 \pm 0,4^b$
ETs ($\text{mg ácido elágico}\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	33 ± 2^a	34 ± 2^a	38 ± 5^a
ORAC-H ($\mu\text{mol trolox equivalentes}\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	1184 ± 97^{ab}	1270 ± 135^a	931 ± 177^b
PT ($\text{mg ácido gálico}\cdot\text{g}^{-1}$, BS)	65 ± 5^a	66 ± 3^a	59 ± 3^a

*Datos son reportados como promedio \pm intervalo de confianza ($n=3$), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).

**Condiciones de MF: $T= 30,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $P_{tm}= 3,60 \text{ bar}$; $U=6,1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= polifenoles totales. BS= base seca del extracto.

El proceso de MF permite reducir considerablemente los valores de turbidez y SIS en los jugos y extractos clarificados, pasando de un extracto turbio (Figura 41.a) a uno de apariencia translúcida (Figura 41.b). El extracto microfiltrado (permeado) presentó un valor de turbidez menor a 1 NTU; esto cumple con lo establecido según Cancino *et al.* (2004) para denominarse producto clarificado, pues es menor a 5 NTU. La MF separa los

sólidos en suspensión que flotan en la disolución del extracto, además de las macromoléculas grandes. Como se aprecia en el Cuadro XXXIV, el permeado presenta los menores valores de SIS y turbidez, y el retenido los mayores valores de estos parámetros analizados ($p < 0,05$). Estos resultados cumplen con lo esperado, ya que durante el proceso de MF se van acumulando las moléculas y compuestos que no logran atravesar la membrana, generando un fluido turbio y oscuro como se muestra en la Figura 41.c.

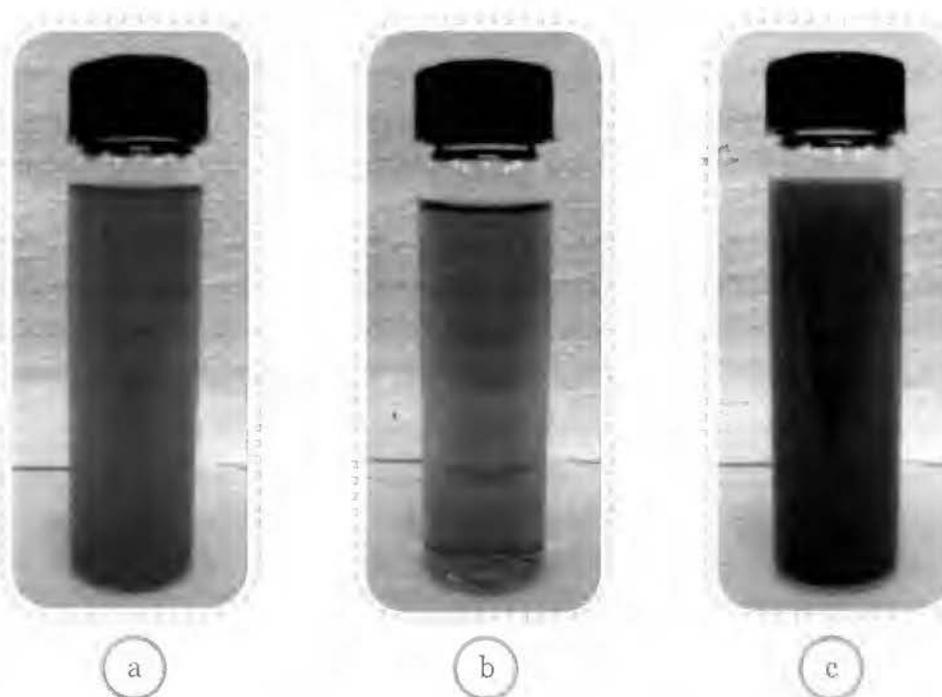


Figura 41. Comparación de las muestras obtenidas durante el proceso de microfiltración tangencial del extracto obtenido a partir del SPIM: a) extracto de alimentación; b) extracto permeado; c) extracto retenido (FRV= 12,6).

Al comparar el contenido de antocianinas, elagitaninos, polifenoles totales y capacidad antioxidante en base seca en las muestras de alimentación y permeado (Cuadro XXXIV), se observa que no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que indica que la clarificación mediante MF no alteró la concentración de estos compuestos en el extracto obtenido del SPIM. Estudios previos han reportado que la MF no genera pérdidas o retención de compuestos polifenólicos en extractos con bajo contenido de SIS (y por lo tanto un bajo valor de turbidez). Por ejemplo, Meng *et al.* (2006) encontraron que la microfiltración (membrana de cerámica con tamaño promedio de poro de $0,2 \mu\text{m}$) de un

extracto acuoso de *Perilla frutescens* no disminuyó el contenido de flavonoides (medido como contenido de antocianinas y flavonas). Asimismo, Cisse *et al.* (2011b) mencionan que después de la microfiltración (membrana de cerámica con tamaño promedio de poro de 0,2 μm) de un extracto de flor de Jamaica, el contenido total de antocianinas no cambió con respecto a la materia prima.

En lo referente al contenido de acidez, sí se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el permeado y la alimentación, siendo mayor este parámetro en el extracto de alimentación, aunque la diferencia fue de 0,022 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ entre ambas muestras; por otro lado, el valor de pH no fue significativamente diferente ($p > 0,05$) en las distintas muestras obtenidas del proceso de MF: alimentación, permeado y retenido.

El objetivo de la microfiltración es separar los compuestos insolubles y obtener una fracción clarificada estable microbiológicamente, manteniendo las características sensoriales y funcionales del producto (Echavarría *et al.*, 2011); en este caso se cumplió con el objetivo de eliminar los sólidos insolubles y mantener o preservar el contenido de polifenoles (PT, ETs y ATCs), así como la capacidad antioxidante en el extracto clarificado (permeado).

7.3 Conclusiones y recomendaciones

7.3.1 Conclusiones

- El extracto obtenido durante el escalamiento a nivel de planta piloto (utilizando un volumen 100 veces mayor) presentó pocas desviaciones con respecto al generado durante el proceso de extracción realizado a nivel de laboratorio. Los factores que pudieron incidir durante el escalamiento en las diferencias encontradas entre los extractos fueron el uso de un agitador mecánico diferente (distinto diseño y potencia), y un mayor tiempo transcurrido durante las etapas de enfriamiento y prensado.
- De acuerdo con las condiciones evaluadas durante la etapa de microfiltración, se encontró un efecto opuesto de la presión transmembranaria sobre el flujo de

permeado y el contenido de ETs presente en el extracto clarificado. Al aumentar la P_{tm} se incrementa el flujo de permeado; sin embargo, disminuye el contenido de ETs, lo que puede ser explicado por el aumento de la resistencia de la capa gel formada sobre la membrana.

- Durante la etapa de MF del extracto se obtuvieron flujos de permeado altos ($\sim 200 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) debido a las características de su composición físico-química, lo que constituye un aspecto positivo debido a que se obtienen altos rendimientos.
- La MF cumplió con su objetivo ya que separó los compuestos insolubles para obtener una fracción clarificada estable microbiológicamente y no alteró las características funcionales del producto. Esto porque se mantuvo el contenido de PT, ETs y ATCs, así como la capacidad antioxidante en el extracto clarificado (permeado).

7.3.2 Recomendaciones

- Evaluar el proceso de extracción a nivel de planta piloto utilizando la misma potencia del agitador mecánico empleado a nivel de laboratorio para eliminar esta variable como un factor que pueda afectar el proceso de extracción de los polifenoles presentes en el SPIM.
- Evaluar otros parámetros de operación durante la microfiltración del extracto tales como la temperatura, velocidad tangencial, factor de reducción volumétrico, entre otros.
- Evaluar la reutilización del retenido que se genera durante la MF, el cual contiene una cantidad significativa de polifenoles.
- Buscar alternativas innovadoras para aprovechar el subproducto que queda después del proceso de extracción, el cual todavía retiene un alto contenido de polifenoles y presenta un alto contenido de fibra dietética y ácidos grasos poliinsaturados.



VIII. Objetivo 3

Evaluación del proceso de ultrafiltración tangencial para obtener un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos y con alto grado de pureza, analizando diferentes parámetros de proceso



VIII. OBJETIVO 3

8.1 Metodología

8.1.1 Diseño experimental

Se evaluó el efecto de la presión transmembranaria y del tipo de membrana en el proceso de ultrafiltración sobre la concentración y purificación del extracto de polifenoles, y en el desempeño del proceso (flujos y consumo de energía). Se empleó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial 2x7 (ver Cuadro XXXV) para evaluar dos factores, el tipo de membrana (Inside Céram y Membralox) y la presión transmembranaria, la cual es controlada con la presión de aire comprimido de la bomba neumática (20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 psi). El tipo de membrana se evaluó como factor nominal y la presión transmembranaria como factor continuo. Para cada ensayo se partió de 6 kg de extracto clarificado (obtenido mediante MF) y para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones.

Cuadro XXXV. Diseño experimental para la evaluación del tipo de membrana y la presión transmembranaria sobre la concentración y purificación del extracto de polifenoles.

Tratamiento	Factor 1: Tipo de membrana	Factor 2:	
		Presión aire comprimido (psi)	Presión transmembranaria (bar)
1	Inside Céram (1 kDa)	20	2,76
2	Inside Céram (1 kDa)	30	3,50
3	Inside Céram (1 kDa)	40	4,33
4	Inside Céram (1 kDa)	50	5,03
5	Inside Céram (1 kDa)	60	5,68
6	Inside Céram (1 kDa)	70	6,27
7	Inside Céram (1 kDa)	80	6,82
8	Membralox (5 kDa)	20	2,76
9	Membralox (5 kDa)	30	3,50
10	Membralox (5 kDa)	40	4,33
11	Membralox (5 kDa)	50	5,03
12	Membralox (5 kDa)	60	5,68
13	Membralox (5 kDa)	70	6,27
14	Membralox (5 kDa)	80	6,82

8.1.2 Procedimiento

- *Ultrafiltración tangencial del extracto*

El proceso de ultrafiltración del extracto clarificado de polifenoles se realizó en la misma unidad piloto de MF-UF descrita anteriormente en la sección 7.1.2 (ver Figura 35). En los ensayos de UF se utilizaron dos tipos de membranas de cerámica: 1) membrana tubular de óxido de titanio (TiO_2) y zirconia (ZrO_2) de 23 canales de la marca Inside Céram™ (Tami Industries, Francia) con un punto de corte MWCO = 1 kDa y un área efectiva de $0,35 \text{ m}^2$; y 2) membrana tubular de zirconia (ZrO_2) de 19 canales, marca Membralox® (Pall Corporation, Francia) con un MWCO = 5 kDa y un área efectiva de filtración de $0,22 \text{ m}^2$. Estas membranas fueron elegidas debido a su disponibilidad en el CITA y a su aplicabilidad a nivel industrial. Todos los ensayos se realizaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, para evitar una posible degradación de los compuestos bioactivos debido al uso de temperaturas más altas.

• *Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y del tipo de membrana*

Para evaluar el efecto de la presión transmembranaria y el tipo de membrana se probaron 7 presiones transmembranarias: 2,76; 3,50; 4,33; 5,03; 5,68; 6,27 y 6,82 bar; y como ya se mencionó, se utilizaron 2 membranas con diferente MWCO: 1 y 5 kDa. Para estos ensayos cada presión se mantuvo constante durante 30 minutos (tiempo de estabilización) a una velocidad tangencial (U) de $7,1 \pm 0,3$ (1 kDa) y $5,5 \pm 0,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (5 kDa). Los valores de flujo de permeado se tomaron durante los últimos 10 minutos para cada presión; después de ese tiempo la presión se incrementaba al siguiente valor. Las muestras de permeado y retenido, para cada presión, fueron tomadas en el último instante (después del tiempo de estabilización) y las cantidades nunca excedieron 50 mL. Asimismo, el permeado y el retenido eran reciclados de nuevo al tanque de alimentación con el fin de mantener una concentración de alimentación constante (todos los experimentos se realizaron a un valor de FRV entre 1,1-1,3). Las muestras de alimentación, retenido y permeado fueron inmediatamente congeladas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en bolsas metalizadas hasta su análisis.

• *Ensayos de ultrafiltración tangencial en modo de concentración*

Una vez seleccionada la presión transmembranaria y tipo de membrana más adecuados para UF con base en los resultados de retención de elagitaninos y antocianinas, además de

los flujos de permeado y consumo de energía, se procedió a realizar los ensayos de UF en modo de concentración. Se elaboraron las gráficas correspondientes para cada ensayo de acuerdo con los datos recopilados, con el objetivo de estudiar el comportamiento del flujo de permeado ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$; ver Ecuación 4, sección 3.5.7) y el factor de reducción volumétrica (FRV, ver Ecuación 20, sección 7.1.2). Además, se determinó la concentración de elagitaninos y antocianinas, así como la concentración de los otros parámetros (sólidos solubles, acidez titulable, polifenoles totales, capacidad antioxidante) en el extracto de alimentación, permeado y retenido.

Se obtuvieron muestras del extracto de alimentación, permeado y retenido (extracto concentrado) a un FRV= 7,9. Todas las muestras se empacaron en bolsas laminadas, las cuales de inmediato se sellaron y almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Las muestras luego se descongelaron a temperatura de refrigeración ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) para determinar la humedad, pH, sólidos solubles, acidez titulable, concentración de elagitaninos totales y antocianinas totales por HPLC-DAD, ORAC-H y polifenoles totales (ver secciones 4.4.1 - 4.4.3). El valor de turbidez de las muestras se determinó antes de congelarlas (ver sección 5.2.1). En la Figura 42 se muestra el flujo de proceso para la obtención del extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de planta piloto mediante ultrafiltración.

- *Retención de los polifenoles (elagitaninos y antocianinas), sólidos solubles y acidez titulable*

Para realizar el análisis de la retención de los compuestos de interés (elagitaninos, antocianinas, sólidos solubles y acidez titulable) por la membrana se estimó la concentración de cada compuesto tanto en el permeado como en el retenido. Para calcular la retención de estos compuestos se utilizó la Ecuación 21:

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{ip}}{C_{ir}}\right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 21})$$

donde:

R_i = retención del compuesto de interés –antocianinas, elagitaninos, sólidos solubles y acidez titulable- (%)

C_{ip} = concentración del compuesto de interés en el permeado ($\text{mg}_{\text{del compuesto}} \cdot \text{g}^{-1}$, BH)

C_{ir} = concentración del compuesto de interés en el retenido ($\text{mg}_{\text{del compuesto}} \cdot \text{g}^{-1}$, BH)

- *Estimación del consumo de energía*

Se evaluó el poder consumido a cada presión transmembranaria evaluada, según la Ecuación 22. Además, se calculó la energía que se necesita para producir un litro de permeado durante una hora de ultrafiltración por metro cuadrado de la membrana (Ecuación 23):

$$E = E_{bc} + E_{bn}; \quad (\text{Ecuación 22})$$

$$E_L = \frac{E}{J_p \times A} \quad (\text{Ecuación 23})$$

donde:

E: poder de consumo (W)

E_{bc} : consumo de la bomba centrífuga (W)

E_{bn} : consumo de la bomba neumática (W)

E_L : energía que se necesita para producir un litro de permeado durante una hora de ultrafiltración ($W \cdot h \cdot L^{-1}$)

J_p : flujo de permeado ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)

A: área de la membrana (m^2)

- *Pureza del extracto de polifenoles*

Para realizar el análisis de pureza del contenido de polifenoles con respecto a los sólidos totales, se estimó la concentración de los polifenoles totales y el contenido de sólidos totales en el retenido. Para calcular la pureza de estos compuestos se utilizó la Ecuación 24:

$$P_{PT} = \frac{C_{PTr}}{C_{STr}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 24})$$

donde:

P_{PT} = pureza del extracto de polifenoles con respecto al contenido de sólidos totales (g de ácido gálico $\cdot 100 g^{-1}$ de sólidos totales)

C_{PTr} = concentración de polifenoles totales en el retenido (g de ácido gálico $\cdot g^{-1}$, BH)

C_{STr} = concentración de sólidos totales en el retenido (g de sólidos totales $\cdot g^{-1}$, BH)

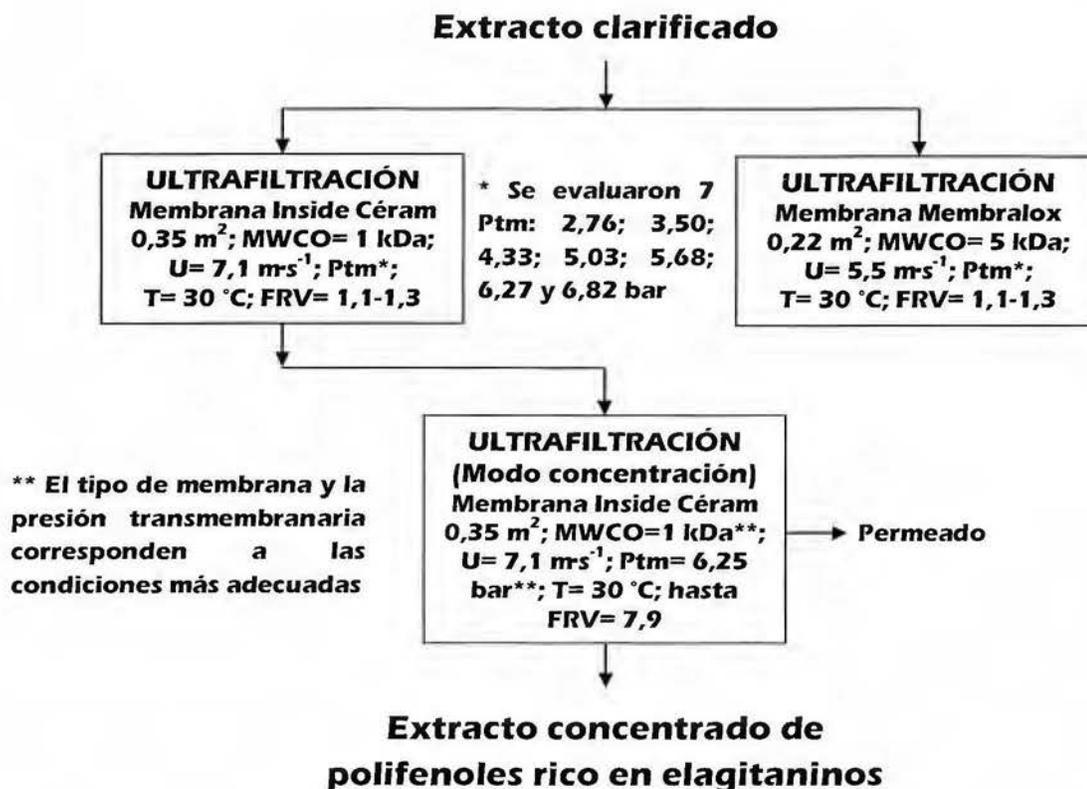


Figura 42. Flujo de proceso para la obtención de un extracto concentrado de polifenoles rico en elagitaninos a nivel de planta piloto mediante ultrafiltración.

8.1.3 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para diseño factorial para cada variable respuesta, con el fin de evaluar la interacción del tipo de membrana y la presión transmembranaria; además, se realizó una prueba de Tukey, utilizando la presión transmembranaria como factor nominal, para elegir la presión más adecuada. Para comparar las muestras obtenidas durante el proceso de UF (FRV= 7,9) se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable respuesta. Por otra parte, para evaluar la repetibilidad de los ensayos de UF tangencial (modo de concentración) se realizó una prueba F (F-test); además, se realizó una comparación de gráficas del proceso de ultrafiltración con el fin de evaluar el flujo de permeado y FRV en función del tiempo. Se utilizó el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA).

8.2 Resultados

Con el propósito de lograr la concentración del extracto de polifenoles rico en elagitaninos se realizaron ensayos de ultrafiltración utilizando el equipo piloto de MF-UF. Para realizar las actividades de este objetivo se utilizó como materia prima el extracto clarificado obtenido del proceso de microfiltración (sección 7.2). Primero se evaluó el efecto de la presión transmembranaria y del tipo de membrana y posteriormente se evaluó el desempeño y efecto del proceso de UF en modo de concentración.

- *Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y del tipo de membrana*

Estos ensayos se realizaron a un FRV entre 1,1 y 1,3; para lograr esto se mantuvo un volumen de alimentación cercano al volumen muerto del equipo, y se recircularon el permeado y retenido al tanque de alimentación. Para comprobar que se mantenía el FRV constante a las diferentes presiones se midió la turbidez en las muestras de retenido para cada repetición (ver Cuadros A-LXXXI y A-LXXXII, Anexo 10.9). De esta forma se confirmó que los valores de turbidez en los retenidos fueron similares y constantes en cada ensayo.

En la Figura 43 se puede observar el comportamiento del flujo de permeado en cada tipo de membrana con respecto a la aplicación de las diferentes presiones transmembranarias evaluadas. Se observó un efecto significativo de la P_{tm} sobre el flujo de permeado del extracto clarificado ($p < 0,05$); para ambas membranas se dio un aumento al incrementarse la P_{tm} . Utilizando la membrana de 1 kDa el flujo pasó de 6,7 a 14,3 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ y con la de 5 kDa el flujo aumentó el doble (de 8 a 16 $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) al incrementarse la presión de 2,76 a 6,82 bar, respectivamente. El factor tipo de membrana no ejerció un efecto, además no se presentó interacción entre el tipo de membrana y la presión transmembranaria ($p > 0,05$) (ver Cuadro A-LXXXIII, Anexo 10.9).

El aumento del flujo sigue un comportamiento lineal al aumentar la P_{tm} , similar para ambas membranas (Figura 43). Este comportamiento también ha sido observado por otros autores en el proceso de ultrafiltración de jugos y extractos. Díaz-Reinoso *et al.* (2009) encontraron que el aumento de la presión transmembranaria (de 2 a 8 bar) generaba un aumento lineal del flujo de permeado durante la UF de un extracto obtenido del proceso de fermentación de uva utilizando una membrana tubular de cerámica (TiO_2) y otra con una

configuración espiral enrollada (polietilenglicol), ambas con un MWCO de 1 kDa. También Cisse *et al.* (2011a) mencionan que este comportamiento fue observado durante la UF de un extracto de flor de Jamaica ($P_{tm}=5-30$ bar) con una membrana de hoja plana de polietersulfona de 5 kDa.

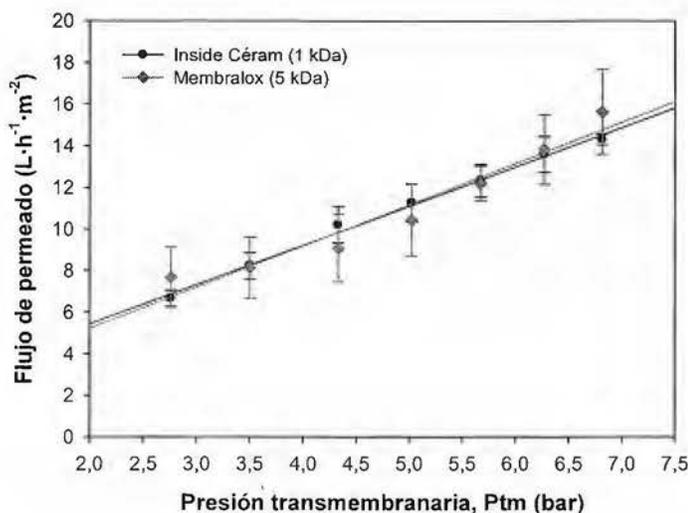


Figura 43. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre el flujo de permeado durante el proceso de ultrafiltración tangencial ($T= 30$ °C; $FRV=1,1-1,3$; $U=5,5-7,1$ $m \cdot s^{-1}$) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n=3$).

De acuerdo con el valor nominal del MWCO de cada membrana utilizada, se esperaba que la membrana de 5 kDa (Inside Céram) presentara un mayor flujo de permeado con respecto a la de 1 kDa (Membralox); sin embargo, los flujos de ambas membranas no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) en cada presión evaluada. Hay que indicar que, a pesar de estar elaboradas de materiales similares, ambas membranas son de marcas diferentes (fabricadas por diferentes compañías), por lo que la distribución del tamaño de los poros podría no ser la misma en cada membrana evaluada, lo que puede incidir en los flujos de permeado obtenidos en el rango de presión evaluado.

En las Figuras 44.a y 44.b se muestran los resultados de retención de acidez titulable y sólidos solubles, respectivamente, para cada P_{tm} evaluada y según el tipo de membrana,

valores calculados de acuerdo con la Ecuación 21 (sección 8.1.2). Se observó un efecto significativo de la Ptm y del tipo de membrana sobre la retención de acidez ($p < 0,05$). La Figura 44.a muestra que al aumentar la Ptm se da un aumento en la retención de acidez en el extracto (retenido). Este parámetro presentó un rango de 20-42 % y 8-28 % para las membranas Inside Céram y Membralox, respectivamente. Por otra parte, solamente el tipo de membrana ejerció un efecto sobre la retención de sólidos solubles ($p < 0,05$). En este caso, al igual que con la acidez, la retención fue mayor en la membrana Inside Céram (promedio de 42 ± 1 %) con respecto a la Membralox (promedio de $38,7 \pm 0,4$ %).

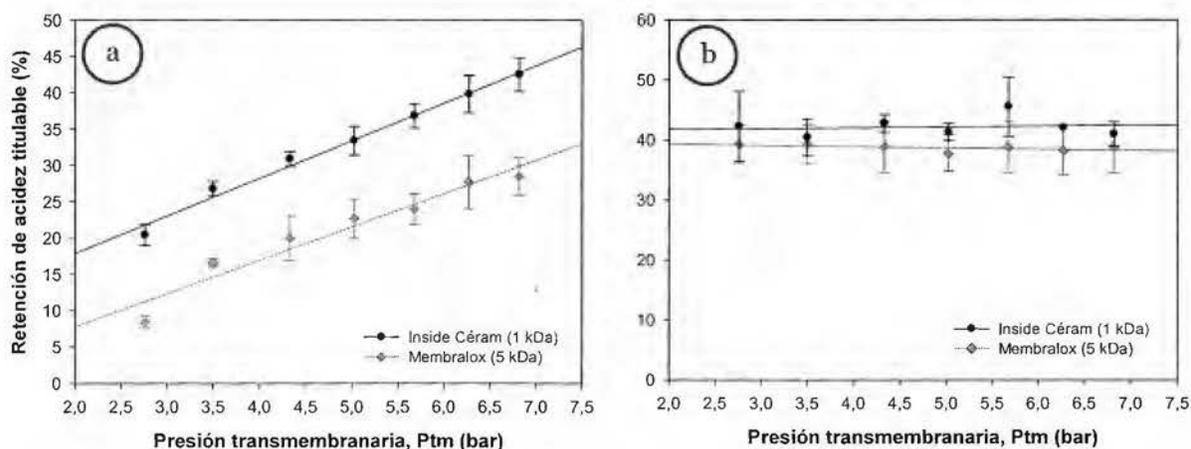


Figura 44. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre la retención de ciertos compuestos durante el proceso de ultrafiltración tangencial ($T = 30$ °C; $FRV = 1,1-1,3$; $U = 5,5-7,1$ $m \cdot s^{-1}$) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n = 3$): a) retención de acidez; b) retención de sólidos solubles.

Los niveles de retención observados con las dos membranas evaluadas son altos, tomando en cuenta la masa molecular de los solutos retenidos, $134,1$ $g \cdot mol^{-1}$ para ácido málico y $342,3$ $g \cdot mol^{-1}$ para la sacarosa, siendo estas moléculas los principales componentes que contribuyen en la acidez y en los sólidos solubles del extracto, respectivamente. Por lo tanto, la retención de estos compuestos no puede ser sólo explicada por consideraciones estéricas. Esto probablemente se debe a otros fenómenos como interacciones entre los solutos y el material de la membrana, la asociación de los solutos con macromoléculas retenidas, etc. (Kalbasi & Cisneros-Zevallos, 2007; Cisse *et al.*, 2011a).

Los valores de retención de antocianinas y elagitaninos para las dos membranas, a las diferentes presiones transmembranarias aplicadas, se muestran en las Figuras 45.a y 45.b. Tanto para la retención de ATCs como de ETs se observó un efecto significativo de la Ptm y del tipo de membrana ($p < 0,05$). Además se evidenció una interacción entre ambos factores sobre la retención de ETs; esto implica que el efecto de la Ptm depende del tipo de membrana, en otras palabras, al comparar la curva de retención de ETs de cada membrana, éstas no presentaron la misma tendencia al aumentar la Ptm.

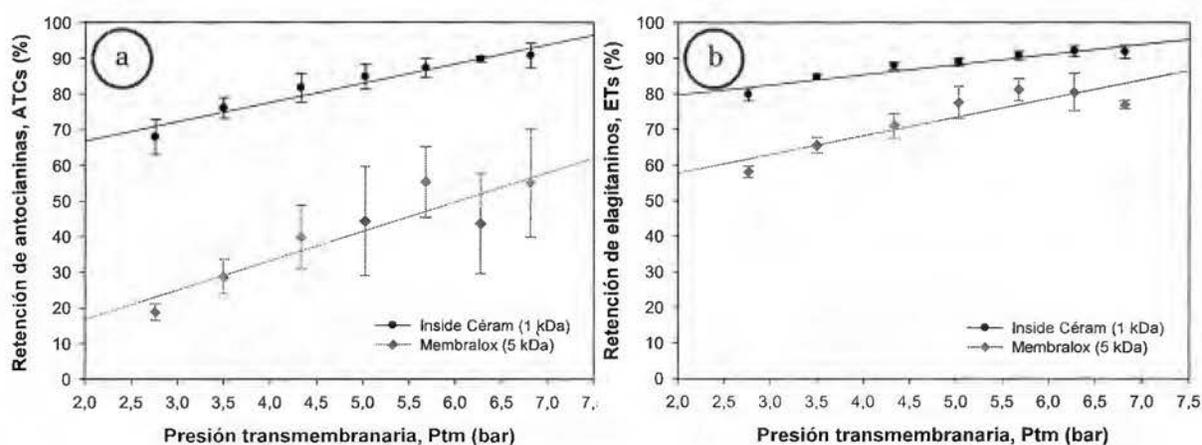


Figura 45. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre la retención de compuestos polifenólicos durante el proceso de ultrafiltración tangencial ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $FRV = 1,1-1,3$; $U = 5,5-7,1\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n = 3$): a) retención de antocianinas; b) retención de elagitaninos.

Para ambos compuestos (antocianinas y elagitaninos) los mayores valores de retención ocurrieron con la membrana Inside Céram, siendo más evidente el efecto del tipo de membrana sobre la retención de ATCs (ver Figura 45). Con respecto a este parámetro se presentó un rango de 68-91 % y 19-55 % para las membranas Inside Céram y Membralox, respectivamente. Por otra parte, la membrana Membralox presentó una mayor variabilidad en la retención de ATCs, principalmente al evaluar las presiones más altas (5,03; 5,68; 6,27 y 6,82 bar).

En el caso de los ETs, la diferencia entre las curvas o rangos de retención de cada membrana fue menor, 80-92 % (Inside Céram) y 58-77 % (Membralox) con respecto a las curvas de retención de ATCs. Sin embargo, se observó que a altas presiones (5,03-6,82 bar) las diferencias entre membranas fue menor (las curvas están más cercas); un comportamiento similar también fue observado por Cisse *et al.* (2011a). Igualmente, se evidenció una mayor variabilidad en la membrana Membralox, principalmente a presiones altas. Esto podría indicar que membranas con mayor MWCO son más sensibles a los cambios de presión en términos de retención de ATCs y ETs. Liu *et al.* (2011) encontraron un comportamiento similar cuando evaluaron la retención de polifenoles totales pero utilizando membranas de hoja plana (50 y 150 kDa).

Este comportamiento de retención de los polifenoles analizados (ATCs y ETs) fue el esperado ya que la membrana Inside Céram (1 kDa) tiene un MWCO menor a la Membralox (5 kDa), por lo cual es razonable que la primera retenga una mayor cantidad de estos compuestos. Los menores porcentajes de retención de las ATCs con respecto a los ETs en la membrana de 5 kDa se deben al mayor tamaño molecular de los principales elagitaninos presentes en el extracto (1870,2 y 2804,2 g·mol⁻¹ para la sanguína H-6 y lambertianina C, respectivamente).

La Figura 46 muestra los valores de consumo de energía, calculados según la Ecuación 23 (sección 8.1.2). El consumo de energía corresponde a la energía que se necesita para producir un litro de permeado durante una hora de ultrafiltración por metro cuadrado de membrana. Para este parámetro se observó un efecto significativo de la P_{tm} y del tipo de membrana, además se evidenció una interacción entre ambos factores (p<0,05) (ver Cuadro A-LXXXVIII, Anexo 10.9). La membrana Inside Céram presentó un menor consumo de energía (694-1460 W·h·L⁻¹) con respecto a la Membralox (1027-2045 W·h·L⁻¹) en el rango de P_{tm} evaluado. Al aumentar la P_{tm} se dio una disminución de este parámetro y, como se observa en la Figura 46, este efecto fue más pronunciado al trabajar a bajas presiones. Esta disminución está asociada a un mejor aprovechamiento del consumo energético de la bomba de alimentación (neumática) y de la bomba centrífuga, debido a que la potencia eléctrica requerida en ambas bombas se mantiene casi constante al incrementar la presión transmembranaria, en el rango de presión evaluado. Analizando la Ecuación 23 para obtener el consumo de energía, el valor del numerador se mantuvo casi constante en cada presión (poder de consumo de las bombas); sin embargo, se dio un

aumento del valor en el denominador (volumen de permeado), lo que provoca una disminución en el consumo de energía.

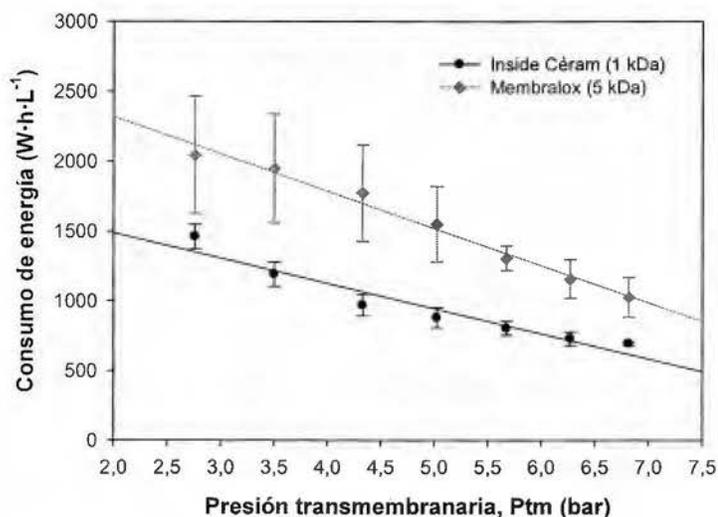


Figura 46. Evaluación del efecto de la presión transmembranaria y tipo de membrana sobre el consumo de energía durante el proceso de ultrafiltración tangencial ($T= 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $FRV=1,1-1,3$; $U=5,5-7,1\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM (barras indican intervalo de confianza al 95 %, $n=3$).

El consumo de energía está ligado al volumen de permeado (flujo de permeado x área de membrana) generado durante un período de tiempo determinado. En este caso, los flujos de permeado ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) fueron similares para ambas membranas en el rango de presión evaluado (ver Figura 43); sin embargo, la membrana Inside Céram al presentar un área mayor de membrana o de filtración ($0,35\text{ m}^2$), permitió generar un mayor volumen de permeado con respecto a la membrana Membralox (área de $0,22\text{ m}^2$). Por ejemplo, a la presión de $6,27\text{ bar}$ se obtuvo un flujo promedio de $13,6$ y $13,8\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ para las membranas Inside Céram y Membralox, respectivamente, lo que significa que se obtuvieron aproximadamente $4,8$ y $3,0$ litros de permeado por hora para cada membrana, respectivamente. En otras palabras, a una presión dada el uso de la membrana Inside Céram permitió consumir menos energía con respecto a la Membralox debido a que generó un mayor volumen de permeado en un tiempo determinado.

Para seleccionar las condiciones de operación más adecuadas (en este caso presión transmembranaria y tipo de membrana) deben ser considerados aspectos técnicos y económicos. Comparando los resultados mostrados anteriormente se evaluó cuál sería la membrana y P_{tm} más adecuadas para realizar el proceso de UF en modo de concentración (ensayos de larga duración). Se tiene que buscar un balance entre el flujo de permeado, el consumo energético y la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto (retenido). Se desea el mayor flujo posible durante la UF y la mayor retención de polifenoles (ATCs y ETs) en el producto de interés (retenido); por otro lado, se busca tener el menor consumo energético y la menor retención de acidez y sólidos solubles (°Brix), esto último porque incide en la pureza del extracto final.

Entre las membranas evaluadas no se encontraron diferencias entre las curvas de flujo de permeado; sin embargo, el consumo de energía fue menor para la membrana Inside Céram (debido al mayor volumen de permeado obtenido). Para los diferentes solutos evaluados, la membrana Inside Céram presentó los mayores valores de retención. Como ya se mencionó, en este caso se desea la mayor retención de ATCs y ETs y la menor de acidez y sólidos solubles. A pesar de que la membrana Membralox retuvo menos ácidos y sólidos solubles con respecto a la Inside Céram, al comparar los valores de estos parámetros en los extractos concentrados, obtenidos por ambas membranas, se encontró que fueron similares. Las muestras presentaron rangos de acidez de 0,31-0,33 y 0,30-0,32 g ácido málico equivalente·100 g⁻¹ para Inside Céram y Membralox, respectivamente. En el caso de los sólidos solubles se obtuvieron valores de 1,12-1,25 °Brix (Inside Céram) y 1,28-1,30 °Brix (Membralox). Por las razones anteriores se decidió elegir la membrana de 1 kDa (Inside Céram).

Es importante recalcar que, en los diferentes parámetros evaluados, la membrana Membralox presentó mayor variabilidad; esto reforzó más la decisión de escoger la membrana Inside Céram para realizar los ensayos en modo de concentración. Una vez seleccionada la membrana se analizó cuál presión transmembranaria era la más adecuada. Para esto se realizó una prueba de Tukey tomando la P_{tm} como un factor nominal (Cuadro L-XXXIX, Anexo 10.9), y se encontró que a una P_{tm} de 6,27 bar se obtenían los mayores flujos de permeado y las mayores retenciones de ATCs y ETs en el extracto, además del menor consumo de energía ($p < 0,05$); en cuanto a la retención de sólidos solubles, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes presiones ($p > 0,05$).

- *Ensayos de ultrafiltración tangencial en modo de concentración*

Se realizaron tres ensayos de UF tangencial en modo de concentración (hasta FRV= 7,9), utilizando el extracto clarificado obtenido del proceso de microfiltración (sección 7). Para estas pruebas se utilizó la membrana Inside Céram (MWCO= 1 kDa) y se aplicó la presión transmembranaria que generó los mejores resultados en cuanto al flujo de permeado y a la retención de ATCs y ETs, como ya se mencionó en la sección anterior. Las condiciones de operación para estos ensayos fueron las siguientes: $P_{tm} = 6,25 \pm 0,02$ bar; $T = 30,01 \pm 0,02$ °C y $U = 7,1 \pm 0,3$ m·s⁻¹. Para evaluar la repetibilidad de los ensayos de UF tangencial, se tomaron en cuenta las curvas obtenidas de los dos últimos ensayos, ya que en el primero se presentaron dificultades técnicas con el medidor de caudal. Para esto se realizó una prueba F (F-test) la cual indicó que no habían diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las dos curvas de UF del extracto (flujo versus tiempo), lo que indica que la prueba de UF del extracto fue repetible a las condiciones aplicadas durante el proceso (ver Cuadro A-XCI, Anexo 10.9).

En la Figura 47 se observa que para los dos ensayos se dio un comportamiento esperado para un proceso de ultrafiltración de extractos acuosos, similar al observado en los ensayos de microfiltración (Figura 40, sección 7.2). Se pueden apreciar tres etapas: una primera etapa que abarca los primeros 20 min de operación, en donde se observa que el flujo de permeado disminuye rápidamente, pasando de 85 a 30 L·h⁻¹·m⁻² (en promedio) lo que representa una caída de alrededor del 65 % respecto al flujo inicial. Esto es explicado por la formación de la capa gel que se genera por la deposición de los sólidos sobre la membrana, aumentando así la resistencia del flujo a través de esta.

Una vez que se ha superado el establecimiento de la capa gel inicial de colmataje se da la segunda etapa caracterizada por una disminución gradual del flujo (entre los minutos 20 y 100 de operación). Finalmente, la tercera etapa ocurre entre los 100 y 190 minutos, donde se mantiene un flujo constante de aproximadamente 15 L·h⁻¹·m⁻². Comportamientos similares han sido descritos por otros autores para el proceso de ultrafiltración de productos parecidos a este extracto de polifenoles, como extractos obtenidos de aguas residuales que se generan durante la extracción de aceite de oliva (Russo, 2007; Cassano *et al.*, 2013), extracto obtenido del desecho de la fermentación de uva (Díaz-Reinoso *et al.*, 2009) y extracto de flor de Jamaica (Cisse *et al.*, 2011a).

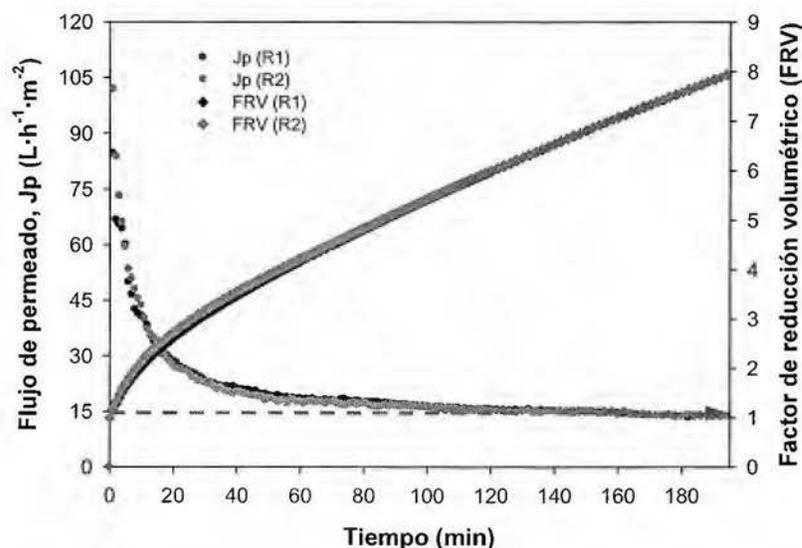


Figura 47. Evaluación del flujo de permeado y factor de reducción volumétrica durante el proceso de ultrafiltración tangencial (MWCO=1 kDa; $T=30,01$ °C; $P_{tm}=6,25$ bar; $U= 7,1$ $m\cdot s^{-1}$) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM ($n=2$).

No hay referencia sobre cuál debe ser el flujo de permeado mínimo o el ideal para este tipo de proceso; sin embargo, hay datos sobre estudios realizados con membranas de cerámica del mismo tipo que la utilizada en esta investigación (Inside Céram, MWCO de 1 kDa) para concentrar mediante ultrafiltración extractos acuosos de polifenoles. Por ejemplo, Russo (2007) obtuvo flujos de ~ 35 $L\cdot h^{-1}\cdot m^{-2}$ a un FRV de 2,5 durante la UF de un extracto obtenido del proceso de extracción de aceite de oliva, aplicando una temperatura de 20-25 °C, una P_{tm} de 1,5 bar y una velocidad tangencial (U) de 4,7 $m\cdot s^{-1}$. Por otra parte, Díaz-Reinoso *et al.* (2009) evaluaron la UF (hasta un FRV de 6,5) de un extracto obtenido del desecho de la fermentación de uva, y encontraron flujos de permeado de ~ 20 $L\cdot h^{-1}\cdot m^{-2}$ aplicando una temperatura, P_{tm} y U de 20 ± 4 °C, 8 bar y 2 $m\cdot s^{-1}$, respectivamente.

Si se comparan los datos anteriores con los flujos obtenidos en este estudio a un FRV de 2,5 (32 $L\cdot h^{-1}\cdot m^{-2}$) y 6,5 ($15,1$ $L\cdot h^{-1}\cdot m^{-2}$) se encuentra que se obtuvieron flujos de permeado similares aunque aplicando condiciones de operación diferentes. Además, a un FRV de 7,9 los flujos de permeado se mantuvieron cercanos a los 15 $L\cdot h^{-1}\cdot m^{-2}$ (ver Figura 47), lo que constituye un rendimiento de ~ 87 %. El valor de flujo de permeado ideal va a depender de varios factores como el costo de proceso, el valor económico del producto final, tipo de

membrana, condiciones de operación (temperatura, velocidad tangencial, presión transmembranaria), entre otros.

En el Cuadro XXXVI se muestran los parámetros evaluados en las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de ultrafiltración del extracto de polifenoles a un FRV de 7,9, correspondientes a la alimentación, permeado y retenido. Los resultados del ANDEVA realizado indican que se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para todas las variables respuesta analizadas: turbidez, acidez, sólidos solubles, contenido de antocianinas y elagitaninos, polifenoles totales y capacidad antioxidante (ORAC-H) (Cuadros A-XCII al A-XCIX, Anexo 10.9).

Cuadro XXXVI. Parámetros físico-químicos de las muestras obtenidas durante el proceso de ultrafiltración tangencial (FRV=7,9) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM*.

Parámetro	Muestras del proceso de UF**		
	Alimentación	Permeado	Retenido
Turbidez (NTU)	36 ± 1 ^b	0,28 ± 0,01 ^c	604 ± 10 ^a
Acidez (g·100 g ⁻¹)	0,331 ± 0,005 ^b	0,30 ± 0,02 ^b	0,52 ± 0,09 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	1,21 ± 0,04 ^b	0,96 ± 0,09 ^b	2,6 ± 0,6 ^a
pH	3,38 ± 0,01 ^a	3,426 ± 0,008 ^a	3,29 ± 0,05 ^b
ATCs (mg cianidina-3-glucósido·g ⁻¹ , BS)	0,37 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,09 ^b	1,6 ± 0,3 ^a
ETs (mg ácido elágico·g ⁻¹ , BS)	40 ± 3 ^b	14,0 ± 0,5 ^b	78 ± 23 ^a
ORAC-H (μmol trolox equivalentes·g ⁻¹ , BS)	1061 ± 124 ^{ab}	738 ± 175 ^b	1364 ± 380 ^a
PT (mg ácido gálico·g ⁻¹ , BS)	83 ± 14 ^{ab}	44 ± 11 ^b	133 ± 50 ^a

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$).
 **Condiciones de UF: T= 30,01 °C; Ptm= 6,25 bar; U=7,1 m·s⁻¹. ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= polifenoles totales. BS= base seca del extracto.

Como se observa en el Cuadro XXXVI, la UF permitió disminuir la turbidez del extracto de alimentación (Figura 48.a) para así obtener un permeado transparente (turbidez inferior a 1 NTU) y casi incoloro (Figura 48.b). Por otra parte, el retenido (extracto concentrado en polifenoles) aumentó su turbidez casi 17 veces con respecto al extracto de alimentación debido a la retención de los compuestos insolubles presentes en el extracto de

alimentación; además el producto retenido presentó un color rojo-vino más intenso ocasionado por la acumulación de antocianinas (Figura 48.c).

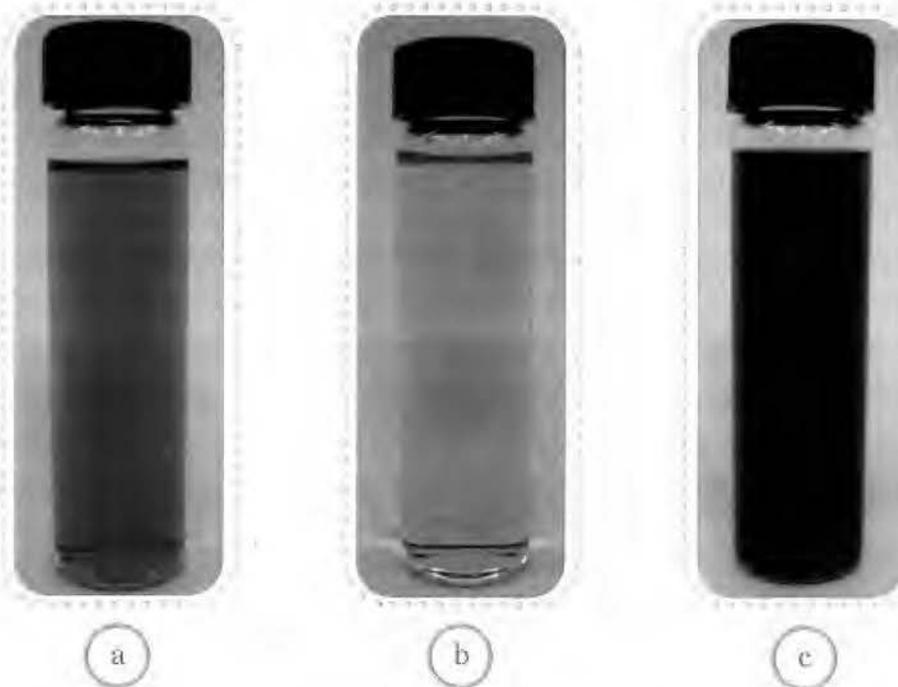


Figura 48. Comparación de las muestras obtenidas durante el proceso de ultrafiltración tangencial (MWCO= 1 kDa) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM: a) extracto de alimentación; b) extracto permeado; c) extracto concentrado (retenido, FRV= 7,9).

El extracto de alimentación presentó un valor de turbidez de 36 NTU a pesar de que éste fue clarificado mediante microfiltración, esto se debe a que el mismo estuvo almacenado en congelación durante 6 meses por cuestiones de logística, lo que provocó un aumento de la turbidez. Se ha observado que el almacenamiento en congelación de jugos y extractos de frutas clarificados (ricos en polifenoles) provoca la formación de complejos insolubles, lo que incide en el aumento de la turbidez. Según Landbo *et al.* (2006) las interacciones proteína-fenoles están involucradas en el desarrollo de la turbidez en jugos de bayas durante el almacenamiento en refrigeración y congelación.

En el Cuadro XXXVI se observa que el retenido presentó los mayores valores de acidez y °Brix ($p < 0,05$); asimismo, entre la muestra de permeado y de alimentación no se presentaron diferencias significativas en los valores de ambos parámetros ($p > 0,05$). Por

otro lado, el valor de pH fue significativamente menor ($p < 0,05$) en la muestra de retenido, lo que es coherente con los datos obtenidos de acidez. Como ya se mencionó, a pesar de que la masa molecular de corte de la membrana es de 1 kDa, ocurre una retención de estos compuestos de un 41 y 62 %, respectivamente (Cuadro XXXVII), debido probablemente a interacciones entre los solutos y el material de la membrana, además de la asociación de estos compuestos con algunas de las macromoléculas retenidas e inclusive con los mismos polifenoles (Kalbasi & Cisneros-Zevallos, 2007; Cisse *et al.*, 2011a).

Con respecto al contenido de antocianinas, elagitaninos, polifenoles totales y capacidad antioxidante (en base seca) en las muestras de alimentación y permeado (Cuadro XXXVI), se observa que no se presentó diferencias significativas ($p > 0,05$), aunque la tendencia fue que el permeado exhibió valores inferiores en estos parámetros con respecto a la alimentación. Por otra parte, el contenido de ATCs y ETs fue significativamente mayor en el retenido ($p < 0,05$) en comparación con las muestras de alimentación y permeado. Para ambos parámetros, la membrana retuvo aproximadamente un 92 % en el extracto concentrado o retenido (Cuadro XXXVII).

El extracto concentrado (o retenido) no presentó diferencias significativas con el extracto de alimentación en cuanto al contenido de polifenoles totales y al valor de ORAC-H ($p > 0,05$). Sin embargo, en el retenido los valores de estos parámetros fueron significativamente superiores a los que presentó el permeado, siendo la retención de polifenoles totales de un 85 %, como se muestra en el Cuadro XXXVII. Este valor de retención de PT es similar al obtenido por Díaz-Reinoso *et al.* (2009); el estudio realizado por estos autores reportó una retención del 85 % de los polifenoles totales durante la UF (FRV de 6,5) de un extracto obtenido del desecho de la fermentación de uva utilizando una membrana Inside Céram de 1 kDa. Otros autores han reportado valores de retención de PT cercanos al obtenido en esta investigación, durante la UF de extractos acuosos ricos en polifenoles: 87 y 91% (Liu *et al.*, 2011), 93 % (Cassano *et al.*, 2013), 80 y 83 % (Chandini *et al.*, 2013).

El uso de membranas de UF requiere solo pequeñas cantidades de energía eléctrica y en el caso de su aplicación para concentrar requiere invertir menos consumo energético para eliminar o extraer agua en comparación con los procesos tradicionales de evaporación (Kumar, 2007). La UF permite realizar el fraccionamiento y la concentración de ciertos

compuestos de acuerdo con su tamaño molecular y a la afinidad de los solutos con la membrana. Esto se logró demostrar con los resultados que se detallan en el Cuadro XXXVII, ya que se presentaron diferentes valores de retención para los parámetros analizados, lo que permitió un fraccionamiento de los compuestos.

Cuadro XXXVII. Porcentaje de retención de algunos parámetros físico-químicos evaluados durante el proceso de ultrafiltración tangencial (FRV=7,9) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM.

Parámetro	Retención (%) [*]	Principales compuestos	Masa molecular (g·mol ⁻¹)
Acidez	41 ± 13	Ácido málico	134,1
Sólidos solubles	62 ± 4	Sacarosa Fructosa	342,3 180,2
Polifenoles totales	85 ± 9	Formas libres y conjugadas de ácido gálico y elágico, flavanoles, flavonoles, antocianinas, elagitaninos ^{**}	170,1 - 2804,2
Antocianinas	92 ± 2	Cianidina-3-glucósido	449,2
Elagitaninos	92 ± 3	Sanguína H-6 Lambertianina C	1870,2 2804,2

^{*}Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Condiciones de UF: T= 30,01 °C; P_{tm}= 6,25 bar; U=7,1 m·s⁻¹. ^{**}Estos compuestos polifenólicos han sido encontrados en mora (*Rubus adenotrichos*) según Mertz *et al.* (2007).

Se observa que hay una coherencia entre los resultados obtenidos y los esperados ya que, al aumentar la masa molecular de los compuestos presentes en el extracto, aumentó el porcentaje de retención de los mismos, presentándose la menor retención en el contenido de acidez (menor masa molecular) y la mayor en el contenido de antocianinas y elagitaninos (compuestos con mayor masa molecular). En el caso del contenido de acidez, el principal ácido orgánico observado en la mora es el ácido málico como lo indican Kafkas *et al.* (2006); igualmente, análisis realizados en el CITA demuestran que éste es el principal ácido en la mora *Rubus adenotrichos*. Por otra parte, con respecto a los sólidos solubles (determinados como °Brix), los principales azúcares presentes reportados en la mora son glucosa, fructosa y sacarosa (Kafkas *et al.*, 2006) y, aunque en la mora fresca la sacarosa está en cantidades no detectables (Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Soto, 2010) en el

compuestos de acuerdo con su tamaño molecular y a la afinidad de los solutos con la membrana. Esto se logró demostrar con los resultados que se detallan en el Cuadro XXXVII, ya que se presentaron diferentes valores de retención para los parámetros analizados, lo que permitió un fraccionamiento de los compuestos.

Cuadro XXXVII. Porcentaje de retención de algunos parámetros físico-químicos evaluados durante el proceso de ultrafiltración tangencial (FRV=7,9) del extracto clarificado obtenido a partir del SPIM.

Parámetro	Retención (%)*	Principales compuestos	Masa molecular (g·mol ⁻¹)
Acidez	41 ± 13	Ácido málico	134,1
Sólidos solubles	62 ± 4	Sacarosa Fructosa	342,3 180,2
Polifenoles totales	85 ± 9	Formas libres y conjugadas de ácido gálico y elágico, flavanoles, flavonoles, antocianinas, elagitaninos**	170,1 - 2804,2
Antocianinas	92 ± 2	Cianidina-3-glucósido	449,2
Elagitaninos	92 ± 3	Sanguina H-6 Lambertianina C	1870,2 2804,2

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Condiciones de UF: T= 30,01 °C; Ptm= 6,25 bar; U=7,1 m·s⁻¹. **Estos compuestos polifenólicos han sido encontrados en mora (*Rubus adenotrichos*) según Mertz *et al.* (2007).

Se observa que hay una coherencia entre los resultados obtenidos y los esperados ya que, al aumentar la masa molecular de los compuestos presentes en el extracto, aumentó el porcentaje de retención de los mismos, presentándose la menor retención en el contenido de acidez (menor masa molecular) y la mayor en el contenido de antocianinas y elagitaninos (compuestos con mayor masa molecular). En el caso del contenido de acidez, el principal ácido orgánico observado en la mora es el ácido málico como lo indican Kafkas *et al.* (2006); igualmente, análisis realizados en el CITA demuestran que éste es el principal ácido en la mora *Rubus adenotrichos*. Por otra parte, con respecto a los sólidos solubles (determinados como °Brix), los principales azúcares presentes reportados en la mora son glucosa, fructosa y sacarosa (Kafkas *et al.*, 2006) y, aunque en la mora fresca la sacarosa está en cantidades no detectables (Acosta-Montoya *et al.*, 2010; Soto, 2010) en el

SPIM (formado principalmente por semillas) la sacarosa y la fructosa fueron los azúcares detectables.

Con respecto a los polifenoles totales, como ya se ha indicado, en *R. adenotrichos* los principales grupos presentes son las antocianinas y los elagitaninos; sin embargo, también hay presencia de polifenoles de menor tamaño molecular como formas libres y conjugadas de ácido gálico y elágico, flavanoles (epicatequina) y flavonoles (quercetina y kaempferol) (Mertz *et al.*, 2007). Por esta razón, la retención de los polifenoles totales fue menor en comparación con la retención de ATCs y ETs (analizados por HPLC), compuestos que presentan una mayor masa molecular, como se detalla en el Cuadro XXXVII.

- *Pureza del extracto de polifenoles concentrado mediante UF*

Finalmente se realizó el cálculo de la pureza del extracto de polifenoles según las diferentes etapas realizadas durante el proceso de extracción y purificación/concentración de los polifenoles obtenidos a partir del SPIM a nivel de planta piloto. Se determinó la pureza del extracto con respecto al contenido de polifenoles totales según la Ecuación 24 (sección 8.1.2) y además se comparó con un jugo de mora clarificado mediante MF. En el Cuadro XXXVIII se muestran los valores de pureza, además del contenido de elagitaninos, polifenoles totales, acidez y sólidos solubles de las diferentes muestras. El ANDEVA realizado para el análisis de estos datos se muestra en los Cuadros A-C al A-CV (Anexo 10.9).

La Figura 49 ilustra en forma esquemática las diferentes etapas realizadas para obtener el extracto concentrado final (retenido obtenido del proceso de UF, R2). Al analizar los datos del Cuadro XXXVIII se observa que la microfiltración no tuvo efecto sobre el contenido de polifenoles en base seca (polifenoles totales, ATCs y ETs), por lo cual la pureza no se vio afectada. Asimismo, la etapa de clarificación no influyó sobre el contenido de acidez ni en el valor de °Brix del extracto, ya que estadísticamente no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los extractos obtenidos después de la extracción (sin clarificar, E) y después de la MF (clarificado, P1).

La información obtenida demuestra que la UF cumplió con el objetivo de aumentar la pureza del extracto de polifenoles, ya que aumentó en casi el doble este valor. El extracto obtenido por UF (R2) fue significativamente más puro al extracto clarificado (P1) y sin

clarificar (E) ($p < 0,05$). Se logró el objetivo de fraccionar los compuestos iniciales presentes en el extracto, ya que los ETs y PT aumentaron aproximadamente 2,3 y 2 veces al comparar el extracto concentrado por UF (R2) con el extracto clarificado mediante MF (P1). Por otra parte, la acidez y los °Brix en el extracto concentrado aumentaron 1,5 y 2 veces, respectivamente. Con respecto a la capacidad antioxidante (ORAC-H) los extractos obtenidos en cada etapa no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), como se muestra en el Cuadro XXXVIII.

Cuadro XXXVIII. Evaluación de las diferentes etapas (tratamientos) del proceso de extracción de polifenoles a partir del SPIM a nivel de planta piloto, sobre algunos parámetros químicos y pureza del extracto y jugo de mora microfiltrado*.

Parámetro	Extracto de polifenoles obtenido del SPIM**			Jugo de mora***
	Extracción Planta Piloto, E	Clarificación (MF), P1	Concentración (UF), R2	
ETs (mg AE·g ⁻¹ , BS)	33 ± 2 ^b	34 ± 2 ^b	78 ± 23 ^a	21 ± 3 ^b
ORAC-H (μmol TE·g ⁻¹ , BS)	1184 ± 97 ^a	1270 ± 135 ^a	1364 ± 380 ^a	441 ± 18 ^b
PT (mg AG·g ⁻¹ , BS)	65 ± 5 ^b	66 ± 3 ^b	133 ± 50 ^a	37 ± 3 ^b
Acidez (g·100 g ⁻¹)	0,372 ± 0,004 ^b	0,35 ± 0,01 ^b	0,52 ± 0,09 ^b	2,4 ± 0,4 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	1,28 ± 0,04 ^c	1,24 ± 0,05 ^c	2,6 ± 0,6 ^b	11,5 ± 0,8 ^a
Pureza (g PT·100 g ⁻¹ ST)	6,5 ± 0,5 ^b	6,6 ± 0,3 ^b	13 ± 5 ^a	3,7 ± 0,3 ^b

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (extractos de polifenoles, n=3; jugo de mora, n=2), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$). **Los datos obtenidos para la Extracción Planta Piloto y Clarificación (MF) se obtuvieron del Cuadro XXXIV (sección 7.2) y para la Concentración (UF) del Cuadro XXXVI (sección 8.2). ***El flujo de proceso para obtener el jugo de mora fue el siguiente: prensado (hidroprensa, P= 50 psi, t= 20 min), tratamiento enzimático (Ultrazym AFP-L, Cn=250 mg·kg⁻¹, T= 35°C, t= 30 min) y microfiltración (poro de 0,2 μm, P_{tm}= 3,0 bar, T= 35 °C, U= 6,1 m·s⁻¹). BS= base seca del extracto o jugo.

Al comparar el extracto obtenido por UF (R2) con respecto al jugo de mora clarificado se evidencia una mayor pureza en cuanto al contenido de polifenoles (aproximadamente 3,5 veces más puro), debido a las diferencias de composición entre ambos productos. El contenido de polifenoles totales y ETs (en base seca) presentes en el extracto concentrado, fue aproximadamente 3,6 y 3,7 veces mayor, respectivamente. Por otra parte, la acidez y el contenido de sólidos solubles del extracto de polifenoles fue significativamente inferior (alrededor de 4,6 y 4,4 veces menor) con respecto al jugo de mora ($p < 0,05$). En cuanto a la

capacidad antioxidante, el valor promedio de ORAC-H en el extracto concentrado fue de 1364 $\mu\text{mol TE}$ por gramo de extracto en base seca, siendo unas 3 veces mayor al valor reportado en el jugo de mora clarificado.

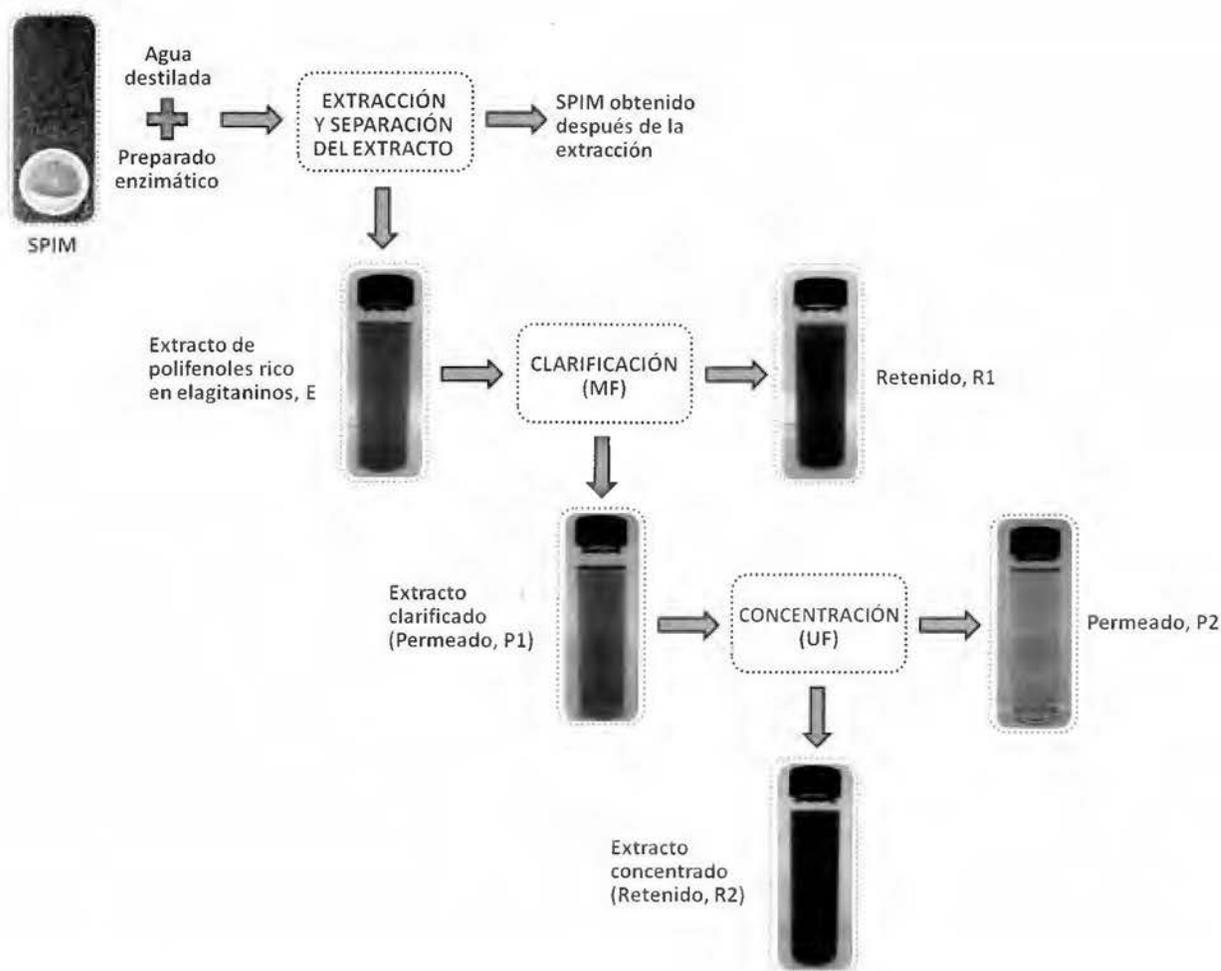


Figura 49. Esquema del flujo de proceso realizado a nivel de planta piloto para la obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos obtenido a partir de un subproducto industrial de mora, aplicando tecnologías de membranas para su purificación y concentración: microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF).

- *Aplicación potencial del extracto concentrado obtenido mediante UF*

Hay que indicar que por cuestiones de logística y problemas con la disponibilidad de materia prima se trabajó hasta un FRV de 7,9; sin embargo, se podrían alcanzar valores de FRV más altos a los obtenidos en este estudio; esto permitiría aumentar el rendimiento de

la operación y así obtener un extracto más concentrado de polifenoles. Sin embargo, hay que valorar otros factores importantes como los flujos de permeado que se puedan obtener y el consumo de energía involucrado; además, hay que recordar que otros compuestos también se van a concentrar (en menor grado con respecto a los polifenoles) como los ácidos y azúcares, lo que podría incidir en la pureza del extracto final.

Asimismo, se pueden aplicar otras técnicas como la diafiltración que permitiría aumentar la pureza del extracto mediante la adición de agua en la alimentación durante el proceso de UF. Inclusive se podría aprovechar el permeado que se genera durante la UF (P2) en lugar de agua para realizar la diafiltración. Por otra parte, este proceso de UF puede ser un paso previo a una operación de secado, por ejemplo, por atomización (*spray dryer*), lo que permitiría obtener un extracto de polifenoles en polvo más estable, que podría agregarse a productos de alta y baja humedad como lo señalan varios autores (Murugesan & Orsat, 2012; Servili *et al.*, 2011; Sun-Waterhouse *et al.*, 2012; Törrönen *et al.*, 2012). También se podría realizar una microencapsulación para aumentar la estabilidad de los polifenoles presentes en el extracto (Sun-Waterhouse *et al.*, 2012; Davidov-Pardo *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en esta investigación revelan el gran potencial de este residuo generado del procesamiento industrial de la mora para la elaboración de pulpa (SPIM). La composición química del SPIM demuestra que este subproducto puede procesarse para obtener ingredientes funcionales ricos en compuestos bioactivos como fibra, aceite con ácidos grasos omega 3 y, por supuesto, el producto obtenido y analizado en este estudio: un extracto de polifenoles rico en elagitaninos. Este último podría utilizarse en la formulación de alimentos funcionales, aportando compuestos antioxidantes con potenciales beneficios para la salud, debido principalmente a los elagitaninos que presenta.

8.3 Conclusiones y recomendaciones

8.3.1 Conclusiones

- La UF permitió un fraccionamiento de los compuestos presentes en el extracto debido a que se presentaron diferentes valores de retención de los distintos

parámetros analizados. Se observó que al aumentar la masa molecular de los compuestos presentes en el extracto, se incrementó el porcentaje de retención de los mismos.

- Los resultados mostraron que las membranas evaluadas (MWCO de 1 y 5 kDa) pueden ser utilizadas para la concentración de polifenoles, principalmente de ETs; sin embargo, la membrana de 1 kDa (Inside Céram) permitió una mayor retención de estos compuestos y generó un menor consumo de energía.
- La presión transmembranaria tuvo un efecto positivo sobre el flujo de permeado y sobre la retención de los compuestos evaluados en el extracto (acidez, sólidos solubles, ATCs y ETs), ya que se observó que al aumentar la P_{tm} se dio un incremento de todos estos parámetros.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró realizar la concentración del extracto de polifenoles mediante la UF, ya que esta operación permitió retener el 85 % y 92 % de los polifenoles totales y elagitaninos, respectivamente. Asimismo, la UF, a las condiciones evaluadas, permitió aumentar al doble la pureza del extracto.

8.3.2 Recomendaciones

- Evaluar otros parámetros de operación durante la ultrafiltración del extracto tales como la temperatura, velocidad tangencial, factor de reducción volumétrico, entre otros.
- Evaluar el efecto de la diafiltración (utilizando agua y el mismo permeado generado) durante la UF sobre las características físico-químicas y la pureza del extracto concentrado de polifenoles.
- Realizar un estudio que permita evaluar una etapa de secado (ejemplo, atomización o *spray dryer*) para obtener un extracto de polifenoles en polvo más estable.
- Evaluar el efecto de la adición del extracto de polifenoles (sea líquido o en polvo) en una matriz alimentaria sobre las características sensoriales y funcionales del alimento.

- Realizar un estudio de factibilidad económica para el proceso de obtención del extracto de polifenoles concentrado rico en elagitaninos.



IX. Referencias bibliográficas



IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABY, K., EKEBERG, D. & SKREDE, G. 2007. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x Ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(11): 4395-4406.
- ABDULLAH, A.G.L., SULAIMAN, N.M., AROUA, M.K., MOHD NOOR, M.J.M. 2007. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering* 81: 65-71.
- ACOSTA-MONTOYA, O., VAILLANT, F., COZZANO, S., MERTZ, C. PÉREZ, A.M. & CASTRO, M.V. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry* 119(4): 1497-1501.
- ADAMS, L.S., SEERAM, N.P., AGGARWAL, B.B., TAKADA, Y., SAND, D. & HEBER, D. 2006. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(3): 980-985.
- AGUILERA, J.M. 2003. Solid-liquid extraction. In Liadakis, G. & Tzia, C., eds. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Florida. Pp. 35-55.
- AGYARE, C., LECHTENBERG, M., DETERS, A., PETEREIT, F. & HENSEL, A. 2011. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine* 18(7): 617-624.
- AJILA, C.-M., NAIDU, K.A., BHAT, S.G. & PRASADA RAO, U.J.S. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry* 105: 982-988.
- AKIN, O., TEMELLI, F. & KOSEOGLU, S. 2012. Membrane applications in functional foods and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(4): 347-371
- ALANÓN, M.E., CASTRO-VAZQUEZ, L., DIAZ-MAROTO, M.C., GORDON, M.H. & PEREZ-COELLO, M.S. 2011. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry* 128(4): 997-1002.
- AOAC, 1999. *Official Methods of Analysis* 16^a ed. Method 981.12. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- 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.

- AOCS. 2000. Official Methods of Analysis. Method Ce 1e-91. Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary GLC. American Oil Chemists' Society, Illinois.
- ARRANZ, S., SAURA-CALIXTO, F., SHAHA, S. & KROON, P.A. 2009. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenols contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(16): 7298-7303.
- ASAMBLEA LEGISLATIVA DE COSTA RICA. 2010. Ley para la Gestión Integral de Residuos. Expediente N° 15.897. Departamento de Comisiones Legislativas, Comisión Permanente de Redacción. San José.
- ASCANIO, G., CASTRO, B. & GALINDO, E. 2004. Measurement of power consumption in stirred vessels-a review. *Chemical Engineering Research and Design* 82(A9):1282-1290.
- AVIRAM, M., VOLKOVA, N., COLEMAN, R., DREHER, M., REDDY, M.K., FERREIRA, D. & ROSENBLANT, M. 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E⁰) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1148-1157.
- BAGGER-JØRGENSEN, R. & MEYER, A.S. 2004. Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on release of phenolic into blackcurrant juice. *European Food Research and Technology* 219(6): 620-629.
- BAKKALBAŞI, E., MENTEŞ, Ö. & ARTIK, N. 2009. Food ellagitannins-occurrence, effects of processing storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49: 283-298.
- BARRAJÓN-CATALÁN, E., FERNÁNDEZ-ARROYO, S., SAURA, D., GUILLÉN, E., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., SEGURA-CARRETERO, A. & MICOL, V. 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 44: 2273-2282.
- BARUAH, G.L. & BELFORT, G. 2003. A predictive aggregate transport model for microfiltration of combined macromolecular solutions and poly-disperse suspensions: model development. *Biotechnology Progress* 19: 1524-1532.
- BARUAH, G.L., NAYAK, A. & BELFORT, G. 2006. Scale-up from laboratory microfiltration to a ceramic pilot plant: design and performance. *Journal of Membrane Science* 274: 56-63.
- BIALONSKA, D., KASIMSETTY, S.G., KHAN, S.I. & FERREIRA, D. 2009a. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21): 10181-10186.

- BIALONSKA, D., KASIMSETTY, S.G., SCHRADER, K.K. & FERREIRA, D. 2009b. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(18): 8344-8349.
- BIALONSKA, D., RAMNANI, P., KASIMSETTY, S.G., MUNTHA, K.R., GIBSON, G.R. & FERREIRA, D. 2010. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International Journal of Food Microbiology* 140(2-3): 175-182.
- BOROWSKA, E.J., SZAJDEK, A. & CZAPLICKI, S. 2009. Effect of heat and enzyme treatment on yield, phenolic content and antioxidant capacity of juices from chokeberry mash. *Italian Journal of Food Science* 2(21): 197-209
- BOUE, S.M., CLEVELAND, T.E., CARTER-WIENTJES, C., SHIH, B.Y., BHATNAGAR, D., McLACHLAN, J.M. & BUROW, M.E. 2009. Phytoalexin-enriched functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2614-2622.
- BUCHERT, J., KOPONEN, J.M., SUURTARINEN, M., MUSTRANTA, A., LILLE, M., TÖRRÖNEN, R. & POUTANEN, K. 2005. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2548-2556.
- BUCIĆ-KOJIĆ, A., PLANINIC, M., TOMAS, S., JAKOBEK, L. & SERUGA, M. 2009. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2394-2401.
- BUSHMAN, B.S., PHILLIPS, B., ISBELL, T., OU, B., CRANE, J.M. & KNAPP, S.J. 2004. Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52. 7982-7987.
- ÇAM, M. & AABY, K. 2010. Optimization of extraction of apple pomace phenolics with water by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9103-9111.
- ÇAM, M. & HISIL, Y. 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry* 123(3): 878-885.
- CANCINO, B., RUBY, R. & ASTUDILLO, C. 2004. Clarificación de jugo de uva por microfiltración. Escuela de Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. CREAS, Centro de Estudios de Alimentos Saludables. Waddington 716, Valparaíso, Chile.

- CARNEIRO, L., SANTOS, S. DOS, SANTOS, F. DOS, MATTA, V. & CABRAL, L. 2002. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination* 148: 93-98.
- CARPENTER, D.E., NGEH-NGWAINBI, J. & LEE, S. 1993. Lipid Analysis. In Sullivan, D.M. & Carpenter, D.E. eds. *Methods of analysis for nutritional labeling*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. Pp. 84-105.
- CARVALHO, L. M. J. DE., CASTRO, I. M. DE. & SILVA, C. A. B. DA. 2008. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration. *Journal of Food Engineering* 87 (4): 447-454.
- CASSANO, A., CONIDI, C., GIORNO, L. & DRIOLI, E. 2013. Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *Journal of Hazardous Materials* 248-249: 185-193.
- CASTAÑEDA-OBANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L., PAÉZ-HERNÁNDEZ, M.E., RODRÍGUEZ, J.A. & GALÁN-VIDAL, C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* 113: 859-871.
- CASTRO, J.J. & CERDAS, M. 2005. Mora (*Rubus* spp.), cultivo y manejo poscosecha. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José.
- CERDÁ, B., PERIAGO, P., ESPÍN, J.C. & TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 2005. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(14): 5571-5576.
- CHANDINI, S.K., RAO, L.J., & SUBRAMANIAN, R. 2013. Membrane clarification of black tea extracts. *Food and Bioprocess Technology* 6(8): 1-18.
- CHERYAN, M. 1998. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. 2da ed. CRC Press, Florida.
- CISSE, M., VAILLANT, F., ACOSTA, O., DHUIQUE-MAYER, C. & DORNIER, M. 2009. Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using Arrhenius, Eyring, and Ball models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6285-6291.
- CISSE, M., VAILLANT, F., PALLET, D. & DORNIER, M. 2011a. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Research International* 44(9): 2607-2614.
- CISSE, M., VAILLANT, F., SORO, D., REYNES, M. & DORNIER, M. 2011b. Crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Food Engineering* 106(1): 20-27.

- CISSE, M., VAILLANT, F., KANE, A., NDIAYE, O., & DORNIER, M. 2012. Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(6): 1214-1221.
- CITA. 2008a. Determinación de polifenoles, AQCITA-M036. Emisión N° 5. San José, Costa Rica.
- CITA. 2008b. Determinación de la actividad antioxidante, Método ORAC con Espectrofluorómetro Biotek, P-SA-MQ-037. Emisión N° 4. San José, Costa Rica.
- CITA. 2010. Azúcares por HPLC, P-SA-MQ-006. Emisión N° 4. San José, Costa Rica.
- COZZANO, S. 2007. Impacto del proceso de microfiltración tangencial sobre el valor de la mora (*Rubus spp.*) como alimento funcional. Tesis de Maestría en Ciencias de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- 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: 837-847.
- DAI, Z., NAIR, V., KHAN, M. & CIOLINO, H.P. 2010. Pomegranate extract inhibits the proliferation and viability of mmtv-Wnt-1 mouse mammary cancer stem cells in vitro. *Oncology Reports* 24(4): 1087-1091.
- DAVIDOV-PARDO, G., AROZARENA, I. & MARÍN-ARROYO, M.R. 2013. Optimization of a wall material formulation to microencapsulate a grape seed extract using a mixture design of experiments. *Food and Bioprocess Technology* 6(4): 941-951.
- DAY, A.J., DuPONT, M.S., RIDLEY, S., RHODES, M., RHODES, M.J.C., MORGAN, M.R.A. & WILLIAMSON, G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *Federation of European Biochemical Societies* 436: 71-75.
- DEAN, A. & VOSS, D. 1999. Design and analysis of experiments. Springer-Verlag, New York.
- DELL'AGLI, M., GALLI, G.V., BULGARI, M., BASILICO, N., ROMEO, S., BHATTACHARYA, D., TARAMELLI, D. & BOSISIO, E. 2010. Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*punica granatum*) antagonize in vitro the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria. *Malaria Journal* 9:1-9.
- DEMIR, N., ACAR, J. & BAHCECI, K.S. 2004. Effects of storage on quality of carrot juices produced with lactofermentation and acidification. *European Food Research and Technology* 218(5): 465-468.

- DEMIR, N., BAHCECI, K.S. & ACAR, J. 2007. The effect of processing method on the characteristics of carrot juice. *Journal of Food Quality* 30(5): 813-822.
- DENG, Q., PENNER, M.H. & ZHAO, Y. 2011. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International* 44(9): 2712-2720.
- DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H. & PARAJÓ, J.C. 2009. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *Journal of Food Engineering* 91: 587-593.
- DIÑEIRO GARCIA, Y., SUAREZ VALLES, B. & PICINELLI LOBO, A. 2009. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: apple pomace. *Food Chemistry* 117(4): 731-738.
- DOBÓN, S. & BAGGER-JØRGENSEN, R. 2000. Cross-flow filtration of fruit juice. Denmark. Danish Ministry of the Environment. Working Report no. 13.
- DRIOLI, E. & ROMANO, M. 2001. Progress and new perspectives on integrated membrane operations for sustainable industrial growth. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 40: 1277-1300.
- ECHAVARRÍA, A.P., TORRAS, C. & PÁGÁN, J. 2011. Fruit juice processing and membrane technology application. *Food Engineering Reviews* 3: 136-158.
- ESPAMER, L., PAGLIERO, C., OCHOA, A. & MARCHESE, J. 2006. Clarification of lemon juice using membrane process. *Desalination* 200: 565-567.
- FERNANDES, L., CASAL, S., CRUZ, R., PEREIRA, J.A. & RAMALHOSA, E. 2013. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50: 161-166.
- FIGUEROLA, F., HURTADO, M. A. L., ESTÉVEZ, A. M., CHIFFELLE, I. & ASENJO, F. 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry* 91(3): 395-401.
- FLORES, D., MONTERO, A., OROZCO, R. & ARGÜELLO, F. 2003. Memoria: Primer foro taller nacional sobre cultivo de mora (*Rubus spp.*) El Empalme, San José.
- GACULA, M.C. & SINGH, J. 1984. Statistical methods in food and consumer research. Academic CRC Press, Florida.
- GALANAKIS, C.M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology* 26: 68-87.

- 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 adenotrichos*). *Food Research International* 44(7): 2243-2251.
- GASPEROTTI, M., MASUERO, D., VRHOVSEK, U., GUELLA, G. & MATTIVI, F. 2010. Profiling and accurate quantification of rubus ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8): 4602-4616.
- GEORGÉ, S., BRAT, P., ALTER, P. & AMIOT, M.J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural 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): 4988-4994.
- GIRARD, B. & FUKUMOTO, L. R. 2000. Membrane processing of fruit juices and beverages: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(2): 91-157.
- GOĐEVAC, D., TEŠEVIĆ, V., VAJS, V., MILOSAVLJEVIĆ, S. & STANKOVIĆ, M. 2011. Blackberry seed extracts and isolated polyphenolic compounds showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Journal of Food Science* 76(7): C1039-C1043.
- GÖKMEN, V., SERPEN, A. & FOGLIANO, V. 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the "QUENCHER" approach. *Trends in Food Science Technology* 20: 278-288.
- GÓMEZ-PLAZA, E., ROMERO-CASCALES, I. & BAUTISTA-ORTÍN, A.B. 2010. Use of enzymes for wine production. In Bayindirli, A., ed. *Enzymes in fruit and vegetables processing, chemistry and engineering applications*. CRC Press, Florida. Pp. 215-244.
- GONZÁLEZ, E. 2011. Desarrollo de una metodología de evaluación de la capacidad antioxidante celular en frutas tropicales y aplicación a un jugo de mora sometido a tratamiento térmico y digestión *in vitro*. Tesis Maestría Académica en Ciencia de Alimentos. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- GONZALEZ-BARRIO, R., TRUCHADO, P., ITO, H., ESPIN, J.C. & TOMAS-BARBERAN, F.A. 2011. UV and ms identification of urolithins and nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(4): 1152-1162.

- GRIGELMO-MIGUEL, N., GORINSTEIN, S. & MARTÍN-BELLOSO, O. 1999. Characterisation of peach dietary fibre concentrate as a food ingredient. *Food Chemistry* 65(2): 175-181.
- GRUNDHÖFER, P., NIEMETZ, R., SCHILLING, G. & GROSS, G.G. 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry* 57(6): 915-927.
- HAGER, T.J., HOWARD, L.R., & PRIOR, R.L. 2008a. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3): 689-695.
- HAGER, T.J., HOWARD, L.R., LIYANAGE, R., LAY, J.O. & PRIOR, R.L. 2008b. Ellagitannin composition of blackberry as determinate by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3): 661-669.
- 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.
- HE, L., XU, H., LIU, X., HE, W., YUAN, F., HOU, Z. & GAO, Y. 2010. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC-ABTS assay. *Food Research International* 44(5): 1161-1167.
- HEBER, D., SEERAM, N.P., WYATT, H., HENNING, S.M., ZHANG, Y., OGDEN, L.G., DREHER, M. & HILL, J.O. 2007. Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(24): 10050-10054.
- HEBER, D. 2008. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters* 269(2): 262-268.
- HEINONEN, I.M. & MEYER, A.S. 2002. Antioxidants in fruits, berries and vegetables. In Jorgen, W., ed. *Fruit and vegetable processing, improving quality*. Woodhead Publishing, Florida. Pp. 23-51.
- HÖHN, A., SUN, D. & NOLLE, F. 2005. Enzymes in the fruit juice and wine industry. In Barret, D.M., Somogyi, L. & Ramaswamy, H., eds. *Processing fruits*. 2da ed. CRC Press, Florida. Pp. 97-112.
- HOLDSWORTH, D. & SIMPSON, R. 2007. Quality optimization. In Holdsworth, D. & Simpson, R. *Thermal processing of packaged foods*. 2da ed. Springer, New York. Pp. 239-269.

- HUANG, W., NIU, H., LI, L., HE, Y., GONG, W. & GONG, G. 2008. Optimization of ellagic acid production from ellagitannins by co-culture and correlation between its yield and activities of relevant enzymes. *Bioresource of Technology* 99: 769-775.
- 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.
- ISHIMOTO, H., SHIBATA, M., MYOJIN, Y., ITO, H., SUGIMOTO, Y., TAI, A. & HATANO, T. 2011. *In vivo* anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(19): 5901-5904.
- KAFKAS, E., KOŞAR, M., TÜREMIŞ, N. & BAŞER, K. 2006. Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry* 97: 732-736.
- KALBASI, A., & CISNEROS-ZEVALLOS, L. 2007. Fractionation of monomeric and polymeric anthocyanins from concord grape (*Vitis labrusca* L.) juice by membrane ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(17): 7036-7042.
- KALT, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science* 70(1): R11-R19.
- KAMMERER, D.R., SCHIEBER, A. & CARLE, R. 2005. Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace - A review. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 79(3): 189-196.
- KAPASAKALIDIS, P.G., RASTALL, R.A. & GORDON, M.H. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11): 4016-4021.
- 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.
- KATAN, M.B. & DE ROOS, N. M. 2004. Promises and Problems of Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 369-377.
- KHAN, M.K., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A.S., DANGLES, O., & CHEMAT, F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119(2): 851-858.
- KHANBABAEE, K. & VAN REE, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Natural Products Reports* 18: 641-649.
- KIASSOS, E., MYLONAKI, S., MAKRIS, D.P. & KEFALAS, P. 2009. Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10(2): 246-252.

- KONG, K.-W., ISMAIL, A., TAN, C.-P. & RAJAB, N.F. 2010. Optimization of oven drying conditions for lycopene content and lipophilic antioxidant capacity in a by-product of the pink guava puree industry using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology* 43: 729-735.
- KOPONEN, J.M., HAPPONEN, A.M., MATTILA, P.H. & TÖRRÖNEN, A.R. 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1612–1619.
- KOPPER, M. 2012. Mejoramiento del proceso de extracción de jugo de zanahoria en una empresa procesadora de frutas y vegetales mediante la implementación de un tratamiento enzimático optimizado. Tesis Lic. en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- KUMAR, A. 2007. Membrane separation technology in processing bioactive components. *In Shi, J. ed. Functional food ingredients and nutraceuticals: processing technologies.* CRC Press, Florida. Pp. 193-208.
- LANDBO, A.K. & MEYER, A.S. 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3169-3177.
- LANDBO, A.K. & MEYER, A.S. 2004. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 503–513.
- LANDBO, A.-K., PINELO, M., VIKBJERG, A.F., LET, M.B. & MEYER, A.S. 2006. Protease-assisted clarification of black currant juice: synergy with other clarifying agents and effects on phenol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6554-6563.
- LANDETE, J.M. 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 44(5): 1150-1160.
- LAORKO, A., LI, Z., TONGCHITPAKDEE, S., CHANTACHUM, S. & YOURAVONG, W. 2010. Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. *Journal of Food Engineering* 100: 514-521.
- LAORKO, A., TONGCHITPAKDEE, S., & YOURAVONG, W. 2013. Storage quality of pineapple juice non-thermally pasteurized and clarified by microfiltration. *Journal of Food Engineering* 116(2): 554-561.
- LARROSA, M., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. & ESPÍN, J.C. 2006. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon

- adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 611-625.
- LARROSA, M., GONZÁLEZ-SARRÍAS, A., YÁÑEZ-GASCÓN, M.J., SELMA, M.V., AZORÍN-ORTUÑO, M., TOTI, S., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., DOLARA, P. & ESPÍN, J.C. 2010. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-a in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21(8): 717-725.
- LAURRARI, J.A. 1999. New approaches in the preparation of high dietary fiber powders from fruit by-products. *Trends in Food Science & Technology* 10: 3-8.
- LEITÓN, C. 2008. Perfil producto: mora. Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER), Dirección Estudios Económicos. San José.
- LI, B.B., SMITH, B. & HOSSAIN, M.M. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology* 48: 189-196.
- LIU, D., VOROBIEV, E., SAVOIRE, R. & LANOISELLÉ, J.-L. 2011. Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 81: 134-140.
- MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K., KAMAL-ELDIN, A. & TÖRRÖNEN, A. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family *Rosaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6178-6187.
- MALIK, A., AFAQ, F., SARFARAZ, S., ADHAMI, V. M., SYED, D. N., & MUKHTAR, H. 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102(41): 14813-14818.
- MANNAPPERUMA, J.D. 1997. Design and performance evaluation of membrane system. *In* Valentas, K., Singh, R.P. & Rotstein, E., eds. *Handbook of food engineering practice*. CRC Press, Florida. Pp. 167-210.
- MAROULIS, Z.B. & SARAVACOS, G.D. 2003. *Food process design*. Marcel Dekker, New York.
- MARRIOTT, J. & SORENSEN, E. 2003. A general approach to modeling membrane modules. *Chemistry Engineering Science* 58(22): 4975-4990.
- McDOUGALL, G.J., ROSS, H.A., IKEJI, M. & STEWART, D. 2008. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3016-3023.

- McLELLAN, M.R. & PADILLA-ZAKOUR, O.I. 2005. Juice processing. In Barret, D.M., Somogyi, L. & Ramaswamy, H., eds. Processing fruits, science and technology. 2da ed. CRC Press, Florida. Pp. 74-96.
- MENG, L.H., LOZANO, Y., BOMBARDA, I., GAYDOU, E. & LI, B. 2006. Anthocyanin and flavonoid production from *Perilla frutescens*: pilot plant scale processing including cross-flow microfiltration and reverse osmosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(12): 4297-4303.
- MERTENS-TALCOTT, S.U., JILMA-STOHLAWETZ, P., RIOS, J., HINGORANI, L. & DERENDORF, H. 2006. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8956-8961.
- 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.
- MONDOR, M., GIRARD, B. & MORESOLI, C. 2000. Modeling flux behavior for membrane filtration of apple juice. *Food Research International* 33: 539-548.
- MONTGOMERY, D.C. 1992. Design and analysis of experiments. 3era ed. John Wiley & Sons, New York.
- MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J. & PARAJÓ, J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72(2): 145-171.
- MULLEN, W., MCGINN, J., LEAN, M.E.J., MACLEAN, M.R., GARDNER, P., DUTHIE, G.G., YOKOTA, T. & CROZIER, A. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18): 5191-5196.
- MURUGESAN, R. & ORSAT, V. 2012. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients—a review. *Food and Bioprocess Technology* 5(1): 3-14.
- MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C. & ANDERSON-COOK, C.M. 2009. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 3era ed. Wiley, New York.
- NICOLI, M.C., ANESE, M. & PARPINEL, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 10: 94-100.

- NIEMETZ, R. & GROSS, G.G. 2005. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* 66(17): 2001-2011.
- NOVOZYMES. 2001. Production of clear, stable juices and concentrates: guidelines on processing and quality control. Switzerland AG. Novozymes, Switzerland.
- NOVOZYMES. 2002. Product sheet, Ultrazym® AFP-L. Switzerland AG. Novozymes, Switzerland.
- OKUYAMA, H., FUJII, Y. & IKEMOTO, A. 2000. n-6/n-3 ratio of dietary fatty acids rather than hypercholesterolemia as the major risk factor for atherosclerosis and coronary heart disease. *Journal of Health Science* 46(3): 157-177.
- OREOPOULOU, V. 2003. Extraction of natural antioxidants. In Liadakis, G. & Tzia, C., eds. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Florida. Pp. 329-346.
- ORTIZ, M.J., VÉLEZ, C.A. & MEJÍA, E.F. 2008. Modelos matemáticos de la colmatación de membranas en microfiltración tangencial. *Revista Ingeniería e Investigación* 28(1): 123-132.
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. & PRIOR, R. 2001. Development and validation of an improved absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619-4626.
- PABBY, A., RIZVI, S.S.H. & SASTRE, A.M. 2009. *Handbook of membrane separations: chemical, pharmaceutical, food and biotechnological applications*. CRC Press, Florida. INTERNET. <https://sibdi.ucr.ac.cr/http://www.crcnetbase.com/books/7106> (Consultado el 15/06/2013).
- PATRAS, A., BRUNTON, N.P., O'DONELL, C. & TIWARI, B.K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods, mechanism and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology* 21: 3-11.
- PINELO, M., ZEUNER, B. & MEYER, A.S. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing* 88: 259-265.
- POKORNÝ, J. & SCHMIDT, Š. 2003. The impact of food processing in phytochemicals: the case of antioxidants. In Johnson, I. & Williamson, G., eds. *Phytochemical functional foods*. Woodhead Publishing, Florida. Pp. 298-314.
- PUECH, J.L., FEUILLAT, F., MOSEDALE, J.R. & PUECH, C. 1996. Extraction of ellagitannins from oak wood of model casks. *Vitis* 35(4): 211-214.
- PUUPPONEN-PIMLÄ, R., HAKKINEN, S.T., AARNI, M., SUORTTI, T., LAMPI, A., EUROLA, M., PIIRONEN, V., NUUTILA, A. M. & OKSMAN-CALDENTY, K. 2003.

- Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1389–1402.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NOHYNEK, L., AMMANN, S., OKSMAN-CALDENTEY, K. & BUCHERT, J. 2008. Enzyme assisted processing increases antimicrobial and antioxidant activity of bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 681–688.
- QUIDEAU, S. & FELDMAN, K.S. 1996. Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews* 96: 475–503.cv
- RAISSI, S & FARSANI, R.-E. 2009. Statistical process optimization through multi-response surface methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 51: 267-271.
- RAMIREZ-CORONEL, M.A., MARNET, N., KOLLI, V.S.K., ROUSSOS, S., GUYOT, S. & AUGUR, C. 2004. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis–high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5): 1344-1349.
- REDDY, M. K., GUPTA, S. K., JACOB, M. R., KHAN, S. I., & FERREIRA, D. 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica* 73(5): 461–467.
- ROJAS, G., FONSECA, L., PÉREZ, A., QUESADA, M. & VAILLANT F. 2009. Tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*) juice exhibits a protective effect on healthy human subject submitted to a high-fat and highcarbohydrate diet. FAV HEALTH 2009, 3rd International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables, Avignon, Francia, 18-21 de octubre.
- ROSENBLAT, M., VOLKOVA, N., COELMAN, R., AVIRAM, M. 2006. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein E-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1928–1935.
- RUPASINGHE, H. P. V., WANG, L., HUBER, G. M. & PITTS, N. L. 2008. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chemistry* 107(3): 1217-1224.
- RUSSO, C. 2007. A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). *Journal of Membrane Science* 288: 239-246.

- SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M. & BRUNI, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91(4): 621-632.
- SACCHI, K.L., BISSON, L.F. & ADAMS, D.O. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56(3): 197-206.
- SANTAMARÍA, B., SALAZAR, G., BELTRÁN, S. & CABEZAS, J.L. 2002. Membrane sequences for fractionation of polyphenolic extracts from defatted milled grape seeds. *Desalination* 148: 103-109.
- SAURA-CALIXTO, F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4303-4306.
- SCHIEBER, A., STINTZING, F.C. & CARLE, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds, recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12: 401-413.
- SCHWEDHELM, E., MAAS, R., TROOST, R. & BOGER, R.H. 2003. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clin Pharmacokinet* 42: 437-459.
- SCOTT, D.D., BOWSER, T.J., & MCGLYNN, W.G. 2005. Scaling up your food process. Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma.
- SEERAM, N.P., LEE, R., HARDY, M. & HEBER, D. 2005. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* 41: 49-55.
- SEERAM, N.P., ZHANG, Y., LEE, R., SAND, D., SCHEULLER, H.S. & HEBER, D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(25): 9329-9339.
- SEERAM, N.P., ARONSON, W.J., ZHANG, Y., HENNING, S.M., MORO, A., LEE, R.-P., SARTIPPOUR, M., HARRIS, D.M., RETTING, M., SUCHARD, M.A., PANTUCK, A.J., BELLDEGRUN, A. & HEBER, D. 2007. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(19): 7732-7737.
- SELMA, M.V., ESPÍN, J.C. & TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(15): 6485-6501.

- SERVILI, M., RIZZELLO, C.G., TATICCHI, A., ESPOSTO, S., URBANI, S., MAZZACANE, F. & DI CAGNO, R. 2011. Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 147(1): 45-52.
- SHARMA, M., LI, L., CELVER, J., KILLIAN, C., KOVOOR, A. & SEERAM, N. 2010. Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 3965-3969.
- SHI, J., NAWAZ, H., POHORLY, J., MITTAL, G., KAKUDA, Y. & JIANG, Y. 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—Engineering and technology. *Food Reviews International* 21: 139-166.
- SILVA, L.M.R.D., FIGUEIREDO, E.A.T.D., RICARDO, N.M.P.S., VIEIRA, I.G.P., FIGUEIREDO, R.W.D., BRASIL, I.M., & GOMES, C.L. 2014. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 143: 398-404.
- SIN, H.N., YUSOF, S., SHEIKH, N. & RAHMAN, R. 2006. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 73(4): 313-319.
- SIRIWOHARN, T. & WROLSTAD, R.E. 2004. Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *Journal of Food Science* 69: 233-240.
- SIRIWOHARN, T., WROLSTAD, R.E. & DURST, R.W. 2005. Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment. *Journal of Food Science*. 70: C189-C197.
- SOTO, M. 2010. Evaluación del efecto de diferentes tratamientos físicos acoplados a un tratamiento enzimático sobre las propiedades físico-químicas y el contenido de compuestos antioxidantes de jugo de mora (*Rubus adenotrichos*). Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- SOTTO, A. 2008. Aplicación de la tecnología de membranas de nanofiltración y ósmosis inversa para el tratamiento de disoluciones acuosas de compuestos fenólicos y ácidos carboxílicos. Tesis doctorado. Universidad Rey Juan Carlos. Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología. Madrid.
- STRIK, B.C., CLARK, J.R., FINN, C.E. & BAÑADOS, M.P. 2008. Worldwide production of blackberries. *International Society for Horticultural Science*. IX International *Rubus* and *Ribes* Symposium, *Acta Horticulturae* 777: 209-218.
- SUN-WATERHOUSE, D., WEN, I., WIBISONO, R., MELTON, L.D. & WADHWA, S. 2009. Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of

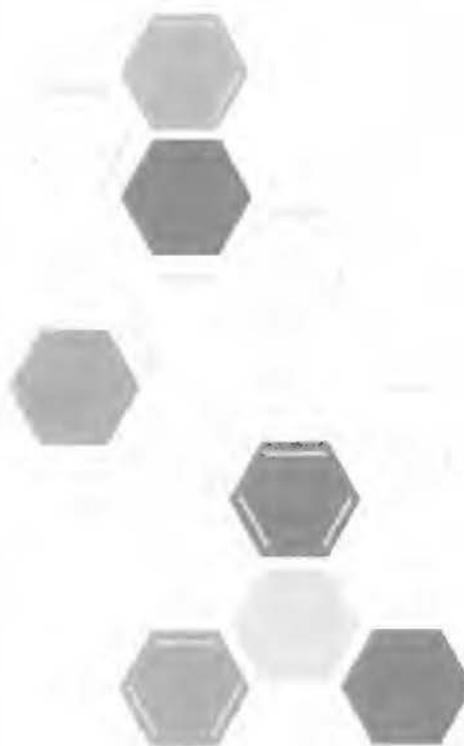
- green kiwifruit juicing. *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2644-2652.
- SUN-WATERHOUSE, D., WADHWA, S.S. & WATERHOUSE, G.I. 2012. Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food and Bioprocess Technology* 6(9): 2376-2388.
- TALAVÉRA, S., FELGINES, C., TEXIER, O., BESSON, C., GIL-IZQUIERDO, A., LAMAISON, J-L. & RÉMÉSY, C. 2005. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3902-3908.
- TAVARES, L., FIGUEIRA, I., MACEDO, D., McDOUGALL, G.J., LEITÃO, M.C., VIEIRA, H.L.A., STEWART, D., ALVES, P.M., FERREIRA, R.B. & SANTOS, C.N. 2012. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 131: 1443-1452.
- TÖRRÖNEN, R., MCDUGALL, G.J., DOBSON, G., STEWART, D., HELLSTRÖM, J., MATTILA, P. & KARJALAINEN, R. 2012. Fortification of blackcurrant juice with crowberry: Impact on polyphenol composition, urinary phenolic metabolites, and postprandial glycemic response in healthy subjects. *Journal of Functional Foods* 4(4): 746-756.
- TZIA, C. 2003. Optimization. In Liadakis, G. & Tzia, C., eds. *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press, Florida. Pp. 329-346.
- UMESALMA, S., & SUDHANDIRAN, G. 2010. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Carcinogenesis Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 107: 650-655.
- VAILLANT, F., MILLAN, A., DORNIER, M., DECLoux, M. & REYNEZ, M. 2001. Strategy for the economical optimization of clarified pulpy fruit juices using cross flow microfiltration. *Journal of Food Engineering* 48: 83-90.
- VAILLANT, F., PÉREZ, A. & VÍQUEZ, F. 2004. Microfiltración tangencial: una alternativa innovadora para la transformación de frutas tropicales. *La Alimentación Latinoamericana*. 252: 38-46.
- VAILLANT, F., CISSE, M., CHAVERRI, M., PÉREZ, A., DORNIER, M., VÍQUEZ, F. & DHUIQUE-MAYER, C. 2005. Clarification and concentration of melon juice using membrane processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 213-220.

- VAILLANT, F., PÉREZ, A.M., ACOSTA, O. & DORNIER, M. 2008. Turbidity of pulpy fruit juice: a key factor for predicting cross-flow microfiltration performance. *Journal of Membrane Science* 325: 404-412.
- VAN HOED, V., DE CLERCQ, N., 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(1): 33-49.
- VASCO, C., RIIHINEN, K., RUALES, J. & KAMAL-ELDIN, A. 2009. Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1204-1212.
- VERGARA-VALENCIA, N., GRANADOS-PÉREZ, E., AGAMA-ACEVEDO, E., TOVAR, J., RUALES, J. & BELLO-PÉREZ, L. A. 2007. Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT - Food Science and Technology* 40(4): 722-729.
- VILHELMOVA, N., JACQUET, R., QUIDEAU, S., STOYANOVA, A. & GALABOV, A.S. 2011a. Three-dimensional analysis of combination effect of ellagitannins and acyclovir on herpes simplex virus types 1 and 2. *Antiviral Research* 89(2): 174-181.
- VILHELMOVA, N., STOYANOVA, A., JACQUET, R., QUIDEAU, S. & GALABOV, A.S. 2011b. Ellagitannins as new highly efficient inhibitors of herpes simplex virus replication and synergists of acyclovir. *Antiviral Research* 90(2): A64-A65.
- VINDAS, L. 2011. Producción nacional de mora creció 42 % en cuatro años. *El Financiero*, San José. Julio 31. INTERNET: http://www.elfinancierocr.com/ef_archivo/2011/julio/31/negocios2857983.html (Consultado el 19/04/2012).
- VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SENDRA, E., SAYAS-BARBERÁ, E. & PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International* 44 : 1217-1223.
- WANG, L. 2011. Advances in extraction of plant products in nutraceutical processing. *In* Pathak, Y., ed. *Handbook of nutraceuticals Volume II: scale-up, processing and automation*. CRC Press, Florida. Pp. 15-52.
- WANG, W.-D., XU, S.-Y. & JIN, M.-K. 2009. Effects of different maceration enzymes on yield, clarity and anthocyanin and other polyphenol contents in blackberry juice. *International Journal of Food Science & Technology* 44: 2342-2349.
- WIJNGAARD, H. & BRUNTON, N. 2009. The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(22): 10625-10631.

- WOLFE, K.L. & LIU, R.H. 2003. Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6): 1676-1683.
- WU, X. & PRIOR, R.L. 2005. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2589–2599.
- YOSHIDA, T., HATANO, T., ITO, H. & OKUDA, T. 2009. Structural diversity and antimicrobial activities of ellagitannins. *In* Quideau, S., ed. *Chemistry and biology of ellagitannins. An underestimated class of bioactive plant polyphenols*. World Scientific Publishing, London. Pp. 55-93.
- YOSHIDA, T., AMAKURA, Y. & YOSHIMURA, M. 2010. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order Myrtales. *International Journal of Molecular Sciences* 11(1): 79-106.
- ZAFRILLA, P., FERRERES, F. & TOMAS-BARBERAN, F.A. 2001. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 3651-3655.
- ZHAO, Y. 2007. Utilization of berry processing by-products. *In* Zhao, Y., ed. *Value-added products for health promotion*. CRC Press, Florida. Pp. 388-410.



X. Anexos



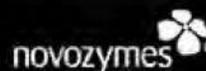
X. ANEXOS

10.1 Fichas técnicas de los preparados enzimáticos utilizados

Fruit & Vegetable / 2002-73555-01.pdf

Product Sheet

Page 1:2



Ultrazym[®] AFP-L

Description

Ultrazym AFP-L is a highly active enzyme preparation with a unique enzyme spectrum of pectolytic and added cellulolytic activity. The enzyme preparation is produced by submerged fermentation of *Aspergillus niger* and fungal *Trichoderma reesei* microorganisms which have not been genetically modified. The enzyme has a pronounced viscosity-reducing effect on plant material.

Product properties

Product type

Ultrazym AFP-L is a brownish liquid with the typical smell of fermented products and has a pH of approx. 5. The density of Ultrazym AFP-L is approx. 1.2 g/ml.

Activity

Ultrazym AFP-L has a standard activity of 3,400 FDU₂₀/ml (pH 3.5). See the Analytical Method for further information.

Food-grade status

The product complies with FAO/WHO JECFA and FCC recommended purity specifications.

Packaging

See the standard packaging list for further packaging information.

Application

Ultrazym AFP-L is especially designed for mash and pomace (secondary mash) treatment of apples and pears. It leads to almost complete disintegration of pectins and fruit cell walls.

The product gives extremely high juice yields (above 95% calculated in soluble dry matter of the fruit) and significantly increased extraction capacity.

Dosage

	20-30°C	40-55°C
Mash (before first extraction)	500 ml/to *	250-300 ml/to *
Pomace/secondary mash (after first extraction)	300-500 ml/to **	200-300 ml/to **

* Per tonne of processed apples (1-2 hours holding time with stirring)

** Per tonne of processed apples (1-2 hours holding time with stirring)

Pomace: water ratio = 1 : 0.8-1.0

Safety

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact. This product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred. Spilled material should be flushed away with water. Avoid splashing. Left-over material may dry out and create dust.

Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection as prescribed on the warning label. Wash contaminated clothes.

A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information on how to handle the product safely.

Storage

Recommended storage conditions are 0-10°C (32-50°F) in unbroken packaging and protected from the sun. The product has been formulated for optimum stability. However, enzyme preparations gradually lose activity over time. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperature, may lead to a higher dosage requirement.

BIOCATALYSTS

Depol™ 40L - D040L



- Maceration of botanical tissue
- Ideal for vegetable bouillon and juice production
- Increased juice extraction
- Facilitates extraction by decanters
- Beta-glucosidase can release bound flavours

Depol™ 40L is a broad spectrum carbohydrase preparation containing a mixture of pectinases, polygalacturonases, cellulases and hemicellulases. These enzymes aid maceration of plant tissues and are active over a wide pH range, making Depol™ 40L useful in a number of fruit and vegetable processing applications.

It helps increase yields of vegetable juice concentrates by solubilising components which would otherwise limit the extraction process and facilitates the separation in decanters.

Depol 40L is particularly suitable for the production of vegetable bouillon, cloud stable carrot juice concentrate and other vegetable juice concentrates.

For example, addition of Depol 40L can produce a 20-60% improvement in the yield of carrot juice (solids in the concentrate) compared to processing without enzyme.

Activity	Cellulase 1200 U/g PG (Endo-galactouronase) 800 U/g
Biological Source	<i>Aspergillus sp/Trichoderma sp.</i>
Form	Clear brown liquid
Working pH	4.0 - 6.0
Temperature range	50 - 65°C

sheet no: 001/2

issue date: 24-10-06



BIOCATALYSTS LIMITED Cefn Coed, Parc Nanigarrw, CF16 7QQ, Wales, UK
Tel: +44 (0)1443 843712 Fax: +44 (0)1443 846600
Email: sales@biocats.com www.biocatalysts.com

BIOCATALYSTS

APPLICATION & DOSAGE

As an initial guide, Depol™ 40L can be added at 100 - 500ppm, based on the weight of solids. The material to be macerated should be chopped as finely as possible and suspended in water with the pH adjusted to 4 - 6. Incubation between 50 and 60°C is suggested but trials are needed to determine the exact conditions to obtain the desired effect.

Carrot juice extraction: The carrots should be mechanically macerated. Water is added (20 - 24%) and acidified to pH 5.0 - 5.2, followed by blanching at 90°C. The heating should be as quick as possible to prevent browning. The mixture is vacuum cooled to 30 - 50°C before addition of Depol™ 40L at 200 - 500ppm on carrot weight. The enzyme should yield 50 - 70kg of juice solids (in the finished concentrate) per tonne of raw carrots processed.

HEALTH AND SAFETY

Always read the Health and Safety sheet (MSDS) before use and retain. If you are in any doubt about recommended product handling and safety, please contact Biocatalysts before use. Generally, when using enzymes avoid contact with the skin and eyes and do not breathe dusts or aerosols containing them.

STORAGE

Activity will remain above the minimum analysis specification for at least 6 months from the date of the Batch Certificate of Analysis, when stored below 20°C.

ALLERGENS

Soybean products and dairy lactose are used as fermentation substrates for this product. Their presence in the product is negligible.

FOOD STATUS

Prepared from enzymes of GRAS status and manufactured to FCC/JECFA/WHO/FAO recommendations for enzymes used in food processing.

QUALITY

1. Food Safety Policy

The company operates a Hazard Analysis at Critical Control Points (HACCP) system. This ensures that ingredients and the production environment are regularly monitored for contamination and that the processes are designed to produce safe products every time.

2. Good Manufacturing Practice (GMP)

The company's integrated management system encompasses Total Quality, Health and Safety, Food Safety and GMP.

3. ISO9001

Biocatalysts Ltd is certified to BS ISO9001:2000. Regular Audits are carried out by the British Standards Institute (BSI) to ensure continuing compliance with the standard.

AVAILABILITY

Liquids: standard 25kg nett plastic jerry cans.
Non-standard quantities of 215kg and 1000kg are also available for some products, please enquire.

The production micro-organism used in this product is not a GMO. Within the proposed guidelines of the European Union regarding Genetically Modified products, the above product would be classed as GMO free.



visit our web site for further relevant & current information
www.biocatalysts.com

Disclaimer: Biocatalysts uses every possible care in preparing the information herein given but cannot accept liability whatsoever in connection with it, neither does it guarantee that the described product without prior testing or that does not infringe third party's patent rights.



Enzyme Development Corporation
 (212) 736-1580 21 Penn Plaza, New York, NY 10001
 E-mail: Info@EnzymeDevelopment.com

ENZECO® PECTINASE VM

TECHNICAL DATA SHEET

DESCRIPTION

An enzyme preparation to increase the digestion and liquefaction of vegetables.

Benefits include increased extraction yield, higher soluble solids, shorter press-time, drier pulp, and a lower clarifying/depectinizing requirement downstream.

PHYSICAL CHARACTERISTICS

Brown liquid.

ENZYMATIC CHARACTERISTICS

Proprietary mix of cellulytic and pectolytic enzymes with optimum conditions at 50 °C (122 °F), pH between 5.0 to 5.2.

APPLICATION

Typical dosing is 300 to 500 grams per metric ton of mash, cooked at 50 C (122 °F) for 2 to 3 hours.

Recommend dilution to 10 % with juice or water prior to addition. Diluted enzyme should be used within a few hours.

SPECIFICATION PARAMETERS

Activities :
 Polygalacturonase (PG) ≥ 1,300 U/g
 Pectin methyl esterase (PE) ≥ 400 U/g

Lead: Not more than 5 ppm

Microbiological Data
 APC: Not more than 50,000/g
 Coliform: Not more than 30/g
 E.coli: Negative/25 g
 Salmonella: Negative/25 g

Contains: Water, glycerol, enzyme, ammonium sulphate, potassium sorbate, sodium benzoate. Please consult the actual product label.

STORAGE RECOMMENDATION

Store at 15° C (59° F) or lower, in closed container. Do not freeze.

HANDLING PRECAUTIONS

Avoid formation of aerosol and dust of the product. Repeated inhalation of enzyme aerosol or dust may cause sensitization and allergic type reactions in sensitized individuals. For detailed information, please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS).

x-xxxx-xxx non SOP 10/2007

These suggestions and data are based on information we believe to be reliable. They are offered in good faith, but without guarantee since conditions and methods of use of our products are beyond our control. Suggestions for use of our products should not be understood as recommendations that they be used in violation of any patents or government regulations.

10.2 Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de la evaluación de la actividad lateral β -glucosidasa de diferentes preparados enzimáticos comerciales (sección 5.1)

Cuadro A-I. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas en el jugo de mora clarificado, según el preparado enzimático utilizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Preparado enzimático	5	7,7011	<0,0019*
Error	12		
Total	17		

*Significativo.

Cuadro A-II. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos en el jugo de mora clarificado, según el preparado enzimático utilizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Preparado enzimático	5	30,0724	<0,0001*
Error	12		
Total	17		

*Significativo.

10.3 Prueba t de Student (t-student) para los resultados de la evaluación del efecto del preparado enzimático sobre la extracción de polifenoles (sección 5.2)

Cuadro A-III. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	0,0105	0,9232
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-IV. Análisis de varianza para el valor de pH en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	61,1895	0,0014*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-V. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	84,5000	0,0008*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-VI. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión (SIS) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	44,7042	0,0026*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-VII. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	295,6959	<0,0001*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-VIII. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	35,3094	0,004*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-IX. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	26,7183	0,0067*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-X. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	301,7289	<0,0001*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-XI. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	1	174,6012	0,0002*
Error	4		
Total	5		

*Significativo.

Cuadro A-XII. Análisis de varianza del efecto de la adición de enzima y el tiempo de proceso sobre el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Adición de enzima (Enzima)	1	348,4034	<0,0001*
Tiempo	1	156,222	<0,0001*
Enzima*Tiempo	1	12,2263	0,0023*

*Significativo.

Cuadro A-XIII. Análisis de varianza del efecto de la adición de enzima y el tiempo de proceso sobre el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Adición de enzima (Enzima)	1	800,1435	<0,0001*
Tiempo	1	332,3008	<0,0001*
Enzima*Tiempo	1	56,6644	<0,0001*

*Significativo.

10.4 Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de la selección de la temperatura del proceso de extracción de polifenoles (sección 5.3)

Cuadro A-XIV. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles (°Brix) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	108,6667	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XV. Análisis de varianza para el valor de pH en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	25,6148	0,0012*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XVI. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	1,6552	0,2676
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XVII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión (SIS) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	0,4430	0,6615
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XVIII. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	20,5238	0,0021*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XIX. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	103,2656	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XX. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos en el extracto obtenido a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	33,9138	0,0005*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXI. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	94,2653	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXII. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM, según la temperatura.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	33,7391	0,0005*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXIII. Análisis de varianza del efecto de la temperatura y el tiempo de proceso sobre el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	280,2209	<0,0001*
Tiempo	1	124,952	<0,0001*
Temperatura*tiempo	1	8,6321	0,0011*

*Significativo.

Cuadro A-XXIV. Análisis de varianza del efecto de la temperatura y el tiempo de proceso sobre el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Temperatura	2	305,9540	<0,0001*
Tiempo	1	79,8896	<0,0001*
Temperatura*tiempo	1	7,824	0,0018*

*Significativo.

10.5 Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de la selección del tiempo del proceso de extracción de polifenoles (sección 5.4)

Cuadro A-XXV. Análisis de varianza para el contenido de humedad en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	1,8088 x 10 ⁹	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXVI. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles (°Brix) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	3,6079	0,0936
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXVII. Análisis de varianza para el valor de pH en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	14,8182	0,0048*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXVIII. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	14,0000	0,0055*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXIX. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión (SIS) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	5,8070	0,0395*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXX. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	18,3816	0,0028*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXXI. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	16,6295	0,0036*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXXII. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	3,8520	0,0839
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXXIII. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	13,3636	0,0062*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXXIV. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	6,7917	0,0288*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXXV. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	59,4762	0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XXXVI. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante, ORAC-H (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tiempo de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tiempo de extracción	2	11,3678	0,0091*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

10.6 Análisis de varianza (ANDEVA) para los resultados de las pruebas para determinar el rango de proporción agua/sólido y concentración de enzima para la extracción de polifenoles (sección 5.5)

Cuadro A-XXXVII. Análisis de varianza para el contenido de humedad en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	242,4444	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XXXVIII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles (°Brix) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	242,4444	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XXXIX. Análisis de varianza para el valor de pH en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	25,2464	0,0002*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XL. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	302,3955	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLI. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión (SIS) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	12,4726	0,0022*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLII. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	210,3137	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLIII. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	13,5045	0,0017*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLIV. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	7,0978	0,0121*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLV Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	92,9000	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLVI. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	27,1056	0,0002*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLVII. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	30,7314	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

Cuadro A-XLVIII. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante, ORAC-H (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el tratamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	67,4820	<0,0001*
Error	8		
Total	11		

*Significativo.

10.7 Síntesis de los análisis de regresión múltiple (Análisis de varianza, ANDEVA) para los modelos generados en las superficies de respuesta (sección 6)

Cuadro A-XLIX. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el contenido de sólidos insolubles en suspensión y logaritmo de turbidez en el extracto obtenido a partir del SPIM.

Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	F	Probabilidad
Sólidos insolubles en suspensión	Regresión	0,192	4	0,048	24,8	0,0003
	Residual	0,014	7	0,002		
	Falta de ajuste	0,010	4	0,002	1,821	0,3250
	Error puro	0,004	3	0,001		
	Total	0,206	11			
	R ²			0,93		
logaritmo de turbidez	Regresión	1,471	4	0,368	47,8	<0,0001
	Residual	0,054	7	0,008		
	Falta de ajuste	0,042	4	0,011	2,803	0,2118
	Error puro	0,011	3	0,004		
	Total	1,525	11			
	R ²			0,96		

Cuadro A-L. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el contenido de sólidos solubles y acidez en el extracto obtenido a partir del SPIM.

Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	F	Probabilidad
Sólidos solubles (°Brix)	Regresión	3,300	2	1,650	36,4	<0,0001
	Residual	0,408	9	0,045		
	Falta de ajuste	0,392	6	0,065	12,373	0,0319
	Error puro	0,016	3	0,005		
	Total	3,707	11			
	R ²			0,89		
Acidez	Regresión	0,219	4	0,055	120,5	<0,0001
	Residual	0,002	5	0,000		
	Falta de ajuste	0,002	4	0,001	121,162	0,0680
	Error puro	0,000	1	0,000		
	Total	0,221	9			
	R ²			0,99		

Cuadro A-LI. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el contenido de antocianinas y de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM.

Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	F	Probabilidad
Contenido de antocianinas	Regresión	9,420	3	3,140	27,9	0,0001
	Residual	0,899	8	0,112		
	Falta de ajuste	0,663	5	0,133	1,686	0,3540
	Error puro	0,236	3	0,079		
	Total	10,319	11			
	R ²			0,91		
Contenido de elagitaninos	Regresión	591,605	2	295,802	36,9	0,0002
	Residual	56,130	7	8,019		
	Falta de ajuste	55,274	6	9,212	10,755	0,2293
	Error puro	0,857	1	0,857		
	Total	647,735	9			
	R ²			0,91		

Cuadro A-LII. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para la extracción de antocianinas y de elagitaninos a partir del SPIM.

Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	F	Probabilidad
Extracción de antocianinas	Regresión	238,391	3	79,464	86,5	<0,0001
	Residual	7,350	8	0,919		
	Falta de ajuste	5,022	5	1,004	1,294	0,4429
	Error puro	2,328	3	0,776		
	Total	245,740	11			
	R ²			0,97		
Extracción de elagitaninos	Regresión	867,308	2	433,654	107,0	<0,0001
	Residual	28,371	7	4,053		
	Falta de ajuste	28,124	6	4,687	19,030	0,1737
	Error puro	0,246	1	0,246		
	Total	895,678	9			
	R ²			0,97		

Cuadro A-LIII. Análisis de varianza para los modelos generados en las superficies de respuesta para el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM.

Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	F	Probabilidad
Polifenoles totales (base seca)	Regresión	1424,100	3	474,700	399,5	<0,0001
	Residual	9,507	8	1,188		
	Falta de ajuste	8,486	5	1,697	4,985	0,1082
	Error puro	1,021	3	0,340		
	Total	1433,607	11			
	R ²			0,99		
Capacidad antioxidante ORAC-H (base seca)	Regresión	424093,383	1	424093,383	65,7	<0,0001
	Residual	64505,038	10	6450,504		
	Falta de ajuste	28147,949	7	4021,136	0,332	0,8963
	Error puro	36357,089	3	12119,030		
	Total	488598,421	11			
	R ²			0,87		

Cuadro A-LIV. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta para el valor de pH en el extracto obtenido a partir del SPIM.

Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados promedio	F	Probabilidad
pH	Regresión	0,007	4	0,002	2,1	0,1889
	Residual	0,006	7	0,001		
	Falta de ajuste	0,006	4	0,001	77,491	0,0023
	Error puro	0,000	3	0,000		
	Total	0,013	11			
R ²				0,54		

Cuadro A-LV. Probabilidad de los coeficientes de regresión para los modelos generados en las superficies de respuesta para las diferentes variables respuesta.

Variables respuesta*	p de los coeficientes de regresión					
	intercepto	X ₁ (Cn)	X ₁ ² (Cn ²)	X ₂ (A/S)	X ₂ ² (A/S ²)	X ₁ X ₂ (Cn*A/S)
y ₁ = SIS	0,0001	0,0316	0,0245	0,0033	0,0062	0,1339
y ₂ transf. = log turbidez	<0,0001	0,0018	0,0079	0,0007	0,0095	0,2719
y ₃ = Acidez	0,0026	0,0968	0,0968	0,0031	0,0111	0,2543
y ₄ = Sólidos solubles	<0,0001	0,3854	0,6694	0,0002	0,0023	0,1565
y ₅ = ATCs (BS)	<0,0001	0,9530	0,0143	0,0036	0,0103	0,2752
y ₆ = ETs (BS)	<0,0001	0,2995	0,2167	<0,0001	0,0101	0,0415
y ₇ = Extracción de ATCs	<0,0001	0,5172	0,0112	0,0006	0,0056	0,2492
y ₈ = Extracción de ETs	0,0086	0,2377	0,3713	0,0108	0,0936	0,2072
y ₉ = ORAC-H (BS)	0,0002	0,3777	0,9476	0,0096	0,8063	0,5633
y ₁₀ = PT (BS)	<0,0001	0,0123	0,7774	<0,0001	0,0021	0,6821
y ₁₁ = pH	<0,0001	0,0062	0,0021	0,0009	0,0033	0,7244

*Variables respuesta: SIS= sólidos insolubles en suspensión; log turbidez= logaritmo de turbidez; ATCs= contenido de antocianinas; ETs= contenido de elagitaninos; Extracción de ATCs= extracción de antocianinas; Extracción de ETs= extracción de elagitaninos; ORAC-H= capacidad antioxidante hidrofílica; PT= contenido de polifenoles totales. BS= base seca.

10.8 Prueba t de Student (t-student), análisis de varianza (ANDEVA) y prueba F (F-test) para los resultados del escalamiento del proceso de extracción de polifenoles a nivel de planta piloto y clarificación mediante microfiltración (sección 7)

Cuadro A-LVI. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión (SIS) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	0,4128	0,541
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LVII. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	26,6606	0,0013*
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LVIII. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	3,5	0,1036
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LIX. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	0,0258	0,8769
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LX. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	0,0427	0,8421
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXI. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	2,9714	0,1284
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXII. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de antocianinas a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	2,4889	0,1587
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXIII. Análisis de varianza para el porcentaje de extracción de elagitaninos a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	17,922	0,0039*
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXIV. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante, ORAC-H (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	5,7996	0,05
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXV. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (base seca) en el extracto obtenido a partir del SPIM, según el nivel de extracción.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Nivel de extracción	1	160,1667	<0,0001*
Error	7		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXVI. Valores de turbidez en las muestras de retenido obtenidas durante los ensayos de microfiltración del extracto, según la presión transmembranaria.

Presión transmembranaria (bar)	Turbidez (NTU)		
	MF-1	MF-2	MF-3
2,58	467	460	506
2,92	467	477	534
3,60	459	474	532
4,22	452	464	522
4,86	445	463	524
5,54	436	453	513
6,22	432	449	496
Promedio	451	463	518
Desviación estándar	14	10	14

Cuadro A-LXVII. Análisis de varianza para el flujo de permeado durante el proceso de microfiltración del extracto, según la presión transmembranaria.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria	1	54,8668	<0,0001*
Error	19		
Total	20		

*Significativo.

Cuadro A-LXVIII. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas en el extracto clarificado mediante microfiltración, según la presión transmembranaria.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria	1	3,2700	0,0864
Error	19		
Total	20		

*Significativo.

Cuadro A-LXIX. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos en el extracto clarificado mediante microfiltración, según la presión transmembranaria.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmenbranaria	1	24,0168	<0,0001*
Error	19		
Total	20		

*Significativo.

Cuadro A-LXX. Flujo de permeado y contenido de antocianinas y elagitaninos en el extracto clarificado mediante microfiltración, según la presión transmembranaria*.

Presión transmembranaria (bar)	Flujo de permeado (L·h ⁻¹ ·m ⁻²)	Antocianinas (mg C3G·L ⁻¹)	Elagitaninos (mg AE·L ⁻¹)
2,58	282 ± 40 ^c	19 ± 2 ^a	342 ± 4 ^a
2,92	311 ± 42 ^{bc}	19 ± 1 ^a	306 ± 33 ^{ab}
3,60	351 ± 23 ^{abc}	20 ± 1 ^a	304 ± 20 ^{ab}
4,22	380 ± 13 ^{ab}	19,0 ± 0,8 ^a	283 ± 11 ^{ab}
4,86	395 ± 22 ^a	19 ± 2 ^a	285 ± 28 ^{ab}
5,54	408 ± 33 ^a	18 ± 2 ^a	271 ± 25 ^b
6,22	418 ± 39 ^a	17 ± 2 ^a	263 ± 37 ^b

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). C3G= cianidina-3-glucósido; AE= ácido elágico.

Cuadro A-LXXI. Prueba F-test para comparar las curvas obtenidas durante los ensayos de MF (flujo vrs tiempo) para determinar la repetibilidad del proceso.

Modelo	Suma de cuadrados	Grados de libertad
<i>Hipótesis nula (una curva para todos los sets de datos)</i>	475964,85	153
<i>Hipótesis alternativa (curvas separadas)</i>		
Ensayo 1	169493,696	52
Ensayo 2	161350,244	48
Ensayo 3	142875,413	51
Total	473719,353	151
Diferencia	2245,497	2
Diferencia relativa	0,474	1,325
Razón (F)	0,3582	
Probabilidad	0,6997	

*Significativo.

Cuadro A-LXXII. Análisis de varianza para el contenido de sólidos insolubles en suspensión (SIS) en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	701,4669	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXIII. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	1169,395	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXIV. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	29,7485	0,0008*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXV. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	153,276	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXVI. Análisis de varianza para el valor de pH en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	0,8543	0,4715
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXVII. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas (base seca) en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	10,4796	0,011*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXVIII. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	2,3131	0,18
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXIX. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante, ORAC-H (base seca) en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	6,0849	0,036*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-LXXX. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (base seca) en el extracto obtenido del proceso de MF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	4,4518	0,0652
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

10.9 Análisis de varianza (ANDEVA) y prueba F (F-test) para los resultados del proceso de concentración y purificación de polifenoles mediante ultrafiltración (sección 8)

Cuadro A-LXXXI. Valores de turbidez en las muestras de retenido obtenidas durante los ensayos de ultrafiltración (membrana con MWCO= 1 kDa) del extracto, según la presión transmembranaria.

Presión transmembranaria (bar)	Turbidez (NTU)		
	UF-1	UF-2	UF-3
2,76	8	12	21
3,50	9	16	24
4,33	11	17	25
5,03	12	19	26
5,68	11	19	26
6,27	12	19	25
6,82	13	18	26
Promedio	11	17	25
Desviación estándar	2	3	2

Cuadro A-LXXXII. Valores de turbidez en las muestras de retenido obtenidas durante los ensayos de ultrafiltración (membrana con MWCO= 5 kDa) del extracto, según la presión transmembranaria.

Presión transmembranaria (bar)	Turbidez (NTU)		
	UF-1	UF-2	UF-3
2,76	15	13	17
3,50	16	16	17
4,33	17	16	20
5,03	18	19	18
5,68	17	20	19
6,27	17	20	19
6,82	16	20	17
Promedio	17	18	18
Desviación estándar	1	3	1

Cuadro A-LXXXIII. Análisis de varianza del efecto del tipo de membrana y presión transmembranaria sobre el flujo de permeado durante el proceso de ultrafiltración del extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria (Ptm)	1	260,8553	<0,0001*
Tipo de membrana (Membrana)	1	0,0338	0,8552
Ptm*Membrana	1	0,1569	0,6943

*Significativo.

Cuadro A-LXXXIV. Análisis de varianza del efecto del tipo de membrana y presión transmembranaria sobre la retención de acidez durante el proceso de ultrafiltración del extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria (Ptm)	1	421,3292	<0,0001*
Tipo de membrana (Membrana)	1	333,6587	<0,0001*
Ptm*Membrana	1	1,4703	0,2328

*Significativo.

Cuadro A-LXXXV. Análisis de varianza del efecto del tipo de membrana y presión transmembranaria sobre la retención de sólidos solubles durante el proceso de ultrafiltración del extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria (Ptm)	1	0,0784	0,7809
Tipo de membrana (Membrana)	1	9,3092	0,0041*
Ptm*Membrana	1	0,4938	0,4865

*Significativo.

Cuadro A-LXXXVI. Análisis de varianza del efecto del tipo de membrana y presión transmembranaria sobre la retención de antocianinas durante el proceso de ultrafiltración del extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria (Ptm)	1	66,254	<0,0001*
Tipo de membrana (Membrana)	1	333,707	<0,0001*
Ptm*Membrana	1	2,8713	0,0984

*Significativo.

Cuadro A-LXXXVII. Análisis de varianza del efecto del tipo de membrana y presión transmembranaria sobre la retención de elagitaninos durante el proceso de ultrafiltración del extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria (Ptm)	1	113,3369	<0,0001*
Tipo de membrana (Membrana)	1	209,4111	<0,0001*
Ptm*Membrana	1	9,9900	0,0031*

*Significativo.

Cuadro A-LXXXVIII. Análisis de varianza del efecto del tipo de membrana y presión transmembranaria sobre el consumo de energía durante el proceso de ultrafiltración del extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Presión transmembranaria (Ptm)	1	137,4747	<0,0001*
Tipo de membrana (Membrana)	1	125,3919	<0,0001*
Ptm*Membrana	1	5,0439	0,0306*

*Significativo.

Cuadro A-LXXXIX. Flujo de permeado, consumo de energía y retención de compuestos para evaluar el efecto de la presión transmembranaria (Ptm) durante la ultrafiltración del extracto con la membrana Inside Céram (1 kDa).

Ptm (bar)	Flujo de permeado (L·h ⁻¹ ·m ⁻²)	Retención acidez (%)	Retención SS (%)	Retención ATCs (%)	Retención ETs (%)	Consumo de energía (W·h·L ⁻¹)
2,76	6,7 ± 0,4 ^e	20 ± 1 ^f	42 ± 6 ^a	68 ± 5 ^d	80 ± 2 ^d	1460 ± 86 ^a
3,50	8,2 ± 0,6 ^e	27 ± 1 ^e	40 ± 3 ^a	76 ± 3 ^{cd}	84,8 ± 0,7 ^c	1191 ± 87 ^b
4,33	10,2 ± 0,9 ^d	31 ± 1 ^{de}	43 ± 1 ^a	82 ± 4 ^{bc}	88 ± 1 ^{bc}	970 ± 79 ^c
5,03	11,3 ± 0,9 ^{cd}	33 ± 2 ^{cd}	41 ± 1 ^a	85 ± 3 ^{ab}	89 ± 1 ^{ab}	879 ± 72 ^{cd}
5,68	12,3 ± 0,8 ^{bc}	37 ± 2 ^{bc}	46 ± 5 ^a	87 ± 3 ^{ab}	91 ± 1 ^{ab}	804 ± 50 ^{de}
6,27	13,6 ± 0,9 ^{ab}	40 ± 3 ^{ab}	42 ± 0 ^a	89,7 ± 0,8 ^{ab}	92 ± 1 ^a	730 ± 48 ^{de}
6,82	14,3 ± 0,3 ^a	42 ± 2 ^a	41 ± 2 ^a	91 ± 3 ^a	92 ± 2 ^a	694 ± 13 ^c

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). SS= sólidos solubles; ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos.

Cuadro A-XC. Flujo de permeado, consumo de energía y retención de compuestos para evaluar el efecto de la presión transmembranaria (Ptm) durante la ultrafiltración del extracto con la membrana Membralox (5 kDa).

Ptm (bar)	Flujo de permeado (L·h ⁻¹ ·m ⁻²)	Retención acidez (%)	Retención SS (%)	Retención ATCs (%)	Retención ETs (%)	Consumo de energía (W·h·L ⁻¹)
2,76	8 ± 1 ^d	8,4 ± 0,8 ^d	39 ± 3 ^a	19 ± 2 ^b	58 ± 2 ^d	2045 ± 420 ^a
3,50	8 ± 1 ^d	16,6 ± 0,6 ^c	39 ± 3 ^a	29 ± 5 ^{ab}	66 ± 2 ^{cd}	1948 ± 391 ^{ab}
4,33	9 ± 2 ^{cd}	20 ± 3 ^{bc}	39 ± 4 ^a	40 ± 9 ^{ab}	71 ± 3 ^{bc}	1772 ± 347 ^{abc}
5,03	10 ± 2 ^{bcd}	23 ± 3 ^{ab}	38 ± 3 ^a	44 ± 15 ^{ab}	78 ± 5 ^{ab}	1551 ± 271 ^{abcd}
5,68	12,2 ± 0,8 ^{abc}	24 ± 2 ^{ab}	39 ± 4 ^a	55 ± 10 ^a	81 ± 3 ^a	1307 ± 87 ^{bcd}
6,27	14 ± 2 ^{ab}	28 ± 4 ^a	38 ± 4 ^a	44 ± 14 ^{ab}	80 ± 5 ^a	1158 ± 138 ^{cd}
6,82	16 ± 2 ^a	28 ± 3 ^a	39 ± 4 ^a	55 ± 15 ^a	77 ± 1 ^{ab}	1027 ± 142 ^d

*Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05). SS= sólidos solubles; ATCs= antocianinas; ETs= elagitaninos.

Cuadro A-XCI. Prueba F-test para comparar las curvas obtenidas durante los ensayos de UF (flujo vrs tiempo) para determinar la repetibilidad del proceso.

Modelo	Suma de cuadrados	Grados de libertad
<i>Hipótesis nula (una curva para todos los sets de datos)</i>	43775	304
<i>Hipótesis alternativa (curvas separadas)</i>		
Ensayo 1	18509,0816	147
Ensayo 2	25260,3844	156
Total	43769	303
Diferencia	5	1
Diferencia relativa	0,0121	0,330
Razón (F)		0,037
Probabilidad		0,8476

*Significativo.

Cuadro A-XCII. Análisis de varianza para el valor de turbidez en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	5,5701	0,0235*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCIII. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	15,834	0,004*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCIV. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	25,7376	0,0011*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCV. Análisis de varianza para el valor de pH en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	24,6195	0,0013*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCVI. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas (base seca) en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	67,013	<0,0001*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCVII. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	22,3209	0,0017*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCVIII. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante, ORAC-H (base seca) en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	5,9219	0,038*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-XCIX. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (base seca) en el extracto obtenido del proceso de UF, según el tipo de muestra.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	2	6,8154	0,0286*
Error	6		
Total	8		

*Significativo.

Cuadro A-C. Análisis de varianza para el contenido de elagitaninos (base seca) en el extracto obtenido según el tipo de tratamiento y en el jugo de mora clarificado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tratamiento	3	14,3138	0,0023*
Error	7		
Total	10		

*Significativo.

Cuadro A-CI. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante, ORAC-H (base seca) en el extracto obtenido según el tipo de tratamiento y en el jugo de mora clarificado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	3	10,2249	0,006*
Error	7		
Total	10		

*Significativo.

Cuadro A-CII. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales (base seca) en el extracto obtenido según el tipo de tratamiento y en el jugo de mora clarificado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	3	8,063	0,0113*
Error	7		
Total	10		

*Significativo.

Cuadro A-CIII. Análisis de varianza para el contenido de acidez en el extracto obtenido según el tipo de tratamiento y en el jugo de mora clarificado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	3	126,7884	<0,0001*
Error	7		
Total	10		

*Significativo.

Cuadro A-CIV. Análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles en el extracto obtenido según el tipo de tratamiento y en el jugo de mora clarificado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	3	422,5299	<0,0001*
Error	7		
Total	10		

*Significativo.

Cuadro A-CV. Análisis de varianza para la pureza de los polifenoles totales en el extracto obtenido según el tipo de tratamiento y en el jugo de mora clarificado.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Probabilidad
Tipo de muestra	3	8,0892	0,0112*
Error	7		
Total	10		

*Significativo.