

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS A PARTIR DE CÁSCARA DE UVA VARIEDAD QUEBRANTA (ICA,
PERÚ) EMPLEANDO TÉCNICAS CONVENCIONALES Y EXTRACCIÓN
ASISTIDA POR ULTRASONIDO**

Tesis para optar el grado de Magíster en Química que presenta

Q.F. JULIA ALICIA DUEÑAS ZURITA

Dirigido por

DRA. EMMA PATRICIA MORALES BUENO

San Miguel, 2017

RESUMEN

La producción de vino y pisco representa una de las principales actividades agrícolas en todo el mundo, esta producción se acompaña con la generación de grandes cantidades de desechos que son ricos en compuestos bioactivos (especialmente compuestos fenólicos) con capacidad antioxidante. El propósito de este trabajo es seleccionar y optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad Quebranta provenientes de vinificaciones empleando un método convencional (sólido líquido) y extracción asistida por ultrasonido para su posterior estudio como agente reductor en la síntesis de nanopartículas metálicas.

Para ello se evalúa y selecciona los parámetros de extracción tanto para la extracción convencional (solvente etanol (0 – 80 % v/v), tiempo (5 - 300 minutos) temperatura (30 – 90 °C)) como para la extracción asistida por ultrasonido (amplitud (20 – 90 %) y tiempo de irradiación (5 – 40 minutos)), en la extracción de compuestos fenólicos totales. Para determinar las condiciones óptimas se usa la metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental a través de Box - Behnken, donde se evalúan tres niveles de cada factor: etanol (45 -55 % v/v), tiempo (160 – 200 minutos) y temperatura (75 - 85 °C) para la extracción convencional y, para la extracción asistida por ultrasonido, amplitud (50 – 90 %), ciclo de trabajo (0.2 – 1.0 s) y tiempo (5 – 15 minutos). Para ambos métodos de extracción, el modelo obtenido es un modelo de segundo orden. Los análisis de regresión muestran que más del 91.7 % y 98.7 % de la variación es explicada por los modelos para la extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido de dichos compuestos respectivamente.

Los extractos obtenidos bajo las condiciones optimizadas se usan como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de oro y plata. Los extractos obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonido muestran mejores resultados en la síntesis de nanopartículas de plata y de oro.

AGRADECIMIENTOS

“Las palabras nunca alcanzan cuando se tiene que decir, gracias”

En primer lugar, agradezco a Dios, quien bendice mi vida y hace realidad este sueño anhelado. A mi familia, en especial a mis queridos padres, quienes son un ejemplo de lucha y amor incondicional, a mis hermanos quienes me inspiran a seguir adelante.

Agradezco la subvención otorgada por CIENCIA ACTIVA – CONCYTEC en el marco del convenio 035-2015-FONDECYT, por haber financiado mis estudios de posgrado.

Agradezco a mi asesora la Dra. Patricia Morales, por su dirección y motivación durante mi investigación.

A los docentes y personal de la Escuela de Posgrado y programa de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por su apoyo durante mis estudios.

A la Dra. Fiorella Cárdenas, al Ing. Fredy Huayta y al equipo de trabajo del Laboratorio de Procesos Industriales – PUCP por la colaboración brindada.

Agradezco al Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Agroindustrial – Ica, en especial al Ing. José Carlos Falconi por el apoyo brindado en la obtención de las muestras.

A la Dra. Maribel Guzmán y al MSc. Jonathan Nué por su colaboración y apoyo brindado en la síntesis y caracterización de las nanopartículas metálicas.

A mis compañeros y amigos por su motivación en la realización de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	2
CONTENIDO.....	4
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo General:	13
3.2 Objetivos Específicos:	13
4. MARCO TEÓRICO:	14
4.1. La industria vitivinícola en el Perú:.....	14
4.2. El orujo : potencial fuente de compuestos bioactivos	16
4.3. Composición fenólica de uvas y vinos	16
4.4. Métodos de extracción.....	27
4.5. Síntesis de nanopartículas usando extractos de plantas:.....	34
5. METODOLOGÍA.....	39
5.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	39
5.1.1. REACTIVOS.....	39
5.1.2. MATERIALES.....	39
5.1.3. EQUIPOS	40
5.2. MUESTRA:.....	40
5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:.....	42
5.3.1. Extracción convencional (sólido líquido):.....	42
5.3.2. Extracción asistida por ultrasonido:	45
5.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS :.....	48
5.4.1. Determinación de compuestos fenólicos totales:.....	48
5.4.2. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular:	48
5.5. SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS USANDO EXTRACTOS	50
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	51
7. RESULTADOS	51
7.1. Calibración del método.....	51
7.2. Influencia de lípidos en la determinación de compuestos fenólicos:	52

7.3.	Extracción convencional:	54
7.4.	Extracción asistida por ultrasonido:	66
7.5.	Resultados del análisis por cromatografía líquida:	74
7.6.	Recuperación	75
7.7.	Resultados de la síntesis y caracterización de las nanopartículas metálicas:	77
8.	DISCUSIÓN	90
8.1.	Influencia de los lípidos:	90
8.2.	Extracción convencional:	90
8.2.1	Selección del solvente:	90
8.2.2	Selección de la temperatura de extracción:	91
8.2.3	Selección del tiempo de extracción:	91
8.2.4	Optimización de las condiciones de extracción convencional:	92
8.3	Extracción asistida por ultrasonido:	93
8.3.1	Selección de la amplitud:	93
8.3.2	Selección del tiempo de extracción:	94
8.3.3	Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos totales por EAU	94
8.4	Análisis por cromatografía líquida:	96
8.5	Síntesis y caracterización de las nanopartículas de metálicas	96
9.	CONCLUSIONES	100
10.	RECOMENDACIONES	102
11.	BIBLIOGRAFÍA	103
12.	ANEXOS	112

TABLAS

Tabla 1. Algunos estudios bibliográficos sobre la extracción convencional de compuestos bioactivos.....	30
Tabla 2. Algunos estudios bibliográficos sobre la extracción de compuestos bioactivos usando ultrasonido.....	34
Tabla 3. Sistema de solvente utilizados para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de vid.	42
Tabla 4. Condiciones de temperatura utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de vid.....	43
Tabla 5. Condiciones de tiempo utilizados para la extracción de compuestos fenólicos de cascara de vid.....	44
Tabla 6. Niveles de tratamiento y variables independientes utilizadas en la extracción convencional de compuestos fenólicos totales.	45
Tabla 7. Condiciones experimentales utilizadas para la evaluación del % de amplitud	46
Tabla 8. Condiciones experimentales utilizadas para la evaluación del tiempo de irradiación	46
Tabla 9. Variables codificadas del diseño experimental empleando extracción asistida por ultrasonido	47
Tabla 10. Perfil de gradiente del sistema cromatográfico.	49
Tabla 11. Curva de calibración del método de Folin Ciocalteu.	51
Tabla 12. Comparación de muestras desgrasadas y sin desgrasar en la determinación de compuestos fenólicos totales	53
Tabla 13. Resultado de la prueba t-Student para muestras independientes en la comparación de muestras desgrasadas y sin desgrasar	53
Tabla 14. Solvente binario en la determinación de compuestos fenólicos totales	54
Tabla 15. Tabla ANOVA de la comparación del solvente binario en la extracción de compuestos fenólicos totales	55
Tabla 16. Comparaciones múltiples test de Tukey B ^a para diferente composición de solvente en la extracción de compuestos fenólicos totales.	55
Tabla 17. Tratamiento de temperaturas en la determinación de compuestos fenólicos totales	56
Tabla 18 . Tabla ANOVA para comparación de las temperaturas de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales	57
Tabla 19. Tiempo de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.....	59
Tabla 20. ANOVA para comparación de los tiempos de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.	59
Tabla 21. Velocidad de extracción convencional.....	61
Tabla 22. Análisis de varianza de la extracción convencional de los compuestos fenólicos totales.....	63
Tabla 23. Coeficiente de regresión para compuestos fenólicos totales	63
Tabla 24. Porcentajes de amplitud en la determinación de compuestos fenólicos totales ...	66

Tabla 25. ANOVA para comparación de los porcentajes de amplitud en la determinación de compuestos fenólicos totales.	67
Tabla 26. Tiempo de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.....	68
Tabla 27. Tabla ANOVA para comparación de tiempo en la determinación de compuestos fenólicos totales.	68
Tabla 28. Velocidad de extracción de los compuestos fenólicos empleando extracción asistida por ultrasonido.....	70
Tabla 29. Análisis de varianza para compuestos fenólicos totales en la extracción asistida por ultrasonido.	72
Tabla 30. Coeficiente de regresión para compuestos fenólicos totales	72
Tabla 31. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC.	75
Tabla 32. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular.	75
Tabla 33. Comparación de los extractos aplicando método convencional y extracción asistida por ultrasonido en la determinación de compuestos fenólicos totales.....	76
Tabla 34. Tabla de t de student para la comparación de los dos métodos de extracción	76
Tabla 35. Análisis elemental de las nanopartículas de oro – método A.....	86
Tabla 36. Análisis elemental de las nanopartículas de oro – método B.	87
Tabla 37. Análisis elemental de las nanopartículas de plata – método A.	88
Tabla 38. Análisis elemental de las nanopartículas de plata – método B.....	89

FIGURAS

Figura 1. La masa de uva producida en las zonas productivas (ha) (22).....	15
Figura 2. Estructura básica de los compuestos fenólicos (17).....	17
Figura 3. Principales ácidos hidroxibenzoicos presentes en uvas y vinos (17).....	18
Figura 4. Principales ácidos hidroxicinámicos presentes en uvas y vinos (17).....	19
Figura 5. Principales estilbenos y derivados presentes en uvas y vinos (17).	20
Figura 6. Estructura química básica de los flavonoides presentes en uvas y vinos (17).....	21
Figura 7. Monómeros de flavanoles y dímeros tipo A y B presentes en uvas y vinos (17). 23	
Figura 8. Principales flavonoles presentes en uvas y vinos (17).....	24
Figura 9. Principales antocianinas presentes en uvas y vinos (17).....	25
Figura 10. Principales dihidroflavonoles presentes en uvas y vinos (17).	27
Figura 11. Principales flavonas presentes en <i>Vitis vinífera</i> (17).....	27
Figura 12. Cavitación producida en el tratamiento ultrasónico (47).	31
Figura 13. Proceso de formación de nanopartículas metálicas (60).	36
Figura 14. Curva de calibración para el método Folin Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos totales.	52
Figura 15. Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales según la composición del solvente binario.....	56
Figura 16. Comparación de las temperaturas de extracción de compuestos fenólicos totales.	58

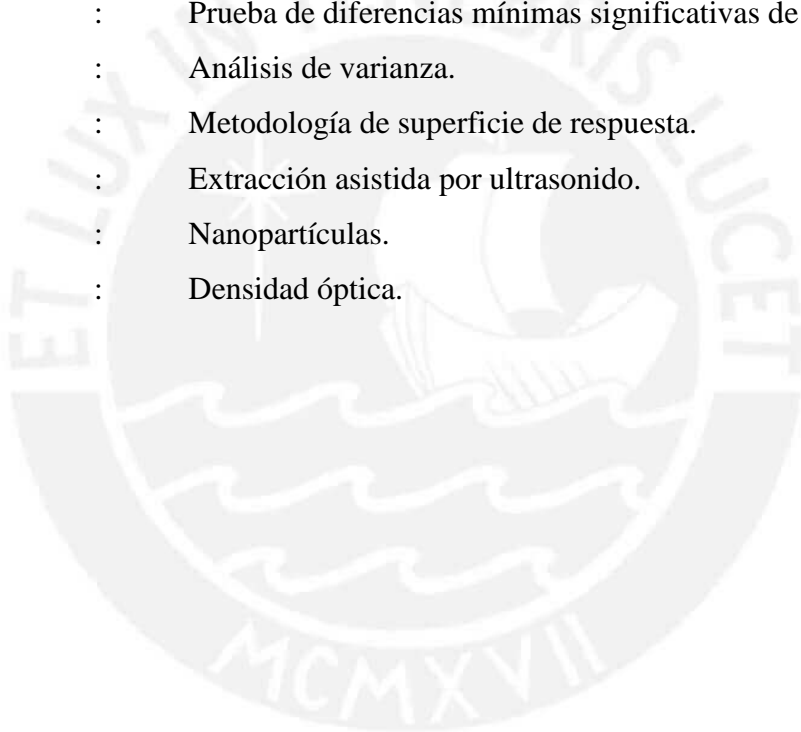
Figura 17. Contenido de compuestos fenólicos totales acumulados en el tiempo en función del tiempo de extracción.....	60
Figura 18. Velocidad de extracción de compuestos fenólicos totales en cáscaras de vid var. Quebranta extraídas con EtOH 50 % a 90 °C.....	62
Figura 19. Gráficos de superficie de respuesta a) Solvente y Tiempo & Compuestos Fenólicos Totales, b) Tiempo y Temperatura & Compuestos Fenólicos Totales, c) Solvente y Temperatura & Compuestos Fenólicos Totales.....	64
Figura 20. Diagrama de Pareto estandarizado para compuestos fenólicos totales	65
Figura 21. Comparación de los tiempos de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.	67
Figura 22. Contenido de compuestos fenólicos totales acumulados en el tiempo según el tiempo de extracción.....	69
Figura 23. Comparación de los tiempos de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.	69
Figura 24. Velocidad de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales en cáscaras de vid variedad Quebranta extraídas con EtOH 50 %.....	71
Figura 25. Gráficos de superficie de respuesta a) Amplitud y Tiempo & Compuestos Fenólicos Totales, b) Amplitud y Ciclo de trabajo & Compuestos Fenólicos Totales, c) Ciclo de trabajo y Tiempo & Compuestos Fenólicos Totales.....	73
Figura 26. Diagrama de Pareto estandarizada para compuestos fenólicos totales	74
Figura 27. Comparación de los métodos en la recuperación de los CFT.	77
Figura 28. Espectros UV-visible de los extractos: filtrado y sin filtrar.....	78
Figura 29. Espectros FT-IR: a) extracto A, b) extracto B, c) extracto A filtrado, d) extracto B filtrado, e) desorción del extracto A, f) desorción del extracto B.	80
Figura 30. Espectro UV-visible de las nanopartículas de oro.	82
Figura 31. Espectro UV-visible de las nanopartículas de plata.....	83
Figura 32. Imagen SEM de las nanopartículas de oro sintetizadas.	84
Figura 33. Imagen SEM de las nanopartículas de plata sintetizadas.....	85
Figura 34. Espectro EDX de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método A.	86
Figura 35. Espectro EDX de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método B.	87
Figura 36. Espectro EDX de las nanopartículas de plata sintetizada por el método A.	88
Figura 37. Espectro EDX de las nanopartículas de plata sintetizadas por el método B.....	89

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de la metodología Folin Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos totales.	112
Anexo 2. Interferencia de lípidos en la determinación de compuestos fenólicos totales..	113
Anexo 3. Extracción convencional (sólido líquido).....	113
Anexo 4. Extracción asistida por ultrasonido.....	118
Anexo 5. Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos. .	122
Anexo 6. Recuperación de los compuestos fenólicos totales.....	123

ABREVIATURAS

GAE	:	Equivalentes al ácido gálico.
CFT	:	Compuestos fenólicos totales.
HPLC	:	Cromatografía líquida de alta eficacia
AuNPs	:	Nanopartículas de oro.
AgNPs	:	Nanopartículas de plata.
SEM	:	Microscopio electrónico de barrido.
UV-vis	:	Ultravioleta visible.
FT-IR	:	Fourier transform infrared spectroscopy.
LSD	:	Prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.
ANOVA	:	Análisis de varianza.
MSR	:	Metodología de superficie de respuesta.
EAU	:	Extracción asistida por ultrasonido.
NPs	:	Nanopartículas.
DO	:	Densidad óptica.



1. INTRODUCCIÓN

La uva es uno de los productos agroindustriales nacionales con mayor relevancia y proyección. Se calcula que alcanzó más del 10 % del total de exportaciones del país (medido en valor FOB) en el año 2013. Crece principalmente en zonas cálidas tropicales, pero puede adaptarse a una gran variedad de climas. En el Perú se cultiva mayoritariamente en las regiones de Ica, La Libertad, Lima y Piura (1).

La industria de vinos y piscos está vinculada directamente a la producción de uva y, en los últimos años, ha tenido un incremento importante (2). Sin embargo, este crecimiento involucra algunos problemas en cuanto al notable crecimiento en la generación de residuos; siendo el bagazo u orujo (cáscaras y semillas) y las lías (sedimentos sólidos) los residuos más abundantes del proceso de vinificación; el primero representa aproximadamente el 5 % del total de uvas procesadas y el segundo el 4 % del volumen total de vino producido (3). Actualmente los residuos de la industria vitivinícola se utilizan normalmente como piensos, abonos y fertilizantes; la mayor parte de estos residuos se siguen eliminando sin ningún tratamiento o reutilización; a su vez muchos de estos residuos son ricos en compuestos bioactivos. Por lo tanto, son una fuente prometedora de sustancias bioactivas naturales de alto valor añadido.

Una alternativa de aprovechamiento de estos residuos que ha cobrado interés es el de su uso como fuente de compuestos fenólicos, los cuales representan entre el 0.09 - 0.35 % del peso del orujo seco (4). Se ha reportado que entre 60 – 65 % de los compuestos fenólicos permanecen en el orujo de uva tinta una vez culminada la vinificación (5). Estos compuestos se caracterizan por su capacidad antioxidante y de allí el interés por su potencial uso en el sector cosmético, farmacéutico y alimentario. En particular, se puede mencionar sus aplicaciones en la prevención del cáncer, enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias (6).

Los métodos más comunes para la extracción de compuestos fenólicos implican el uso de solventes. Existe un gran número de investigaciones orientadas a la obtención de estos

compuestos a partir de material vegetal, incluyendo la cáscara y las semillas de uva. Sin embargo, el uso de solventes en estos métodos convencionales de extracción puede convertirse en un inconveniente por la alta cantidad requerida de ellos combinada con su toxicidad. Hay algunos otros factores presentes en estos procedimientos que afectan la extracción de fenólicos como son el aumento del tiempo de extracción y el bajo rendimiento.

Paladino (7) reportó que la temperatura presenta un efecto significativo sobre la extracción de fenólicos. Asimismo, precisa que el calentamiento tiene la capacidad de que exista una mejor penetración del solvente hacia los tejidos vegetales, lo cual favorecería la liberación de los compuestos fenólicos. En el estudio de Thoo et al. (8), se reportó que las condiciones de extracción de compuestos fenólicos, como concentración de solvente, tiempo y temperatura, muestran un efecto significativo sobre la extracción de fenólicos y capacidad antioxidante en *Morinda citrifolia*.

Para mejorar esta última variable se han reportado algunos métodos alternativos, entre los que se destaca la aplicación de ultrasonido que ha mostrado algunas ventajas adicionales como la reducción del tiempo de extracción y del consumo de solventes (4,9). La rapidez de la extracción asistida por ultrasonido se debe a la alta área de superficie de contacto entre la fase sólida y líquida. La potencia de la cavitación acústica del ultrasonido (frecuencias 18 - 40 kHz) causa la ruptura de las paredes celulares, mejorando la transferencia de masa y facilitando el ingreso del disolvente a la célula vegetal (10). De esta manera se alcanza una alta reproducibilidad en tiempos más cortos, manipulación simplificada, menor temperatura, menor consumo de energía y menor consumo de disolvente en plena correspondencia con el concepto de extracción verde (11).

Barba et al. (12) reportaron las metodologías empleadas en la recuperación de compuestos bioactivos (mayormente compuestos fenólicos) de desechos y subproductos de la bodega, siendo el ultrasonido una alternativa en la extracción de dichos compuestos, por su parte dicho método es simple, presenta menor consumo de energía, evita la degradación de los compuestos termolábiles por usar temperaturas bajas y los tiempos de extracción son más cortos comparados con métodos tradicionales.

Además, Parniakov et al. (13) muestran resultados significativos en la recuperación de compuestos bioactivos, empleando extracción asistida por ultrasonido. Por otro lado, en los estudios de Corrales et al. (14) y Vilku et al. (15) se reporta la existencia de una mejora significativa en el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos cuando emplearon extracción asistida por ultrasonido en cultivares de uva.

Otros aspectos relevantes para la extracción de fenólicos a partir de uvas fueron reportados en los estudios de Baydar et al. (16). Sus estudios mostraron la existencia de diferencias entre los cultivares de uva Cabernet Sauvignon, Kalecik Karası y Narince, tanto en las cáscaras y semillas de uva, como en los vinos en relación al contenido de compuestos fenólicos. Asimismo, estas variaciones afectaron la capacidad antioxidante. Por su parte Sánchez (17) evidenció la existencia de algunas diferencias en la composición fenólica, así como en el perfil de flavonoides y no-flavonoides de los cultivares de vid, provenientes de distintas zonas geográficas.

Dichos estudios muestran que la composición fenólica es diferente en los cultivares de vid; por lo tanto, la influencia de diversos factores como los asociados a la variedad, manejo del viñedo, suelo, clima y entre otros son determinantes en la calidad de la uva.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

Tomando en cuenta que la composición química así como la estructura, propiedades físico-químicas y la diversidad de factores que pueden influir en la composición de compuestos fenólicos no siguen un patrón común, no existe un protocolo de extracción universal de estos compuestos. De ahí la necesidad de desarrollar y optimizar la metodología de extracción para cada fuente de compuestos fenólicos (8,17–19).

En este contexto, resulta necesario desarrollar y optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos para cada variedad, particularmente para la Quebranta, que es la variedad de uva de mayor producción en el Perú (20). No se ha reportado una metodología de extracción optimizada de compuestos fenólicos. En este sentido, el presente trabajo de

investigación busca determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos, aplicando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido, evaluando así la recuperación y rendimiento de los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de uva variedad Quebranta (Ica, Perú). De comprobar que se tiene una fuente rica de compuestos fenólicos, esta puede constituirse en una alternativa interesante de aprovechamiento, otorgándole así un valor agregado a dichos residuos.

En este estudio también se plantean las siguientes interrogantes: ¿Cuáles serán los parámetros óptimos de la extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido en la determinación de compuestos fenólicos totales? ¿Será más eficiente la extracción asistida por ultrasonido que la extracción convencional? Los extractos de compuestos fenólicos obtenidos a partir de la extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido, ¿podrán ser usados como un potencial agente reductor en la síntesis de nanopartículas metálicas? Complementariamente el presente trabajo de investigación pretende ser una contribución al estudio y conocimiento de la composición química, particularmente de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de las cáscaras de la variedad Quebranta (Ica, Perú). Dicho conocimiento es importante para la valorización de los residuos y subproductos de la industria vitivinícola debido a su riqueza en compuestos fenólicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Optimizar las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad Quebranta (Ica, Perú) empleando técnica convencional y extracción asistida por ultrasonido.

3.2 Objetivos Específicos:

- 1) Evaluar y seleccionar el mejor sistema binario de solvente, tiempo y temperatura de extracción convencional que permita un mayor rendimiento de los compuestos fenólicos totales a partir de cáscaras de uva.
- 2) Establecer las condiciones óptimas de temperatura, sistema binario de solvente y tiempo de tratamiento en la determinación del contenido de compuestos fenólicos

totales, empleando la extracción convencional con el uso del diseño de Box-Behnken de metodología de superficie de respuesta.

- 3) Evaluar y seleccionar el porcentaje de amplitud y tiempo de irradiación de ultrasonido que permita un mayor rendimiento de los compuestos fenólicos totales a partir de cáscaras de uva.
- 4) Establecer las condiciones óptimas de porcentaje de amplitud, ciclo de trabajo y tiempo de irradiación en la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, empleando la extracción asistida por ultrasonido con el uso del diseño de Box-Behnken de metodología de superficie de respuesta.
- 5) Evaluar el perfil cromatográfico de compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los extractos obtenidos con los parámetros optimizados.
- 6) Evaluar y analizar la recuperación de los compuestos fenólicos en general y los rendimientos de los diferentes métodos de extracción empleados.
- 7) Evaluar la posible aplicación de los extractos obtenidos como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de oro y plata.

4. MARCO TEÓRICO:

4.1. La industria vitivinícola en el Perú:

Actualmente la viticultura constituye una de las actividades frutícolas de mayor importancia por su amplitud, valor de la producción y por ser la materia prima por excelencia de la industria vitivinícola nacional. En el Perú, la producción de uva se encuentra concentrada principalmente en la costa sur (Ica, Lima Arequipa, Moquegua y Tacna) y la costa norte (Piura y Trujillo), siendo Ica el mayor productor de uva, esto es debido principalmente a las condiciones agronómicas favorables (21).

En enero 2015, la producción de uva registró 54 mil toneladas, volumen mayor en 6 % (3 mil toneladas), al que se logró el mismo mes en el 2014 (51 mil toneladas). Los mayores incrementos de la producción se dieron en los departamentos de Ica (8 %), Lima (111 %) y Arequipa (48 %), como resultado de una mayor superficie en producción, siguiendo la

tendencia creciente, en los últimos años, asimismo la producción de uva en enero 2015 fue la más alta en los últimos diez años (21).

En el mercado nacional la producción de uva es destinada principalmente a la elaboración de pisco (49 %), seguido de uva de mesa (27 %), vinificación (15 %) y consumo familiar (9 %) tal como se observa en la Figura 1 (22).

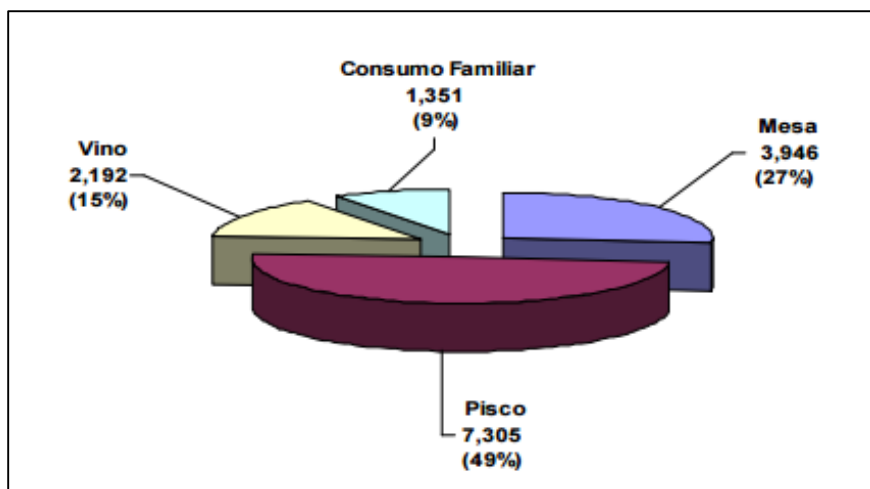


Figura 1. La masa de uva producida en las zonas productivas (ha) (22).

La producción de pisco en el Perú está dominada por la mediana industria, las variedades de uva que se emplean en la elaboración de pisco se clasifican en aromáticas (Albilla, Italia, Moscatel y Torontel) y no aromáticas (Quebranta, Mollar, Negra Criolla y Uvina) que son cultivadas en las zonas de producción reconocidas, todas ellas pertenecen a la especie *Vitis vinífera* L., excepto la Uvina que es una variedad híbrida. según la NTP 211.001.2006, asimismo cabe mencionar que a nivel nacional la mayor parte del pisco se elabora con uva Quebranta (20,23,24).

La producción nacional de pisco en el periodo 2011 - 2015 acumuló un crecimiento de 34 %, alcanzando su máximo valor en el 2015, asimismo la producción de pisco genera grandes cantidades de residuos y subproductos que son ricos en compuestos bioactivos especialmente en compuestos fenólicos; se estima que la mayoría de los residuos generados son residuos orgánicos (25).

La recuperación y aprovechamiento de estos residuos constituye un punto clave para su revalorización, estos compuestos bioactivos tienen beneficios para la salud, podrían ser usados como aditivos en la industria de los alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos.

4.2. El orujo : potencial fuente de compuestos bioactivos

El orujo de la vid es uno de los principales residuos del proceso de vinificación, siendo un subproducto rico en compuestos fenólicos que pueden ser potencialmente aprovechables por su capacidad antioxidante o agente reductor.

Teniendo en cuenta la gran variedad de subespecies de vides, los compuestos bioactivos pueden variar principalmente en su concentración más que en el tipo de compuesto. Los compuestos responsables del color de las uvas se encuentran básicamente en los hollejos de las mismas, siendo los compuestos fenólicos los más importantes (26).

En el proceso de elaboración del vino, los racimos de uvas son estrujados, y en el caso particular del vino tinto, quedan en contacto con el mosto los hollejos y las semillas durante el tiempo que dure la fermentación. Este proceso libera los principios antioxidantes presentes en el fruto. Por lo tanto, las uvas se someten a una extracción ligera pero prolongada con una mezcla agua - etanol que proporciona al vino tinto un contenido variable de compuestos fenólicos. Sin embargo, el residuo restante después del estrujado o de la fermentación (el orujo), que se compone principalmente de cáscaras y semillas, todavía contiene altos niveles de compuestos fenólicos (27), que son aprovechados. La utilización de estos residuos puede constituir una alternativa interesante como fuente de compuestos fenólicos.

4.3. Composición fenólica de uvas y vinos

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias químicas más abundantes del reino vegetal. Son biosintetizados en las plantas a través del metabolismo secundario y cumplen numerosas funciones biológicas que han permitido la adaptación y evolución de las distintas especies. Entre las mismas se encuentran, el transporte de

hormonas, la atracción de agentes polinizadores, el crecimiento del tubo polínico y la fecundación, la dispersión de semillas, el establecimiento de relaciones simbióticas, la protección de los fotosistemas frente al daño oxidativo, las respuestas de defensa frente a herbívoros y al ataque de patógenos, y la tolerancia a condiciones abióticas desfavorables (17).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos incluyen una gran diversidad de estructuras muy heterogéneas, que se caracterizan por poseer al menos un núcleo bencénico sustituido con uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (Figura 2). Su reactividad se debe tanto al carácter ácido de la función fenólica como al carácter nucleofílico que le confiere la alta densidad electrónica del anillo bencénico (28).

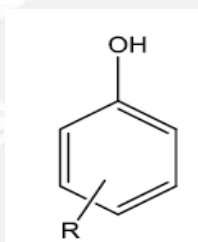


Figura 2. Estructura básica de los compuestos fenólicos (17).

Estos compuestos pueden ser clasificados siguiendo varios criterios. La clasificación más común y empleada para describir la matriz fenólica de uvas y vinos se basa en la estructura de su esqueleto carbonado, dividiéndose en compuestos no-flavonoides y flavonoides. Cada grupo se divide a su vez en diferentes familias químicas, cuyas características estructurales le confieren propiedades específicas tales como color, aroma y sabor. En las uvas, los compuestos flavonoides se encuentran principalmente distribuidos en hollejos, semillas y escobajo y en menor proporción en pulpa; mientras que los no-flavonoides se hallan esencialmente en la pulpa, en relación a otras partes de la baya (17).

4.3.1. No-flavonoides

Los principales compuestos no-flavonoides presentes en la uva y el vino son los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), en sus formas libres y esterificadas, y los

estilbenos. Adicionalmente a estos compuestos, en el vino se pueden encontrar algunos alcoholes fenólicos y otros derivados relacionados (17).

4.3.1.1. Ácidos fenólicos

Dentro de este grupo se encuentran los compuestos formados por un sólo anillo de 6 átomos de carbono, incluyendo a los ácidos hidroxibenzoicos, con una estructura del tipo C6-C1 (Figura 3), y a los ácidos hidroxicinámicos, con una estructura C6-C3 (Figura 4).

4.3.1.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos

El ácido gálico es el único ácido hidroxibenzoico formalmente identificado en estado nativo en las uvas, encontrándose en la pulpa y en las partes sólidas de la baya (semilla y hollejo) en forma libre o bien como éster de flavanol ((-)-epicatequina-3-galato). Posee propiedades gustativas amargas y astringentes y en forma libre se oxida muy fácilmente formando quinonas. Los principales ácidos de este grupo, identificados en uvas y vinos, se presentan en la Figura 3. Complementariamente a estos compuestos, se han descrito una serie de derivados en vinos blancos y tintos, incluyendo por ejemplo vanillato de etilo, *p*-hidroxibenzoato de etilo, ésteres metílicos de los ácidos vanílico y protocatéuico, protocatecato de etilo, galato de etilo y el éster glucosilado del ácido vanílico, entre otros (28). Por su parte, los vinos criados en contacto con madera poseen taninos hidrolizables, que consisten en poliésteres de ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos), los cuales por hidrólisis pueden originar los correspondientes ácidos (17).

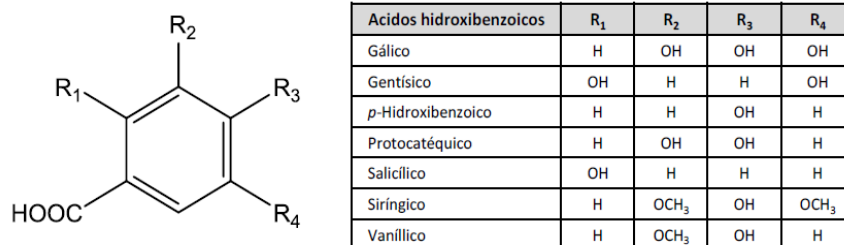


Figura 3. Principales ácidos hidroxibenzoicos presentes en uvas y vinos (17).

4.3.1.1.2. Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran ubicados principalmente en las vacuolas de las células del hollejo y de la pulpa de las bayas bajo la forma de ésteres tartáricos. Los principales compuestos presentes en la uva son los isómeros trans del ácido caftárico (cafeiltartárico), cutárico (*p*-cumariltartárico) y fertárico (feruliltartárico), aunque también se han detectado pequeñas cantidades de los isómeros cis y los ésteres glucosilados de los ácidos trans-*p*-cumárico y trans-ferúlico (17,28).

Desde el punto de vista organoléptico, estos compuestos poseen propiedades gustativas amargas, aunque pueden aportar sensaciones minoritarias de astringencia y acidez. Carecen de color en el espectro visible pero participan en la acilación de las antocianinas (ácidos *p*-cumárico y cafeico), influyen indirectamente en el color del vino a través de su participación en el fenómeno de copigmentación y actúan como precursores en la formación de piranoantocianinas. Por su parte, los ácidos ferúlico y cumárico pueden generar defectos olfativos debido a su degradación microbiana originando fenoles volátiles. Por otro lado, el ácido cafeico y su éster tartárico son los principales sustratos de la oxidación enzimática de los mostos, formando quinonas muy reactivas que pueden provocar la oxidación de antocianinas y taninos (17,28).

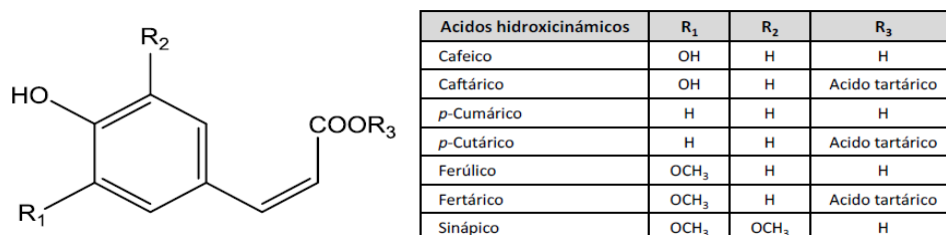


Figura 4. Principales ácidos hidroxicinámicos presentes en uvas y vinos (17).

4.3.1.2. Estilbenos

Los estilbenos poseen una estructura molecular formada básicamente por dos anillos bencénicos separados por un puente eteno (C6-C2-C6). Son biosintetizados en las plantas de

vid, especialmente en los hollejos y semillas de las bayas y en las raíces, como respuesta a condiciones de estrés (fitoalexinas), tales como infecciones fúngicas y radiación UV. Si bien existen en diferentes especies vegetales, las uvas y sus productos derivados se consideran la fuente dietaria más importante de estilbenos. El compuesto más abundante y estudiado en uvas y vinos es el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), que puede encontrarse en sus formas libres (isómeros *cis* y *trans*) o glucosilados formando los denominados piceidos (Figura 5). Los estilbenos también pueden formar complejos oligoméricos y poliméricos denominados viniferinas. En general, no poseen propiedades sensoriales, sin embargo, según diversos estudios se los relaciona con funciones benéficas para la salud humana por sus potenciales efectos antioxidante, anticarcinogénico, cardioprotectivo y neuroprotectivo (17,29).

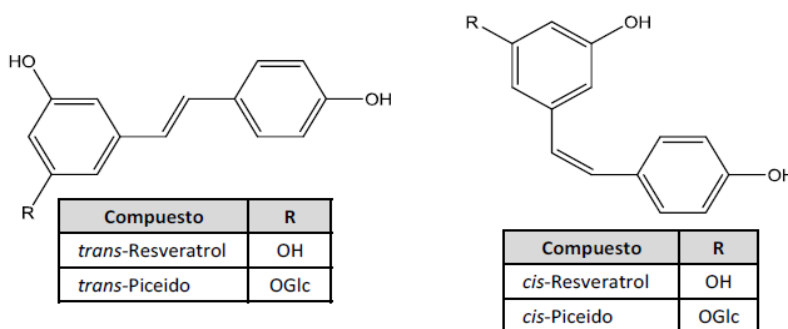


Figura 5. Principales estilbenos y derivados presentes en uvas y vinos (17).

4.3.2. Flavonoides

Los compuestos flavonoides constituyen el grupo de polifenoles de mayor importancia tecnológica en uvas y vinos, tanto en calidad como en cantidad. Su estructura molecular básica (C6-C3-C6) comprende dos anillos bencénicos polihidroxilados (A y B), unidos a través de un heterociclo central oxigenado (C) (Figura 6). El grado de insaturación del anillo C determina las distintas familias de compuestos englobados dentro de este grupo, distinguiéndose los flavanoles, flavonoles y antocianinas, y en menor proporción los dihidroflavonoles y flavonas. Dentro de cada familia, los distintos compuestos se diferencian de acuerdo al número y localización de los grupos hidroxilos y metoxilos presentes en el anillo B. Dichas estructuras básicas pueden presentarse a su vez bajo formas O-glicosiladas

en el C3 del anillo C, y estos glicósidos a su vez pueden encontrarse acilados o no. Una característica distintiva de estos compuestos es que pueden actuar tanto como electrófilos o como nucleófilos, lo que explica su alta reactividad en la matriz del vino (17).

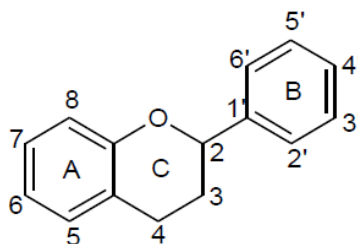


Figura 6. Estructura química básica de los flavonoides presentes en uvas y vinos (17).

4.3.2.1. Flavanoles

Los flavanoles o flavan-3-oles se encuentran ubicados en diferentes tejidos de la planta de vid (madera, hojas, escobajo) y en las partes sólidas de la baya (hollejo y semilla), como monómeros o formando oligómeros y polímeros conocidos con el nombre de proantocianidinas o taninos condensados. En uvas y vinos, el contenido de proantocianidinas es muy superior a la concentración de las unidades monoméricas. Desde el punto de vista sensorial, poseen propiedades gustativas (amargor) y táctiles (astringencia), e intervienen en la estabilización del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación con las antocianinas (17).

También participan en reacciones de pardeamiento oxidativo químico y enzimático, en interacciones con otras macromoléculas del vino y en la formación de turbidez o precipitados. Las unidades monoméricas comúnmente presentes en uvas de *Vitis vinífera* son la (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, y (-)-epigalocatequina. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina se presentan ortohidroxiladas en las posiciones C3' y C4' del anillo B, en tanto que la (+)-galocatequina y la (-)-epigalocatequina poseen un tercer grupo hidroxilo en la posición C5'. En la estructura química de estos compuestos existen dos carbonos asimétricos (C2 y C3) que determinan dos pares de isómeros ópticos con una configuración 2R:3S para (+)-catequina y (+)-galocatequina, y 2R:3R para (-)-epicatequina y (-)-epigalocatequina (17,28).

En la naturaleza, estos monómeros pueden encontrarse como tal, o bajo la forma de derivados metilados, glucosilados, acilados o esterificados con ácido gálico en la posición C3. En general, los monómeros mayoritarios en uvas y vinos son la (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato, y en menor concentración, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, (+)-catequina-3-galato y (+)-galocatequina-3-galato (17,28).

Con respecto a las proantocianidinas (oligómeros y polímeros), su denominación se refiere a la propiedad de liberar antocianidinas por calentamiento en medio ácido a partir de la ruptura del enlace interflavánico. En la uva se distinguen dos grupos de proantocianidinas dependiendo de la naturaleza de la antocianidina liberada (cianidina o delfinidina) en medio ácido (reacción de Bate-Smith): las procianidinas, compuestas por (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las prodelfinidinas, compuestas por (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. Las primeras se encuentran sólo en las semillas de las bayas, mientras que los hollejos poseen ambos grupos de compuestos (17,28).

Las proantocianidinas también se distinguen por el número de unidades de flavanoles que forman la cadena y por la naturaleza del enlace interflavánico. El término “oligómero” se refiere generalmente a moléculas con un número de unidades promedio o grado medio de polimerización (mDP) entre 2 y 5, mientras que los polímeros consisten en moléculas con un mDP > 5. Sin embargo, estas definiciones son subjetivas y varían en función del sustrato y de la técnica de medición empleada. En general, los hollejos se caracterizan por presentar polímeros de cadena larga, mientras que las semillas contienen proantocianidinas con un grado de polimerización menor y una mayor proporción de unidades galoiladas (13 – 29 %) comparadas con los hollejos (3 – 6 %). En función de la naturaleza del enlace, se encuentran las proantocianidinas de tipo B y las de tipo A (Figura 7). Las primeras son aquellas en que las uniones entre los monómeros están establecidas entre el C4 de la unidad superior (o de extensión) y el C6 o C8 de la unidad inferior, siendo más abundantes los dímeros C4 → C8 que los C4 → C6. Mientras que las proantocianidinas tipo A, presentan además un enlace tipo éter entre el C2 de la unidad superior y los grupos hidroxilos del C5 o C7 de la unidad inferior (28).

Existe una gran diversidad de oligómeros detectados en uvas y vinos, los cuales han sido reportados por diversos autores y se resumen en la revisión bibliográfica realizada por Monagas et al. (28). Por su parte, el conocimiento acerca de los polímeros presentes en dichas matrices es menor, debido a la variabilidad existente en el tamaño molecular y en su composición, dificultando el análisis y la identificación.

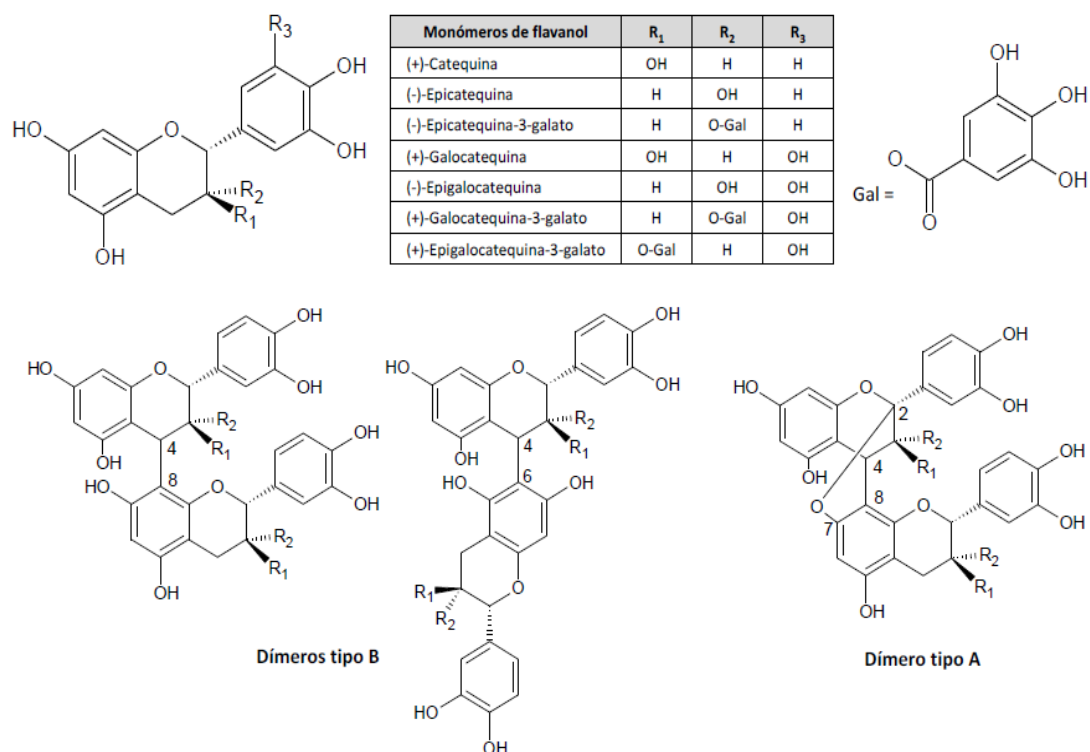


Figura 7. Monómeros de flavanoles y dímeros tipo A y B presentes en uvas y vinos (17).

4.3.2.2. Flavonoles

Los flavonoles de la vid se localizan principalmente en los hollejos de las uvas y en las hojas, aunque también se han detectado algunos compuestos en la pulpa y en los brotes e inflorescencias durante el desarrollo de la baya.

Se presentan principalmente bajo la forma de heterósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos o glucurónidos) de cuatro agliconas principales (quercetina,

miricetina, kaempferol e isoramnetina) (Figura 8), no obstante se han identificado otros compuestos derivados de la laricitrina y siringetina (30,31) como así también algunos diglicósidos (28). Adicionalmente a estos compuestos, en el vino se pueden encontrar las formas libres, originadas probablemente por la hidrólisis de los glicósidos durante el proceso de vinificación.

Desde el punto de vista organoléptico, los flavonoles son pigmentos que contribuyen a la componente amarilla del color de los vinos, y debido a su estructura planar participan como cofactores en el fenómeno de copigmentación de las antocianinas (32). Con respecto a la quercetina, cuando se presenta en concentraciones elevadas en vinos tintos, puede aportar gusto amargo acompañado de una cierta sensación de astringencia (33).

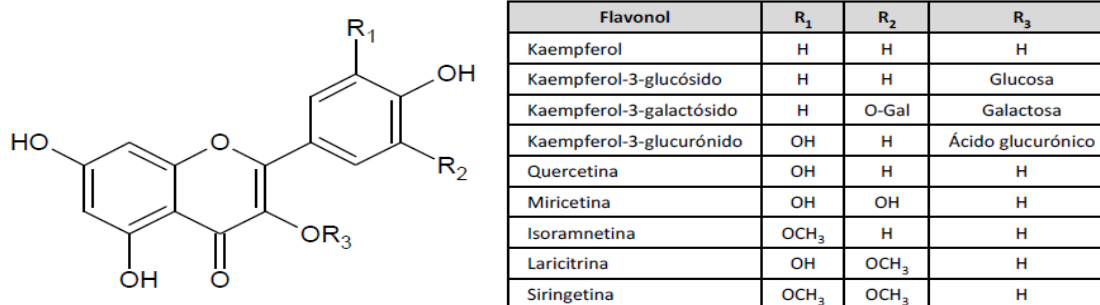


Figura 8. Principales flavonoles presentes en uvas y vinos (17).

4.3.2.3. Antocianinas

Las antocianinas o antocianos son los compuestos fenólicos responsables del color rojo de las uvas y vinos tintos, y se encuentran ubicados principalmente en los hollejos de las bayas, aunque también están presentes en la pulpa de algunas variedades tintoreras (17). Son pigmentos solubles en agua, formados por una aglicona (antocianidina) cuya estructura básica comprende un anillo A (derivado del floriglucinol) unido a un heterociclo C, el cual a su vez se encuentra unido al anillo bencénico B (Figura 9). El anillo C posee una carga positiva situada sobre el átomo de oxígeno, la cual está deslocalizada en todo el heterociclo e incluso en los ciclos adyacentes (A y B). Esta deslocalización es la responsable de la

interacción con la luz y, por lo tanto, del color rojo de la molécula, pero también explica su inestabilidad, ya que dicha carga puede perderse por hidratación. Las antocianinas identificadas en las uvas y vinos de *Vitis vinifera* son los 3-O-monoglucósidos y los 3-O-monoglucósidos acilados de las antocianidinas delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las cuales difieren entre sí en el número y posición de los sustituyentes hidroxilos y metoxilos localizados en el anillo B (Figura 9). La acilación de estos compuestos se produce en el C6 de la molécula de glucosa por medio de la esterificación con los ácidos acético, p-cumárico y cafeico (17).

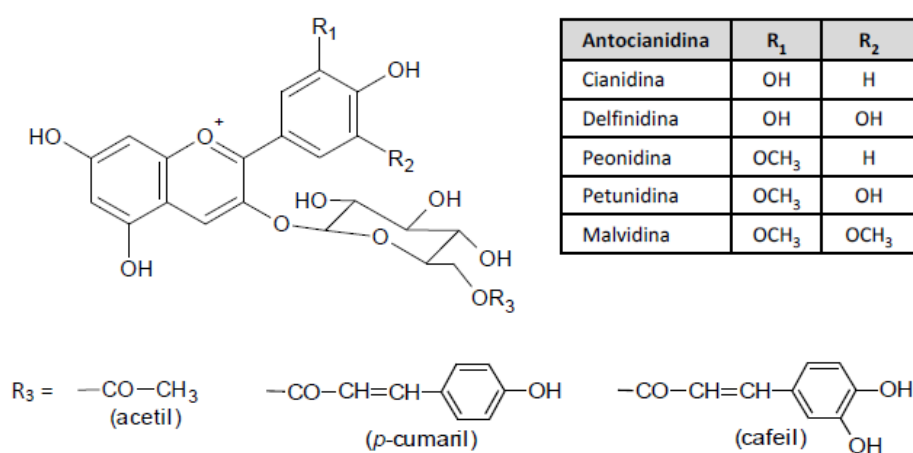


Figura 9. Principales antocianinas presentes en uvas y vinos (17).

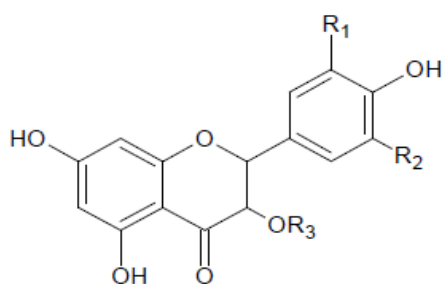
En medio acuoso, la mayoría de las antocianinas naturales coexisten bajo la forma de cuatro estructuras químicas en equilibrio, con características cromáticas particulares dependiendo del pH. Dichas formas son la base quinoidal de color azul, el catión flavilium de color rojo, la pseudo-base carbinol o hemiacetal incolora, y la forma chalcona, también incolora (28). En condiciones muy ácidas (pH < 2), las antocianinas existen principalmente en la forma roja de catión flavilium. A medida que el pH aumenta, el catión flavilium desaparece debido a una rápida desprotonación, generándose las formas quinoidales de color azul. Paralelamente, también se produce la hidratación del catión flavilium dando lugar a la formación de la pseudo-base carbinol incolora. Ambas reacciones ocurren simultáneamente dependiendo de las constantes de equilibrio. Por otro lado, en condiciones levemente ácidas (pH 4 - 5) y temperaturas elevadas, la pseudo-base carbinol puede ser convertida a las formas cis- o trans

chalcona por medio de una reacción rápida de apertura del anillo y de un proceso lento de isomerización. Las chalconas pueden ser neutras e incoloras, o ionizarse y tomar un color levemente amarillo. La reversión a la forma flavilium por disminución del pH se produce más lentamente en el caso del isómero trans comparado con el cis, indicando que el primero puede ser irreversible. En el rango de pH de la mayoría de los vinos tintos (alrededor de 3,5), se puede considerar la existencia de un balance entre las diferentes formas. El catión flavilium de color rojo está presente en un 12,2 %, estando el equilibrio desplazado mayoritariamente hacia la pseudo-base carbinol (45,2 %) y la chalcona (27,6 %), ambas incoloras, y minoritariamente hacia la base quinoidal de color azul (15 %) (17).

Además del factor pH, el color de las soluciones que contienen antocianinas también depende de la estructura y concentración del pigmento, temperatura, presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, oxígeno, azúcares y sus productos de degradación, y dióxido de azufre, entre otros. Durante el proceso de vinificación, las antocianinas participan en reacciones de oxidación, hidrólisis y condensación, generándose importantes cambios en el color del vino (17,28).

4.3.2.4. Dihidroflavonoles

Los dihidroflavonoles o flavanoles desempeñan un rol funcional en las plantas de vid, actuando como mecanismo de defensa ante el ataque de hongos como Botritis y son considerados también compuestos bioactivos capaces de promover efectos fisiológicos benéficos (antioxidantes, antimicrobianos, antibacteriales, hepatoprotectivos y quimiopreventivos, entre otros) en humanos. Según la literatura, son considerados compuestos minoritarios en *Vitis vinifera*. Entre los dihidroflavonoles reportados en uvas y vinos de variedades blancas figuran la astilbina (dihidroquercetina-3-ramnósido) y la engeletina (dihidrokaempferol-3-ramnósido). Mientras que en vinos tintos se han identificado dihidrokaempferol-3-glucósido, dihidromiricetina-3-ramnósido y astilbina (17). En la Figura 10, se observa la estructura química de los principales dihidroflavonoles presentes en uvas y vinos.

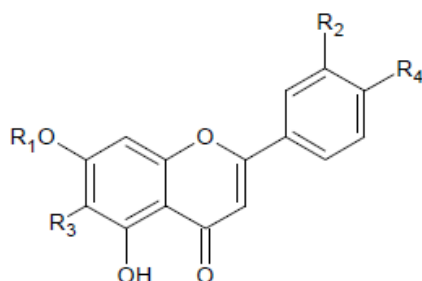


Dihidroflavonol	R ₁	R ₂	R ₃
Dihidrokaempferol	H	H	H
Dihidrokaempferol-3-ramnósido	H	H	Ramnosa
Dihidrokaempferol-3-glucósido	H	H	Glucosa
Dihidroquercetina	OH	H	H
Dihidroquercetina-3-ramnósido	OH	H	Ramnosa
Dihidroquercetina-3-glucósido	OH	H	Glucosa
Dihidromiricetina-3-ramnósido	OH	OH	Ramnosa

Figura 10. Principales dihidroflavonoles presentes en uvas y vinos (17).

4.3.2.5. Flavonas

Estos compuestos constituyen una fracción minoritaria de los fenoles presentes en *Vitis vinifera*. En hojas se han identificado algunos glucósidos de apigenina y luteolina, mientras que otros autores han detectado apigenina, baicaleina y luteolina en vinos (17). La Figura 11, muestra la estructura química de algunas flavonas detectadas en *Vitis vinifera*.



Flavona	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Apigenina	H	H	H	OH
Apigenina-7-O-glucósido	Glucosa	H	H	OH
Luteolina	H	OH	H	OH
Luteolina-7-O-glucósido	Glucosa	OH	H	OH
Baicaleina	H	H	OH	H

Figura 11. Principales flavonas presentes en *Vitis vinifera* (17).

4.4. Métodos de extracción

La extracción es un paso importante en la recuperación de los compuestos fenólicos en residuos agroindustriales. Sin embargo, actualmente no existe un método o un protocolo de extracción estándar, en este sentido el desarrollo de dichos métodos de extracción pueden proporcionar valiosa información para la caracterización de muestras e incluso aumentar el valor económico de estos residuos.

Existen diferentes métodos para la extracción de bioactivos a partir de matrices vegetales, los métodos de extracción realizadas a presión atmosférica, con o sin agitación y temperatura utilizadas de manera general son considerados como método clásicos o convencionales.

Los métodos convencionales, como la extracción sólido-líquido, han sido muy utilizados, pero consumen mucho tiempo y requieren cantidades relativamente grandes de solventes (27,34). Asimismo, debido a las etapas prolongadas de extracción utilizadas por estas técnicas, como por ejemplo empleo de altas temperaturas se produce una pérdida de compuestos fenólicos debido a ionización, hidrólisis y oxidación durante el procedimiento de extracción. Además, factores como el solvente de extracción y la relación muestra/solvente son relevantes para lograr buenas recuperaciones, especialmente teniendo en cuenta la naturaleza polar de dichos compuestos.

En los últimos años se han desarrollado métodos no convencionales, que fueron propuestos con éxito para la extracción de compuestos fenólicos en uva. Estas técnicas se centran principalmente en acortar el tiempo de extracción, reducir el consumo de solventes orgánicos mientras se mantiene o incluso mejora la recuperación de estos compuestos de interés (27).

4.4.1 Extracción convencional (sólido-líquido)

El proceso de extracción de muestras sólidas con solventes (orgánicos) capaces de disolver la muestra, generalmente es conocido como extracción sólido-líquido, en el que se recuperan compuestos solubles mediante difusión desde una matriz sólida hacia una matriz líquida; siendo éste un método muy utilizado en la recuperación de compuestos fenólicos a partir de orujo y otros residuos agroindustriales (35).

Paladino (7) determinó en las extracciones utilizando solventes acuosos-orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (agua, metanol, acetona, etanol) se obtienen extractos con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos. Asimismo, de acuerdo a Fontana et al. (27), la eficiencia del fenómeno de transporte de masa ocurrido durante el proceso de extracción convencional puede optimizarse mediante cambios en las gradientes de

concentración, coeficientes de difusión, tipo de solvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción. Los compuestos fenólicos presentan naturaleza polar, debido a ello, estos son fácilmente solubilizados en medios próticos polares como pueden ser las soluciones hidroalcohólicas.

Diversas investigaciones realizadas sobre la recuperación de compuestos fenólicos en residuos agroindustriales determinaron que la manera más común de extraer estos compuestos es la utilización de soluciones generalmente hidroalcohólicas, aplicando elevadas temperaturas para poder liberar la mayor parte de los compuestos no extraíbles. Se cree que estos compuestos permanecen en el residuo asociados a componentes de la fibra dietética (polisacáridos) o bien formando complejos con proteínas o unidos entre sí formando compuestos de alto peso molecular. La utilización de soluciones hidroalcohólicas, por un lado, permite la liberación de los polifenoles unidos a la matriz vegetal y, por otro lado, permite la despolimerización de compuestos de alto peso molecular a compuestos de estructuras más sencillas, que puedan ser cuantificados en base a patrones conocidos, aunque es posible también que se produzca la degradación de ciertas estructuras de compuestos fenólicos. La mezcla etanol-agua es el solvente comúnmente empleado para la extracción de compuestos bioactivos, siendo el etanol un solvente inocuo (aceptado por la FDA como solvente grado alimenticio) y de fácil manipulación (36).

En la Tabla 1, se presenta una síntesis de algunos estudios bibliográficos sobre el uso de la extracción convencional de compuestos bioactivos. Las investigaciones han demostrado que los compuestos fenólicos pueden extraerse con solventes polares tales como etanol, metanol, agua y combinaciones de estos. Sin embargo, en la literatura no existe un protocolo estandarizado sobre qué solvente es el más eficiente en una determinada matriz. Por lo tanto, la elección del solvente dependerá de un número de factores mencionados anteriormente incluyendo la capacidad del solvente para solubilizar el soluto, temperatura de extracción y tiempo de extracción.

Tabla 1. Algunos estudios bibliográficos sobre la extracción convencional de compuestos bioactivos

VARIABLES DE EXTRACCIÓN	VARIABLES OPTIMIZADAS	MUESTRA	INTERÉS	APLICACIONES	REF.
temperatura / relación sólido-líquido / solvente	solvente etanol / temperatura	caña de vid variedad Pinot noi	trans -resveratrol, trans -ε-viniferin, ácido ferúlico, fenoles totales	analítica	(37)
solvente / temperatura / tiempo	solvente / temperatura / tiempo	grano de trigo entero; salvado de trigo.	actividad antioxidante	analítica	(38)
solvente / temperatura / tiempo	etanol 86,8% a 58,2 °C / tiempo 46,8 min	hojas de Inga edulis	fenoles totales, flavonoides totales, flavonoles totales.	analítica	(39)
solvente / temperatura / tiempo	solvente más eficiente: agua a 90°C ; tiempo de tratamiento 3 horas.	semillas de vid cv. Cabernet Sauvignon	compuestos fenólicos, actividad antioxidante		(7)
temperatura / concentración de etanol / tiempo	temperatura (65 °C), concentración de etanol (40 %), tiempo (80 min)	frutos secos Mengkudu (Morinda citrifolia)	compuestos fenólicos totales , contenido de flavonoides, capacidad antioxidante		(8)
temperatura / tiempo de maceración / solvente	influencia de la temperatura, tiempo y solvente; mayores rendimientos a 60 °C, a 5 h.	orujo de uva	compuestos fenólicos totales, antocianinas totales, taninos, acidos cinámicos, flavonoles y capacidad antioxidante		(40)
temperatura / tiempo / relación sólido-líquido	influencia de temperatura / relación sólido-líquido	subproductos de la industria vitivinícola	compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante	enológico	(41)
solvente / tiempo / ratio sólido-líquido.	influencia del solvente / tiempo / ratio	semillas y cáscaras de Vitis vinifera L. cv. Bou-Ahmar Amar	contenido de fenoles totales		(42)
concentración de etanol / temperatura / tiempo	influencia de concentración etanol / temperatura / tiempo	residuos sólidos de Citrus paradisi L	compuestos fenólicos totales , capacidad antioxidante total		(43)
temperatura / tiempo / relación sólido-líquido	temperatura (57 °C), tiempo (61 min) / relación sólido-líquido (1:8,7 g/ mL).	uva roja	compuestos fenólicos totales, antocianinas totales, contenido de flavonoides totales		(44)

4.4.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Esta técnica emplea ondas sonoras con una frecuencia superior a 20 kHz. En el proceso de extracción mediante la aplicación de ondas de ultrasonido, la vibración se propaga en el medio transportando energía mecánica en forma de rápidas variaciones de presión. El medio de propagación de la onda ultrasónica se somete a una sucesión de compresiones y descompresiones, provocando la formación de burbujas. El ultrasonido provoca modificaciones de la temperatura y de la presión dentro de las burbujas hasta que las mismas alcanzan una dimensión crítica, produciéndose su implosión. Este proceso de compresión, rarefacción y el colapso de las burbujas se denomina cavitación. Los efectos mecánicos del ultrasonido inducen una mayor penetración del solvente en las matrices vegetales y mejoran la transferencia de masa. También pueden causar ruptura de las paredes celulares, facilitan la difusión del solvente y la solubilización de los compuestos encontrados al interior de la célula, facilitando la liberación del contenido celular (45,46).

Existen dos tipos de cavitación: cavitación estable, en la que presenta crecimiento pero no rompimiento de la burbuja, y cavitación transitoria en la que presenta crecimiento e implosión de la burbuja en el medio (47). En la Figura 12, se observa la expansión de las burbujas en un medio líquido, la cual puede inducir presiones negativas y positivas; y una vez formadas, las burbujas crecen y finalmente colapsan, denominándose este efecto como cavitación.

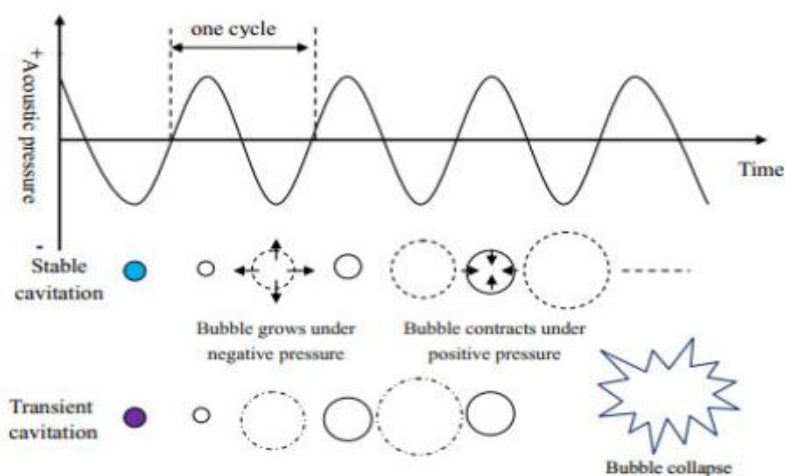


Figura 12. Cavitación producida en el tratamiento ultrasónico (47).

Parámetros que afectan el proceso de EAU:

Los factores principales a tener en cuenta durante la extracción asistida por ultrasonido son las siguientes:

Solvente: La intensidad de las cavitaciones ultrasónicas se ve afectada por la tensión superficial, la viscosidad y la presión de vapor del medio. Los líquidos con baja presión de vapor producen pocas burbujas de cavitación. Sin embargo, líquidos con alta presión de vapor, crean más burbujas, pero estas colapsan con menor intensidad debido a una diferencia de presión interna / externa. Por otra parte, la cavitación se produce más fácilmente en líquidos de baja viscosidad porque la intensidad ultrasónica aplicada puede superar más fácilmente las fuerzas moleculares del líquido. Además, un líquido de baja viscosidad tiene una baja densidad y alta difusividad, y puede difundir fácilmente en los poros de la matriz vegetal. Asimismo, los líquidos que tienen baja tensión superficial requieren menor energía y producen burbujas más fácilmente (48–50).

Temperatura: La aplicación de ultrasonido permite trabajar a temperatura ambiente y presión atmosférica. Por este motivo, el uso de la extracción asistida por ultrasonido es recomendable para compuestos termolábiles, ya que éstos pueden sufrir alteraciones si se los somete a altas condiciones de temperatura. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el ultrasonido genera calor, por lo que se debe controlar la temperatura de extracción (50,51).

Tiempo de Extracción: El fenómeno de cavitación conduce a la intensificación de la transferencia de masa y la interacción entre el disolvente y los tejidos de la planta. El rendimiento de la extracción se incrementa con la duración del ultrasonido; esto es, con el incremento en el tiempo de contacto entre el líquido y el material vegetal sólido (47). Sin embargo, se debe ser cuidadoso con el tiempo de exposición a la sonicación, ya que esta puede dañar la calidad de los compuestos de interés. Este efecto está relacionado con la energía de ultrasonido, la estabilidad de los compuestos y el medio (50).

Características del ultrasonido: En general, la frecuencia de ultrasonido tiene un efecto importante sobre el rendimiento y la cinética de extracción. Sin embargo, estos efectos dependen de la naturaleza del material vegetal a extraer. Por su parte, un aumento en la potencia del ultrasonido genera una mayor recuperación del producto. Una explicación para este efecto es que, cuanto mayor es la amplitud de la onda de ultrasonido que se propaga en el medio, debido al incremento de la potencia, más violentamente colapsan las burbujas. Sin embargo, este aumento en la eficiencia de la extracción no es tan notable, posiblemente debido a que sólo una pequeña fracción de la energía eléctrica del transductor entra en el disolvente de extracción del baño de ultrasonidos. La distribución de las ondas ultrasónicas dentro de un extractor es también un parámetro clave en el diseño del equipo. La intensidad del ultrasonido disminuye abruptamente a medida que aumenta la distancia de la superficie radiante. También la intensidad de ultrasonido es atenuada con un aumento de partículas sólidas (50).

Hay dos dispositivos comunes para la aplicación de ultrasonidos, es decir, unidades de baño y de la sonda. Aunque los baños de ultrasonidos se utilizan más ampliamente, tienen dos principales desventajas que disminuyen sustancialmente la repetibilidad experimental y reproducibilidad: la falta de uniformidad en la distribución de energía de ultrasonidos (sólo una pequeña fracción del volumen total de líquido en la proximidad inmediata de la fuente de ultrasonido experimenta cavitación); y la disminución de la potencia con el tiempo, de modo que la energía suministrada a los baños se desperdicia. Las sondas ultrasónicas tienen la ventaja sobre los baños de ultrasonidos en que centran su energía en una zona localizada de la muestra, proporcionando de esta manera más eficiente la cavitación en el líquido (52).

La extracción asistida por ultrasonido es una alternativa de bajo costo y es más eficiente en comparación con las técnicas de extracción convencional y, en algunos casos, incluso con la extracción usando fluidos supercríticos y la extracción asistida por microondas (52). Del mismo modo muchos estudios han empleado el ultrasonido en la extracción de compuestos de interés como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunos estudios bibliográficos sobre la extracción de compuestos bioactivos usando ultrasonido.

VARIABLES DE EXTRACCIÓN	VARIABLES OPTIMIZADAS	MUESTRA	INTERÉS	APLICACIONES	REF.
temperatura / amplitud / duración del ciclo de ultrasonido / punta de la sonda ultrasónica / tiempo de extracción / relación muestra - solvente / solvente	temperatura (75 °C), amplitud (70%), duración del ciclo de ultrasonidos (0,7 s), punta de la sonda ultrasónica (7 mm de diámetro), tiempo (15 min), relación muestra - solvente (1: 30), etanol (80% v/v)	tallos de uva	estibenoides (trans-resveratrol)	trazabilidad en viñedos	(53)
potencia / temperatura / concentración de etanol	potencia (377,35 W), temperatura (70 °C), y concentración EtOH (58,37%) para FT; potencia (318,28 W), temperatura (59,65 °C), y concentración EtOH (64,43%) para CA, IA, FA.	raíces de C. rizoma	ácido cafeico, ácido isoferulico, ácido ferúlico y fenoles totales		(54)
temperatura / amplitud de salida / ciclo de trabajo / cantidad de muestra / tiempo	Temperatura (75 °C), amplitud de salida (100%), ciclo de trabajo (1 s), cantidad de muestra (1 g), y tiempo (6 min)	uva roja var. Tempranillo	compuestos fenólicos, antocianinas, taninos condensados	enológicas	(55)
frecuencia / densidad de potencia / tiempo	frecuencia (40 kHz), densidad de potencia (150 W/L), tiempo de tratamiento (25 min)	orujo de uva (pieles y semillas) variedad Syrah	fenoles totales, flavonoles totales y capacidad antioxidante		(56)
solvente / temperatura / tiempo	disolvente (etanol 60%), temperatura (75 °C) y tiempo (10 min); empleando la relación muestra-disolvente (1:40); con extracción ultrasónica (200 W; 24 kHz, amplitud 70%, ciclo 0,7s; punta 7 mm de diámetro)	tallos de uva	estilbenos influencia de secado (horno o congelación)		(57)

4.5. Síntesis de nanopartículas usando extractos de plantas:

Las nanopartículas metálicas son agregados aislados de átomos de metales rodeados de una cápsula protectora o estabilizadora que evita su aglomeración, presentan un tamaño entre 1 y 100 nm. De acuerdo a la disminución del tamaño, el radio entre el área de superficie y el

volumen se incrementa en forma muy importante, lo que lleva a modificaciones significativas en sus propiedades ópticas, electrónicas, catalíticas, magnéticas, etc, que difieren significativamente de aquellas presentes a mayor escala (58). Asimismo, dichas propiedades están fuertemente relacionadas con el tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de las nanopartículas (59).

La síntesis de nanopartículas metálicas ha cobrado interés. Hoy en día, debido a sus diversas aplicaciones en el campo tecnológico, médico, medio ambiente, etc. En la actualidad existe una tendencia en la síntesis de nanopartículas metálicas que presenten morfologías uniformes para ser empleadas en diversas aplicaciones. No obstante, la mayoría de los métodos de síntesis son costosos y/o agresivos con el medio ambiente, por lo que se ha incrementado la búsqueda de nuevos procedimientos de síntesis fácilmente escalables, rentables y eco-amigables. Asimismo, se ha reportado en la literatura que los extractos de las plantas pueden actuar como agentes reductores en la síntesis de las partículas metálicas y óxidos metálicos puros en la escala nanométrica con potenciales aplicaciones.

Generalizando, la primera etapa de formación de las dispersiones coloidales metálicas es la nucleación, la cual comienza con la reducción de la sal metálica mediante un reductor adecuado para obtener átomos del metal con un estado de oxidación igual a cero. Los átomos metálicos pueden colisionar con iones metálicos o aglomerados de átomos y formar un núcleo metálico denominado semilla. La segunda etapa consta del crecimiento de estos núcleos, mediante la difusión y la transferencia de masa de los iones o átomos metálicos presentes en la solución hacia la superficie de dichos núcleos, siendo los factores más importantes el gradiente de concentración y la temperatura. Por último, la estabilidad de las dispersiones coloidales depende de la presencia de un agente estabilizante, el cual recubre la superficie de las NPs, evitando su aglomeración (Figura 13). Dependiendo de la naturaleza química de las moléculas estabilizantes, la estabilidad de las dispersiones puede deberse a interacciones electrostáticas o a factores estéricos. La estabilización electrostática implica la repulsión coulombica entre partículas causada por la doble capa eléctrica formada por los iones adsorbidos en la superficie de las NPs (por ejemplo citrato de sodio). En el caso de la estabilización estérica, las moléculas orgánicas (polímeros, surfactantes) actúan como un

escudo protector sobre la superficie de las NPs. Los factores cruciales que se deben considerar durante todo el proceso de la síntesis son la concentración del agente reductor y del estabilizante, la temperatura, el pH y la fuerza iónica, ya que éstos controlarán el tamaño y la forma de las NPs obtenidas (60).

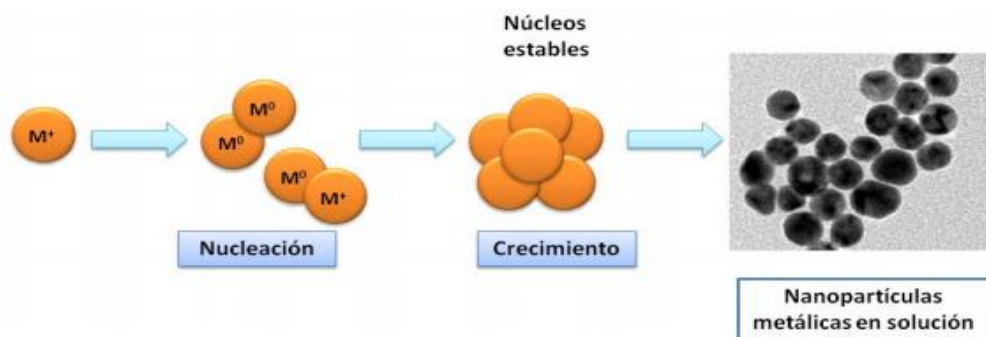


Figura 13. Proceso de formación de nanopartículas metálicas (60).

Actualmente, como un paso más hacia el desarrollo de métodos eco-amigables para la síntesis de nanopartículas, se han hecho intentos de reemplazar partes de plantas con desechos agroindustriales que contienen diferentes compuestos orgánicos. Por ejemplo, la industria vitivinícola produce una gran cantidad de residuos (orujo), dichos residuos son una fuente de varios compuestos orgánicos como los compuestos fenólicos, que pueden actuar como agentes reductores; dándole así a estos residuos un mejor aprovechamiento.

Ismail et al. (61) estudiaron la síntesis de nanopartículas de oro utilizando extractos acuosos de hojas de uva y semillas como una fuente natural de agentes reductores y estabilizantes. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por espectros UV-visible, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos X (XRD), los cuales mostraron que las nanopartículas sintetizadas tuvieron diversas formas y tamaños, asimismo reportaron que a medida que aumenta la concentración del extracto, el tamaño de las partículas disminuye.

Xu et al. (62) estudiaron la síntesis de nanopartículas por reducción de iones de plata en nanopartículas de plata en presencia de extracto de semillas de uva. Dichas nanopartículas

presentaron formas esféricas y poligonales con un diámetro de 25 – 35 nm y mostraron una actividad antibacteriana eficaz contra bacterias gram negativas y gram positivas. La síntesis resultó de un solo paso, estable y amigable con el medio ambiente.

Krishnaswamy et al. (63) reportaron el uso potencial de residuos de agroindustriales como la piel de la uva, el tallo y las semillas empleados como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de oro, los resultados mostraron que el crecimiento de las nanopartículas fue instantáneo en 5 minutos y altamente estabilizado, presentando una morfología esférica con un tamaño promedio de 20 a 25 nm. Asimismo, los resultados de este estudio mostraron que la síntesis de nanopartículas de oro fue influenciada por los compuestos fenólicos presentes en la semilla de uva, la piel y el tallo. Además en el estudio se resalta el aprovechamiento de estos residuos ricos en compuestos fenólicos que pueden convertirse potencialmente en un nanoproducto de alto valor.

Zia et al. (64) reportaron que en la síntesis de nanopartículas de Ag utilizaron como agentes reductores y de recubrimiento; extractos de jugos de tomate y uva, las nanopartículas que resultaron de este estudio se caracterizaron mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, técnicas espectroscópicas UV-visible y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, lo cual mostró que las nanopartículas sintetizadas registraron un tamaño promedio de 10 a 30 nm. Asimismo, las nanopartículas mostraron una buena actividad antibacteriana y además presentaron actividad anticancerígena en la inhibición de la proteína quinasa.

Farhadi et al. (65) reportaron que el extracto de fruta de uva es un agente reductor muy eficiente en la síntesis de nanopartículas de Ag, con un tamaño promedio de 25 - 85 nm y morfologías esféricas. Sin embargo, la síntesis se vio afectada por la variación en las condiciones del tiempo, temperatura, concentración de extracto de fruta de uva, concentración de precursor y pH. No obstante, las nanopartículas de Ag formadas fueron bastante estables, asimismo mostraron una mejor actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas que a gram negativas, y a su vez mostraron una buena actividad catalítica en la reducción de algunos compuestos aromáticos nitroderivados.

La síntesis de nanopartículas metálicas utilizando residuos agroindustriales, como el de la industria vitivinícola (orujo), es una alternativa que está emergiendo en la síntesis química. Presentan varias ventajas como la posibilidad de controlar el tamaño de las nanopartículas variando la concentración de extracto vegetal empleado sin necesidad de usar agentes surfactantes y/o estabilizantes (61,63). Asimismo se ajusta a un enfoque más rentable, no hay generación de residuos tóxicos, siendo una ruta sintética eco-amigable. Sin embargo, muy pocos estudios se han realizado hasta ahora sobre este tema. En este estudio se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de oro y plata utilizando extractos de cáscara de uva para la reducción de sus sales metálicas.



5. METODOLOGÍA

5.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1. REACTIVOS

- Ácido gálico anhidro, Merck, pureza ≥ 98.0 %.
- (-)-Epicatequina, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 90.0 %.
- Quercetina-3-b-glucósido, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 90.0 %.
- (+)-Catequina, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99.0 %.
- Resveratrol, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99.0 %.
- Folin – Ciocalteu, N.R.109001 Merck.
- Etanol, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99 %.
- Metanol, Sigma-Aldrich, pureza 99,8 % (HPLC).
- Acetonitrilo, Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99,9$ % (HPLC).
- Carbonato de sodio, Na_2CO_3 , J.T. Backer.
- Ácido acético, JT Backer.
- Éter de petróleo, JT Backer.
- Acetato de etilo, JT Backer.
- Eter de etilo, JT Backer.
- Solución patrón de oro, Merck, pureza 1000 ppm de Au.
- Solución estándar nitrato de plata, Merck, pureza 1000 ppm de Ag.
- Ácido sulfúrico JT Backer.
- Agua tipo I.

5.1.2. MATERIALES

- Columna: Phenomenex C-18 empacada (4,6 X 250 mm, 5 μm . Merck), con pre-columna Phenomenex C-18.
- Filtro nylon 0.45 μ .
- Viales de vidrio con septo de 1.5 mL.
- Micropipeta transferpette BRND704780, 100-1000 μL .

- Bureta 25, 50 mL.
- Beaker 10, 25, 50 100, 250 mL.
- Crisoles.
- Pinzas metálicas.
- Soporte universal.

5.1.3. EQUIPOS

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent 1260, DAD, bomba, automuestreador, detector UV-visible, software Chem station. Ubicado en el Laboratorio de Instrumentación de la Sección Química de la PUCP.
- Espectrofotómetro Uv-visible Agilent 8453. Ubicado en el Laboratorio de Instrumentación de la Sección Química de la PUCP.
- Baño maría con agitación GFL modelo 1083. Ubicado en el Laboratorio N°. 111 de la Sección Química de la PUCP.
- Sonda ultrasónica Hielscher UP200Ht. Ubicada en el Laboratorio N°. 111 de la Sección Química de la PUCP.
- Balanza analítica de 4 dígitos, Ohaus. Ubicada en el Laboratorio N°. 111 de la Sección Química de la PUCP.
- Centrifuga 5804 eppendorf. Ubicada en el Laboratorio de Análisis Químico y Medio Ambiente de la Sección de Ingeniería de Minas.
- Horno mufla. Ubicado en el Laboratorio de Análisis Químico y Medio Ambiente de la Sección de Ingeniería de Minas.
- Estufa. Ubicada en el Laboratorio de Análisis Químico y Medio Ambiente de la Sección de Ingeniería de Minas.

5.2. MUESTRA:

Se emplearon cáscaras de vid variedad Quebranta, procedentes de la vinificación realizada en el Centro de Innovación Tecnológica Agroindustrial, ubicada en la Panamericana Sur Km 293.3; distrito Salas Guadalupe, Ica, Perú, con fecha de cosecha marzo 2017. Las vides que

originaron estas uvas fueron cultivadas en el viñedo situado en el mismo centro antes mencionado.

Después del proceso de vinificación, el mosto se prensó y se tomaron las muestras de orujo fresco, cabe mencionar que los orujos recolectados no fueron sometidos a los procesos de maceración ni fermentación alcohólica. Las muestras fueron colocadas en un cooler, enfriadas con hielo durante su transporte hacia el laboratorio. Los orujos recepcionados fueron almacenados en envases herméticamente cerrados protegidos de la luz, los cuales fueron refrigerados.

5.2.1. Matriz:

Se separaron manualmente las cáscaras de uva del orujo, las cuales fueron secadas a 50 °C hasta peso constante (66), luego fueron pulverizadas hasta un tamaño de partícula de 180 - 215 micras, posteriormente fueron almacenadas en oscuridad en un desecador hasta sus posteriores análisis.

5.2.2. Interferencia de lípidos en la determinación de compuestos fenólicos totales:

Con el objetivo de reducir el uso del solvente orgánico éter de petróleo, se evaluó la probabilidad de la existencia de interferencias lipídicas en el método Folin Ciocalteu adaptado (67). En tal sentido, se procedió al análisis de la comparación de las muestras desgrasadas y sin desgrasar, el proceso de remoción de las sustancias liposolubles se realizó empleando éter de petróleo, la proporción empleada fue de 50 mL de éter de petróleo por cada 10 g de muestra, posteriormente se sometió a agitación 200 rpm por 1 hora a temperatura ambiente, se procedió a filtrar, la muestra desengrasada fue secada al aire a temperatura ambiente. Los compuestos fenólicos totales, se extrajeron usando etanol:agua (1:1), a 30°C en agitación constante (120 rpm) durante 4 horas. La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó siguiendo el método de Folin Ciocalteu, empleando ácido gálico como estándar, cuya expresión equivalente es de mg GAE/g de muestra seca.

5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:

5.3.1. Extracción convencional (sólido líquido):

Para la extracción convencional, se utilizó el diseño experimental de un solo factor, en el cual se estudiaron tres variables independientes: sistema binario etanol:agua, tiempo de tratamiento y temperatura de extracción en función a la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (variable dependiente). Las condiciones de extracción fueron seleccionadas de acuerdo a estudios previos (25,65,67,68). Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

5.3.1.1 Selección del solvente:

En la extracción de los compuestos fenólicos, se empleó la relación de muestra-solvente 1:10, se empleó el solvente binario etanol-agua, en el que se varió el porcentaje de concentración de etanol de 10 en 10 en el rango de 0 % a 80 %. Se realizó el análisis a 30°C durante 4 horas (240 minutos) (Tabla 3). La mejor concentración de etanol fue seleccionada en función al contenido de compuestos fenólicos totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu empleando ácido gálico como estándar. La expresión de la concentración es mg GAE/g de muestra seca.

Tabla 3. Sistema de solvente utilizados para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de vid.

Parámetro	Relación de muestra (g/mL)	% Solvente binario (v/v)	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
Selección del solvente	1:10	EtOH 0%	30	4
	1:10	EtOH 10%	30	4
	1:10	EtOH 20%	30	4
	1:10	EtOH 30%	30	4
	1:10	EtOH 40%	30	4
	1:10	EtOH 50%	30	4
	1:10	EtOH 60%	30	4
	1:10	EtOH 70%	30	4
	1:10	EtOH 80%	30	4

5.3.1.2 Selección de la temperatura de extracción:

El estudio se realizó empleando diferentes temperaturas en un rango de 30 °C a 90 °C, incrementando de 10 en 10. La relación de la muestra-solvente fue de 1:10, se utilizó la mejor concentración de etanol (50 % v/v) estudiada anteriormente y se empleó el tiempo de tratamiento de 4 horas (240 minutos) (Tabla 4). La concentración de los compuestos fenólicos totales fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu empleando ácido gálico como estándar. La expresión de la concentración es mg GAE/g de materia seca.

Tabla 4. Condiciones de temperatura utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de vid.

Parámetro	Relación de muestra (g/mL)	% Solvente binario (v/v)	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
Selección de la temperatura	1:10	EtOH 50%	30	4
	1:10	EtOH 50%	40	4
	1:10	EtOH 50%	50	4
	1:10	EtOH 50%	60	4
	1:10	EtOH 50%	70	4
	1:10	EtOH 50%	80	4
	1:10	EtOH 50%	90	4

5.3.1.3 Selección del tiempo de extracción:

Los compuestos fenólicos se extrajeron empleando etanol y temperatura de tratamiento de 50 % (v/v) y 80 °C, respectivamente, los cuales fueron evaluados y seleccionados previamente; la relación de muestra-solvente fue de 1:10, se tomaron alícuotas cada 20 minutos durante 5 horas (300 minutos) (Tabla 5). La concentración de los compuestos fenólicos totales fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu y expresada como mg GAE/g de muestra seca.

Tabla 5. Condiciones de tiempo utilizados para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de vid.

Parámetro	Relación de muestra (g/mL)	% Solvente (v/v)	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
Tiempo	1:10	EtOH 50%	80	5*

*Toma de alícuotas cada 20 minutos.

5.3.1.1 Optimización de las condiciones de extracción convencional

La metodología de superficie en respuesta fue introducida por Box y Wilson en 1951 y desarrollada por Box y Hunter 1987 (70,71). Esta metodología se basa en el análisis estadístico de regresión de un modelo óptimo minimizando la variación de los residuales. Por lo tanto, en el presente trabajo, con la finalidad de ver los efectos de los distintos parámetros seleccionados en la extracción convencional de los compuestos fenólicos totales, se elaboró un diseño experimental a través de Box-Behnken. Se evaluaron tres niveles de cada factor: solvente binario (mínimo Etanol 45 % y máximo Etanol 55 %), tiempo de extracción (mínimo 160 minutos y máximo 200 minutos) y temperatura de tratamiento (mínimo 75 °C y máximo 85 °C). En el diseño, los valores de las variables experimentales fueron codificadas y representadas como -1, 0 ó +1, dependiendo de la distancia relativa con el valor central. Para expresar las variables experimentales % solvente, tiempo y temperatura en variables codificadas tipo xi, se empleó la siguiente relación, el valor de la variable original (parámetro seleccionado), es el promedio entre el máximo y mínimo, y Δ es el valor medio entre la diferencia de los valores máximo y mínimo.

Los valores centrales que se obtuvieron para los parámetros de Solvente, Tiempo y Temperatura fueron 50 %, 180 minutos y 80 °C, respectivamente. Asimismo se asignaron los valores -1, 0 ó +1 dependiendo si los valores eran menores, iguales o mayores al punto central, como se muestra en la Tabla 6. Quince combinaciones de 5 bloques fueron seleccionadas en orden aleatorio de acuerdo con un diseño Box-Behnken, la correlación entre las variables independientes y la variable dependiente (compuestos fenólicos totales mg GAE/g) fue expresada en función a la expresión de un polinomio de segundo orden.

Tabla 6. Niveles de tratamiento y variables independientes utilizadas en la extracción convencional de compuestos fenólicos totales.

	Codificación	Variables independiente	Niveles		
			(-1)	(0)	(1)
Extracción convencional	x ₁	% Solvente (v/v)	45	50	55
	x ₂	Tiempo (min)	160	180	200
	x ₃	Temperatura (°C)	75	80	85

En el Anexo 3.11, se muestran los 75 experimentos que resultaron de la matriz utilizada en el diseño experimental. Las variables codificadas fueron x₁ para el porcentaje de solvente, x₂ para el tiempo y x₃ para la temperatura. Los resultados fueron expresados en función a la determinación de los compuestos fenólicos totales (mg GAE/g de muestra seca) y fueron analizados mediante la Metodología de Superficie de Respuesta, que es un conjunto de técnicas matemáticas con pruebas estadísticas empleadas para modelar y analizar con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de operación de un sistema. En este estudio, los resultados obtenidos de los distintos experimentos del diseño se analizaron y optimizaron empleando el programa StatGraphics Centurion XV.

5.3.2. Extracción asistida por ultrasonido:

En la extracción asistida por ultrasonido, para establecer los parámetros de trabajo se realizaron pruebas preliminares de diagnóstico (55,72) se utilizó el diseño experimental de un solo factor, en el cual se estudiaron dos variables independientes: amplitud (%) y tiempo de tratamiento en función al contenido de compuestos fenólicos totales (variable dependiente). Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

5.3.2.1 Selección de la amplitud:

Los compuestos fenólicos, se extrajeron empleando el parámetro optimizado de concentración de etanol (EtOH 47 %) analizado previamente. En el análisis se evaluaron los porcentajes de amplitud en un rango que va de 20 % a 90 %, incrementándose de 10 en 10,

la relación de muestra-solvente fue de 1:10, con un tiempo de tratamiento de 10 minutos. Se realizó el análisis para cada muestra por cuadruplicado a temperatura ambiente, como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones experimentales utilizadas para la evaluación del % de amplitud

Parámetro	Relación de muestra (g/mL)	% Solvente binario (v/v)	Temperatura (°C)	Amplitud (%)	Tiempo (min)
Selección de la amplitud	1:10	EtOH 47%	25	20	10
	1:10	EtOH 47%	25	30	10
	1:10	EtOH 47%	25	40	10
	1:10	EtOH 47%	25	50	10
	1:10	EtOH 47%	25	60	10
	1:10	EtOH 47%	25	70	10
	1:10	EtOH 47%	25	80	10
	1:10	EtOH 47%	25	90	10

5.3.2.2 Selección del tiempo de irradiación:

Los compuestos fenólicos se extrajeron empleando el parámetro optimizado de concentración de solvente (EtOH 47 %). Asimismo, se empleó el porcentaje de amplitud seleccionado previamente (50 %). Se procedió a tomar alícuotas en los tiempos de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos (Tabla 8). La extracción se realizó por cuadruplicado. La concentración de los compuestos fenólicos totales fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu. La expresión de la concentración es mg GAE/g de muestra seca.

Tabla 8. Condiciones experimentales utilizadas para la evaluación del tiempo de irradiación

Parámetro	Relación de muestra (g/mL)	% Solvente binario (v/v)	Temperatura (°C)	Amplitud (%)	Tiempo (min)
Selección del tiempo	1:10	EtOH 47%	25	50	5
	1:10	EtOH 47%	25	50	10
	1:10	EtOH 47%	25	50	15
	1:10	EtOH 47%	25	50	20
	1:10	EtOH 47%	25	50	30
	1:10	EtOH 47%	25	50	40

5.3.2.3 Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos totales por MSR:

Esta metodología se basa en el análisis estadístico de regresión de un modelo óptimo minimizando la variación de los residuales. Por lo tanto, con la finalidad de ver los efectos de los distintos parámetros seleccionados en la extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos totales, se empleó un diseño factorial 2^3 con 3 puntos centrales. Los parámetros a evaluar fueron amplitud (mínimo 50 % y máximo 90 %), ciclos de trabajo (mínimo 0.2 s y máximo 1.0 s) y tiempos de tratamiento (mínimo 5 minutos y máximo 15 minutos)

En el diseño, los valores de las variables experimentales fueron codificadas y representadas como -1, 0 y +1, dependiendo de la distancia relativa con el valor central. Para expresar las variables experimentales amplitud, ciclo de trabajo y tiempo en variables codificadas tipo x_i , se empleó la siguiente relación, el valor de la variable original (parámetro seleccionado), es el promedio entre el máximo y mínimo, y Δ es el valor medio entre la diferencia de los valores máximo y mínimo.

Los valores centrales que se obtuvieron para Amplitud, Ciclo de trabajo y Tiempo, fueron 70 %, 0.6 y 10 minutos, respectivamente. Asimismo se asignaron los valores -1, 0 ó +1 dependiendo si los valores eran menores, iguales o mayores al punto central, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Variables codificadas del diseño experimental empleando extracción asistida por ultrasonido

	Codificación	Variables independiente	Niveles		
			(-1)	(0)	(1)
Extracción asistida por ultrasonido	x_1	Amplitud (%)	50	70	90
	x_2	Ciclo de trabajo (s)	0.2	0.6	1.0
	x_3	Tiempo (min)	5	10	15

En el Anexo 4.7, se muestran los 75 experimentos que resultaron de la matriz utilizada en el diseño experimental. Las variables codificadas fueron x_1 para el porcentaje de amplitud, x_2

para el ciclo de trabajo y x_3 para el tiempo. Los resultados fueron expresados en función a los compuestos fenólicos totales (mg GAE/g de muestra seca) y fueron analizados mediante la Metodología de Superficie de Respuesta, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas del sistema de extracción. En este estudio, los resultados obtenidos de los distintos experimentos del diseño se analizaron y optimizaron empleando el programa StatGraphics Centurion XV.

5.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS :

5.4.1. Determinación de compuestos fenólicos totales:

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos se determinó según el procedimiento adaptado de Folin-Ciocalteu (67).

A 500 μ L de extracto crudo diluido se adicionó 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 10 veces). Después de 3 minutos, se agregó 2.0 mL de solución de carbonato de sodio 7,5 %, luego se homogenizó. Las muestras se incubaron a 45°C por 15 minutos para estabilizar la reacción y se procedió a medir la absorbancia a 765 nm, empleando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico frente a un blanco preparado a las mismas condiciones.

Curva de calibración: Las mediciones se calibraron con solución estándar de ácido gálico con concentraciones de 20 - 220 mg/L. Se utilizó 500 μ L de cada solución y se procedió de igual modo que con una muestra en análisis. Los análisis se realizaron por cuadruplicado, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación tipo $y = b + (m * C)$. Donde “b” corresponde a la intersección de la recta en el eje de ordenadas, “m” es la pendiente de la recta, “y” corresponde a la señal de la densidad óptica a 765 nm y C corresponde a la concentración del ácido gálico mg/L.

5.4.2. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular:

La metodología se adaptó de acuerdo con las condiciones descritas en la literatura (73,74). Los extractos se obtuvieron usando las condiciones optimizadas. 5 mL del extracto fue

extraído tres veces con 4 mL de éter etílico y tres veces con 4 mL de acetato de etilo. Se recolectaron tanto las fracciones orgánicas de éter etílico, acetato de etilo como las fracciones acuosas, seguidamente las fracciones por separado se evaporaron hasta sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno suave a 25°C. El residuo sólido se disolvió con 2 mL de metanol/agua (1:1) y se filtró a través de una membrana de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro. Luego se inyectó 30 µL del filtrado en el sistema HPLC-DAD, empleando una columna Phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm) con una pre-columna Phenomenex C18. Se empleó un sistema en gradiente para la elución: fase móvil A (agua/ ácido acético, 98: 2, v/v) y fase móvil B (acetonitrilo /agua /ácido acético, 78:20:2, v/v/v). El perfil de gradiente se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Perfil de gradiente del sistema cromatográfico.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A	Fase móvil B	Flujo
0	90	10	1.1 mL/min
3	90	10	1.1 mL/min
6	85	15	1.3 mL/min
9	85	15	1.3 mL/min
55	20	80	1.0 mL/min
70	10	90	1.2 mL/min
90	10	90	1.2 mL/min
95	90	10	1.1 mL/min
100	90	10	1.1 mL/min

Fase móvil A: agua/ácido acético, 98:2 (v/v).

Fase móvil B: acetonitrilo /agua /ácido acético, 78:20:2 (v/v/v).

La elución de los picos fue monitoreada a 280 nm para epicatequina, ácido gálico, (-)-catequina y resveratrol, y a 250 nm para quercetina-3-b-glucósido. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de sus espectros y tiempos de retención con los respectivos estándares. Para la cuantificación se prepararon soluciones de estándares de epicatequina (24 - 380 µg/mL), ácido gálico (1- 200 µg/mL), quercetina-3-b-glucósido (10 - 150 µg/mL), (+)-catequina (5 - 500 µg/mL) y resveratrol (1 - 500 µg/mL). Dichas soluciones estándar se inyectaron en las mismas condiciones que para las muestras analizadas. La

cuantificación se obtuvo mediante interpolación en las curvas de calibración realizadas con los patrones ($R^2 \geq 0,98$).

5.5. SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS USANDO EXTRACTOS

5.5.1 Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs):

Siguiendo la metodología modificada de Krishnaswamy et al. (63), por cada 5 mL del extracto previamente estudiado sin filtración y con filtración mediante carbón activo granular, se añadió gota a gota a 12 mL de la solución de HAuCl_4 2.5 mM; luego se añadió agua hasta completar un volumen total de 60 mL. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación de 150 rpm durante 2 horas. La solución se dejó reposar por 48 horas, después la solución fue centrifugada a 5000 rpm por 8 minutos, el precipitado se lavó con agua ultrapura por triplicado, se secó a 80 °C por 24 horas. Luego el precipitado fue transferido a un crisol, se calcinó con ácido sulfúrico en una plancha a 150°C hasta que no se desprendían humos y posteriormente fue llevado a la mufla a 600 °C durante 1 hora. Como resultado se obtuvieron nanopartículas libres de materia orgánica, las cuales fueron almacenadas en un desecador para su posterior caracterización.

5.5.2 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs):

Siguiendo la metodología modificada de Roy et al. (75), por cada 1 mL del extracto previamente estudiado, sin filtración y con filtración mediante carbón activo granular, se añadió gota a gota a 1 mL de AgNO_3 7 mM. La reacción se llevó a temperatura ambiente con agitación 150 rpm durante 2 horas. La solución se dejó reposar por 48 horas, después fue centrifugada a 5 000 rpm por 8 minutos. El precipitado se lavó tres veces y se secó a 80 °C por 24 horas. Luego el precipitado fue transferido a un crisol, se calcinó con ácido sulfúrico en una plancha a 150°C hasta que no se desprendían humos y posteriormente fue llevado a la mufla a 600 °C durante 1 hora. Como resultado se obtuvieron nanopartículas libres de materia orgánica, las cuales fueron almacenadas en un desecador y protegidas de la luz, para su posterior caracterización.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos fueron sometidos a tratamientos estadísticos como t-Student y ANOVA, con la finalidad de contrastar si existen diferencias entre las medias de los niveles de las variables (factores) verificándose previamente que los datos cumplan con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza. Los datos fueron procesados usando los programas de IBM SPSS statistics 22.0 y Statgraphics Centurion XV.

7. RESULTADOS

7.1. Calibración del método

Se calibró el método para la determinación de compuestos fenólicos totales haciendo uso de la metodología adaptada (67) empleando ácido gálico como patrón. En la Tabla 11, se muestran los valores de la densidad óptica (DO) a 765 nm correspondientes a las diferentes concentraciones de ácido gálico (mg/L).

Tabla 11. Curva de calibración del método de Folin Ciocalteu.

Ácido gálico (mg/L)	Densidad óptica 765 nm *
20.2	0.0862 ± 0.0005
60.2	0.3691 ± 0.0063
100.2	0.8867 ± 0.0085
140.2	1.2392 ± 0.0109
180.2	1.6171 ± 0.0028
220.2	1.9591 ± 0.0192

(*)Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

Los datos de la Tabla 11 fueron sometidos a una regresión lineal simple, con la finalidad de obtener una curva de calibración para el método y la ecuación que asocia a las dos variables en estudio. El análisis de regresión lineal nos permite obtener una función lineal que relaciona una variable dependiente Y (DO 765 nm) con una variable independiente X (ácido gálico

mg/L). El coeficiente de determinación R^2 indica el grado de correlación entre las dos variables. Del análisis se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0.010 x - 0.13$, con $R^2=0.99.57$. Esto significa que el 99.57% de la variabilidad de la concentración puede ser explicada por la variable densidad óptica a 765 nm. En la Figura 13, se observa la representación de la curva de calibración.

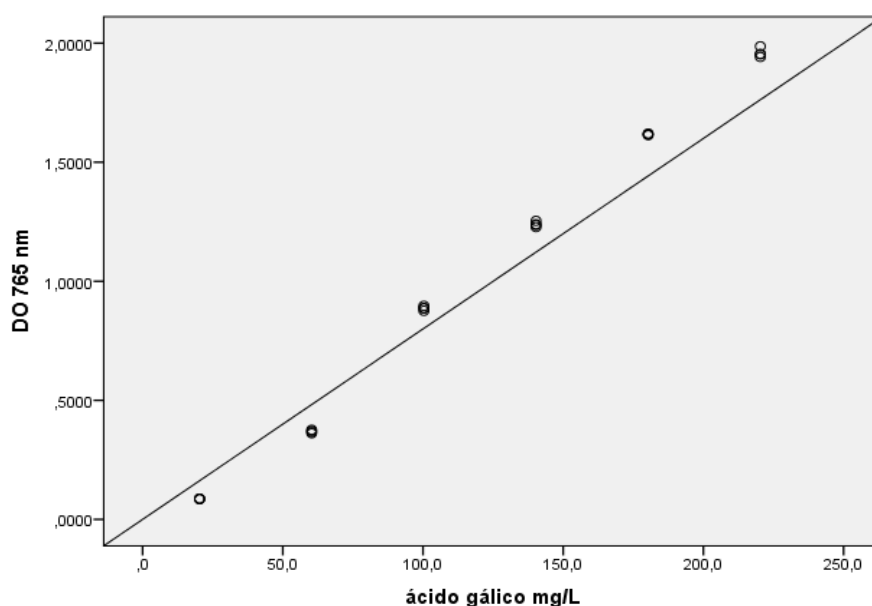


Figura 14. Curva de calibración para el método Folin Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos totales.

En la determinación de los compuestos fenólicos totales, las concentraciones se expresan de acuerdo a la calibración del método en mg de ácido gálico/L de extracto o mg GAE/L de extracto. En el estudio, se empleó una relación de muestra 1:10 (1 g de cáscara de uva seca en 10 mL de solvente de extracción); por lo tanto en 10 mL de extracto hay 1 g de muestra, entonces en 1000 mL hay 100 g de muestra seca; siendo la expresión mg/L equivalente a mg/100 g de muestra, cuya expresión simplificada equivale a mg GAE/g de muestra seca.

7.2. Influencia de lípidos en la determinación de compuestos fenólicos:

Con el objetivo de reducir el uso del solvente orgánico éter de petróleo y a su vez para evitar posibles interferencias en la determinación de los compuestos fenólicos totales, se procedió

a la cuantificación de dichos compuestos en muestras desgrasadas y sin desgrasar (Tabla 12). Las determinaciones de los compuestos fenólicos totales se realizaron empleando el método espectrofotométrico. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de t-Student para muestras independientes, verificándose previamente que los datos tengan una distribución normal y la homogeneidad de varianzas.

Tabla 12. Comparación de muestras desgrasadas y sin desgrasar en la determinación de compuestos fenólicos totales

Tratamientos	DO a 765 nm *
Muestra desgrasada (D)	11.6483 ± 0.6182
Muestra sin desgrasar (SD)	12.5489 ± 0.5907

(*)Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

Los resultados obtenidos cumplieron con los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). De acuerdo a la prueba t-Student (Tabla 13), se observa que el valor de P es mayor a 0.05, lo cual nos indica que no existen diferencias significativas en la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en muestras desgrasadas y sin desgrasar a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 13. Resultado de la prueba t-Student para muestras independientes en la comparación de muestras desgrasadas y sin desgrasar

		Prueba de Levene		Prueba t para la igualdad de medias				
		F	Sig.	T	gl	Sig.	Dif. de medias	Dif. de error estándar
Compuestos fenólico totales mg GAE/g	Se asumen varianzas iguales	0.40	0.548	-2.106	6	0.080	-0.901	0.42752
	No se asumen varianzas iguales			-2.106	5.98	0.080	-0.901	0.42752

7.3. Extracción convencional:

7.3.1. Selección del solvente:

Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante el uso de una mezcla binaria de etanol-agua, ajustando la composición de etanol a partir de 0% (v/v) hasta 80% (v/v). La determinación de los compuestos fenólicos totales se realizó por el método espectrofotométrico. En la Tabla 14, se muestra los resultados.

Tabla 14. Solvente binario en la determinación de compuestos fenólicos totales

Solvente	Concentración* (mg GAE/g de muestra seca)
EtOH 0%	5.5000 ±0.1212 a
EtOH 10%	7.2763 ±0.0482 b
EtOH 20%	9.5804±0.2169 c
EtOH 30%	11.1663 ±0.2575 e
EtOH 40%	11.0034 ±0.5310 d, e
EtOH 50%	12.5654 ±0.6179 f
EtOH 60%	12.0368 ±0.2452 f
EtOH 70%	10.4390 ±0.3426 c
EtOH 80%	9.3411 ±0.2688 d

(*) Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

(*) Los valores seguidos por letras diferentes representan diferencias estadísticas.

Los datos obtenidos cumplieron con el supuesto de normalidad y de homocedasticidad de varianza, por lo tanto se procede al análisis de varianza (ANOVA). De acuerdo a la comparación de medias mediante ANOVA (Tabla 15), el valor de P menor a 0.05, permite afirmar que existe una diferencia estadísticamente significativa debido a la composición del solvente en la extracción de compuestos fenólico totales con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 15. Tabla ANOVA de la comparación del solvente binario en la extracción de compuestos fenólicos totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	165.744	8	20.718	178.63	0.0000
Intra grupos	3.13151	27	0.115982		
Total (Corr.)	168.876	35			

Ante la existencia de estas diferencias estadísticamente significativas, se procede a realizar un análisis de comparaciones múltiples haciendo uso del test de Tukey –b, con la finalidad de profundizar más en las diferencias existentes debidas a la composición del solvente en la extracción de compuestos fenólicos totales. Los resultados se observan en la Tabla 16.

Tabla 16. Comparaciones múltiples test de Tukey B^a para diferente composición de solvente en la extracción de compuestos fenólicos totales.

Solvente binario	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
EtOH 0 %	4	5.499984					
EtOH 10 %	4		7.276334				
EtOH 80 %	4			9.341075			
EtOH 20 %	4			9.580423			
EtOH 70 %	4				10.438991		
EtOH 40 %	4				11.003392	11.003392	
EtOH 30 %	4					11.166268	
EtOH 60 %	4						12.036810
EtOH 50 %	4						12.565424

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000

En Figura 15, se observa que EtOH 50 % y EtOH 60 % presentan una mayor concentración de compuestos fenólicos totales con respecto a las demás composiciones de etanol. Se selecciona al solvente binario EtOH 50 % como parámetro para las posteriores extracciones.

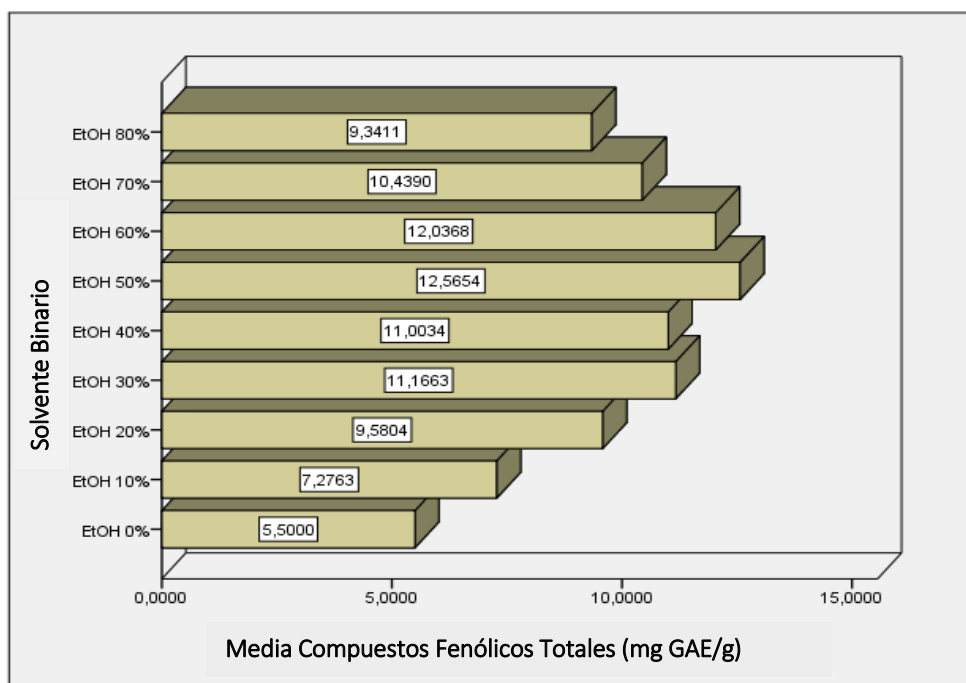


Figura 15. Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales según la composición del solvente binario.

7.3.2. Selección de la temperatura de extracción:

Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante el uso del solvente binario EtOH 50 %, previamente evaluado a diferentes temperaturas. La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó por el método espectrofotométrico, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 17.

Tabla 17. Tratamiento de temperaturas en la determinación de compuestos fenólicos totales

Temperatura (°C)	Concentración (mg GAE/g de muestra seca)*
30	10.9427±1.6843
40	10.7835±1.6843
50	11.9867±1.6843
60	13.4635±1.6843
70	16.2804±1.6843
80	18.2567±1.6843
90	19.7694±1.6843

(*) Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

Teniendo en cuenta que los datos obtenidos no presentaban una distribución normal, se procedió a su respectiva normalización obteniendo los correspondientes valores tipificados. De acuerdo a la comparación de medias mediante ANOVA (Tabla 18), se observa que el valor de P es menor a 0.05, con lo cual se afirma que existen diferencias significativas en el tratamiento de temperaturas para la extracción de compuestos fenólicos totales con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 18 . Tabla ANOVA para comparación de las temperaturas de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	315.625	6	52.6041	48.55	0.0000
Intra grupos	22.7548	21	1.08356		
Total (Corr.)	338.38	27			

En la Figura 16, se observa que a medida que se incrementa la temperatura existe un aumento en la cantidad extraída de compuestos fenólicos totales, obteniéndose una mayor recuperación a la temperatura de 90°C. Asimismo de acuerdo a la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher LSD (Anexo 3.4), se observa que las temperaturas de extracción de 80 °C y 90 °C no presentan diferencias significativas entre ellas. Por lo tanto, para evitar la degradación de los compuestos fenólicos termosensibles se elige la temperatura de tratamiento de 80 °C, con lo cual también se reduce el uso de energía en el tratamiento térmico.

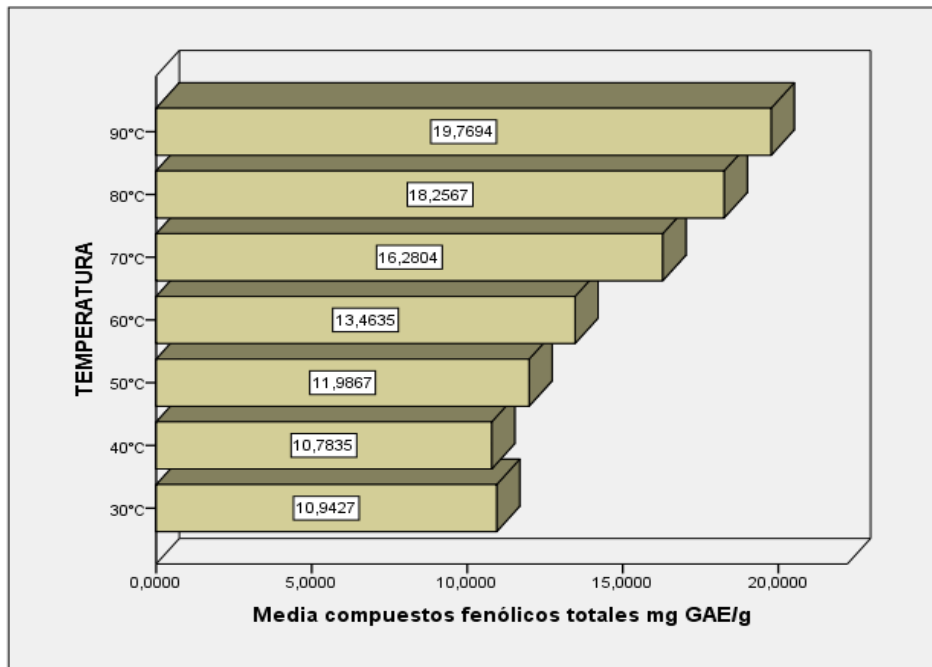


Figura 16. Comparación de las temperaturas de extracción de compuestos fenólicos totales.

7.3.3. Selección del tiempo de extracción:

Dado que los datos originales no presentaron una distribución normal, se procedió a obtener los valores tipificados de los mismos. Los compuestos fenólicos se extrajeron considerando los parámetros previamente seleccionados como etanol 50 % y temperatura de extracción 80 °C. Se procedió al estudio del proceso de extracción con la finalidad de reducir el tiempo de tratamiento. La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó por el método espectrofotométrico. En la Tabla 19 se muestran los resultados.

Tabla 19. Tiempo de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales

Muestras	Concentración (mg GAE/g de muestra seca)
M_5 minutos	5.8523 ± 0.1177
M_10 minutos	7.8769 ± 0.3104
M_15 minutos	8.6457 ± 0.9623
M_20 minutos	9.3655 ± 0.0295
M_40 minutos	11.4696 ± 0.3918
M_60 minutos	11.4122 ± 0.8644
M_80 minutos	12.1412 ± 0.6476
M_100 minutos	12.5222 ± 0.4361
M_120 minutos	13.3294 ± 1.0234
M_140 minutos	13.5864 ± 1.3906
M_160 minutos	13.3610 ± 2.4845
M_180 minutos	15.6522 ± 1.1068
M_200 minutos	15.8278 ± 0.5484
M_220 minutos	15.2324 ± 2.2816
M_240 minutos	15.4118 ± 1.2734
M_260 minutos	15.3440 ± 2.1614
M_280 minutos	16.1714 ± 0.9573
M_300 minutos	16.4912 ± 1.0225

(*)Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

De acuerdo a la comparación de medias mediante ANOVA (Tabla 20), se encuentra que el valor de P es menor a 0.05, demostrando que hay diferencias significativas entre los datos agrupados según el tiempo de extracción a un nivel del 95 % de confianza.

Tabla 20. ANOVA para comparación de los tiempos de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	63.4597	17	3.73293	26.73	0.0000
Intra grupos	7.54026	54	0.139635		
Total (Corr.)	71.0	71			

Se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con la finalidad de determinar cuáles medias son significativamente diferentes de las otras. Se observó que a

partir de 180 minutos en adelante no se presentaban diferencias estadísticamente significativas (Anexo 3.6) en cuanto a la concentración de compuestos fenólicos totales extraídos, a un nivel del 95% de confianza, de esta forma se justificaría la reducción del tiempo de tratamiento con un consiguiente ahorro de energía. En la Figura 17 se muestra la evaluación del proceso de extracción en el rango de tiempo estudiado.

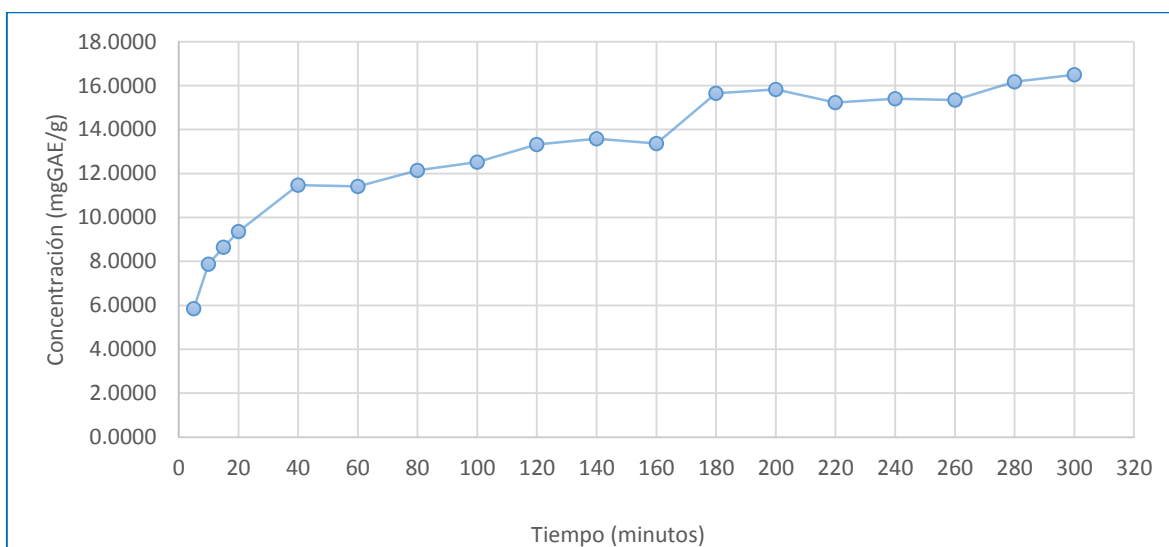


Figura 17. Contenido de compuestos fenólicos totales acumulados en el tiempo en función del tiempo de extracción

En la Figura 17, se observa que a los 180 minutos se extrajo 15.6522 mg GAE/g de muestra seca de un total de 16.4912 mg GAE/g de muestra seca extraída a los 300 minutos; representando el 94.91 % de la extracción total, por lo que en 120 minutos más de tratamiento sólo se obtiene un incremento de 5.09 % de compuestos fenólicos totales.

Los datos (Anexo 3.5) obtenidos durante el proceso de extracción fueron sometidos a un ajuste por mínimos cuadrados, a partir del cual se obtuvo la siguiente ecuación: $Y = 1.961X - 1.075X^2$ con $R^2 = 0.934$. Donde “Y” corresponde a mg GAE/ g de muestra seca y “X” corresponde a tiempo de extracción en minutos.

Aplicando la derivada respecto del tiempo a la ecuación, se obtuvo la velocidad de extracción (Tabla 21), dicha velocidad es expresada en mg GAE/ g de muestra seca por minuto; está dada por la siguiente ecuación: $Y' = 1.961 - 2.15X$

Tabla 21. Velocidad de extracción convencional

Tiempo (minutos)	Velocidad* (mg GAE/g muestra x minuto)
5	-8.789
10	-19.539
15	-30.289
20	-41.039
40	-84.039
60	-127.039
80	-170.039
100	-213.039
120	-256.039
140	-299.039
160	-342.039
180	-385.039
200	-428.039
220	-471.039
240	-514.039
260	-557.039
280	-600.039
300	-643.039

(*) Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones.

De la Figura 19, se puede observar que a los 180 minutos de tratamiento, la velocidad de extracción de los compuestos fenólicos totales se redujo a un 40.1 % con respecto a la velocidad inicial.

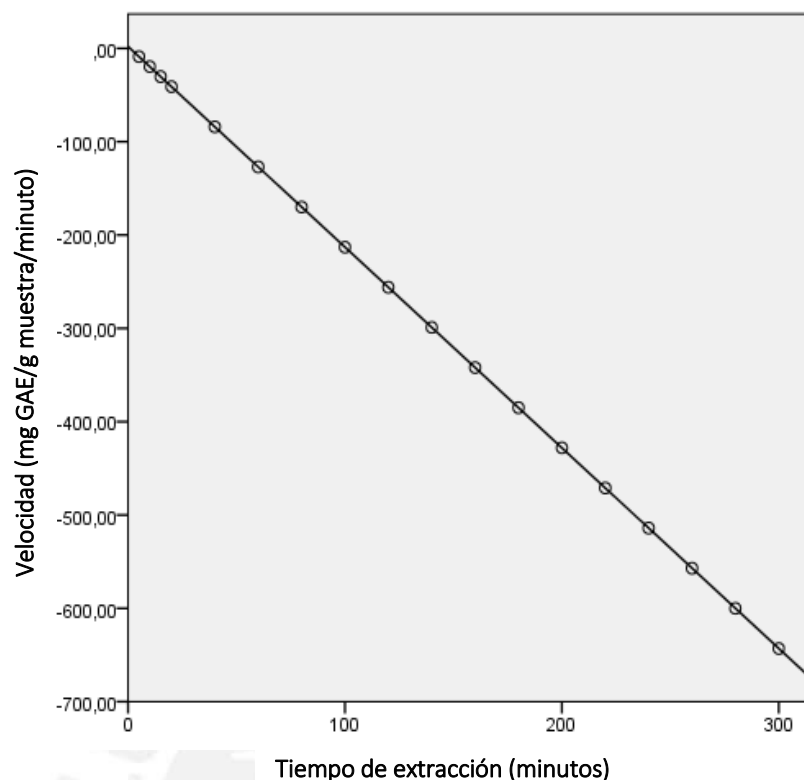


Figura 18. Velocidad de extracción de compuestos fenólicos totales en cáscaras de vid var. Quebranta extraídas con EtOH 50 % a 90 °C.

7.3.4. Optimización de las condiciones de extracción convencional:

En el Anexo 3.11, a partir de la matriz del diseño de Box-Behnken, se presenta el número de experimentos entre las combinaciones de las variables independientes y el contenido de compuestos fenólicos totales.

El análisis de varianza (Tabla 22) muestra que las variables de % solvente, tiempo y temperatura presentan un valor P menor que 0.05, por lo tanto la respuesta del contenido de compuestos fenólicos totales mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos a un nivel de confianza del 95.0 %.

Tabla 22. Análisis de varianza de la extracción convencional de los compuestos fenólicos totales.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Solvente EtOH:H2O	1.77961	1	1.77961	5.09	0.0276
B:Tiempo	38.1085	1	38.1085	109.06	0.0000
C:Temperatura	80.5263	1	80.5263	230.45	0.0000
AA	3.34404	1	3.34404	9.57	0.0030
AB	0.00236926	1	0.00236926	0.01	0.9346
AC	1.66884	1	1.66884	4.78	0.0327
BB	40.5514	1	40.5514	116.05	0.0000
BC	2.25357	1	2.25357	6.45	0.0137
CC	49.8764	1	49.8764	142.74	0.0000
Bloques	10.2707	4	2.56767	7.35	0.0001
Error total	21.315	61	0.349427		
Total (corr.)	257.418	74			

También se observa que el valor de F muestra un valor mayor con respecto al valor crítico, lo que evidencia que el modelo es altamente significativo.

Tabla 23. Coeficiente de regresión para compuestos fenólicos totales

Coeficiente	Estimado
Constante	151.855
x1:Solvente EtOH:H2O	2.56499
x2:Tiempo	1.64577
x3:Temperatura	-9.05375
x1x1	-0.017024
x1x2	0.000108841
x1x3	-0.0115545
x2x2	-0.00370518
x2x3	-0.00335677
x3x3	0.0657466

El valor del coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.917, dicho valor indica que el modelo obtenido es capaz de explicar el 91.7 % de las variaciones en el contenido de compuestos

fenólicos totales. El modelo ajustado al contenido de compuestos fenólicos totales presentó la siguiente ecuación con x_1 : solvente etanol:agua, x_2 : tiempo y x_3 : temperatura, como se observa los coeficientes en la Tabla 23.

$$\text{Compuestos fenólicos totales} = 151.86 + 2.57x_1 + 1.65x_2 - 9.05x_3 - 0.02x_1^2 - 0.01x_1x_3 - 0.003x_2^2 - 0.003x_2x_3 + 0.07x_3^2$$

El factor x_1x_2 fue rechazado debido a que su valor P es mayor a 0.05. Por lo tanto, no muestra un efecto significativo. A su vez el modelo muestra un aumento en el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos totales. Los resultados obtenidos de todos los experimentos que correspondieron al modelo explicado, se procesaron aplicando la metodología de superficie de respuesta con el programa estadístico StatGraphics Centurion XV. De esta forma se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción de los compuestos fenólicos totales.

Como resultado las condiciones optimizadas para la extracción convencional de compuestos fenólicos totales en cáscara de vid variedad Quebranta fueron: solvente EtOH 47 %, tiempo 184 minutos y temperatura 85 °C.

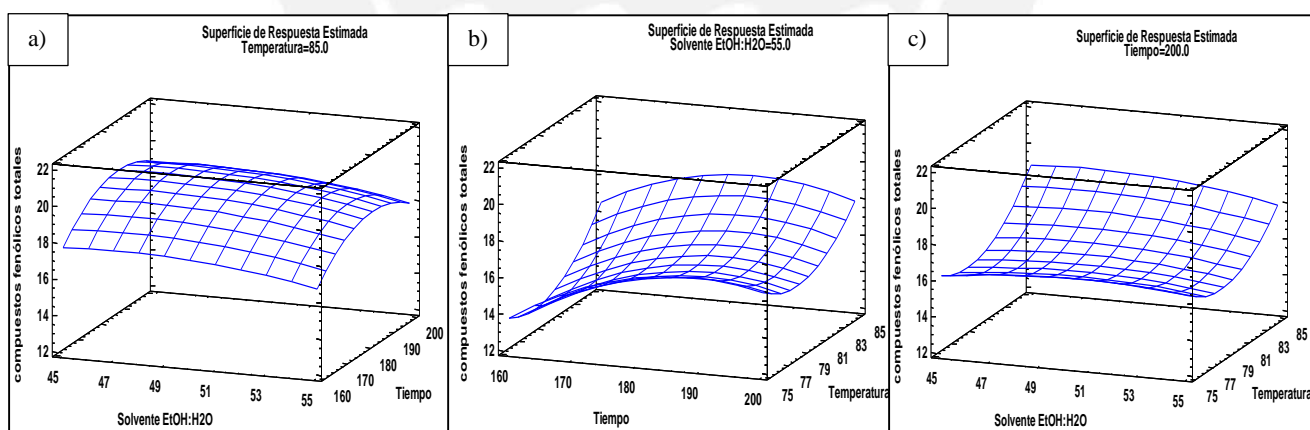


Figura 19. Gráficos de superficie de respuesta a) Solvente y Tiempo & Compuestos Fenólicos Totales, b) Tiempo y Temperatura & Compuestos Fenólicos Totales, c) Solvente y Temperatura & Compuestos Fenólicos Totales.

La Figura 19 muestra las gráficas de superficie de respuesta en la determinación de compuestos fenólicos totales en función a las variables de solvente y temperatura y tiempo. Asimismo se observa en la Figura 19 a) que, a medida que se incrementó el tiempo de tratamiento, descendió el contenido de compuestos fenólicos totales; a su vez, a medida que se incrementó el % de EtOH, se observó un comportamiento constante del contenido de compuestos fenólicos totales. En la Figura 19 b) se puede observar que, a medida que se incrementó la temperatura de extracción, hay un incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales; a su vez, a medida que se aumentó el tiempo de tratamiento, incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales con un ligero descenso. De igual manera se observa en la Figura 19 c) que, a medida que se aumentó la temperatura de extracción, se incrementó en el contenido de compuestos fenólicos totales, y a medida que se incrementó el % de EtOH, se observó un ligero incremento del contenido de compuestos fenólicos totales. Estos resultados evidencian la influencia de dichos parámetros en la extracción de los compuestos fenólicos totales.

En la Figura 20 el diagrama de Pareto muestra que todos los parámetros y sus interacciones exceptuando AB presentan efectos positivos. Asimismo los factores C, seguido de CC, BB y B presentan los efectos significativos, siendo C el más significativo, lo cual indica la presencia de una curvatura en el modelo y con ello una posible máxima concentración en la extracción de compuestos fenólicos totales, con lo cual se evidencia la influencia de dichos parámetros en la extracción de los compuestos fenólicos totales.

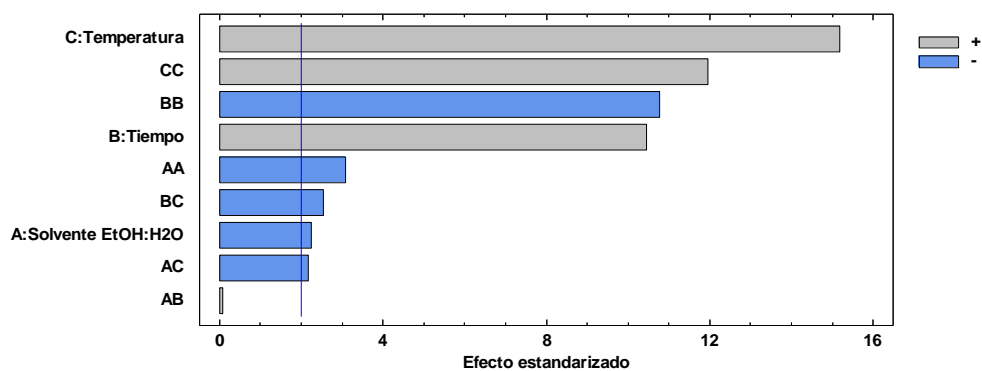


Figura 20. Diagrama de Pareto estandarizado para compuestos fenólicos totales

Los análisis en los gráficos de superficie de respuesta permitieron analizar la forma en que influyeron los parámetros estudiados en función a la determinación de compuestos fenólicos totales.

7.4. Extracción asistida por ultrasonido:

7.4.1. Selección de la amplitud:

En cuanto al análisis de la amplitud, en la extracción de compuestos fenólicos totales se emplearon los porcentajes de amplitud de 20 a 90 % con intervalos de 10 en 10, empleando como solvente óptimo de extracción EtOH 47 % previamente evaluado. La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó por el método espectrofotométrico, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 24.

Tabla 24. Porcentajes de amplitud en la determinación de compuestos fenólicos totales

% de amplitud	Concentración (mg GAE/g de muestra seca)*
M_20%	10.5050 ± 0.0926
M_30%	11.6125 ± 0.1021
M_40%	12.7931 ± 0.3692
M_50%	14.2629 ± 0.0106
M_60%	14.1908 ± 0.0170
M_70%	14.2589 ± 0.0053
M_80%	14.2997 ± 0.0030
M_90%	14.1101 ± 0.1133

(*) Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

De acuerdo a la comparación de medias mediante ANOVA (Tabla 25), el valor de P es menor a 0.05, demostrando que hay diferencias significativas entre los datos agrupados en función del % de amplitud en la extracción de compuestos fenólicos totales a un nivel del 95 % de confianza.

Tabla 25. ANOVA para comparación de los porcentajes de amplitud en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	60.7819	7	8.68313	412.06	0.0000
Intra grupos	0.505744	24	0.0210727		
Total (Corr.)	61.2876	31			

Se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Dicha comparación se empleó con la finalidad de determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, identificándose que los % de amplitud 50, 60, 70 80 y 90, no presentan diferencias estadísticamente significativas a un nivel del 95% de confianza.

En la Figura 21, se observa que en la extracción realizada variando el % de amplitud, se presentó una mayor recuperación de los compuestos fenólicos totales a partir de 50%, por lo que se elige este valor para los ensayos siguientes.

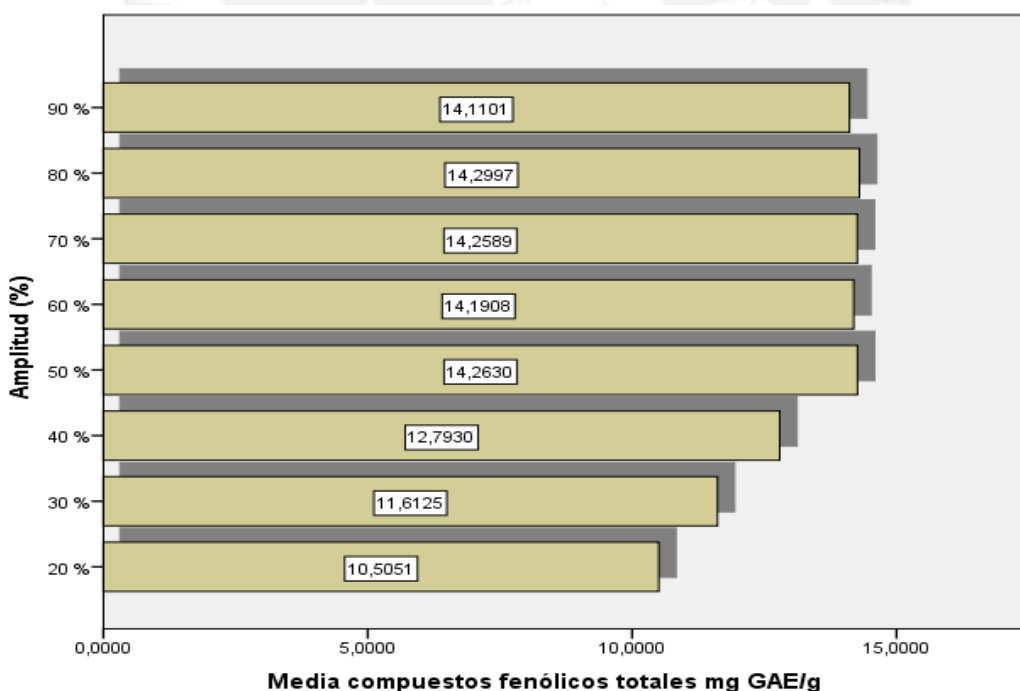


Figura 21. Comparación de los tiempos de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.

7.4.2. Selección del tiempo de extracción:

Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante los parámetros de solvente binario Etanol 48 %, amplitud de 50 % que fueron previamente evaluados, asimismo la cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó por el método espectrofotométrico. En la Tabla 26 se muestran los resultados.

Tabla 26. Tiempo de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales

Tiempo (min)	Concentración* (mg GAE/g de muestra seca)
5	13.4492 ± 1.4994
10	15.2472 ± 1.1736
15	15.1894 ± 0.1087
20	15.9308 ± 0.0232
30	15.9663 ± 0.6340
40	16.5469 ± 0.1362

(*) Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

De acuerdo a la comparación de medias mediante ANOVA (Tabla 27), el valor de P es menor a 0.05, demostrando que hay diferencias significativas entre los datos agrupados según la variable tiempo en la extracción de compuestos fenólicos totales a un nivel del 95 % de confianza.

Tabla 27. Tabla ANOVA para comparación de tiempo en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	23.1618	5	4.63235	6.85	0.0010
Intra grupos	12.1749	18	0.676384		
Total (Corr.)	35.3367	23			

Se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Dicha comparación se empleó con la finalidad de determinar cuáles medias eran significativamente diferentes de otras, identificándose que los tiempos de 10, 15, 20 y 30 minutos no presentaban diferencias estadísticamente significativas a un nivel del 95 % de confianza.

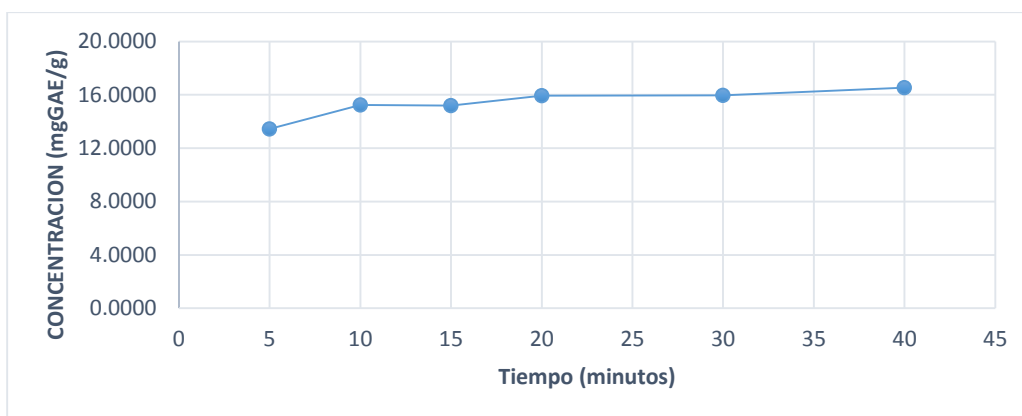


Figura 22. Contenido de compuestos fenólicos totales acumulados en el tiempo según el tiempo de extracción.

En las Figuras 22 y 23, se observa que a los 10 minutos se extrae 15.2472 mg GAE/g de muestra seca de un total de 16.5489 mg GAE/g de muestra seca extraída a los 40 minutos; representando el 92.13 % de la extracción total, lo que significa que en 30 minutos más de tratamiento sólo se obtiene un incremento de 7.87 % de compuestos fenólicos totales.

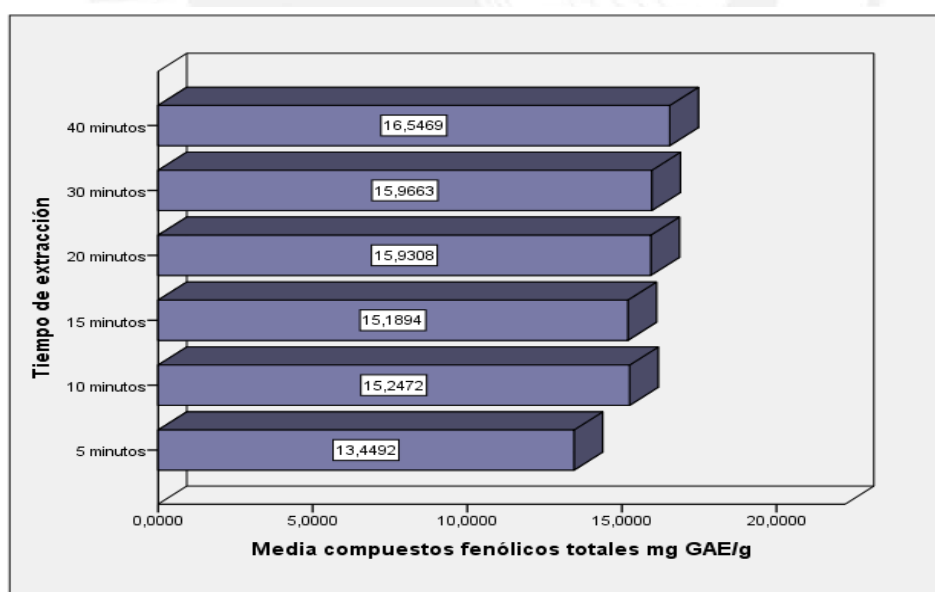


Figura 23. Comparación de los tiempos de extracción en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Los datos (Anexo 4.1) obtenidos durante el proceso de extracción fueron sometidos a un ajuste de mínimos cuadrados, del cual se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 2.155X - 1.268X^2 \quad (*)$$

$$R^2 = 0.90$$

Donde:

Y: mg GAE/ g de muestra seca.

X: Tiempo de extracción en minutos.

Aplicando la derivada respecto al tiempo de la ecuación (*), se obtiene la velocidad de extracción (Tabla 28). Dicha velocidad es expresada en mg GAE/ g de muestra seca por minuto; que está dada por la siguiente ecuación $Y' = 2.155 - 2.536X$.

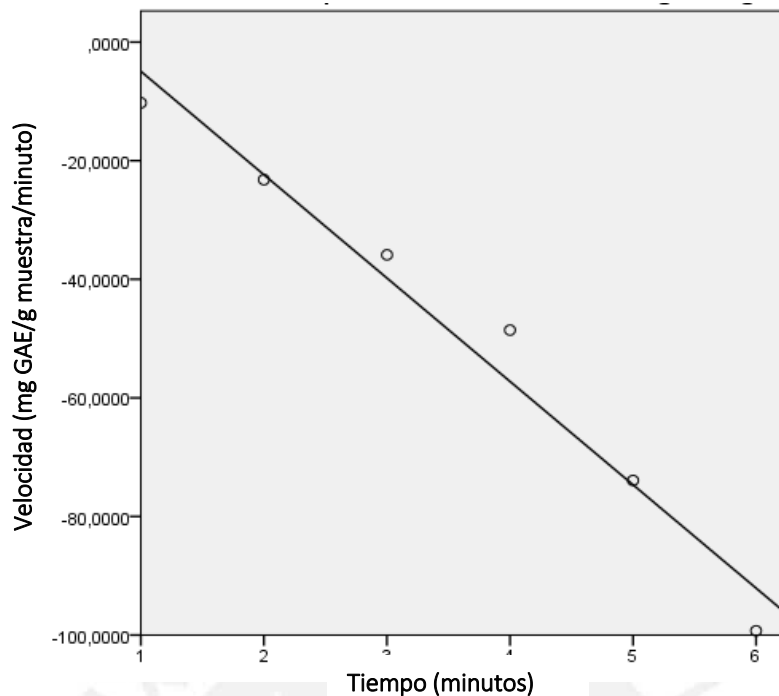
Tabla 28. Velocidad de extracción de los compuestos fenólicos empleando extracción asistida por ultrasonido.

Tiempo (minutos)	Velocidad* (mg GAE/g muestra seca/min)
5	-10.525
10	-23.205
15	-35.885
20	-48.565
30	-73.925
40	-99.285

(*) Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones \pm desviación estándar.

En Tabla 28 se puede observar que a los 10 minutos de tratamiento, la velocidad de extracción de los compuestos fenólicos totales se redujo a un 23.37 % con respecto a la velocidad inicial.

En Figura 24, se puede observar que a los 15 minutos de tratamiento, la velocidad de extracción de los compuestos fenólicos totales se reduce con respecto a la velocidad inicial.



** 1 (5 minutos); 2 (10 minutos); 3 (15 minutos); 4 (20 minutos); 5 (30 minutos); 6 (40 minutos).

Figura 24. Velocidad de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales en cáscaras de vid variedad Quebranta extraídas con EtOH 50 %.

7.4.3. Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos totales:

En el Anexo 4.7, se presenta la cuantificación de los compuestos fenólicos totales empleando la extracción asistida por ultrasonido y aplicando el diseño factorial 2^3 .

El análisis estadístico (ANOVA) (Tabla 29) muestra que los parámetros de amplitud, ciclo de trabajo y tiempo presentan un valor P menor que 0.05. Por lo tanto, presentan un efecto significativo sobre la extracción de compuestos fenólicos totales a un nivel de confianza del 95.0 %.

Tabla 29. Análisis de varianza para compuestos fenólicos totales en la extracción asistida por ultrasonido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Amplitud	6.46328	1	6.46328	213.44	0.0000
B: Ciclo de trabajo	51.7988	1	51.7988	1710.59	0.0000
C: Tiempo	39.0307	1	39.0307	1288.94	0.0000
AA	3.55979	1	3.55979	117.56	0.0000
AB	6.93347	1	6.93347	228.97	0.0000
AC	15.0052	1	15.0052	495.53	0.0000
BB	1.63632	1	1.63632	54.04	0.0000
BC	6.6848	1	6.6848	220.76	0.0000
CC	4.70368	1	4.70368	155.33	0.0000
Bloques	0.0934886	4	0.0233721	0.77	0.5477
Error total	1.84716	61	0.0302813		
Total (corr.)	138.025	74			

En la Tabla 30, se observa los coeficientes de la ecuación del modelo ajustado correspondiente a la superficie de respuesta obtenida para compuestos fenólicos totales, presentando la siguiente ecuación:

$$\text{Compuestos fenólicos totales} = 13.86 + 0.0430121*A - 7.43053*B - 0.178393*C - 0.00109779*A^2 + 0.0735987*A*B + 0.00866175*A*C + 1.86072*B^2 + 0.289067*B*C - 0.0201904*C^2$$

Tabla 30. Coeficiente de regresión para compuestos fenólicos totales

Coeficiente	Estimado
Constante	13.86
A: Amplitud	0.0430121
B: Ciclo de trabajo	-7.43053
C: Tiempo	-0.178393
AA	-0.00109779
AB	0.0735987
AC	0.00866175
BB	1.86072
BC	0.289067
CC	-0.0201904

Asimismo, la ecuación de la superficie de respuesta presentó un coeficiente de determinación igual a 0.987, expresando que el modelo explica el 98.7 % de la variabilidad en la extracción de compuestos fenólicos totales.

Las condiciones óptimas en la evaluación de los compuestos fenólicos totales empleando extracción asistida por ultrasonido en cáscara de vid variedad Quebranta fueron: 90 % de amplitud: 1.0 s de ciclo de trabajo y 15 minutos del parámetro tiempo.

En la Figura 25, se puede observar que la concentración de compuestos fenólicos totales se incrementa al aumentar el % amplitud, ciclo de trabajo y el tiempo.

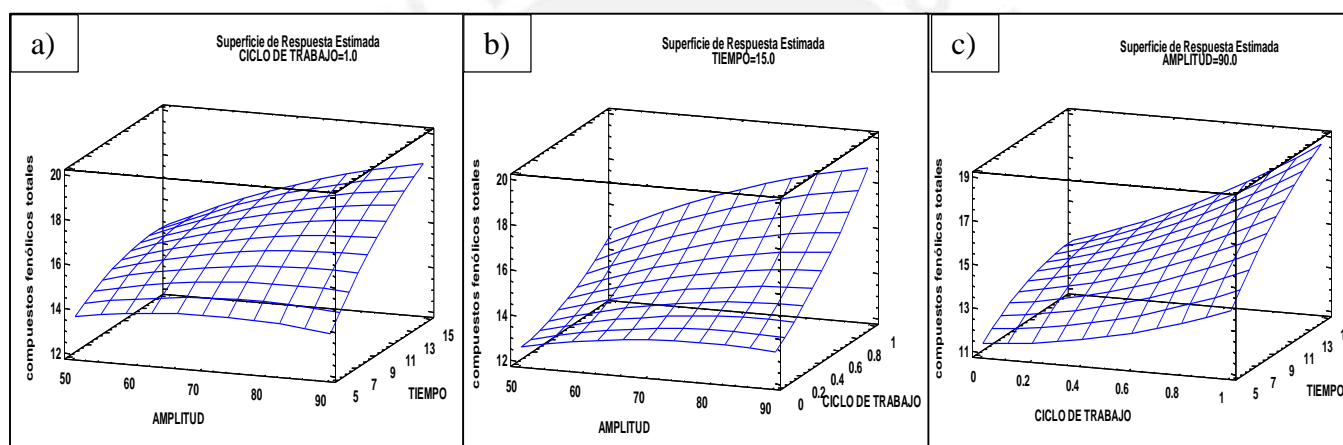


Figura 25. Gráficos de superficie de respuesta a) Amplitud y Tiempo & Compuestos Fenólicos Totales, b) Amplitud y Ciclo de trabajo & Compuestos Fenólicos Totales, c) Ciclo de trabajo y Tiempo & Compuestos Fenólicos Totales.

En la Figura 25 a), se observa que a medida que se incrementó el % de amplitud, hubo un ligero incremento del contenido de compuestos fenólicos. A su vez, cuando se incrementó el tiempo, se observó un aumento más notorio. También se observa que, cuando estas dos variables aumentaron, se incrementó el contenido de fenólicos. De igual modo, se observa en la Figura 25 b), que a medida que se incrementó el % de amplitud, se observó un ligero incremento de compuestos fenólicos; asimismo, cuando se incrementó el ciclo de trabajo, se observó un aumento más notorio de contenido de compuestos fenólicos. En la Figura 25 c)

se observa que, a medida que se aumentó el ciclo de trabajo y el tiempo hubo un incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales.

En la Figura 26, se puede observar y a su vez corroborar como afectan las tres variables al proceso de extracción, de las cuales el ciclo de trabajo y tiempo son las variables que afectan más notoriamente a dicho proceso de extracción.

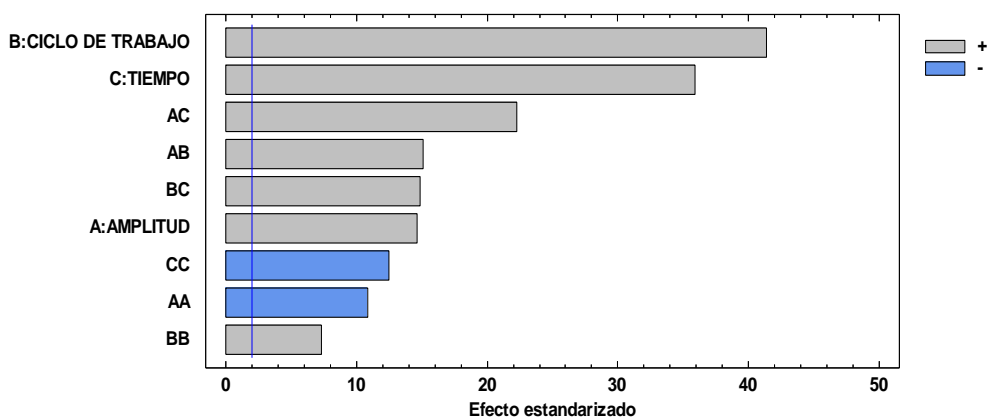


Figura 26. Diagrama de Pareto estandarizada para compuestos fenólicos totales

7.5. Resultados del análisis por cromatografía líquida:

El análisis de los extractos fue por HPLC en fase reversa, equipado con un auto inyector, un detector fotodiodo y un software, usando una pre columna C18 y una columna C18 de 4,6 nm x 2,0 nm para la separación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular a 35°C.

En la Tabla 31 se muestran la longitud de onda, los tiempos de retención y la ecuación de calibración de los respectivos estándares empleados en la cuantificación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Tabla 31. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC.

Compuesto	λ (nm)	tR (min.)	Ecuación de la calibración	R
Epicatequina	280	35.3	$y = 16.832x - 15.22$	0.9998
Ácido gálico	280	5.6	$y = 66.097x - 44.303$	0.9998
Quercetina-3- β -glucósido	250	60.2	$y = 25.898x - 54.828$	0.9988
(+)-Catequina	280	22.3	$y = 23.823x - 525.34$	0.9939
Resveratrol	280	75.5	$y = 5.504.8x + 189.36$	0.9849

En la Tabla 32, se observan los tiempos de retención de seis compuestos fenólicos de bajo peso molecular en la extracción por método convencional y no convencional de las muestras de cáscara de vid. Se observa que la extracción empleando ultrasonido presentó mayor concentración de compuestos como: epicatequina, ácido gálico, quercetina 3- β -glucósido y catequina que la extracción convencional. A su vez, se observa que en ambos métodos no hay presencia de resveratrol.

Tabla 32. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Compuesto	λ (nm)	tR (min.)	Extracción convencional ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca)			Extracción EAU ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca)		
			Fase etérea	Fase acetato	Fase acuosa	Fase etérea	Fase acetato	Fase acuosa
Epicatequina	280	35.3	0.5329	0.2428	0.6979	1.5320	0.5862	0.7649
Ácido gálico	280	5.6	3.9474	1.2225	1.6525	4.0162	1.1590	0.8585
Quercetina-3- β -glucósido	250	60.2	8.5308	3.6794	1.6626	16.1665	3.4582	6.2624
(+)-Catequina	280	22.3	13.037	ND	ND	19.4407	11.5114	17.5373
Resveratrol	280	75.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

tR: tiempo de retención, λ : longitud de onda, ND: no identificado.

7.6. Recuperación

Se determinaron los compuestos fenólicos totales usando las metodologías de extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido empleando los parámetros optimizados para cada caso, en la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 33. Comparación de los extractos aplicando método convencional y extracción asistida por ultrasonido en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Tratamientos	Compuestos fenólicos totales * (mg GAE/g)
Extracción S-L	17.7020±0.7010
Extracción UAE	16.7937±0.4975

* Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones ± desviación estándar.

S-L: extracción convencional (sólido líquido) y UAE: extracción asistida por ultrasonido.

De acuerdo a la prueba t de Student para muestras independientes (Tabla 34), se observa que en la prueba de Levene el valor de P es mayor a 0.05, por lo cual los datos presentan homogeneidad de varianzas; asimismo se observa que no hay diferencias significativas en la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales empleando tanto la extracción convencional y la extracción asistida por ultrasonido a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 34. Tabla de t de student para la comparación de los dos métodos de extracción

		Prueba de Levene		Prueba t para la igualdad de medias				
		F	Sig.	T	gl	Sig.	Dif. de medias	Dif. de error estándar
Compuestos fenólico totales (mg GAE/g)	Se asumen varianzas iguales	1.38	0.285	2.11	6	0.079	0.90839	0.42980
	No se asumen varianzas iguales			2.11	5.4	0.084	0.90839	0.42980

De acuerdo con el análisis de la metodología de superficie de respuesta, las condiciones óptimas para extracción convencional fueron: EtOH 47 %, 85 °C y 184 minutos; y para la EAU fueron: 90% amplitud, 1.0 ciclo de trabajo y 15 minutos. Empleando dichas condiciones el valor óptimo para la extracción convencional y EAU en la determinación de compuestos fenólicos totales fueron de 19.9144 mg GAE/g y 18.6117 mg GAE/g respectivamente. Sin embargo, realizando los experimentos empleando para ambos casos las condiciones optimizadas, la cantidad determinada de compuestos fenólicos totales fue de 17.7021 mg GAE/g y 16.7937 mg GAE/g (Figura 27). Dichos valores reflejan una desviación del 11.1 %

y 9.8 % respectivamente con respecto al valor óptimo en cada caso. Sin embargo, pueden ser considerados como punto de inicio para posteriores experimentos.

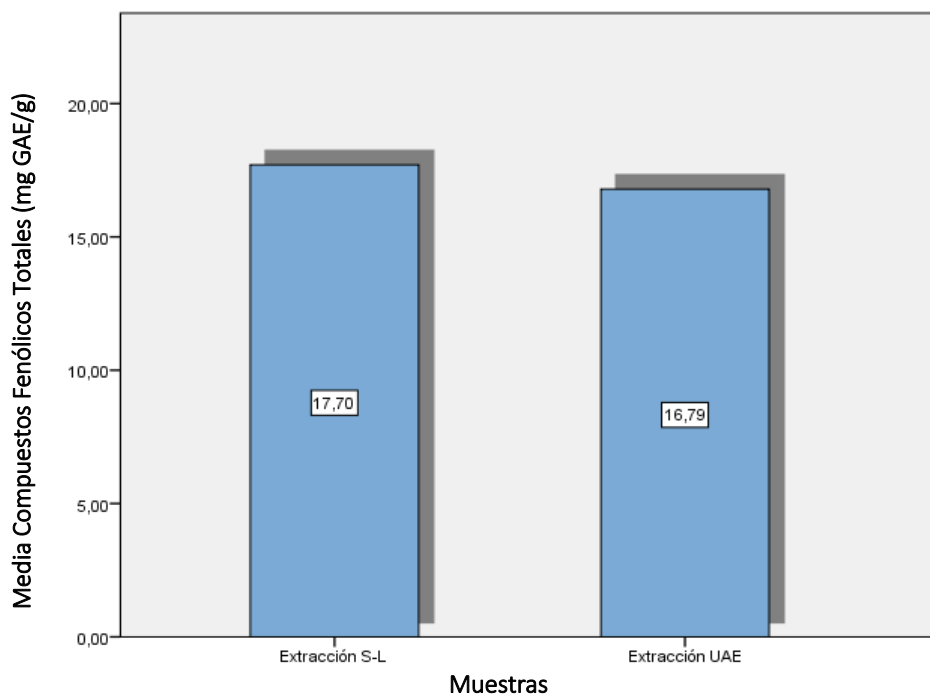


Figura 27. Comparación de los métodos en la recuperación de los CFT.

7.7. Resultados de la síntesis y caracterización de las nanopartículas metálicas:

7.7.1 Caracterización de los extractos obtenidos por método convencional y extracción asistida por ultrasonido

7.7.1.1 Espectros UV-visible del extracto filtrado y sin filtrar

En la Figura 28 se muestran los espectros UV-visibles de los extractos ricos en compuestos fenólicos extraídos por método convencional (extracto A) y extracción asistida por ultrasonido (extracto B). También se presentan los espectros UV-visible de los extractos que

fueron filtrados a través del carbón activo granular, y la desorción de los mismos que se emplearon en la síntesis de las nanopartículas de oro y plata.

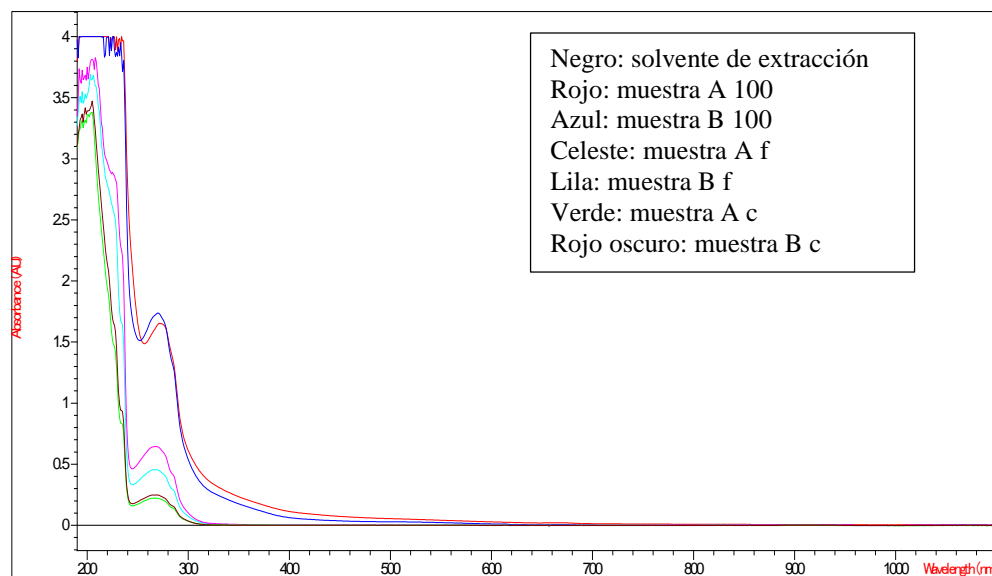
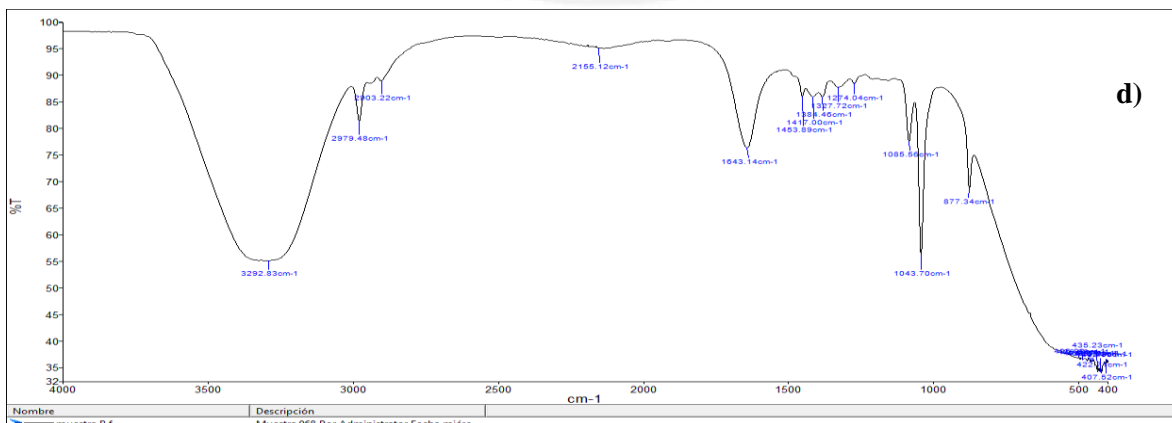
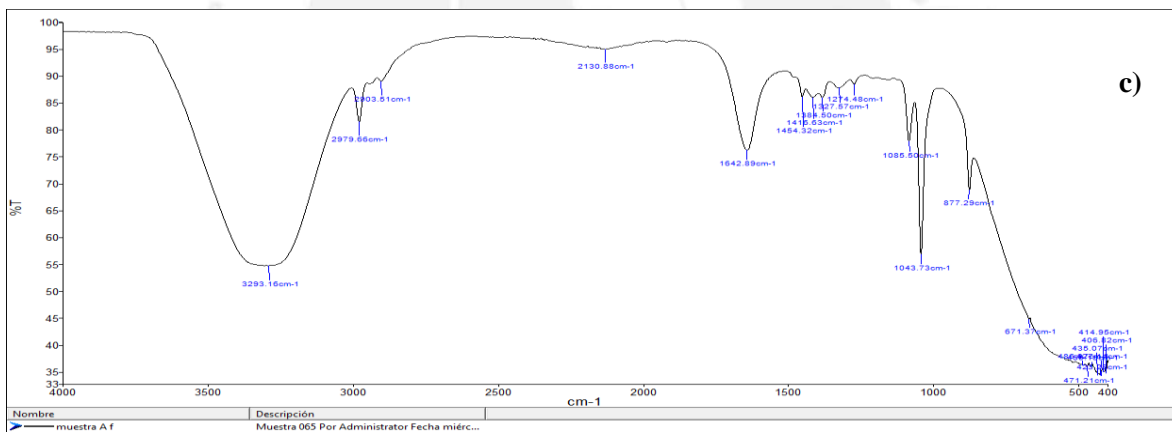
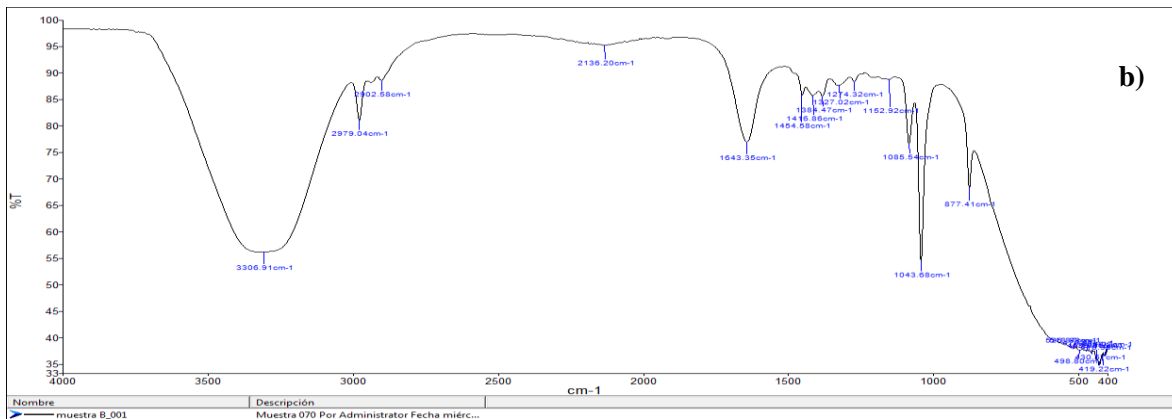
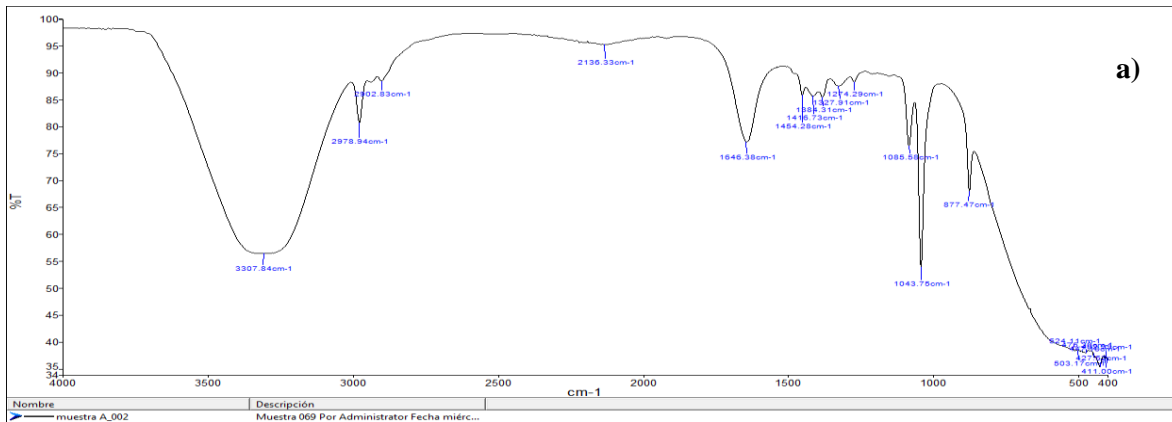


Figura 28. Espectros UV-visible de los extractos: filtrado y sin filtrar.

Muestra A 100: extracto 100 % obtenido por método convencional, muestra B 100: extracto 100 % obtenido por método no convencional, muestra A f: extracto 100 % obtenido por método convencional filtrado, muestra B f: extracto 100 % obtenido por método no convencional filtrado, muestra A c: desorción del extracto 100 % obtenido por método convencional, muestra B c: desorción del extracto 100 % obtenido por método no convencional.

7.7.1.2 Espectros FT-IR de los extractos filtrados y sin filtrar

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica analítica no destructiva que proporciona información estructural sobre las características moleculares de una amplia gama de compuestos. El análisis por FT-IR se llevó a cabo para la identificación de las moléculas responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas metálicas sintetizadas, empleando los extractos de la cáscara de vid ricos en compuestos fenólicos extraídos mediante un método convencional (extracto A) y extracción asistida por ultrasonido (extracto B). La Figura 29 muestra los espectros FT-IR de los extractos A y B también se presentan los espectros FT-IR de los extractos A y B que fueron filtrados a través del carbón activo granular y la desorción de los mismos que se emplearon en la síntesis de las nanopartículas de oro y plata.



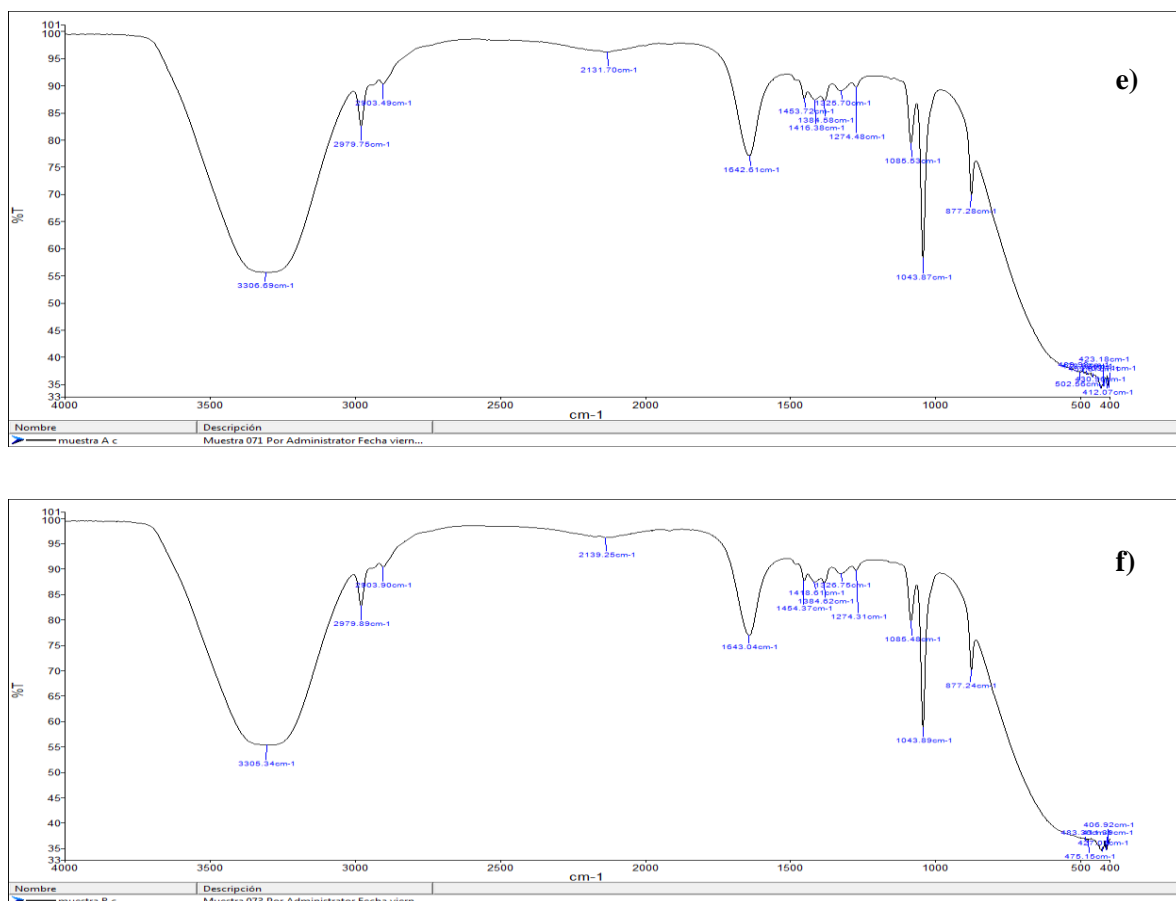


Figura 29. Espectros FT-IR: a) extracto A, b) extracto B, c) extracto A filtrado, d) extracto B filtrado, e) desorción del extracto A, f) desorción del extracto B.

*Extracto A: Extracción mediante método convencional.

*Extracto B: Extracción mediante extracción asistida por ultrasonido.

En la Figura 29 se observa que las muestras presentan patrones de espectros similares. Se identificaron varias bandas de absorción incluyendo aquellas dentro de la región entre 800-1750 cm^{-1} que se clasifican como tramos de anillo aromático C = CC (1580-1615 cm^{-1} , 1450 - 1510 cm^{-1}) mientras que bandas IR en la zona de 820 a 760 cm^{-1} pueden atribuirse a las vibraciones del anillo. Además, picos entre 670-900 cm^{-1} se pueden atribuir a CH aromático fuera de plano (750-1000 cm^{-1}) y en plano de flexión (950-1225 cm^{-1}) (76). Las regiones IR de importancia significativa para este estudio fueron de 1542 a 965 cm^{-1} , usualmente denominada región de "huella dactilar" y varias bandas de IR, incluidas las correspondientes a la vibración de los enlaces CO, CC, CH y CN, se producen en esta región (77). Esta área

proporciona información importante con respecto a compuestos orgánicos tales como azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos presentes en la muestra. Los distintos picos de absorbancia ubicados en la longitud de onda 3307 cm^{-1} es resultado de la absorbancia del agua (78). Otras bandas de absorción de interés implicaron aquellas a 1043 y 1085 cm^{-1} , que son indicativas de un grupo funcional alcohólico. La banda de absorción de 1384 cm^{-1} atribuye al OH en deformación plana en polifenoles (79). La naturaleza cíclica del éter se refleja por los picos situados a 1274 cm^{-1} , que se produjo por el estiramiento del enlace CO aromático. La vibración de deformación de los enlaces carbono-carbono en los grupos fenólicos absorben en la región de $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ (76).

La naturaleza cíclica del éter se reflejó por los picos situados a 1274 cm^{-1} . La absorción de IR debido a la presencia de grupos funcionales de azúcar está dentro del intervalo de 1200 y 950 cm^{-1} , más específicamente los picos observados a 1085 , 1043 cm^{-1} . Picos a 1643 y 1454 cm^{-1} corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento para el ión carboxilato (COO^-) que indica la existencia de ácido carboxílico, éster o grupos carbonilo (78). Los picos situados en la región de 1450 a 1410 cm^{-1} se originan a partir de la vibración de estiramiento simétrica de CO, y los de alrededor de 1500 cm^{-1} se pueden asignar a estiramiento CC en los anillos (76).

7.7.3 Caracterización de las nanopartículas metálicas:

7.7.3.1 Espectroscopía UV-visible

La espectroscopía UV-visible es útil para conocer las propiedades ópticas, en particular para analizar los espectros de la resonancia de plasmones superficiales de las nanopartículas de oro y plata en solución.

Una vez sintetizadas las nanopartículas de oro, se procedió a la caracterización de las mismas. La Figura 30 muestra el espectro UV-visible de 4 muestras, sintetizadas tanto por el método A como por el método B, empleando extractos al 100 % y al 50 %, donde se muestran la longitud de onda máxima y la absorción, siendo la absorción máxima 275 nm la que

corresponde a la síntesis de AuNPs sintetizado por el método A, empleando extracto al 100 %. Sin embargo, no se observó longitud de onda máxima en las otras muestras.

La banda de plasmones de superficie se muestra en la Figura 30. Para las nanopartículas de oro aparece a 275 nm y no posee hombro, lo que indica menor dispersión. Sin embargo, para las otras concentraciones no se observa

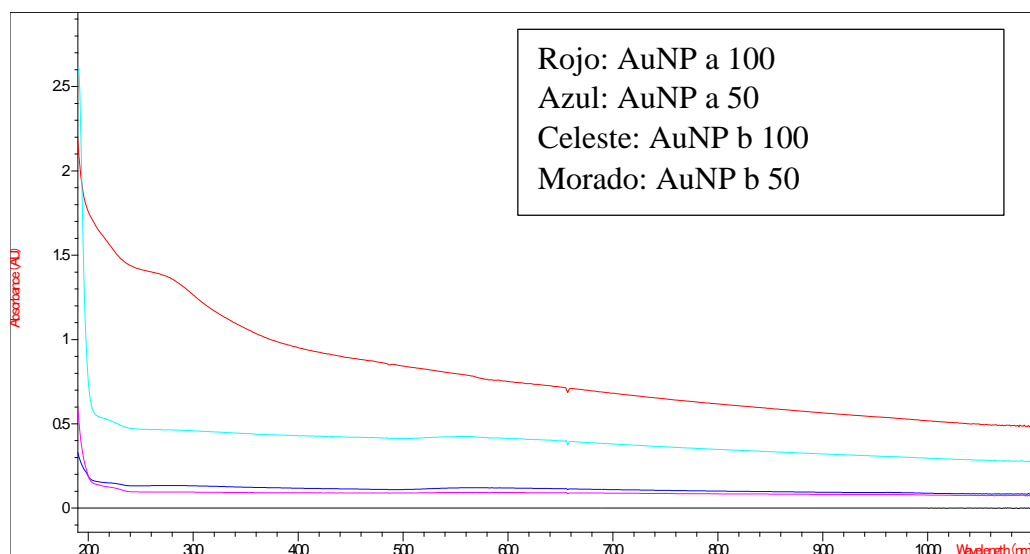


Figura 30. Espectro UV-visible de las nanopartículas de oro.

AuNP a 100: síntesis de AuNP usando extracto al 100 % obtenido por método convencional.

AuNP a 50: síntesis de AuNP usando extracto al 50 % obtenido por método convencional.

AuNP b 100: síntesis de AuNP usando extracto al 100 % obtenido por método no convencional.

AuNP b 50: síntesis de AuNP usando extracto al 50 % obtenido por método no convencional.

Asimismo, una vez sintetizadas las nanopartículas de plata, se procedió a la caracterización de las mismas. La Figura 31 muestra el espectro UV-visible de 2 muestras, sintetizadas tanto por el método A como por el método B, empleando extractos al 100 %, con absorción máxima de 215 nm.

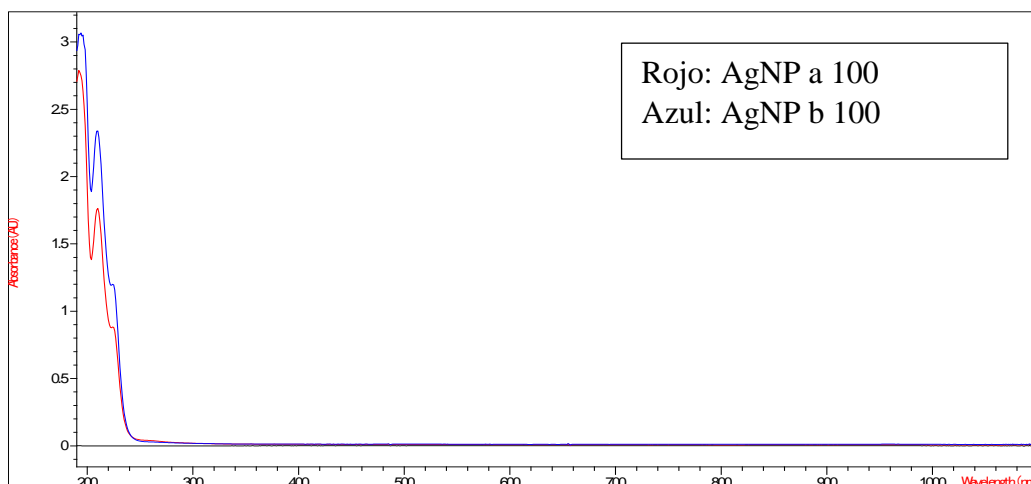


Figura 31. Espectro UV-visible de las nanopartículas de plata.

AgNP a 100: síntesis de AgNP usando extracto al 100 % obtenido por método convencional.

AgNP b 100: síntesis de AgNP usando extracto al 100 % obtenido por método no convencional.

La distribución de tamaño y la morfología de las nanopartículas obtenidas prácticamente dependen de factores que pueden ser controlados como: concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc. (59). La posición del máximo de absorción (215 nm) sugiere partículas de gran tamaño (>30 nm) donde los efectos multipolares en el espectro de absorción son importantes. Adicionalmente, el plasmón de superficie no es muy ancho cubriendo gran parte del espectro UV-Visible. Esta característica es compatible con una distribución ancha de tamaño de partículas. El origen de las características ópticas observadas, se deben a nanopartículas de plata de diferentes formas y tamaños.

7.7.3.2 Microscopía electrónica de barrido:

La microscopía de barrido electrónico (SEM) permitió el conocer la morfología de los aglomerados de las nanopartículas metálicas tanto de oro como de plata que fueron sintetizadas utilizando extractos extraídos por método convencional (método A) y extracción asistida por ultrasonido (método B).

En la Figura 32 se muestra las imágenes SEM de las nanopartículas de oro sintetizadas tanto por el método A y por el método B. No se observa claramente la morfología debido a la formación de agregación de las nanopartículas.

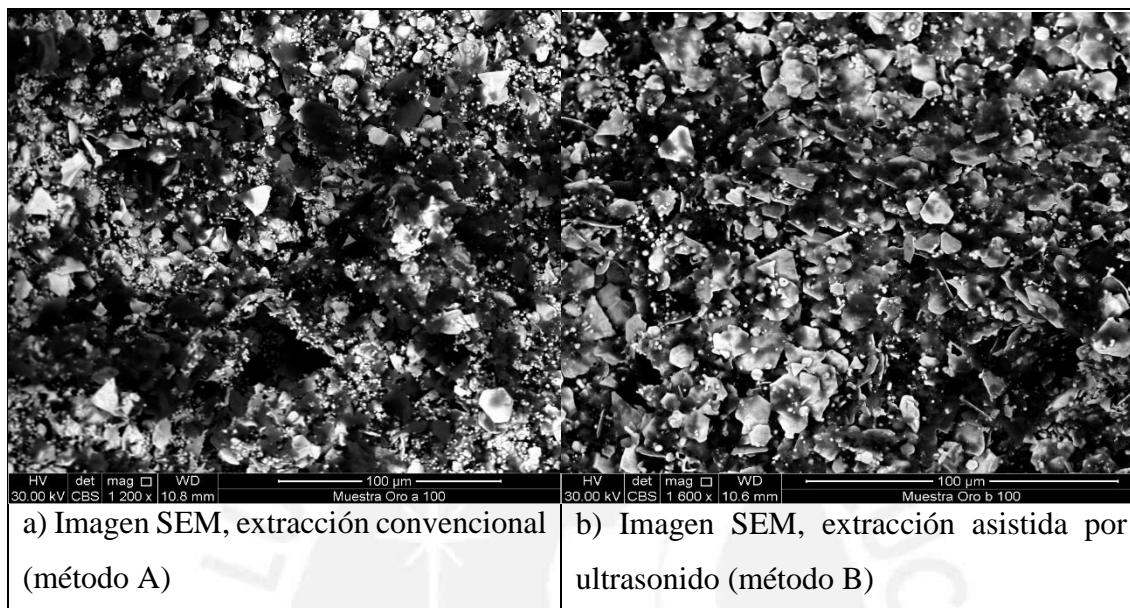


Figura 32 .Imagen SEM de las nanopartículas de oro sintetizadas.

De igual modo, en la Figura 33 se muestra las imágenes SEM de las nanopartículas de plata sintetizadas tanto por el método A y por el método B. Se evidencia que las nanopartículas se encuentran en gran medida agregadas.

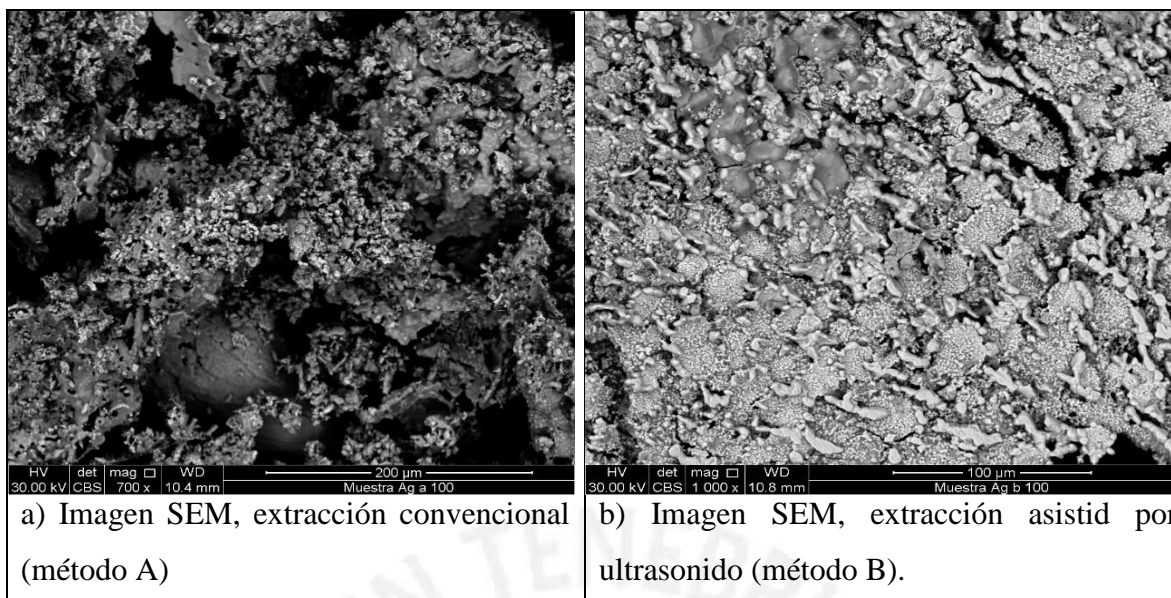


Figura 33. Imagen SEM de las nanopartículas de plata sintetizadas.

7.7.3.2.1 Análisis elemental

El análisis elemental de las nanopartículas sintetizadas se llevó a cabo mediante EDX, siendo este el detector del microscopio de barrido electrónico (SEM), para lo cual en cada muestra se seleccionó un punto correspondiente a nanopartículas individuales o aglomerados, según sea el caso.

En la Tabla 35, se muestra el análisis elemental de nanopartículas de oro sintetizadas mediante el método A. Se comprobó la presencia de oro como componente mayoritario, siendo el 56.05 ± 5.54 %. Asimismo, se observó presencia de algunos componentes minoritarios como sodio, potasio y hierro. Se presume que posiblemente la muestra se haya contaminado en el proceso de purificación, debido a la complejidad de la separación de las nanopartículas de oro de la materia orgánica obtenidas como productos de la síntesis.

Tabla 35. Análisis elemental de las nanopartículas de oro – método A

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
O K	41.83	88.13	240.6	9.87
NaK	1.08	1.58	8.92	54.54
K K	0.25	0.22	6.07	63.47
FeK	0.79	0.47	17.72	34.15
AuL	56.05	9.599.59	311.73	5.54

La Figura 34 muestra el análisis elemental de las nanopartículas de oro sintetizadas mediante el método A, donde el espectro indica la presencia de oro como componente mayoritario, según los valores reportados en la Tabla 35.

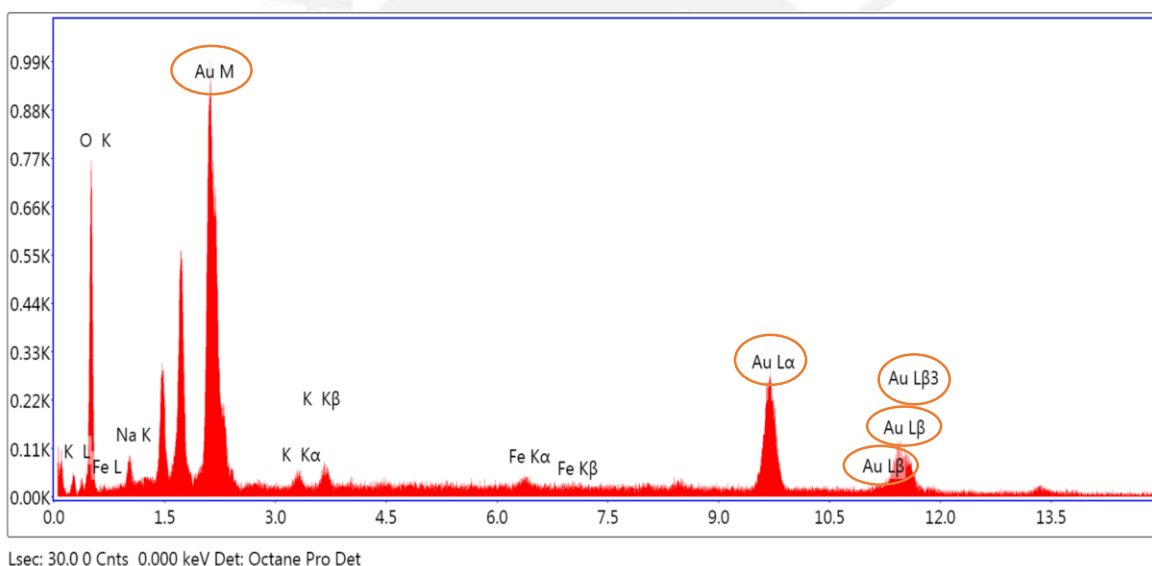


Figura 34. Espectro EDX de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método A.

Asimismo, la Tabla 36 muestra el análisis elemental de nanopartículas de oro sintetizadas mediante el método B, de igual modo se evidencia la presencia de oro como componente mayoritario, siendo el porcentaje igual a 56.62 ± 4.12 %. También se observa la presencia de componentes minoritarios como sodio, potasio y azufre. Se presume que dichos componentes minoritarios podrán provenir de residuos. Tal es el caso del azufre que proviene del ácido sulfúrico empleado en la calcinación.

Tabla 36. Análisis elemental de las nanopartículas de oro – método B.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
O K	22.22	56.12	131.03	10.76
NaK	12.05	21.19	152.05	10.42
S K	7.36	9.28	208.99	9.03
K K	1.74	1.8	49.64	16.27
AuL	56.62	11.62	400.59	4.12

La Figura 35 muestra el análisis elemental de las nanopartículas de oro sintetizadas mediante el método B, donde el espectro muestra la presencia de oro como componente mayoritario.

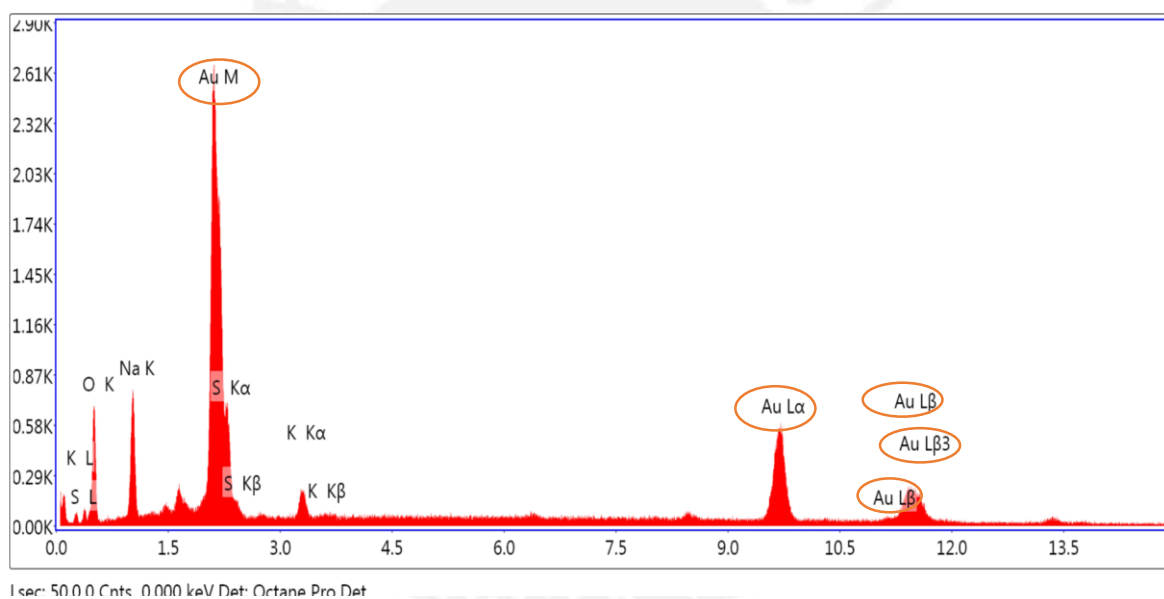


Figura 35. Espectro EDX de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método B.

La Tabla 37 se muestra el análisis elemental de nanopartículas de plata sintetizadas mediante el método A, donde se confirma la presencia de plata como componente mayoritario con un 65.63 ± 2.71 %. Asimismo se observa presencia de algunos componentes minoritarios como magnesio, potasio, azufre y hierro, dichos componentes posiblemente provengan del proceso

de purificación debido a la complejidad de la separación de las nanopartículas de plata de la materia orgánica obtenidos como productos en dicha síntesis.

Tabla 37. Análisis elemental de las nanopartículas de plata – método A.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
O K	27.52	67.9	25.8	15.05
MgK	0	0	0	8.69
P K	0	0	0	5.49
S K	6.19	7.62	91.03	10.5
AgL	65.63	24.01	515.39	2.71
FeK	0.66	0.47	5.22	58.7

La Figura 36 muestra el análisis elemental de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante el método A, donde el espectro constata la presencia de plata como componente mayoritario, según los valores reportados en la Tabla 37.

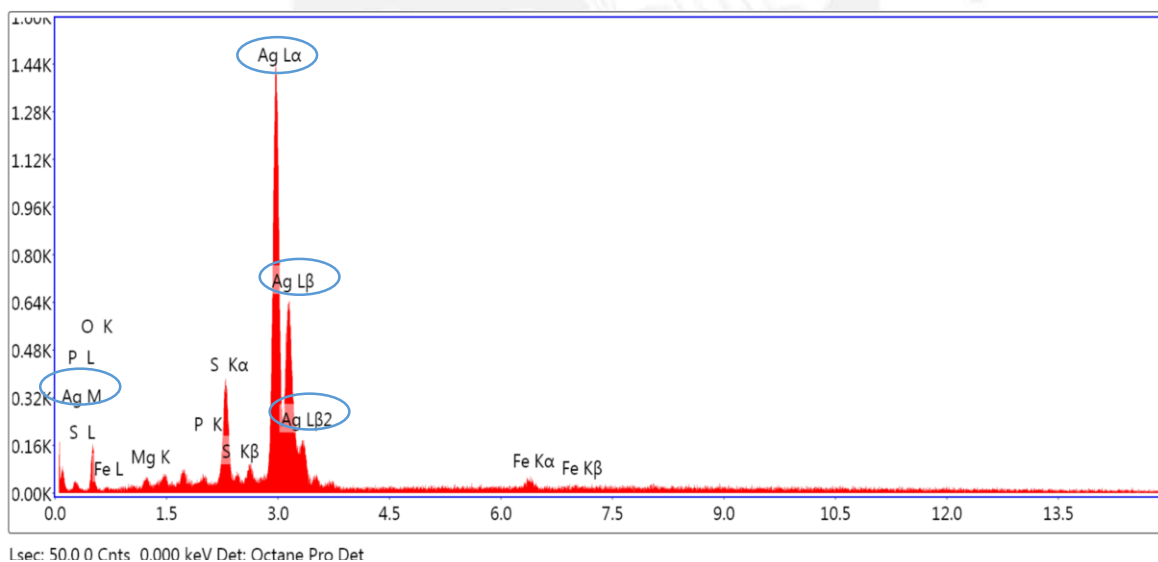


Figura 36. Espectro EDX de las nanopartículas de plata sintetizada por el método A.

La Tabla 38 muestra el análisis elemental de nanopartículas de plata sintetizadas mediante el método B, donde se corrobora la presencia de plata como componente mayoritario con un porcentaje de $96.95 \pm 1.99 \%$. Asimismo se visualiza la presencia de componentes minoritarios como azufre y hierro. Dichos componentes son residuos provenientes del proceso de purificación de las nanopartículas.

Tabla 38. Análisis elemental de las nanopartículas de plata – método B.

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
S K	2	6.35	42.1	16.16
AgL	96.95	91.72	1171.61	1.99
FeK	1.05	1.93	12.17	58.42

La Figura 37 muestra el análisis elemental de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante el método B, donde el espectro indica la presencia de plata como componente mayoritario.

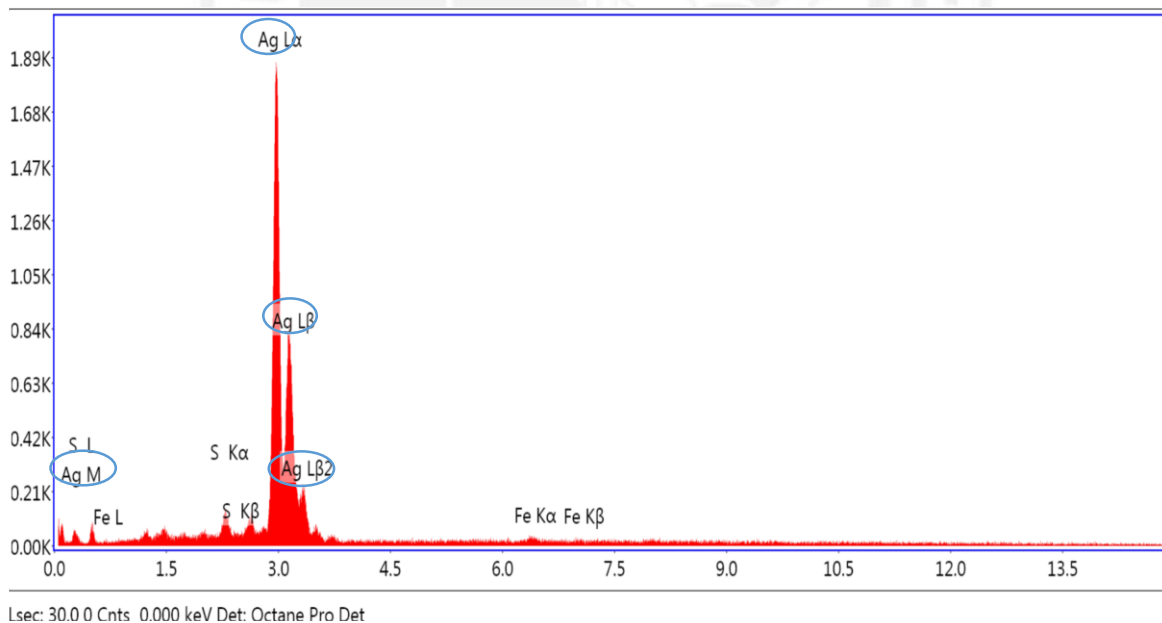


Figura 37. Espectro EDX de las nanopartículas de plata sintetizadas por el método B.

8. DISCUSIÓN

8.1. Influencia de los lípidos:

De los resultados del análisis de la influencia de lípidos en la determinación de compuestos fenólicos totales, se puede afirmar que los lípidos presentes en las cáscaras de vid no constituyen interferencia en la determinación de dichos compuestos. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Paladino (26). En tal sentido se justifica la omisión del solvente orgánico éter de petróleo durante el procesamiento de la muestra. Con ello se favorece la tendencia hacia un proceso eco-amigable, atendiendo al quinto principio de la Química Verde que refiere a la disminución del uso de solventes tóxicos.

8.2. Extracción convencional:

8.2.1 Selección del solvente:

El efecto de la concentración de etanol en la extracción de compuestos fenólicos totales fue significativo. La concentración de dichos compuestos se maximizó cuando se usó el sistema etanol 50%, mostrando una ligera disminución con incrementos adicionales de etanol. Cabe precisar que el etanol es un disolvente de menor polaridad que el agua. La polaridad del sistema se incrementará con la adición de agua al etanol (80). Asimismo, la combinación del etanol con agua contribuye a la creación de un medio que asegura eficacia en la extracción de los compuestos fenólicos (81).

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Thoo et al. (8), donde evaluaron los efectos de la concentración de etanol. Ellos reportaron que el sistema etanol 40 % presentó un mejor rendimiento en la evaluación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. De igual modo, un efecto similar fue reportado en el estudio de Wang et al. (82) y Zhang et al. (80); ellos establecieron que un sistema de disolvente binario es superior al de un sistema mono-disolvente si se emplea agua o etanol puro en la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, en el estudio Paladino (26) reportaron que el agua a 90°C presentó mayor concentración de polifenoles comparados con metanol 70 % a 30 °C, acetona 75 % a 30 °C

y etanol 20 % a 30 °C en muestras de semillas de uva; observando que las polaridades de los compuestos fenólicos extraídos variaban significativamente, siendo difícil el desarrollo de un método único para la extracción óptima de todos los compuestos fenólicos. Por lo tanto, la selección de parámetros y la optimización del procedimiento de extracción son esenciales para un ensayo preciso de compuestos fenólicos de diferentes matrices de alimentos

8.2.2 Selección de la temperatura de extracción:

Los resultados experimentales mostraron que un incremento de temperatura favorece la extracción de compuestos fenólicos, puesto que incrementa la solubilidad del soluto y del mismo modo el coeficiente de difusión (83).

Paladino (26) considera que la temperatura presenta un efecto significativo sobre la extracción de compuestos fenólicos. Precisa que el calentamiento tiene la capacidad de mejorar la penetración del solvente hacia los tejidos vegetales, lo cual favorecería la liberación de los compuestos fenólicos.

8.2.3 Selección del tiempo de extracción:

Es importante seleccionar el tiempo de tratamiento en la extracción de compuestos fenólicos debido a que estos podrían degradarse (40).

En el análisis de la cinética de extracción a 80 °C, se pudo comprobar que existe un incremento gradual del contenido de compuestos fenólicos totales cuando se incrementa el tiempo de extracción, pero después de los 180 minutos, los posteriores incrementos de la concentración fenólica ya no son significativos. En consecuencia dichos resultados justifican la reducción del tiempo de tratamiento de 300 minutos a 180 minutos.

Del mismo modo Thoo et al. (8) reportaron que el tiempo de extracción tuvo un efecto significativo en la determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Por su lado Paladino (7) menciona que debido a los diferentes grados de polimerización fenólica,

así como la solubilidad de los compuestos fenólicos y la interacción de estos con otros componentes de la matriz. Se debe considerar un tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre el soluto y el solvente. Sin embargo, Thoo et al. (8) reportan que un exceso de tiempo de extracción reduce el rendimiento de compuestos fenólicos.

De la evaluación de la cinética de extracción, se seleccionó el tiempo óptimo de tratamiento en la extracción de compuestos fenólicos totales. A su vez dicho estudio ayudó a elucidar los fenómenos involucrados, mejorando así el sistema de extracción con mayor rendimiento.

Sobre la base de los datos experimentales y la predicción del modelo cuadrático, el tiempo de contacto para alcanzar el equilibrio se fijó en 180 minutos, ya que a partir de dicho tiempo, los incrementos que se producen en la concentración de compuestos fenólicos totales no son significativos.

8.2.4 Optimización de las condiciones de extracción convencional:

La metodología de superficie de respuesta (MSR) representa una técnica de optimización con la finalidad de hacer eficientes los tratamientos de un proceso. Como resultado permite reducir gastos de energía, reducción de costos en tiempo, reducción del uso de solventes y entre otros, por lo que actualmente es aplicada ampliamente como alternativa en los procesos de extracción.

Para optimizar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos totales empleando la extracción convencional sólido líquido, se construye un diseño factorial de 2^3 a través de Box-Behnken. Este modelo ha sido empleado satisfactoriamente por otros investigadores

En base a los datos obtenidos, el efecto cuadrático de los factores % solvente, tiempo y temperatura en la determinación de compuestos fenólicos totales es significativo.

La finalidad del modelo de la ecuación es reproducir el comportamiento de las variables independientes con respecto a la variable dependiente. En este caso el modelo expresa el

91.7 % de la variabilidad en la extracción de compuestos fenólicos totales, dicho resultado se encuentra por encima del 70 %, valor sugerido como mínimo para procesos de optimización (84).

Esto significa que el modelo representa adecuadamente el proceso, alcanzando una recuperación máxima de compuestos fenólicos totales del 91.7 % bajo las condiciones analizadas empleando solvente binario EtOH 47 %, tiempo de extracción 180 minutos con una temperatura de tratamiento de 85 °C.

8.3 Extracción asistida por ultrasonido:

La técnica de extracción asistida por ultrasonido (EAU) es simple y de bajo costo de equipamiento. Se basa en el uso de energía derivada del ultrasonido (ondas sonoras con frecuencias superiores a 20 kHz) para facilitar la extracción de los analitos de la muestra sólida por el disolvente, que se selecciona en función de la naturaleza de los solutos a extraer. Esta técnica se ha utilizado para extraer varios compuestos orgánicos de diferentes matrices, incluidos los compuestos fenólicos en uva.

8.3.1 Selección de la amplitud:

La energía proporcionada por el ultrasonido es necesaria para obtener compuestos de una determinada matriz. Sin embargo, esta energía también puede acelerar el proceso de degradación de los compuestos fenólicos. Se ha encontrado que durante la extracción asistida por ultrasonido (durante 30 minutos) se puede producir una degradación hasta el 75 % (55) y todas las reacciones se promueven cuando se utilizan altas amplitudes, incluyendo la formación de radicales libres (85). En estos casos, los compuestos fenólicos pueden sufrir reacciones de oxidación.

A partir de los resultados obtenidos se observa que hay un incremento significativo en la cantidad de compuestos fenólicos totales al emplear una amplitud del 50 %. A partir de este porcentaje de amplitud se observa un incremento no significativo en la cantidad total de

compuestos fenólicos extraídos. La amplitud al 50 % logra obtener un mayor porcentaje de recuperación en la extracción de compuestos fenólicos totales.

Del mismo modo, Carrera et al. (55) estudiaron la extracción de compuestos fenólicos totales, taninos condensados y antocianinas mediante extracción asistida por ultrasonido. Evaluaron tanto para diferentes amplitudes como para ciclos de trabajo a diferentes tiempos a partir de los valores más bajos permitidos por el sistema. Llegaron a la conclusión que cuanto mayor es la amplitud, mayor es la recuperación. En la mayoría de los casos no hubo diferencias significativas entre el 100 % de amplitud y el 50% de amplitud. Se encontró el mismo efecto para el ciclo de trabajo. Sin embargo, las recuperaciones encontradas usando 100 % de amplitud y ciclo de trabajo fueron siempre significativas.

8.3.2 Selección del tiempo de extracción:

A partir de los resultados obtenidos se observa que hay un incremento significativo en la cantidad de compuestos fenólicos totales hasta el minuto 10 de extracción. A partir de este tiempo se observa un pequeño incremento en la cantidad total de compuestos fenólicos extraídos, aunque dicha disminución no es estadísticamente significativa. Por tanto, se obtiene que 10 minutos de extracción es el tiempo que logra obtener mayor porcentaje de recuperación en la extracción de compuestos fenólicos totales.

Ello coincide con las observaciones de Ghafoor et al. (86), quienes indicaron que el efecto ejercido por el tiempo de extracción es el más significativo en la EAU de fenólicos y en la capacidad antioxidante de los extractos de piel y pepitas de uva.

8.3.3 Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos totales por EAU:

La finalidad del modelo es reproducir el comportamiento de las variables independientes con respecto a la variable dependiente (concentración de compuestos fenólicos totales).

Para optimizar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos totales empleando la extracción asistida por ultrasonido, se construye un diseño factorial de 2^3 a través de Box-Behnken, este modelo ha sido empleado satisfactoriamente por otros investigadores como Carrera et al. (55) y Ghafoor et al. (86).

En función de los datos obtenidos, el efecto cuadrático de los factores amplitud, ciclo de trabajo y tiempo en la determinación de compuestos fenólicos totales tienen efecto significativo en el proceso de extracción de dichos compuestos.

En general, se observa una clara tendencia en los valores del contenido total de compuestos fenólicos para las combinaciones de las variables estudiadas como se observa en la figura 25 se evidenció que conforme aumenta el tiempo, la amplitud y el ciclo de trabajo, la cantidad total de compuestos fenólicos aumentan gradualmente. Con los resultados obtenidos, se presume que los valores de los compuestos fenólicos totales tiende a incrementarse con la amplitud y el tiempo de extracción. Del mismo modo Carrera et al. (55) determinaron que la amplitud, ciclo de trabajo y tiempo de extracción son parámetros que necesitan ser controlados para obtener un mejor rendimiento del contenido fenólicos en muestras de uva.

La finalidad del modelo de la ecuación es reproducir el comportamiento de las variables independientes con respecto a la variable dependiente. En este caso el modelo expresa el 98.7 % de la variabilidad en la extracción de compuestos fenólicos totales. Dicho resultado se encuentra por encima del 70 %, valor sugerido como mínimo para procesos de optimización (84). Esto significa que el modelo representa adecuadamente el proceso, alcanzando una recuperación máxima de compuestos fenólicos totales del 90.23 % bajo las condiciones analizadas empleando amplitud 90 %, ciclo de trabajo 1.0 s y tiempo 15 minutos. En nuestro trabajo, se obtuvieron valores muy cercanos a las condiciones optimizadas por Ghafoor et al. (86). Asimismo se obtuvo como valor máximo 18.61 mgGAE/g en cáscara de la variedad Quebranta, siendo este valor mucho mayor al obtenido en el estudio de Ghafoor et al. (86). Una posible explicación podría ser que la intensidad o potencia del ultrasonido haya sido menor que la usada en el nuestro trabajo.

8.4 Análisis por cromatografía líquida:

El análisis del perfil de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos por método convencional y extracción asistida por ultrasonido se llevó a cabo mediante un análisis de HPLC-RP-DAD, con la finalidad de determinar la composición fenólica individual de cada uno de ellos.

En cuanto al extracto obtenido extracción asistida por ultrasonido, el grupo fenólico principal fue el de los flavanoles, destacando la catequina como componente mayoritario. El segundo grupo fue el de los flavonoles, donde resalta la quercetina-3-Oglucosido coincidiendo con Nieto (87). No se identificó al resveratrol. El perfil fenólico general de los tres extractos obtenidos a partir del método convencional y extracción asistida por ultrasonido de cáscara de vid, resultó similar. Sin embargo, la extracción asistida presentó mayores concentraciones de dichos compuestos.

Coincidiendo con Figueredo-Gonzales (88), el derivado glucosilado de la quercetina fue uno de los flavonoles mayoritarios.

8.5 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de metálicas

8.5.1 Extractos obtenidos de la optimización de la extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido.

8.5.1.1 Espectros UV-visible de las soluciones del extracto filtrado y sin filtrar

Se evidenció que los extractos sin filtrar obtenidos por diferentes métodos son agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de oro y de plata, debido a que estos extractos presentan una banda de absorción en la región ultravioleta alrededor de 280 nm que corresponde a la transición electrónica $n \rightarrow \pi$ del grupo $C=C$. A su vez, los anillos bencénicos presentan un pico máximo en dicha longitud de onda, lo que puede considerarse como un índice válido del conjunto de los polifenoles totales. Sin embargo, no se evidenció la síntesis

de nanopartículas tanto de oro ni de plata con los extractos filtrados, a pesar que se observa en el espectro UV-visible presencia de polifenoles. Dichos extractos no fueron lo suficientemente buenos en la reducción de los iones metálicos. Es muy probable que los compuestos fenólicos responsables de la reducción quedaran adheridos a la superficie del carbono activo granular que se empleó en el proceso de purificación de los extractos en estudio. Asimismo se confirmó que la presencia de compuestos fenólicos juega un papel importante durante el proceso de reducción de los iones metálicos en la síntesis de nanopartículas, ya que estos muestran una afinidad hacia la superficie de las nanopartículas, por lo cual pueden ser estabilizados a través de interacciones electrostáticas con estos grupos (63).

8.5.1.2 Espectro FT-IR del extracto filtrado y sin filtrar

Los resultados obtenidos del FT-IR mostraron grupos funcionales correspondientes a los principales componentes del extracto, en su mayoría se evidencia presencia de grupos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoles.

La presencia de compuestos fenólicos se puede evidenciar en la zona de huella dactilar, como la banda en 1384 cm^{-1} que es característica de la deformación en el plano del enlace O-H de compuestos fenólicos, y la banda en 1274 cm^{-1} que es característica de los flavonoles. Además la presencia de esta familia de compuestos está indicada por bandas características para el ácido gálico a $669, 763, 1025, 1100$ y 1654 cm^{-1} y el ácido tánico a $669, 860, 1172, 1511$ y 1627 cm^{-1} (89,90). Huang et al. (91), evidenciaron que los grupos hidroxilo y ácido carboxílico presentes en el extracto de cilantro desempeñaron un papel esencial en la reducción de los iones de plata y también controlaron el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas formadas. Aunque hasta la fecha se requiere un estudio más detallado para establecer el mecanismo de formación y estabilización de las nanopartículas de plata.

8.5.2 Caracterización de nanopartículas de oro y plata

8.5.2.1 Caracterización UV-visible de nanopartículas de oro y plata

Los espectros UV-visible obtenidos (Figura 30 y 31), muestra que los valores medios de las absorbancias máximas obtenidos para la síntesis de nanopartículas de oro – método B y nanopartículas de plata método A y B se encuentran dentro del rango 240 – 300 nm y 205 – 240 nm respectivamente. En la Figura 30 de la síntesis de nanopartículas de oro, no hubo presencia de otros picos de absorbancia máxima en la síntesis usando los extractos al 50% tanto para el método A como para el método B.

Morales et al. (92) observaron en los espectros UV-visible, longitudes de onda para nanopartículas de plata en el rango de 400 a 450 nm, lo cual fue atribuido a la formación del pico de resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas, indicando así la formación de estas. En nuestro caso el desplazamiento de la banda de absorción hacia el UV puede deberse a múltiples factores, siendo el principal el tamaño promedio de las nanopartículas.

La síntesis involucra la reducción de los iones metálicos usando el extracto que es rico en compuestos fenólicos. La reacción ocurre en una sola etapa, siendo el extracto uno de los componentes claves en el proceso de síntesis, debido a que la morfología de las nanopartículas depende de la relación del extracto/ion metálico.

Existen diferentes parámetros que pueden ser ajustados para controlar el tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de las nanopartículas metálicas. A pesar de la gran versatilidad del método, la síntesis química de AgNPs y AuNPs usando extractos de cáscara de uva, aún no ha sido completamente estudiada (63).

Se ha demostrado que el papel de los extractos de cáscara de uva ricos en compuestos fenólicos en las síntesis acuosas de las nanopartículas, tiene una doble función como agente reductor y estabilizador (93–95). Sin embargo, no existe información clara del mecanismo de reducción.

8.5.2.1 Caracterización SEM de nanopartículas de oro y plata

La morfología superficial, el tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas se analizaron mediante microscopio electrónico de barrido. Las Figuras 32 y 33 muestran la imagen SEM de nanopartículas de oro y de plata sintetizadas a partir de extractos obtenidos por método convencional y extracción asistida por ultrasonido. Las imágenes de SEM muestran nanopartículas de oro y de plata predominantemente en forma de conglomerados. Se aprecia agregados sin morfología definida.

Del estudio de análisis elemental, se confirmó la formación de nanopartículas de oro como de plata. Los picos EDS correspondientes al elemento oro cero valente, mostraron la presencia de oro como elemento mayoritario obtenido de la síntesis empleando tanto el método A como el método B equivalente a $56.05 \pm 5.54 \%$ y $56.62 \pm 4.12 \%$ respectivamente. Asimismo los picos EDS correspondientes al elemento plata cerovalente, mostraron la presencia de plata como elemento mayoritario obtenido de la síntesis empleando tanto el método A como el método B equivalente a $65.63 \pm 2.71 \%$ y $96.95 \pm 1.99 \%$, respectivamente. Por lo tanto, la síntesis de plata empleando el método B fue la que dio mejores resultados. Cabe mencionar que las nanopartículas son altamente reactivas debido a su alta relación superficie a volumen.

9. CONCLUSIONES

- En la evaluación de las variables solvente, tiempo y temperatura en el proceso de extracción convencional, se determinó las condiciones en donde se obtuvo mayor rendimiento en la extracción de compuestos fenólicos totales a partir de cáscara de uva. Estas condiciones fueron solvente binario EtOH 50 % (v/v), tiempo de 180 minutos y temperatura de 80 °C.
- Se logró optimizar las condiciones de sistema de solvente, tiempo y temperatura de tratamiento mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta a través del diseño Box-Behnken. Las condiciones optimizadas fueron solvente EtOH 47 % (v/v), tiempo de 184 minutos y temperatura de 85 °C en la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales empleando la extracción convencional.
- En la evaluación de las condiciones de % de amplitud y tiempo de irradiación en el proceso mediante el uso de la extracción asistida por ultrasonido, se determinó las condiciones en donde se obtuvo mayor rendimiento en la extracción de los compuestos fenólicos totales para la extracción de compuestos fenólicos en cáscara de uva. Estas condiciones fueron amplitud de 50 % y tiempo de irradiación de 10 minutos.
- Se logró optimizar las condiciones de % de amplitud, ciclo de trabajo y tiempo de irradiación mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta a través del diseño Box-Behnken. Las condiciones optimizadas fueron amplitud de 90 %, ciclo de trabajo de 1.0 s y tiempo de irradiación de 15 minutos en la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales empleando la extracción asistida por ultrasonido.
- Respecto al perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los extractos obtenidos con los parámetros optimizados de los dos métodos de extracción, se observó que la catequina y quercetina-3-β-glucósido fueron las que

presentaron mayores concentraciones tanto en la extracción convencional como en la extracción asistida por ultrasonido; siendo esta última la que presentó mayor concentración. Sin embargo, para una mejor evaluación del perfil cromatográfico se necesita analizar el análisis empleando otro tipo de detector como espectrometría de masas.

- Se logró obtener un alto porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos totales tanto del método de extracción convencional como con el de extracción asistida por ultrasonido, empleando en ambos casos las condiciones optimizadas. Los resultados obtenidos fueron representativos con un 90.2 % para la extracción convencional y 88.9 % para la extracción asistida por ultrasonido.
- Fue posible sintetizar nanopartículas de oro y de plata a partir de los extractos obtenidos mediante la extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido, usando las condiciones optimizadas en ambos casos. Los extractos obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonido mostraron mejores resultados en la síntesis de nanopartículas de plata y de oro. Las mediciones por UV-visible de las nanopartículas obtenidas presentaron intensas bandas de absorción característica del plasmón de resonancia de las nanopartículas de plata. Sin embargo, para las nanopartículas de oro solamente se presentó una ligera banda de absorción empleando los extractos al 100 %. Los estudios por SEM y el análisis elemental han mostrado la formación de las nanopartículas tanto de oro como de plata, siendo esta última la que dio mejores resultados. Las respuestas de las nanopartículas ha sido diferente para cada proceso de extracción debido a la diferente composición química de cada uno de los extractos.
- Se puede afirmar que se lograron los objetivos planteados para el aprovechamiento del residuo proveniente del proceso de vinificación, los cuales, por la presencia de compuestos fenólicos pueden tener una diversidad de aplicaciones. En este estudio se ha obtenido evidencias para una posible obtención de nanopartículas metálicas.

10. RECOMENDACIONES

Las siguientes son recomendaciones para futuras investigaciones siguiendo la línea del proyecto.

- Para una mejor caracterización de los compuestos fenólicos en el extracto, se sugiere evaluar el perfil cromatográfico usando distintos tipos de detectores como IT-MS, ESI-TOF-MS, QTOF-MS, que faciliten la identificación de los compuestos presentes en los extractos evaluados.
- Desarrollar un diseño experimental para evaluar la influencia de los parámetros que controlan la forma y el tamaño de las nanopartículas (oro, plata y otros). Asimismo evaluar la estabilidad de las mismas y su caracterización y estudiar sus posibles aplicaciones incluyendo aplicaciones biomédicas, químicas, fotoquímicas y fotovoltaicas.
- En búsqueda de nuevas alternativas que conduzcan a la sostenibilidad ambiental, se sugiere estudiar la síntesis de las nanopartículas metálicas empleando los principios de la química verde mediante el uso de alguna métrica que se ajuste al proceso de síntesis.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Banco Mundial. Análisis Integral de Logística en Perú parte 2e: Resultados por productos: Uva. Práctica Global de Transporte y Tecnologías de la Información Región de América Latina y el Caribe. 2016 [cited 2016 Nov];1–44. Available from: <https://www.mincetur.gob.pe>
2. Ramos Ramos RJ. Estudio de pre factibilidad para el desarrollo industrial de productos alternativos en base a subproductos derivados de la industria vitivinícola en la región de Ica [Tesis]. Pontificia Universidad Católica del Perú; 2015.
3. Barcia MT, Pertuzatti PB, Bochi VC, Hermosín-gutiérrez I, Godoy HT. Vinification By-products and Their Phenolic Compounds. *American Journal of Food Science and Technology*. [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan];3(4):18–23. Available from: doi: 10.12691/ajfst-3-4A-4
4. Martínez M, Usaquén XP. Evaluación del efecto de pre-tratamiento con ultrasonido sobre el nivel de extracción y la actividad de sustancias antioxidantes contenidas en el bagazo de uva (*Vitis vinifera*) [Tesis]. Universidad de la Sabana; 2005.
5. Sun B, Spranger I, Roque-do-Vale F, Leandro C, Belchior P. Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2001 [cited 2016 Jan];49(12):5809–16. Available from: doi: 10.1021/jf010661v
6. Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2011 [cited 2016 Mar];29(3):365–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>
7. Paladino SC, Zuritz CA. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: Eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* [Internet] 2011 [cited 2016 Feb];43(1),187-199. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/refca/v43n1/v43n1a13.pdf>
8. Thoo YY, Ho SK, Liang JY, Ho CW, Tan CP. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem* [Internet]. 2010 [cited 2016 Jul];120(1):290–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064>
9. Taylor P, Júnior DS, Krug FJ, Pereira MDG. Currents on Ultrasound Assisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination. *Appl Spectrosc* [Internet]. 2007 [cited 2016 Jun];41:305–21. Available from: doi: org/10.1080/05704920600620436
10. Novak I, Janeiro P, Seruga M, Oliveira-Brett AM. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-

- performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* [internet]. 2008 [cited 2016 Dec];630(2):107–15. Available from: doi: 10.1016/j.aca.2008.10.002
11. Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem* [Internet]. 2010 [cited 2016 Feb];119(2):851–8. Available from: doi: org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046
 12. Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant’Ana AS, Orlie V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2016 [cited 2016 May];49:96–109. Available from: doi: org/10.1016/j.tifs.2016.01.006
 13. Parniakov O, Deng Q, Patras A, Rosello E. Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. *Food Engineering Reviews* [Internet]. 2015 [cited 2016 Jun];8(2):214-234. Available from: doi: org/10.1007/s12393-015-9131-1
 14. Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2008 [cited 2016 Jun];9(1):85–91. Available from: doi: org/10.1016/j.ifset.2007.06.002
 15. Vilku K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [Internet]. 2008 [cited 2016 Jan];9(2), 161-169. Available from: doi: org/10.1016/j.ifset.2007.04.014
 16. Baydar, N. G., Babalik, Z., Türk, F. H., & Cetin ES. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. *J Agric Sci* [Internet]. 2011 [cited 2016 May];17: 67-76. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TR2013000709>
 17. Sánchez MLF. Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial. [Tesis]. Universitat Rovira i Virgili; 2012.
 18. Contini M, Baccelloni S, Massantini R, Anelli G. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chem* [Internet]. 2008 [cited 2016 May];110(3):659–69. Available from: doi: org/10.1016/j.foodchem.2008.02.060
 19. Silva EM, Pompeu DR, Larondelle Y, Rogez H. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2007 [cited 2016 Jul];53(3):274–80. Available from: doi: org/10.1016/j.seppur.2006.07.012
 20. INDECOPI. Mercado del Pisco [Internet]. Lima; 2016 [cited 2017 Aug];33:3-28 Available from: <https://www.indecopi.gob.pe>

21. MINAGRI. Dirección de Estadística [Internet]. Lima; 2008 [cited 2016 Dec];1-43. Available from: <http://www.minagri.gob.pe>
22. MINAGRI. Sistema Integrado de Estadística Agraria [Internet]. Lima; 2015 [cited 2017 Jul];10-165. Available from: <http://www.minagri.gob.pe>
23. Moncayo L. Caracterización de los piscos del Perú a través de su composición aromática. [Tesis]. Universidad de Zaragoza; 2014. Available from: <https://zaguan.unizar.es/record/13513?ln=es>
24. INDECOPI. Norma Técnica Peruana: Bebidas alcohólicas. Pisco. Requisitos [Internet]. 2006 [cited 2016 Jun];1-29. Available from: <http://www.indecopi.gob.pe>
25. Comercio E. Producción de pisco peruano alcanzó niveles históricos en el 2016. El Comercio Perú [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul]. Available from: <http://elcomercio.pe/economia/peru/produccion-nacional-pisco-alcanzo-niveles-historicos-2016-426264>
26. Paladino SC. Actividad antioxidante de los compuesto fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.) [Tesis]. Universidad Nacional de Cuyo; 2008. Available from: <http://bdigital.uncu.edu.ar/2627>
27. Fontana AR, Antonioli A, Bottini R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep];61(38):8987–9003. Available from: doi: 10.1021/jf402586f.
28. Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2005 [cited 2016 Jun];45:85–118. Available from: doi: 10.1080/10408690490911710
29. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad. *Mutat Res* [Internet]. 2008 [cited Jul];658(1–2):68–94. Available from: doi: 10.1016/j.mrrev.2007.08.004
30. Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R. Metabolite profiling of grapes: flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2006 [cited 2016 Jun];54:7692–702. Available from: doi: 10.1021/jf061538c
31. Castillo N, Gómez S, García E, Gómez MV, Velders AH, Hermosín I. Flavonol 3- O -Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2009 [cited 2016 Agust];57(1):209–19. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf802863g>
32. Gutiérrez IH, Lorenzo ESP, Espinosa AV. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem* [Internet]. 2005 [cited 2016 Oct.];92(2):269–83. Available from: doi: org/10.1016/j.foodchem.2004.07.023
33. Sáenz MP, Tao YS, Dizy M, Ferreira V, Fernández P. Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and

- their correlation to quality perception. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2010 [cited 2016 Oct];58(23):12407–16. Available from: doi: 10.1021/jf102546f
34. Corrales M, García AF, Butz P, Tauscher B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *J Food Eng* [Internet]. 2009 [cited 2016 Sep];90(4):415–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.003>
 35. Ballard TS. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins. [Tesis]. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University; 2008. Available from: <https://theses.lib.vt.edu>
 36. Venanzi LH. Estudio de métodos de extracción de compuestos fenólicos de orujos provenientes de vinificación de uvas cv Malbec. [Tesis]. Universidad Nacional de Cuyo; 2014. Available from: <http://bdigital.uncu.edu.ar/6467>
 37. Karacabey E, Mazza G. Optimization of solid-liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem* [Internet]. 2008 [cited 2016 Apr];56(15):6318–25. Available from: doi: 10.1021/jf800687b
 38. Liyana-pathirana C, Shahidi F. Food Chemistry Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry* [Internet]. 2004 [cited 2016 Nov];93(1):47-56. Available from: doi: org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050
 39. Silva EM, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* [Internet]. 2007 [cited 2016 Sep.];55(3), 381-387. Available from: doi: org/10.1016/j.seppur.2007.01.008
 40. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng* [Internet]. 2007 [cited 2016 Oct];81(1):200–8. Available from: doi:org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021
 41. Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 [cited 2016 Oct];53(6):2111–7. Available from: doi: 10.1021/jf0488110
 42. Medouni-Adrar S, Boulekbache-Makhlouf L, Cadot Y, Medouni-Haroune L, Dahmoune F, Makhoukhe A, et al. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb];77:123–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.039>
 43. Garcia-castello EM, Rodriguez-lopez AD, Mayor L, Ballesteros R, Conidi C, Cassano A. Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *Food Sci Technol* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jan];64(2):1114–22. Available from: doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.024

44. Jeganathan PM, Venkatachalam S, Karichappan T, Ramasamy S. Preparative Biochemistry and Biotechnology Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using Box – Behnken. *Prep Biochem Biotechnol* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jan];37–41. Available from: doi: 10.1080/10826068.2013.791629.
45. Larrea J. Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. [Tesis]. Universidad Pública de Navarra; 2012. Available from: <http://academica-e.unavarra.es/handle/2454/6531>
46. Carciochi RA, Manrique D. Obtención de ingredientes alimenticios con capacidad antioxidante mejorada por aplicación de distintos procesos a semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa*). [Tesis]. Universidad de Buenos Aires; 2014. Available from: <http://repositorioubas.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba>
47. Cheng X, Zhang M, Xu B, Adhikari B, Sun J. The principles of ultrasound and its application in freezing related processes of food materials: A review. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul];27:576–85. Available from: doi: org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.015
48. Djilani A, Legseir B, Soulimani R, Dicko A. New Extraction Technique for Alkaloids. *J Braz Chem Soc* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jul];17(3):518–20. Available from: doi: org/10.1590/S0103-50532006000300013
49. Yang CL. Electrochemical coagulation for oily water demulsification. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2007[cited 2017 Apr];54(3):388–95. Available from: doi: org/10.1016/j.seppur.2006.10.019
50. Izquierdo AI. Estudio comparativo de cuatro métodos de extracción de compuestos fenólicos de bayas de vitis vinifera. [Tesis]. Universidad de Chile; 2011. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111142>
51. Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jul];13(6):543–8. Available from: doi: org/10.1016/j.ultsonch.2005.09.009
52. Luque JL, Luque De Castro MD. Ultrasound: A powerful tool for leaching. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2003 [2016 Dec];22(1):41–7. Available from: doi: org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X
53. Piñeiro Z, Marrufo CA, Serrano MJ, Palma M. Ultrasound-assisted extraction of stilbenes from grape canes. *Molecules* [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr];1-12. Available from: doi:10.3390/molecules21060784
54. Liu L, Shen B-J, Xie D-H, Cai B-C, Qin K-M, Cai H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cimicifugae rhizoma* with response surface methodology. *Pharmacogn Mag* [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug];11(44):682–9. Available from: 10.4103/0973-1296.165545.
55. Carrera C, Ruiz A, Palma M, Barroso CG. Ultrasound assisted extraction of phenolic

- compounds from grapes. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2012 [cited 2016 Nov];732:100–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
56. González MR, Knoerzer K, Sabarez H, Simal S, Rosselló C, Femenia A. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jan];21(6):2176–84. Available from: doi: [10.1016/j.ultsonch.2014.01.021](http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021)
 57. Piñeiro Z, Marrufo CA, Serrano M, Palma M. Ultrasound-Assisted Extraction of Stilbenes from Grape Canes. *Molecules* [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug];21(6):784. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/784>
 58. Romano I, Lijima S, Nanotecnolog L, Nanotecnolog L. Nanopartículas de plata : obtención , utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jun];58(260):19–28. Available from: <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanoparti%CC%81culas-de-plata.pdf>
 59. Panigrahi S, Praharaj S, Basu S, Kumar SG, Jana S, Pande S, et al. Self-Assembly of Silver Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Optical Properties, and Application in Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem* [Internet]. 2006 [cited 2017 Apr];110(27),13436–13444. Available from: doi: [10.1021/jp062119i](https://doi.org/10.1021/jp062119i) 2006
 60. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jun];31(2):346–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
 61. Ismail EH, Khalil MMH, Seif F, El-magdoub F. Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Extract of Grape (*Vitis Vinifera*) Leaves and Seeds. *Prog Nanotechnol Nanomater* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jun];3:1–12. Available from: <http://www.academicpub.org/pnn>
 62. Xu H, Wang L, Su H, Gu L, Han T, Meng F, et al. Making Good Use of Food Wastes: Green Synthesis of Highly Stabilized Silver Nanoparticles from Grape Seed Extract and Their Antimicrobial Activity. *Food Biophys* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun];10(1):12–8. Available from: doi: [10.1007/s11483-014-9343-6](https://doi.org/10.1007/s11483-014-9343-6)
 63. Krishnaswamy K, Vali H, Orsat V. Value-adding to grape waste: Green synthesis of gold nanoparticles. *J Food Eng* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jun];142:210–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.014>
 64. Zia M, Gul S, Akhtar J, Abbasi BH, Hussain A, Naz S, et al. Green synthesis of silver nanoparticles from grape and tomato juices and evaluation of biological activities. *IET Nanobiotechnol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul];11(2):193-199. Available from: doi: [10.1049/iet-nbt.2015.0099](https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0099).
 65. Farhadi S, Ajerloo B, Mohammadi A. Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of Silver nanoparticles by using grapes fruit extract and study of antibacterial and catalytic effects. *Int J Nano Dimens J Nano Dimens* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul];8(81):49–60. Available from:

http://www.ijnd.ir/article_24376_a5cd6101911c71c1a85b022e44fd4ded.pdf

66. Spigno G, De Faveri DM. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J Food Eng* [Internet]. 2007 [cited 2016 Jun];78(3):793–801. Available from: doi: org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.020
67. Li H Bin, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2008 [cited 2016 Jul];41(3):385–90. Available from: doi: org/10.1016/j.lwt.2007.03.011
68. Amendola D, De Faveri DM, Spigno G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J Food Eng* [Internet]. 2010 [cited 2017 Jan];97(3):384–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.033>
69. Bucic A, Planinic M, Tomas S, Jakobek L, Šeruga M. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. 2009 [cited 2016 Dec];44(12):2394–401. Available from: doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x
70. Rushing H, Karl A, Wisnowski J. Design and Analysis of Experiments. *Des Anal Exp by Douglas Montgomery: A Suppl Using JMP*. [Internet]. North Caroline. USA, 2013 [cited 2017 Jan];101–28. Available from: https://www.sas.com/storefront/aux/en/spdesignanlysisjmp/66584_excerpt.pdf
71. Teresa M, Sánchez DÁ, García-Alamilla P, Lagunes-Gálvez LM, García-Alamilla R, Gregorio E, et al. Aplicación de metodología de superficie de respuesta para la degradación de naranja de metilo con tio 2 sol-gel sulfatado. *Rev. Int. Contam. Ambient. México* [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug]. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v31n1/v31n1a8.pdf>
72. Zlabur Lana, Voca Sandra, Dobricevic Nadica, Brncic Nladen, Dujmic Filip BS. Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int Agrophysics* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jan];29(2):231–7. Available from: doi: 10.1515/intag-2015-0017
73. Fanzone M, Peña-Neira Á, Jofre V, Assof M, Zamora F. Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *J Agric Food Chem* [Internet]. 2010 [cited 2017 Jan];58(4):2388–97. Available from: doi: 10.1021/jf903690v
74. Fanzone M, Zamora F, Jofré V, Assof M, Peña-Neira Á. Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. effect of cluster thinning. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jan.];59(11):6120–36. Available from: doi: 10.1021/jf200073k
75. Roy K, Biswas S, Banerjee PC. “Green” synthesis of silver nanoparticles by using grape (*Vitis vinifera*) fruit extract: Characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Res J Pharm Biol Chem Sci* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr];4(1):1271–8. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/>

76. Agatonovic-Kustrin S, Morton DW, Yusof APM. The Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Artificial Neural Networks (ANNs) to Assess Wine Quality. *Mod Chem Appl* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jun];1(4). Available from: doi: 10.4172/2329-6798.1000110
77. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev* [Internet]. 2007 [cited 2017 Aug];42(5):493–541. Available from: doi: org/10.1080/05704920701551530
78. Zhang Y, Chen J, Lei Y, Zhou Q, Sun S, Noda I. Discrimination of different red wine by Fourier-transform infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *J Mol Struct* [Internet]. 2010 [cited 2017 Aug];974(1–3):144–50. Available from: doi: org/10.1016/j.molstruc.2010.03.021
79. Özacar M, Soykan C, Sengil LA. Studies on synthesis, characterization, and metal adsorption of mimosa and valonia tannin resins. *J Appl Polym Sci* [Internet]. 2006 [cited 2017 Aug];102(1):786–97. Available from: doi: 10.1002/app.23944
80. Zhang ZS, Li D, Wang LJ, Ozkan N, Chen XD, Mao ZH, et al. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2007 [cited 2017 Jan];57(1):17–24. Available from: doi: org/10.1016/j.seppur.2007.03.006
81. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* [Internet]. 2005 [cited 2017 Jan];71(2):214–22. Available from: doi: org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036
82. Chen F, Sun Y, Zhao G, Liao X, Hu X, Wu J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2007 [cited 2017 Jul];14(6):767–78. Available from: doi: org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.011
83. Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem* [Internet]. 2005 [cited 2017 Jan];92(1):109–17. Available from: doi: org/10.1016/j.foodchem.2004.07.015
84. Gutierrez Pulido H, Vara Salazar R. *Análisis y diseño de experimentos*, 2da Edición. Mc Graw Hill Mexico [Internet]. 2016. [cited 2017 Aug];564. Available from: <http://biblioteca.soymercadologo.com/wp-content/uploads/2016/05/An%C3%A1lisis-y-Dise%C3%B1o-de-Experimentos-2ed-Guti%C3%A9rrez-Pulido.pdf>
85. Luque de Castro MD, Priego F. Ultrasound assistance to liquid–liquid extraction: A debatable analytical tool. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2007 [cited 2017 Jul];583(1):2–9. Available from: doi: 10.1016/j.aca.2006.09.039
86. Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, Jo IH. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2009 [cited 2016 Nov];57(11):4988–94.

Available from: doi: 10.1021/jf9001439.

87. Nieto J. Comprehensive study on the grape (*Vitis vinifera* L.) as a source of bioavailable phenolic compounds with biological activity. [Tesis]. Universidad Autónoma de Madrid; 2015. Available from: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/152067/1/nietotesis.pdf>
88. Figueiredo M, Regueiro J, Cancho B, Simal J. Garnacha. Tintorera based sweet wines: Detailed phenolic composition by HPLC/DAD-ESI/MS analysis. *Food Chem* [Internet]. 2014 [cited 2017 Feb];143:282–92. Available from: doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.120.
89. Ragupathi Raja Kannan R, Arumugam R, Anantharaman P. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Seagrass Polyphenols. *Curr Bioact Compd* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun];7(2):118–25. Available from: doi: 10.2174/157340711796011142
90. Segura C, Guerrero C, Posada E, Mojica J, Perez W. Caracterización de residuos de la industria vinícola del valle de Sáchica con potencial nutricional para su aprovechamiento después del proceso agroindustrial. *Encuentro Nac Investig y Desarro ENID*, 2 [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul];6. Available from: doi: 10.13140/RG.2.1.3024.8406
91. Njagi EC, Huang H, Stafford L, Genuino H, Galindo HM, Collins JB, et al. Biosynthesis of iron and silver nanoparticles at room temperature using aqueous sorghum bran extracts. *Langmuir* [Internet]. 2011[cited 2017 Apr];27(1):264–71. Available from: doi: 10.1021/la103190n
92. Soriano F, Morales G, Acuña P. Incorporación de nanopartículas de plata en poliestireno de alto impacto: Efecto sobre la cinética de polimerización y la estructura morfológica. *Rev Iberoam Polímeros Vol Iberoam Polím* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jul];12(122):116–24. Available from: <http://www.reviberpol.iibcaudo.com.ve/pdf/MAR11/soriano.pdf>
93. Upadhyay RK, Soin N, Bhattacharya G, Saha S, Barman A, Roy SS. Grape extract assisted green synthesis of reduced graphene oxide for water treatment application. *Mater Lett* [Internet]. 2015 [cited 2016 Jul];160:355–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.07.144>
94. Xin Lee et al. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Garcinia mangostana* Fruit Peels. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr];7(2):25005. Available from: doi: [org/10.1155/2016/8489094](https://doi.org/10.1155/2016/8489094)
95. Roy K, Biswas S, Banerjee PC. Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Grape (*Vitis vinifera*) Fruit Extract: Characterization of the Particles and Study of Antibacterial Activity. *Res J Pharm Bio Chem Sci* [Internet]. 2013[cited 2017 Jul];4:1271–8. Available from: <https://www.researchgate.net/publication>

12. ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de la metodología Folin Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Anexo 1.1 Estadístico descriptivo de los datos en la curva de calibración.

	Media	Desviación estándar	N
DO 765 nm	1,026237	,6724529	24
ácido gálico mg/L	120,300	69,7823	24

Anexo 1.2 Correlaciones de los datos en la curva de calibración.

		DO 765 nm	ácido gálico mg/L
Correlación de Pearson	DO 765 nm	1,000	,998
	ácido gálico mg/L	,998	1,000
Sig. (unilateral)	DO 765 nm	.	,000
	ácido gálico mg/L	,000	.
N	DO 765 nm	24	24
	ácido gálico mg/L	24	24

Anexo 1.3 Cuadro resumen del modelo de regresión lineal.

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Estadísticos de cambio				
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
1	,998 ^a	,996	,995	,0458831	,996	4918,211	1	22	,000

a. Predictores: (Constante), ácido gálico mg/L

Anexo 1.4. Coeficientes del modelo de regresión lineal.

Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados	Error estándar	Coeficientes estandarizados	t	Sig.	95.0% intervalo de confianza para B	
						Beta	Límite inferior
1	(Constante)	-,130	,019		,000	-,170	-,091
	ácido gálico mg/L	,010	,000	,998	,000	,009	,010

a. Variable dependiente: DO 765 nm

Anexo 2. Interferencia de lípidos en la determinación de compuestos fenólicos totales.

Anexo 2.1 Estadístico descriptivo de los datos en la curva de calibración.

compuestos fenólico totales mg GAE/g de muestra

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					muestra desgrasado	4		
muestra sin desgrasar	4	12,548908	,5907129	,2953565	11,608952	13,488864	11,8346	13,2696
Total	8	12,098623	,7382759	,2610200	11,481409	12,715837	11,0219	13,2696

Anexo 3. Extracción convencional (sólido líquido).

Anexo 3.1 Selección del solvente: Resumen estadístico de la concentración (mg GAE/g de muestra seca).

SOLVENTE	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
EtOH 0%	4	5.49998	0.12121	2.20382%	5.4069	5.674
EtOH 10%	4	7.27633	0.048232	0.662861%	7.20438	7.30463
EtOH 20%	4	9.58042	0.21693	2.26431%	9.41745	9.88052
EtOH 30%	4	11.1663	0.2575	2.30605%	11.0208	11.5519
EtOH 40%	4	11.0034	0.53097	4.82551%	10.4305	11.7158
EtOH 50%	4	12.5654	0.617878	4.91729%	11.8346	13.3357
EtOH 60%	4	12.0368	0.245226	2.0373%	11.7443	12.3385
EtOH 70%	4	10.439	0.342555	3.28149%	10.1167	10.8878
EtOH 80%	4	9.34108	0.268835	2.87799%	9.13366	9.73412
Total	36	9.87874	2.19659	22.2356%	5.4069	13.3357

Anexo 3.2 Selección del solvente: Prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) para Concentración (mg GAE/g) por solvente.

Método: 95.0 porcentaje LSD

SOLVENTE	Casos	Media	Grupos Homogéneos
EtOH 0%	4	5.49998	X
EtOH 10%	4	7.27633	X
EtOH 80%	4	9.34108	X
EtOH 20%	4	9.58042	X
EtOH 70%	4	10.439	X
EtOH 40%	4	11.0034	X
EtOH 30%	4	11.1663	X
EtOH 60%	4	12.0368	X
EtOH 50%	4	12.5654	X

Anexo 3.3 Selección de temperatura: Resumen estadístico de la concentración (mg GAE/g de muestra seca).

TEMPERATURA	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
30	4	10.9427	1.68431	15.392%	9.44567
40	4	10.7835	0.836642	7.75855%	10.1831
50	4	11.9867	0.322262	2.6885%	11.5047
60	4	13.4635	0.353633	2.6266%	13.1351
70	4	16.2804	0.482263	2.96223%	15.8596
80	4	18.2567	0.0266605	0.146032%	18.2318
90	4	19.7694	1.89364	9.57869%	18.1158
Total	28	14.4976	3.54014	24.4189%	9.44567

Anexo 3.4 Selección de temperatura: Prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) para Concentración (mg GAE/g) por temperatura.

Método: 95.0 porcentaje LSD

TEMPERATURA	Casos	Media	Grupos Homogéneos
40	4	10.7835	X
30	4	10.9427	X
50	4	11.9867	XX
60	4	13.4635	X
70	4	16.2804	X
80	4	18.2567	X
90	4	19.7694	X

Anexo 3.5 Selección de tiempo: Resumen estadístico de la concentración (mg GAE/g de muestra seca).

TIEMPO minutos	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
5	4	5.85232	0.117696	2.0111%	5.7443
10	4	7.87688	0.31039	3.94052%	7.6075
15	4	8.6457	0.962298	11.1304%	7.7353
20	4	9.36555	0.0294784	0.314754%	9.3294
40	4	11.4696	0.391799	3.41597%	11.129
60	4	11.4122	0.864368	7.57407%	10.6537
80	4	12.1412	0.647627	5.33414%	11.1698
100	4	12.5222	0.43612	3.48278%	11.8681
120	4	13.3294	1.02345	7.67814%	12.2069
140	4	13.5864	1.3906	10.2353%	11.9689
160	4	13.361	2.48451	18.5953%	10.6936
180	4	15.6522	1.10678	7.07112%	14.0548
200	4	15.8278	0.548426	3.46496%	15.166
220	4	15.2324	2.28166	14.979%	13.14
240	4	15.4118	1.27343	8.2627%	13.9932
260	4	15.344	2.16134	14.0859%	13.4755
280	4	16.1714	0.957355	5.92007%	15.2967
300	4	16.4912	1.02253	6.20044%	15.0187
Total	72	12.7607	3.25856	25.5358%	5.7443

Anexo 3.6 Selección de tiempo: Prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) para Concentración (mg GAE/g) por tiempo.

Método: 95.0 porcentaje LSD

TIEMPO minutos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	4	-2.12008	X
10	4	-1.49878	X
15	4	-1.26283	X
20	4	-1.04193	X
60	4	-0.413842	X
40	4	-0.396216	X
80	4	-0.190135	XX
100	4	-0.0732053	XX
120	4	0.174513	X
160	4	0.18422	X
140	4	0.253382	XX
220	4	0.758525	XX
260	4	0.792755	X
240	4	0.813573	X
180	4	0.887333	X
200	4	0.941232	X
280	4	1.04667	X
300	4	1.14482	X

Anexo 3.7 Selección del tiempo: Resumen del modelo de regresión lineal.

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
,967	,935	,926	,854

La variable independiente es tiempo de extracción.

Anexo 3.8 Selección del tiempo: Resumen de coeficientes del modelo de regresión lineal.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
tiempo de extracción	,062	,008	1,961	7,885	,000
tiempo de extracción ** 2	,000	,000	-1,075	-4,323	,001
(Constante)	7,544	,454		16,627	,000

Anexo 3.9 Selección del tiempo: Resumen del modelo de regresión lineal de la velocidad.

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1,000	1,000	1,000	,000

La variable independiente es tiempo de extracción.

Anexo 3.10 Selección del tiempo: Resumen de coeficientes del modelo de regresión lineal de la velocidad.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
tiempo de extracción	-2,150	,000	-1,000		
(Constante)	1,961	,000		1474420,131	,000

Anexo 3.11 Condiciones experimentales en la optimización de las condiciones de extracción convencional de compuestos fenólicos totales.

% Solvente binario (v/v)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración (mg GAE/g)
50 (0)	180 (0)	80 (0)	14.8988
50 (0)	180 (0)	80 (0)	15.5876
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.0801
45 (-1)	160 (-1)	80 (0)	13.4502
55 (+1)	160 (-1)	80 (0)	13.3340
45 (-1)	200 (+1)	80 (0)	15.6644
55 (+1)	200 (+1)	80 (0)	14.5279
45 (-1)	180 (0)	75 (-1)	15.1908
55 (+1)	180 (0)	75 (-1)	16.3361
45 (-1)	180 (0)	85 (+1)	18.8403
55 (+1)	180 (0)	85 (+1)	17.5452
50 (0)	160 (-1)	75 (-1)	14.1672
50 (0)	200 (+1)	75 (-1)	15.9996
50 (0)	160 (-1)	85 (+1)	17.3383
50 (0)	200 (+1)	85 (+1)	18.3416

50 (0)	180 (0)	80 (0)	15.7053
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.5019
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.5224
45 (-1)	160 (-1)	80 (0)	14.2358
55 (+1)	160 (-1)	80 (0)	13.3340
45 (-1)	200 (+1)	80 (0)	16.9816
55 (+1)	200 (+1)	80 (0)	15.6040
45 (-1)	180 (0)	75 (-1)	15.4060
55 (+1)	180 (0)	75 (-1)	16.7183
45 (-1)	180 (0)	85 (+1)	20.2527
55 (+1)	180 (0)	85 (+1)	19.8148
50 (0)	160 (-1)	75 (-1)	14.1656
50 (0)	200 (+1)	75 (-1)	17.2410
50 (0)	160 (-1)	85 (+1)	18.0764
50 (0)	200 (+1)	85 (+1)	18.8917
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.4854
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.7092
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.7135
45 (-1)	160 (-1)	80 (0)	14.3007
55 (+1)	160 (-1)	80 (0)	13.3340
45 (-1)	200 (+1)	80 (0)	15.8740
55 (+1)	200 (+1)	80 (0)	15.5569
45 (-1)	180 (0)	75 (-1)	14.6047
55 (+1)	180 (0)	75 (-1)	16.7353
45 (-1)	180 (0)	85 (+1)	19.5855
55 (+1)	180 (0)	85 (+1)	19.3094
50 (0)	160 (-1)	75 (-1)	13.9902
50 (0)	200 (+1)	75 (-1)	16.5189
50 (0)	160 (-1)	85 (+1)	17.5961
50 (0)	200 (+1)	85 (+1)	18.7726
50 (0)	180 (0)	80 (0)	16.8232
50 (0)	180 (0)	80 (0)	17.1645
50 (0)	180 (0)	80 (0)	18.7800
45 (-1)	160 (-1)	80 (0)	14.5447
55 (+1)	160 (-1)	80 (0)	13.3327
45 (-1)	200 (+1)	80 (0)	15.7395
55 (+1)	200 (+1)	80 (0)	15.2266
45 (-1)	180 (0)	75 (-1)	17.3288
55 (+1)	180 (0)	75 (-1)	16.5009

45 (-1)	180 (0)	85 (+1)	20.0388
55 (+1)	180 (0)	85 (+1)	19.4400
50 (0)	160 (-1)	75 (-1)	14.4561
50 (0)	200 (+1)	75 (-1)	16.9885
50 (0)	160 (-1)	85 (+1)	16.9091
50 (0)	200 (+1)	85 (+1)	18.6946
50 (0)	180 (0)	80 (0)	17.0704
50 (0)	180 (0)	80 (0)	17.2586
50 (0)	180 (0)	80 (0)	17.2586
45 (-1)	160 (-1)	80 (0)	14.4961
55 (+1)	160 (-1)	80 (0)	13.3327
45 (-1)	200 (+1)	80 (0)	16.2606
55 (+1)	200 (+1)	80 (0)	15.4624
45 (-1)	180 (0)	75 (-1)	17.2263
55 (+1)	180 (0)	75 (-1)	16.3872
45 (-1)	180 (0)	85 (+1)	20.0473
55 (+1)	180 (0)	85 (+1)	19.7992
50 (0)	160 (-1)	75 (-1)	14.4482
50 (0)	200 (+1)	75 (-1)	17.7561
50 (0)	160 (-1)	85 (+1)	16.9219
50 (0)	200 (+1)	85 (+1)	18.7045

Anexo 4. Extracción asistida por ultrasonido

Anexo 4.1 Selección del % de amplitud: Resumen estadístico de la concentración (mg GAE/g de muestra seca).

AMPLITUD	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M_amp20%	4	10.5051	0.0925789	0.88128%	10.3718	10.5718
M_amp30%	4	11.6125	0.102073	0.878991%	11.4662	11.7033
M_amp40%	4	12.7931	0.369209	2.88601%	12.2394	12.9871
M_amp50%	4	14.263	0.0106221	0.0744737%	14.2511	14.2766
M_amp60%	4	14.1908	0.0169908	0.119731%	14.166	14.2046
M_amp70%	4	14.2589	0.00530935	0.0372353%	14.251	14.2623
M_amp80%	4	14.2997	0.00298147	0.0208499%	14.2966	14.3036
M_amp90%	4	14.1101	0.113305	0.803002%	13.9717	14.2478
Total	32	13.2541	1.40607	10.6085%	10.3718	14.3036

Anexo 4.2 Selección del % de amplitud: Prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) para Concentración (mg GAE/g) por amplitud.

Método: 95.0 porcentaje LSD

AMPLITUD	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M_amp20%	4	10.5051	X
M_amp30%	4	11.6125	X
M_amp40%	4	12.7931	X
M_amp90%	4	14.1101	X
M_amp60%	4	14.1908	X
M_amp70%	4	14.2589	X
M_amp50%	4	14.263	X
M_amp80%	4	14.2997	X

Anexo 4.3 Selección de tiempo: Resumen estadístico de la concentración (mg GAE/g de muestra seca).

TIEMPO	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
M_10min	4	15.2472	1.17356	7.69687%	14.2343	16.4335
M_15min	4	15.1894	0.108718	0.715749%	15.0305	15.2768
M_20min	4	15.9308	0.0231516	0.145326%	15.9071	15.9544
M_30min	4	15.9663	0.634008	3.97091%	15.4368	16.7154
M_40min	4	16.5469	0.136153	0.822827%	16.429	16.6648
M_5min	4	13.4492	1.4994	11.1487%	12.1487	14.8861
Total	24	15.3883	1.23951	8.05486%	12.1487	16.7154

Anexo 4.4 Selección del tiempo: Prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) para Concentración (mg GAE/g) por tiempo.

Método: 95.0 porcentaje LSD

TIEMPO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M_5min	4	13.4492	X
M_15min	4	15.1894	X
M_10min	4	15.2472	X
M_20min	4	15.9308	XX
M_30min	4	15.9663	XX
M_40min	4	16.5469	X

Anexo 4.5 Selección del tiempo: Resumen del modelo de regresión lineal.

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
,949	,901	,835	,437

La variable independiente es TIME.

Anexo 4.6 Selección del tiempo: Resumen de los coeficientes del modelo de regresión lineal.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
TIME	1,240	,511	2,155	2,426	,094
TIME ** 2	-,102	,071	-1,268	-1,428	,249
(Constante)	12,597	,781		16,130	,001

Anexo 4.7 Condiciones experimentales en la optimización de las condiciones de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos totales.

Amplitud (%)	Ciclo de trabajo (s)	Tiempo (min)	Concentración (mg GAE/g)
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.9501
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.9576
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.9628
50 (-1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.5571
90 (+1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.4067
50 (-1)	1 (+1)	10 (0)	14.6844
90 (+1)	1 (+1)	10 (0)	16.9151
50 (-1)	0.6 (0)	5 (-1)	13.5945
90 (+1)	0.6 (0)	5 (-1)	12.4090
50 (-1)	0.6 (0)	15 (+1)	13.5387
90 (+1)	0.6 (0)	15 (+1)	15.8226
70 (0)	0.2 (-1)	5 (-1)	12.9145
70 (0)	1 (+1)	5 (-1)	13.9786
70 (0)	0.2 (-1)	15 (+1)	14.0406
70 (0)	1 (+1)	15 (+1)	17.4016
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.9613
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.9679

70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.8482
50 (-1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.5549
90 (+1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.4887
50 (-1)	1 (+1)	10 (0)	14.7060
90 (+1)	1 (+1)	10 (0)	16.9379
50 (-1)	0.6 (0)	5 (-1)	13.5992
90 (+1)	0.6 (0)	5 (-1)	12.4181
50 (-1)	0.6 (0)	15 (+1)	13.5512
90 (+1)	0.6 (0)	15 (+1)	15.8336
70 (0)	0.2 (-1)	5 (-1)	12.9140
70 (0)	1 (+1)	5 (-1)	14.0044
70 (0)	0.2 (-1)	15 (+1)	14.0211
70 (0)	1 (+1)	15 (+1)	17.4045
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.8622
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.8666
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.8549
50 (-1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.5642
90 (+1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.4137
50 (-1)	1 (+1)	10 (0)	14.6942
90 (+1)	1 (+1)	10 (0)	16.9479
50 (-1)	0.6 (0)	5 (-1)	13.5782
90 (+1)	0.6 (0)	5 (-1)	12.4152
50 (-1)	0.6 (0)	15 (+1)	13.5287
90 (+1)	0.6 (0)	15 (+1)	15.8377
70 (0)	0.2 (-1)	5 (-1)	12.9147
70 (0)	1 (+1)	5 (-1)	13.9845
70 (0)	0.2 (-1)	15 (+1)	14.0297
70 (0)	1 (+1)	15 (+1)	17.4144
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.8427
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.5750
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.5471
50 (-1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.5394
90 (+1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.4141
50 (-1)	1 (+1)	10 (0)	14.6822
90 (+1)	1 (+1)	10 (0)	16.9051
50 (-1)	0.6 (0)	5 (-1)	13.5852
90 (+1)	0.6 (0)	5 (-1)	12.4142
50 (-1)	0.6 (0)	15 (+1)	13.5471
90 (+1)	0.6 (0)	15 (+1)	15.8302
70 (0)	0.2 (-1)	5 (-1)	12.9056
70 (0)	1 (+1)	5 (-1)	13.9892

70 (0)	0.2 (-1)	15 (+1)	13.9996
70 (0)	1 (+1)	15 (+1)	17.4201
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.5426
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.5447
70 (0)	0.6 (0)	10 (0)	14.5525
50 (-1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.5394
90 (+1)	0.2 (-1)	10 (0)	13.4087
50 (-1)	1 (+1)	10 (0)	14.6902
90 (+1)	1 (+1)	10 (0)	16.9037
50 (-1)	0.6 (0)	5 (-1)	13.5996
90 (+1)	0.6 (0)	5 (-1)	12.4131
50 (-1)	0.6 (0)	15 (+1)	13.5550
90 (+1)	0.6 (0)	15 (+1)	15.8330
70 (0)	0.2 (-1)	5 (-1)	12.9021
70 (0)	1 (+1)	5 (-1)	13.9823
70 (0)	0.2 (-1)	15 (+1)	14.0090
70 (0)	1 (+1)	15 (+1)	17.4102

Anexo 5. Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos.

Anexo 5.1 Cromatograma de la determinación de compuestos fenólicos fracción etérea, extraída por S-L.

