



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



**"OPTIMIZACIÓN DEL TIPO DE DISOLVENTE Y/O
MEZCLA EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
RASPÓN DE UVA SYRAH (*Vitis vinífera*) MEDIANTE
EL MODELO DE REGRESIÓN CÚBICO ESPECIAL"**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

CLARA UBERA VAZQUEZ

ASESORA DE TESIS:

DRA. EDITH CORONA JIMÉNEZ

CO-ASESOR DE TESIS:

DR. HÉCTOR RUIZ ESPINOSA

OCTUBRE 2019

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Cuerpo Académico de "Innovación en Tecnología para el Desarrollo de Procesos Alimenticios", por permitirme desarrollar el trabajo experimental de tesis dentro de sus instalaciones.

A mi asesora de tesis, la Dra. Edith Corona Jiménez, por concederme la oportunidad de trabajar en su equipo, por la orientación, ayuda, confianza y tiempo que me proporciono en el desarrollo de esta tesis.

A mi co-asesor de tesis, el Dr. Héctor Ruiz Espinosa, por su apoyo para la elaboración de este trabajo.

A mi jurado, la Dra. Paola Hernández Carranza y la M.A. Tania Meza Gaspar, por su tiempo y apreciables contribuciones y observaciones en la valoración de este trabajo.

A las compañeras de trabajo M.A. Tania Martínez Ramos y a M.A. Gabriela Magaly Vega Romero, por compartirme sus enseñanzas.

A mi familia, a mi madre Isabel, por ser mi fuerza del alma. A mis hermanos y sobrinos, especialmente a Sinaí Guadalupe por ser tan valiente y a mi amiga del alma Leonor.

Finalmente quisiera agradecer a Eduardo, por todo su apoyo y motivación brindada.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
I ANTECEDENTES	7
1.1 Generalidades de la uva Syrah	7
1.2 Morfología	7
1.3 Composición química y nutricional	9
1.4 Compuestos fenólicos	11
1.4.1 Clasificación de los compuestos fenólicos	12
1.4.2 Compuestos fenólicos en uva Syrah	15
1.5 Antioxidantes	17
1.6 Métodos de cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante	18
1.7 Extracción convencional de compuestos fenólicos	19
1.8 Importancia de las variables del proceso de extracción	20
1.9 Afinidad de los disolventes en la extracción	21
1.10 Diseño De Mezclas	22
II OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo general	27
2.2 Objetivos específicos	27

III MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Preparación de la materia prima	29
3.2 Diseño de mezclas para la selección del tipo de disolvente	30
3.3 Extracción convencional de compuestos fenólicos	32
3.4 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT)	33
3.5 Determinación de la actividad antioxidante (AA)	33
3.6 Desarrollo de la cinética de extracción	34
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Caracterización de raspón de uva Syrah (<i>Vitis vinífera</i>).	35
4.2 Evaluación de la influencia del solvente y sus mezclas sobre el contenido total de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante	36
4.3 Cinética de extracción óptima	43
V CONCLUSIONES	47
Bibliografía	48

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Morfología de la especie <i>Vitis vinífera</i> , donde se diferencia a cada una de las partes del sistema aéreo y radicular (A) y conformación del racimo de uva (B).	9
1.2	Rutas de síntesis de compuestos fenólicos (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).	12
3.1	Plan de trabajo.	29
3.2	Diseño Simplex-Centroides y tres puntos interiores añadidos para los tres componentes del sistema de mezcla.	32
4.1	Simplex-Centroides obtenido a partir del diseño de mezclas (A) y ajuste de los datos experimentales contra los calculados del modelo cúbico de regresión especial para la evaluación de los Compuestos Fenólicos Totales (B).	37
4.2	Simplex-Centroides del modelo cúbico de regresión especial que describe la superficie respuesta de la actividad antioxidante(A) y gráfico de regresión, donde se visualiza el ajuste de los datos experimentales contra los calculados por medio de la prueba DPPH (B).	40
4.3	Simplex-Centroides del modelo cúbico de regresión especial que describe la superficie respuesta de la actividad antioxidante (A) y gráfico de regresión, donde se visualiza el ajuste de los datos experimentales contra los calculados por medio del ensayo ABTS (B).	41
4.4	Cinética de extracción de compuestos fenólicos totales a diferentes tiempos de extracción.	44
4.5	Cinéticas de extracción de la actividad antioxidante mediante la técnica ABTS (A) y DPPH (B) bajo diferentes tiempos de extracción.	45

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Composición química de tallos de uva Syrah.	10
1.2	Composición química y nutricional de diferentes partes del racimo de uva Syrah, expresados en porcentaje de peso fresco.	11
1.3	Clasificación de compuestos fenólicos según su estructura química. . . .	13
1.4	Comparación de compuestos fenólicos presentes en orujo, piel y semillas de uva Syrah (<i>Vitis vinífera</i>).	16
1.5	Estudios reportados que aplican modelos matemáticos para la optimización de diferentes parámetros de extracción	26
3.1	Tratamientos del diseño experimental de mezclas.	31
4.1	Caracterización del raspón de uva Syrah (<i>Vitis vinífera</i>)	35

RESUMEN

El uso de solventes durante los procesos de extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos resulta ser una de las variables limitantes involucradas en dicho proceso, esto debido a que existe una influencia de la naturaleza de los mismos sobre los compuestos a extraer, siendo algunos de ellos tóxicos y que influyen en el proceso de transferencia de materia, alargando los tiempos de procesamiento. La búsqueda de solventes que permita una adecuada extracción de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos sigue siendo de interés y a pesar de que muchas técnicas ya han sido utilizadas para minimizar los tiempos del proceso de extracción, el uso de métodos convencionales sigue siendo una de las mejores opciones a nivel industrial por lo que se siguen optimizando los mismos. Así, mezclas de disolventes orgánicos han sido implementadas y diferentes herramientas matemáticas de optimización son utilizadas para encontrar la mejor combinación de éstos. En el presente trabajo se ha realizado un estudio del uso de disolventes orgánicos de naturaleza prótica y aprótica sobre la extracción de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Para ello se estableció un diseño de mezclas, siguiendo el método de Simple-Centroide y la implementación de un modelo de regresión Cúbico-Especial que permita evaluar la interacción entre los disolventes y su influencia sobre la extracción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del orujo de uva Syrah (*Vitis vinífera*), subproducto de la industria vinícola. De esta manera, para la extracción de los compuestos fenólicos se utilizaron como medio disolvente 3 disolventes en estado puro (agua, etanol y acetona), 3 mezclas binarias, 3 mezclas ternarias y una terciaria en partes iguales. Los resultados obtenidos mostraron que el modelo matemático obtuvo coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) y que la mezcla acetona-agua a una relación de 40-60%, obtuvo los valores máximos de compuestos fenólicos extraídos (2022.633 mg GAE/100 g m.s.). Lo anterior se infirió a que existió un efecto sinérgico de los disolventes durante la extracción debido a la capacidad que tienen ambos disolventes de formar uniones de hidrógeno con el agua y los grupos OH de los compuestos fenólicos extraídos, ya que en conjunto favorecen la obtención de los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Para la actividad antioxidante, la mezcla etanol-agua (40-60)% obtuvo el valor máximo (35.11 mg TROLOX/100 g m.s.) para ABTS, mientras que para DPPH la mezcla acetona-agua (30-70%) obtuvo los valores máximos (20.82 mg TROLOX/100 g m.s.). Las diferencias encontradas en

los resultados obtenidos entre ambas técnicas pueden estar relacionadas con la manera en como los radicales ABTS y DPPH trabajan. Por lo tanto, optimizando el proceso, la mezcla más adecuada ($p < 0.05$) para la mejora de la extracción de los compuestos fenólicos con una adecuada actividad antioxidante es la mezcla binaria acetona-agua a una relación del 40-60 %. Por lo que en función del tiempo de procesamiento, dicha mezcla permitió un incremento del 67 % de la extracción, obteniendo una concentración final de 4807.43 mg de GAE/100 g de m.s. a los 120 minutos. Mientras que la actividad antioxidante incrementó un 87 % para ABTS y un 76 % para DPPH hasta alcanzar el equilibrio, mostrando una actividad antioxidante elevada. Por lo tanto, la optimización de la extracción mediante el uso del método de Simplex-Centroide y el modelo de regresión Cúbico-Especial permitieron elegir el solvente que mayor sinergia obtuvo y que favoreció la extracción de los compuestos fenólicos, lo que podría ser implementado a nivel industrial.

ABSTRACT

The use of solvents during the solid-liquid extraction processes of bioactive compounds turns out to be one of the limiting variables involved in this process, due to there is an influence of their nature on the compounds to be extracted, some of them being toxic and with a high influence on the process of mass transfer, lengthening processing times. The search for solvents that allow adequate extraction of bioactive compounds such as phenolic compounds remains of interest and despite the fact that many techniques have already been used to minimize the extraction process times, the use of conventional methods remains one of the best options at the industrial level so they continue to optimize them. Thus, mixtures of organic solvents have been implemented and different mathematical optimization tools are used to find the best combination of these. In the present work, a study of the use of organic solvents, with protic and aprotic nature, on the extraction of phenolic compounds and their antioxidant activity has been carried out. For this purpose, a mixture design was established, following the Simplex-Centroid method and the implementation of a Cubic-Special regression model that allows the evaluation of the interaction between solvents and their influence on the extraction of phenolic compounds and the antioxidant activity of the pomace of grape Syrah (*Vitis vinífera*), by-product of the wine industry. Thus, for the extraction of the phenolic compounds, 3 solvents in pure state (water, ethanol and acetone), 3 binary mixtures, 3 ternary mixtures and one tertiary in equal parts were used as solvent medium. The results showed that the mathematical model obtained significant correlation coefficients ($p < 0.05$) and the acetone-water mixture at a ratio of 40-60%, obtained the maximum value of phenolic compounds extracted (2022.633 mg GAE/100 g ms). This fact was inferred that there was a synergistic effect of the solvents during the extraction due to the ability of both solvents to form hydrogen bonds with the water and the OH groups of the phenolic compounds, and together they favour obtaining the phenolic compounds present in the sample. For the antioxidant activity, the ethanol-water mixture (40-60%) obtained the maximum value (35.11 mg TROLOX/100 g ms) for ABTS, while the acetone-water mixture (30-70%) obtained the maximum value (20.82 mg TROLOX/100 g ms) for DPPH assay. The differences found in the results obtained between both techniques may be related to the way in which the ABTS and DPPH radicals work. Therefore, optimizing the process, the most

appropriate mixture ($p < 0.05$) for the improvement of the extraction of phenolic compounds with an adequate antioxidant activity is the binary acetone-water mixture at a ratio of 40-60 %. Therefore, depending on the processing time, this mixture allowed an increase of 67 % on the extraction, obtaining a final concentration of 4807.43 mg of GAE/100 g of m.s. at 120 minutes. While the antioxidant activity increased 87 % for ABTS and 76 % for DPPH, respectively, until equilibrium was reached, showing a high antioxidant activity. Therefore, the optimization of the extraction through the use of the Simplex-Centroid method and the Cubic-Special regression model allowed us to choose the solvent that obtained the greatest synergy and favored the extraction of the phenolic compounds, which could be implemented at industrial level.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes como los compuestos fenólicos son un extenso grupo de metabolitos secundarios de las plantas, frutas y vegetales que forman parte de una familia de compuestos químicos heterogéneos que comprende ácidos fenólicos, estilbenos, melano-idinas, bioflavonoides, taninos, entre otros (Hernández, 2010; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). La extracción, cuantificación y caracterización de dichos compuestos ha ganado un enorme interés debido a su aplicación terapéutica, dietaria y funcional que les confieren propiedades preventivas como antiinflamatorias, antivirales y de protección contra enfermedades cardiovasculares (Bataglion *et al.*, 2015; Martínez, 2015; Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Zhang *et al.*, 2014). Una fuente importante de compuestos fenólicos disponible se encuentra en subproductos de vinificación, no obstante, durante su proceso en la industria vinícola, sólo es aprovechado el mosto de las uvas descartando así gran parte de raspones, orujos y pepitas, siendo aprovechados únicamente como materiales de composta o alimento para ganado. La presencia de dichos compuestos en estos desechos resulta de interés para la industria de los alimentos debido a que su extracción permitiría su aplicación en la producción de alimentos con valor agregado, un ejemplo de esto es que podrían funcionar como estabilizantes del color en bebidas, ya que actúan como sustratos de oxidación, evitando cambios indeseables de coloración en las antocianinas (Gordillo *et al.*, 2014).

La extracción de compuestos fenólicos se ha logrado utilizando un sin fin de métodos tradicionales como la maceración, hasta métodos recientemente novedosos como la aplicación de fluidos supercríticos, ultrasonidos de potencia y aplicación de microondas, sin embargo, la extracción sólido-líquido, es un método muy versátil que tiene gran capacidad de adaptación (Anastas & Eghbali, 2010; Jelley *et al.*, 2016). Dicha extracción consta de tres etapas sucesivas, la primera es el cambio de fase del soluto al disolvente a través de una interfase sólido-líquido; la segunda es la difusión molecular del disolvente a través de los poros del sólido, produciéndose entonces una transferencia de soluto desde el interior de la partícula hacia su superficie; y la tercera es la transferencia del soluto desde la superficie de las partículas hacia la matriz de la disolución por efecto del gradiente de concentración (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2011; Vega Romero, 2016). Cada una de estas etapas puede interferir en el proceso de separación, no

obstante la segunda etapa suele ser la etapa limitante debido a la resistencia que puede presentar la matriz vegetal y/o frutal, la selección de los disolventes estará sujeta a la solubilidad de los compuestos a extraer o de interés, mediante interacciones particulares de los disolventes con los sólidos de la matriz, que provocaran el rompimiento de sus enlaces y con ello poder liberar a los compuestos de importancia. Por este motivo es importante considerar las propiedades químicas, físicas, grado de volatilidad y nivel de toxicidad de los disolventes a emplear (Lamarque, 2008). Por tanto cuanto más grande sea la densidad de los compuestos de interés por los disolventes seleccionados, más sencilla será su extracción. A lo largo de los años se han realizado diversos estudios que intentan identificar la mejor mezcla de disolventes, para así poder extraer un mayor contenido de compuestos fenólicos, la literatura reporta el uso de disolventes puros como el etanol, metanol, acetona y agua, así como la utilización de mezclas binarias de metanol-agua (Liazid *et al.*, 2011) y etanol-agua (Rajha *et al.*, 2014) a pesar de esto, se presenta el inconveniente en la formulación de la mezcla debido a que puede ser formulada a base de métodos empíricos o ensayos de prueba y error, ocasionando que las proporciones de los disolventes se seleccionen de forma arbitraria, provocando así que la mezcla no sea lo suficientemente óptima para el proceso de extracción. Aunque el interés y aplicación del diseño de experimentos con mezclas es novedoso, existen dificultades en su implementación e interpretación, que pueden deberse a que no es una metodología aún del todo difundida (Ortega *et al.*, 2015), es por eso que la aplicación de modelos matemáticos es de suma importancia en el desarrollo de experimentos con mezclas, pues no se trata de probar formulaciones que se le ocurran al investigador, ya que se estaría retornando al método de ensayo y error, pues el uso de modelos matemáticos hace posible que se puedan distribuir de forma adecuada las mezclas en la región experimental (Ortega *et al.*, 2015), el ajuste del modelo matemático serviría para poder investigar, visualizar y entender correctamente las interacciones de los disolventes y/o mezcla de ellos sobre la variable respuesta de los compuestos fenólicos con respecto a las interacciones intermoleculares que se puedan presentar entre los disolventes y la matriz a analizar. Con la implementación de un modelo matemático es posible tratar de mejorar la recuperación de estos compuestos a través de una simple pero útil extracción convencional. Encontrar la adecuada combinación de las variables que mejoren el proceso de extracción, estaría contribuyendo a incrementar el valor de la fruta y sus subproductos, además de que se estaría utilizando un método más seguro y amigable con el medio ambiente.

I. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de la uva Syrah

La variedad de uva Syrah (*Vitis vinífera*) es una de las más destacadas a nivel mundial y remonta su origen antiguo en Francia, ya que descende de las variedades Mondeuse blanche y Dureza, pertenecientes al Valle del Ródano (Bettiga *et al.*, 2003). Esta uva es conocida con diversos sinónimos, tales como Shiraz, Sirah, Syra, Schiras, Sirac, Syrac y Pequeño Syras que es nombrado en Francia, sin embargo en California se nombra Syrah, ya que esta variedad puede llegar a confundirse con Pequeño Sirah que pertenece a un híbrido de Syrah y Peloursin (Bettiga *et al.*, 2003). Por el gran número de sinónimos, que posee esta uva se puede generar cierta confusión a la hora de nombrarla, sin embargo, en la mayoría de los países del continente Americano esta variedad se conoce como Syrah. La apariencia de los racimos de esta uva, presentan una compacidad mediana, sus pedúnculos son debidamente largos, lo que ocasiona que los racimos queden separados de los bastones, su longitud característica oscila entre los 12 y 17 cm, con un peso promedio de 184 a 266 gramos. Los granos de uva son medianamente pequeños (2.160 ± 0.266 gramos), con forma ovalada, cuya longitud ronda entre los 14.921 ± 0.749 mm (Tomás Merlos, 2012), la cantidad de pruina es intermedia, y la pigmentación de la epidermis es azuladamente oscura. La adaptación y el crecimiento de la uva Syrah suele ser excesiva en superficies de tierra fértiles, produciendo así brotes ostentosos y largos que se extienden a lo largo de los surcos del terreno (Bettiga *et al.*, 2003).

1.2. Morfología

La vid es una planta, que pertenece a la especie *Vitis vinífera* y descende de la familia de las Ampelídeas (Hidalgo, 2006). Esta planta trepadora se puede agrupar en dos sistemas principales, el sistema aéreo, que está compuesto de todo lo que es visible en la vid, desde el tronco, los sarmientos, las yemas, las hojas, los zarcillos, los racimos hasta llegar a los granos de uva, y el sistema radicular, que se integra básicamente de raíces subterráneas que se encargan de extenderse a lo largo del suelo, para poder

absorber el agua y los minerales necesarios para el crecimiento y maduración de la vid (Gallego & Leria, 2018). Es también en este sistema donde se acumulan y reservan algunos hidratos de carbono como el almidón, que interviene en la producción de energía y síntesis de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y citoquininas que benefician el crecimiento de los granos de uva (Taiz, 2006).

Agregado a lo anterior, el sistema aéreo (Figura 1.1 A) se describe de la siguiente manera:

- Tronco: Es la parte de soporte y sujeción que sostiene a los sarmientos, los racimos y las hojas de la vid, de apariencia leñosa que posee una corteza fuerte y rígida (Villa, 2018; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011).
- Brazos: Son la parte donde el tronco comienza a dividirse y propagarse (Gallego & Leria, 2018; Villa, 2018).
- Sarmientos: Es la base frutal de las hojas y los zarcillos, su apariencia en la etapa de maduración es de aspecto leñoso y ramificado (Gallego & Leria, 2018), por lo que representa la unión entre racimos y ramas.
- Yemas: Forman parte de los sarmientos, y son el vínculo de floración para hojas, zarcillos y racimos. Existen tres tipos de yemas en la vid, como son las yemas tempranas que originan a las hembrillas fértiles o infértiles, las yemas durmientes que son las encargadas de generar brotes tanto de madera como frutales, y las yemas latentes que generan brotes estériles (Oriol, 2003; Villa, 2018).
- Hojas; Son el medio para la realización de los procesos fisiológicos de respiración, transpiración y fotosíntesis. Las formas más comunes de las hojas son redondeadas, cordiforme, corazón y cuneiforme (Gallego & Leria, 2018; Villa, 2018).
- Zarcillos: Son una especie de inflorescencia infertil y se encuentran en la misma posición que los racimos, colocándose así en los nudos de los pámpanos, en ocasiones estos zarcillos suelen curvarse sobre si mismos, como una especie de espiral (Hidalgo, 2006; Oriol, 2003).
- Racimos: Constituyen el producto de la fecundación de la vid y se compone de granos de uva y raspón o escobajo (esqueleto vegetal del racimo) (Gallego & Leria, 2018).

- Granos de uva: Se sitúan en el racimo por medio de las uniones entre los raspones y pedicelos y es la vía por donde los haces vasculares transportan los minerales y nutrientes necesarios para los granos (Moreno & Peinado, 2012). La estructura de los granos se constituye de hollejo, que es la película de recubrimiento en el cual se aprecia el color del grano, la pruina de apariencia cerosa que envuelve a los granos, la pulpa que es el tejido blando y jugoso de relleno y las semillas que son los óvulos fecundados de la flor (Hidalgo, 2006). El aroma varietal presente en los granos de Syrah es puramente aromático (Bettiga *et al.*, 2003).

Cabe destacar que en la morfología del racimo de uva, no solo son importantes los granos, sino que también el raspón o escobajo, ya que representa una fuente alterna de compuestos fenólicos de interés. El raspón se define como el medio de soporte de los granos de uva, así como también es la vía por la cual circulan los nutrientes vitales para el desarrollo de los granos. Su estructura consta del pedúnculo que es una zona no ramificada leñosa que se unen a los peciolos (Hidalgo, 2006), los cuales son pequeñas ramificaciones que sirven de unión entre los granos de uva, esto se puede apreciar en la Figura 1.1 B.

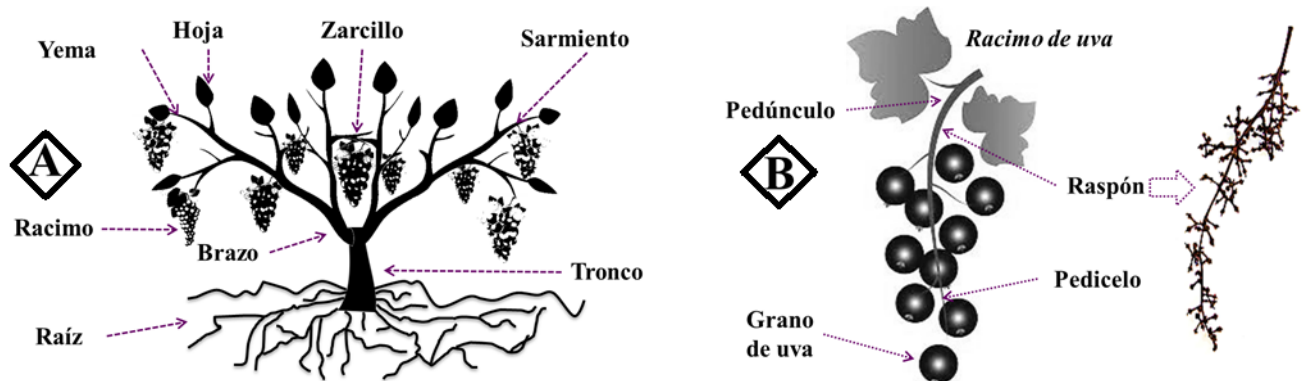


Figura 1.1. Morfología de la especie *Vitis vinífera*, donde se diferencia a cada una de las partes del sistema aéreo y radicular (A) y conformación del racimo de uva (B).

1.3. Composición química y nutricional

La variedad de uva Syrah en la etapa floración se compone mayormente de agua, azúcares, lípidos, taninos, minerales, compuestos nitrogenados y ácidos orgánicos como

el ácido tartárico, el ácido málico y el ácido cítrico, tal como se observa en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Composición química de tallos de uva Syrah.

Componente	Miliequivalentes por Kg de tallos
Azúcar (g/Kg)	< 10
pH	4.1-4.5
Ácidos libres	60-90
Sales ácidas	102-140
Ácido tartárico	30-90
Ácido málico	80-150
Ácido cítrico	4-10
Aniones totales	170-183
Cationes totales	100-205
Polifenoles solubles	5.4-15.2

Fuente: (Moreno & Peinado, 2012)

Debido a la importancia de recalcar la composición química del raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*), se encontró que esta variedad de raspón en la etapa de maduración representa alrededor del 4 al 5 % del peso del racimo, aportando un 20 % del total de compuestos fenólicos, 15 % de Taninos, 26 % de leucoantocianos (constituyentes de los taninos condensados y, por lo tanto, vinculados a la astringencia), 15 % de catequinas, 16 % de ácido gálico y 9 % del total del ácido cafeico (Moreno & Peinado, 2012). La cantidad de cenizas de estos raspones comprende de un 5 % a 6 % del peso seco, siendo las sales de potasio las más abundantes, con un 50 %, de ahí le siguen en mediana proporción el calcio, el magnesio, el sodio, el hierro, el cobre, el manganeso y el zinc en proporciones mucho más bajas (Moreno & Peinado, 2012). Los raspones en la etapa de maduración y de variedades rojas como Syrah, son peculiarmente ricos en polifenoles (Tabla 1.2), que le otorgan sabores amargos y astringentes, por lo que una alta concentración de estos compuestos en el vino podría llegar a reducir la calidad del sabor del vino (Moreno & Peinado, 2012).

Tabla 1.2. Composición química y nutricional de diferentes partes del racimo de uva Syrah, expresados en porcentaje de peso fresco.

Componente	Raspón	Piel	Semillas	Pulpa
% en peso fresco, del racimo	3-6	7-12	0-6	83-91
pH	4-4.5	3.8-4.3	-	3-4.5
Agua	78-80	78-80	25-45	70-85
Azúcares	0.5-1.5	-	34-36	14-26
Ácidos Orgánicos	0.5-1.6	0.8-1.6	-	0.6-2.7
Lípidos	-	-	13-20	-
Ácidos grasos libres	-	-	1	-
Polisacáridos	-	-	-	0.3-0.5
Polifenoles	-	-	-	0.05
Antocianinas	-	0-0.5	-	-
Taninos	2-7	0.4-3	4-10	-
Sustancias aromáticas	-	< 1	-	< 0.01
Ceras	-	< 1	-	-
Minerales	2-2.5	1.5-2	2-4	0.08-0.28
Compuestos nitrogenados	1-1.5	1.5-2	4-6.5	0.4-0.7
Vitaminas	-	-	-	0.02-0.08

Fuente: (Moreno & Peinado, 2012)

1.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentes en las plantas son también conocidos como fito-fenoles, pues son metabolitos secundarios, sintetizados a partir de las rutas del ácido siquímico y del ácido malónico (Ávalos & Pérez-Urria, 2009), tal como se muestra en la Figura 1.2.

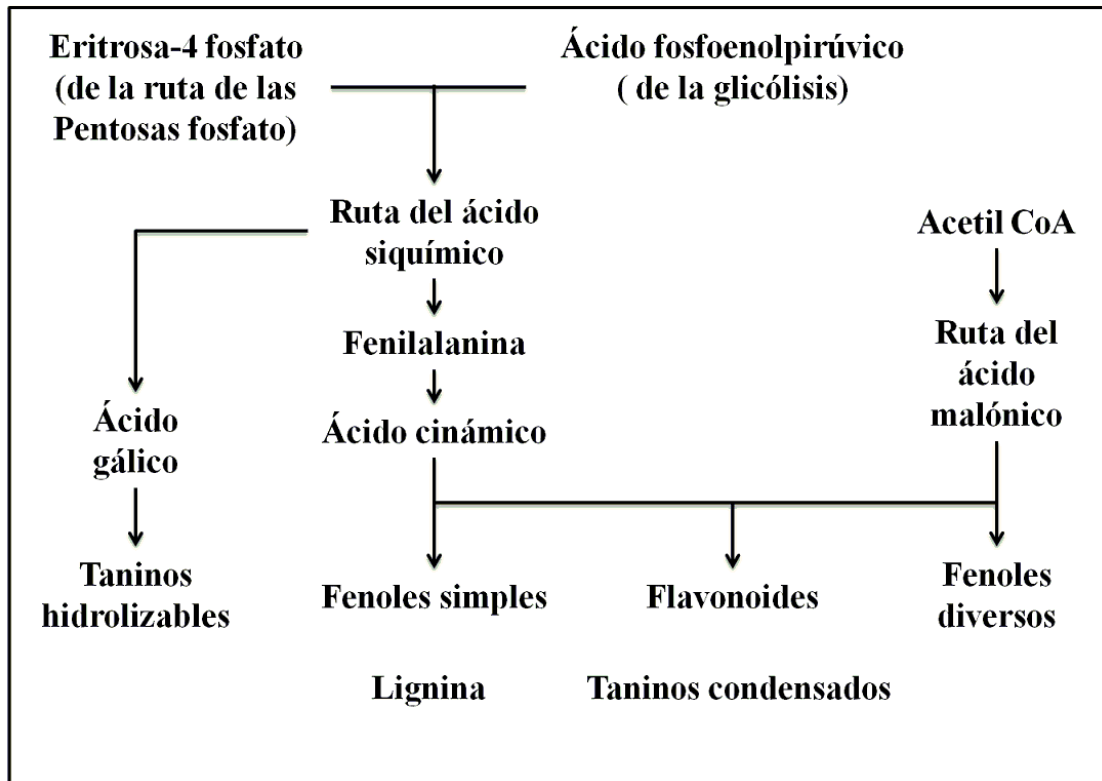


Figura 1.2. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).


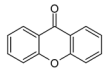
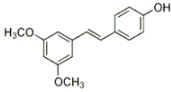

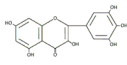

Los compuestos fenólicos están conformados por moléculas que poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, su importancia radica en la actividad antioxidante que poseen, ya que su efecto protector es capaz de prevenir, secuestrar e inhibir la formación de radicales libres a través de la donación de átomos de hidrógeno. Los compuestos fenólicos presentan diferentes grupos funcionales que participan en las funciones metabólicas de las plantas como en el crecimiento, la reproducción y la resistencia a patógenos y depredadores (Hernández, 2010). Además de atribuir color y aspectos sensoriales como la astringencia a las frutas (Peñarrieta *et al.*, 2014).

1.4.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

La clasificación de los compuesto fenólicos es diversa debido que constituyen una familia numerosa, pues se conocen más de 8000 estructuras (Hernández, 2010). Por tal motivo su clasificación puede ser de acuerdo a su estructura química básica o en

función del número de anillos fenólicos. La Tabla 1.3 muestra la clasificación general de los compuestos fenólicos de acuerdo a su estructura química.

Tabla 1.3. Clasificación de compuestos fenólicos según su estructura química.

Clasificación	Estructura química
Ácidos fenólicos	
Xantonas	
Estilbenos	
Taninos	
Flavonoides	
Naftoquinonas	

Fuente: (Dai & Mumper, 2010; Eva, 2004; Hernández, 2010)

- Ácidos fenólicos ($C_6 - C_1$): Son los polifenoles más abundantes de origen vegetal que se distinguen por ser portadores de una cadena lateral insaturada (Hernández, 2010), comúnmente son divididos en derivados de ácido benzoico como el ácido gálico, vanílico, protocatéquico, elágico, siríngico y los derivados del ácido cinámico como el ácido ferúlico y cafeico. El ácido cafeico es el ácido fenólico más abundante en muchas frutas sobre todo en uvas tintas, el ácido ferúlico por otra parte está presente en los cereales y se encuentra esterificando a la hemicelulosa en la pared celular (D Archivo *et al.*, 2007; Dai & Mumper, 2010;

Vega Romero, 2016), mientras que la presencia de los derivados de ácido benzoico en vinos tintos llega a ser de entre 0.1 a 30 partes por millón (Hernández, 2010).

- Las xantonas ($C_6 - C_1 - C_6$): Son una clase de compuestos fenólicos que derivan de la ciclación de benzofenonas, formándose por la adición de dos átomos de carbono a un ácido benzoico. Algunas de estas xantonas como la mangostina (*Garcinia mangostana L.*), poseen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y tuberculostática (Castillo García, 2007; Hernández, 2010).
- Estilbenos ($C_6 - C_2 - C_6$): Este tipo de compuestos, está conformado por la presencia de dos anillos de benceno que a su vez están separados por la presencia de dos átomos de carbono. Generalmente son considerados fitoalexinas por su bajo peso molecular (Hernández, 2010; Sun & Spranger, 2005; Vega Romero, 2016) y comúnmente se encuentran en la médula de troncos de especies arbóreas, se conoce que la fórmula molecular más extendida es el transresveratrol, presente en las familias *Pinaceae* y *Vitaceae* (Castillo García, 2007).
- Taninos ($C_6 - C_3 - C_6$)_n: Son un grupo de compuestos fenólicos con una amplia diversidad de estructuras que comparten su habilidad para enlazar y precipitar proteínas. Son clasificados en taninos condensados y taninos hidrosolubles (Hernández, 2010; Martínez, 2015; Vermerris & Nicholson, 2007) .
- Flavonoides ($C_6 - C_3 - C_6$): Su estructura química consta de tres anillos: benzopirano 2-fenil o un anillo dihidroxilados fenólicos, un segundo anillo fenólico generalmente como mono-hidroxilado y un último anillo heterocíclico (Hernández, 2010; Peñarrieta *et al.*, 2014). Este grupo ejerce diferentes funciones tales como la modulación de la actividad enzimática, inhibir la proliferación celular, son agentes antiinflamatorios, antioxidantes y antiestrogénicos, lo que explica su efecto en la reducción de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hernández, 2010). Los flavonoides a su vez se dividen en seis subgrupos: flavones, flavonoles, flavanoles, flavanones, isoflavones y antocianinas (Dai & Mumper, 2010).
- Naftoquinonas ($C_6 - C_4$): Son un grupo importante de compuestos fenólicos, que se caracteriza por portar un solo anillo aromático ligado a un anillo conjugado por un grupo cetona doble (Hernández, 2010; Peñarrieta *et al.*, 2014). Se utilizan como colorantes y pigmentos (Cantú *et al.*, 2012; Vega Romero, 2016).

1.4.2. Compuestos fenólicos en uva Syrah

En raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) se han identificado ácidos fenólicos, flavan-3-ols y flavonoles (Gordillo *et al.*, 2014) como:

- ◆ Ácido gálico ($174.2 \pm 8.7 \text{mg/L}$)
- ◆ Ácido trans-caftarico ($21.5 \pm 1.7 \text{mg/L}$)
- ◆ Ácido trans-coutaric ($11.6 \pm 1.2 \text{mg/L}$)
- ◆ Ácido syringic ($1.7 \pm 0.1 \text{mg/L}$)
- ◆ (+)-Catequina ($16.1 \pm 1.7 \text{mg/L}$)
- ◆ (-)-Epicatequina ($13.8 \pm 1.2 \text{mg/L}$)
- ◆ Isorhamnetin-3-glucósido ($4.6 \pm 0.4 \text{mg/L}$)
- ◆ Myricetin-3-glucuronida ($0.8 \pm 0.1 \text{mg/L}$)
- ◆ Myricetin-3-glucósido ($14.9 \pm 0.1 \text{mg/L}$)
- ◆ Quercetina-3-glucuronida ($10.7 \pm 1.0 \text{mg/L}$)
- ◆ Quercetina-3-glucósido ($12.8 \pm 0.9 \text{mg/L}$)
- ◆ Laricitrina-3-glucósido ($8.4 \pm 1.0 \text{mg/L}$)
- ◆ Kaempferol-3-glucósido ($2.0 \pm 0.2 \text{mg/L}$)

También se han determinado un grupo de importante de Estilbenos y Antocianinas (Gordillo *et al.*, 2014; Piñeiro *et al.*, 2013) como:

- ◆ Trans-resveratrol ($122.5 \pm 0.8 \text{mg/Kg}$)
- ◆ Piceatannol ($16.6 \pm 0.1 \text{mg/Kg}$)
- ◆ ϵ -viniferina ($71.1 \pm 0.2 \text{mg/Kg}$)
- ◆ Vitisina-B ($22.2 \pm 0.1 \text{mg/Kg}$)
- ◆ Delphinidin-3-glucósido ($72.2 \pm 5.8 \text{mg/L}$)
- ◆ Petunidin-3-glucósido ($63.1 \pm 2.1 \text{mg/L}$)
- ◆ Peonidin-3-glucósido ($178.4 \pm 4.3 \text{mg/L}$)
- ◆ Malvidin-3-glucósido ($547.8 \pm 25.1 \text{mg/L}$)
- ◆ Petunidin-3-acetil-glucósido ($43.1 \pm 1.9 \text{mg/L}$)
- ◆ Peonidin-3-acetil-glucósido ($46.7 \pm 6.1 \text{mg/L}$)
- ◆ Malvidin-3-acetil-glucósido ($310.4 \pm 12.4 \text{mg/L}$)
- ◆ Petunidin-3-pcumaroil-glucósido ($23.5 \pm 10.9 \text{mg/L}$)
- ◆ Peonidin-3-pcumaroil-glucósido ($16.7 \pm 2.3 \text{mg/L}$)
- ◆ Malvidin-3-pcumaroil-glucósido ($225.4 \pm 30.8 \text{mg/L}$)

Los subproductos de uva Syrah tales como el orujo también son una fuente potencial de polifenoles (Tabla 1.4) ya que durante la vinificación solo se alcanza de un 30 a 40% de su extracción. Un ejemplo son los estilbenos (Resveratrol-3-O-glucósido), sintetizados principalmente en pieles, hojas y raíces en respuesta a posibles infecciones y protección a la luz UV (Ky *et al.*, 2014).

Tabla 1.4. Comparación de compuestos fenólicos presentes en orujo, piel y semillas de uva Syrah (*Vitis vinífera*).

Compuestos fenólicos	Piel de uva (mg/g)	Orujo de uva (mg/g)	Semillas de uva (mg/g)
Contenido total de fenoles	45.2±2.2	72.8±0.7	35.6±1.8
Total Taninos	73.0±6.0	79.2±1.4	123.3±1.4
Catequina	1.4±0.0	2.8±0.2	4.5±0.1
Epicatequina	0.4±0.0	2.6±0.1	3.2±0.2
\sum Monómeros	1.8±0.0	5.4±0.1	7.8±0.2
Total antocianinas	12.1±0.3	-	-
Delphinidin-3-O-monoglucósido	1.4±0.0	-	-
Cyanidin-3-O-monoglucósido	0.1±0.0	-	-
Petunidin-3-O-monoglucósido	1.1±0.0	-	-
Peonidin-3-O-monoglucósido	1.0±0.0	-	-
Malvidin-3-O-monoglucósido	7.0±0.0	-	-
Monoglucósidos de antocianinas	10.4±0.2	-	-
Petunidin-3-O-monoglucósido de acetilo+peonidin-3-O-monoglucósido de acetilo+malvidin-3-O-monoglucósido de acetilo	0.7±0.0	-	-
Peonidin-3-(6-O-p-coumaroyl) mono-glucósido+malvidin-3-(6-O-p-coumaroyl) monoglucósido	2.0±0.0	-	-

\sum Monómeros (Catequina + Epicatequina)

Fuente:(Ky *et al.*, 2014)

1.5. Antioxidantes

Los antioxidantes presentan potentes mecanismos de acción ante la oxidación desencadenada por los radicales libres. Se pueden definir a los radicales libres como especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) que a su vez son moléculas que presentan electrones no apareados, ocasionando que su estructura química sea altamente reactiva.

En la actualidad existen dos tipos de antioxidantes, los sintéticos y los naturales, generalmente los antioxidantes sintéticos son los más usados por la industria de los alimentos, sin embargo, algunos estudios han reportado que los antioxidantes sintéticos son tóxicos para el organismo (Vega Romero, 2016), por tal motivo se ha incrementado el interés de extraer antioxidantes de fuentes naturales a partir de subproductos frutales y/o vegetales.

Debido a su efecto protector los antioxidantes pueden funcionar como agentes reductores que atrapan radicales libres y actúan como quelantes, limitando la oxidación de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, ayudando a evitar enfermedades degenerativas (Ky *et al.*, 2014). Los compuestos antioxidantes llegan a ser tan importantes para el sistema biológico gracias a la acción de postergar las reacciones de degradación oxidativa, mejorando así el mantenimiento de la salud (Dubie *et al.*, 2013; Vega Romero, 2016). A pesar de que el sistema humano desarrolla sus propios mecanismos de defensa contra las especies reactivas de oxígeno y de más radicales libres, es importante consumir un excedente de antioxidantes en busca de la prevención de enfermedades, así como del retardo de la per-oxidación en lípidos (Gülcin, 2012). Se conoce que los mecanismos de acción de los antioxidantes pueden ejercer un efecto preventivo, ya que actúan como sustrato de radicales superóxido e hidróxido; secuestrante, pues capturan a los radicales libres y reparador, por que intervienen en los procesos de regeneración de compuestos oxidados (Martínez, 2015; Naveda González, 2010).

Se ha comprobado que algunos compuestos fenólicos como la catequina, epicatequina y miricetina, presentes en el vino tinto, ejercen una mayor actividad antioxidante en las lipoproteínas de baja densidad que el ejercido por el α -tocoferol (Hernández, 2010).

1.6. Métodos de cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

El método Folin-Ciocalteu es una de las metodologías más ampliamente utilizadas para determinar compuestos fenólicos totales (CFT), pues los datos que se obtienen proporcionan una idea general de la concentración total, pero no particular de estos compuestos. Por lo tanto los resultados dependerán únicamente de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra a estudiar, así como de la cantidad de grupos -OH que puedan oxidarse con esta prueba (Rebollo López, 2007). Por otra parte los métodos más utilizados para cuantificar la actividad antioxidante (AA), son los radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (2,2-azinobis-3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico), con la utilización de dichos métodos se puede evaluar la AA, en compuestos de naturaleza lipófila con el uso del DPPH y de naturaleza tanto hidrófila como lipófila en el caso del ABTS. A continuación se describe su mecanismo de acción frente a los antioxidantes.

FOLIN-CIOCALTEU

En la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) es ampliamente utilizado el método colorimétrico Folin-Ciocalteu ya que es una técnica analítica simple, confiable y rápida para la determinación de compuestos fenólicos totales en matrices vegetales o frutales. Consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico (coloración amarillo neón), el método se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del polianión molibdotungstosfosfórico para generar un producto coloreado azul con un máximo de absorción de 765 nm (Pérez-Nájera *et al.*, 2013). La cuantificación de compuestos fenólicos totales en la matriz vegetal se determina a partir de una curva de calibración con respecto al Ácido Gálico o Catequina, siendo estos dos patrones cuantitativos que únicamente determinan la cantidad total de compuestos fenólicos

DPPH

Método descrito por Brand-Williams *et al.*(1995) (Londoño Londoño, 2012), es uno de los métodos más utilizados. El mecanismo de reacción sucede cuando el antioxidante cede electrones de hidrógeno al radical libre DPPH, con ello se logra la forma reducida del radical, el cual es estequiométrico con respecto al número de electrones que capture, tornándose de color púrpura a un color amarillo pálido (Pérez et al.,2013). Este radical

posee solubilidad en medios orgánicos pero sobre todo en medios donde el contenido de alcohol sea importante, sin embargo es afectado en medios acuosos, por lo que esto puede ser una limitante a la hora de interpretar antioxidantes hidrófilos (Arnao, 2000). La densidad óptica es apreciablemente medible a una longitud de onda de 515 nm. La medida de la actividad antioxidante se calcula como el porcentaje de inhibición que representa la cantidad de radical DPPH inhibido o neutralizado por los antioxidantes de la muestra.

ABTS

El radical ABTS (2,2-azinobis-3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) tiene el comportamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Su principio se basa en la capacidad que presenta para atrapar radicales libres del medio. El radical catiónico de color verde azulado ABTS, se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio. El radical ABTS es un compuesto estable y soluble en metanol. Por la capacidad antioxidante de la muestra se evalúa en función de la habilidad que presenta para disminuir la concentración del radical. El compuesto ABTS puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Pérez-Nájera *et al.*, 2013; Re *et al.*, 1999). Para cuantificar la actividad antioxidante se utiliza el patrón cualitativo de la curva de concentración de TROLOX.

1.7. Extracción convencional de compuestos fenólicos

La extracción es una operación unitaria de transferencia de materia que se basa en la disolución de una mezcla que puede ser líquida o sólida a partir de un disolvente (líquido-líquido o sólido-líquido), esta operación se delimita por la difusión de los componentes presentes en el seno de la mezcla (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2011). En la extracción con disolventes se pueden utilizar dos formas: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido, o bien, otra forma de operación es en continuo y en discontinuo. Por lo que se refiere a discontinuo se puede recurrir a una sola etapa simple o múltiples etapas, con la utilización de solvente nuevo en cada una de ellas o en contracorriente (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2011).

Para la extracción sólido-líquido convencional, también conocida como lixiviación, consta básicamente de un mezclador con agitador, donde entraran en contacto los

sólidos de la matriz (vegetal o frutal) y los disolventes durante un definido tiempo. La mezcla resultante se colocara en una centrifuga (separador), para obtener las fases del extracto y las del refinado. Se define al extracto o flujo superior como la solución separada integrada por soluto y disolvente y al refinado o flujo inferior como la parte de residuos y solución retenida, está formado por solidos inertes y la fracción mínima de solución retenida (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2011).

La extracción convencional con disolventes puede ser mejorada por la selección de las variables de proceso, como lo son el tipo de disolvente y/o sus mezclas (binarias y ternarias), el nivel de temperatura y el tiempo de agitación, entre otras. A partir de estas consideraciones se puede incrementar la solubilidad de los compuestos de interés y facilitar la transferencia de materia, ya que este grupo de factores sí influyen en la extracción de compuestos (Allothman *et al.*, 2009).

1.8. Importancia de las variables del proceso de extracción

Las variables del proceso afectan las condiciones de extracción, de esta forma el tamaño de partícula, los tipos de disolventes, la temperatura y el tiempo de extracción, influirán en la extracción de los compuestos de interés. La importancia de algunas de las variables se detalla a continuación:

- Tamaño de partícula

El proceso de extracción sólido-líquido depende de los tratamientos previos a los que se haya sometido la muestra sólida (Martínez, 2015). Con la finalidad de aumentar la superficie de contacto, las muestras deben ser molidas ya que entre más pequeño sea el tamaño de partícula, éste tendera a poseer mayor área de transferencia a los solventes y por consiguiente, mayor rendimiento de extracto (Pérez-Nájera *et al.*, 2013).

- Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción

La temperatura y el tiempo de extracción siempre influirán en la extracción de compuestos fenólicos, ya que con el aumento de la temperatura se maximizara la solubilidad y con ello la velocidad en la extracción, debido a la reducción de la viscosidad y tensión superficial del disolvente, sin embargo, se deben tener ciertas consideraciones con el

aumento de la temperatura ya que esta puede perjudicar a los compuestos fenólicos provocando su oxidación (Martínez, 2015).

- Influencia del disolvente

La solubilidad de los compuestos fenólicos en relación con la polaridad de los disolventes siempre se verá afectada por la composición química de las matrices vegetales y/o frutales, ya que las asociaciones de los compuestos fenólicos son variadas, un ejemplo de esto son los compuestos flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona o agua (Pérez-Nájera *et al.*, 2013).

1.9. Afinidad de los disolventes en la extracción

El uso de solventes así como el método de extracción, influyen en la eficacia de dicho proceso y están directamente vinculados con los costos de producción, tiempo de extracción, volumen de solvente ocupado, efectos perjudiciales en humanos y en el medio ambiente (Dai & Mumper, 2010; Martínez, 2015). A partir del análisis de estas cuestiones, las técnicas de extracción han avanzado en los últimos años, con el propósito de hacer más rentables los procesos de extracción mediante la selección de los disolventes más apropiados y afines a la muestra, considerando que la solubilidad de los compuestos fenólicos está delimitada por la composición química de la muestra (frutas o vegetales) y la afinidad de los disolventes (próticos y apróticos) a utilizar. Los materiales vegetales pueden contener compuestos fenólicos que varían, tales como compuestos simples en el caso de los ácidos fenólicos, hasta sustancias altamente polimerizadas como los Taninos (Martínez, 2015), es por ello que las propiedades físicas de los disolventes como la tensión superficial, viscosidad y presión de vapor deben de ser consideradas en el proceso de extracción.

La naturaleza de los disolventes próticos, se define por los grupos -OH o -NH, que pueden poseer en su estructura, como en el caso del etanol, el metanol y el agua. Estos disolventes se distinguen por formar puentes de hidrógeno y con ello son capaces de ejercer un efecto de solvatación entre los nucleófilos (Cabildo Miranda *et al.*, 2011). Por otra parte, los disolventes apróticos polares como la piridina y la acetona, poseen

pares de electrones no compartidos, con lo cual resultan ser agentes que rodean a los cationes, es decir, solvatan cationes (Dupont & George, 2007).

Se ha reportado que el metanol y sus mezclas acuosas (50-90 %v/v) son utilizadas en la extracción de ácidos fenólicos, antocianinas, catequinas, flavononas, flavonas y flavonoles (Martínez, 2015; Ross *et al.*, 2009). Compuestos orgánicos no polares, como la acetona y el hexano se ha utilizado en la extracción de compuestos fenólicos presentes en cáscaras de cítricos (Bocco *et al.*, 1998; Kawaii *et al.*, 2000; Pérez-Nájera *et al.*, 2013). Estos solventes así como sus mezclas son algunos de los ejemplos de los disolventes que pueden ser utilizados para la extracción de compuestos fenólicos.

1.10. Diseño De Mezclas

El diseño de experimentos con mezclas se basa en determinar cuáles de los componentes de la mezcla tienen una mayor influencia sobre la variable de respuesta, además de que a partir de este diseño se pueden modelar las respuestas de interés en función de las proporciones de los componentes, utilizando un número pequeño de ensayos experimentales (González & Lise, 2013), considerando que sus niveles no son independientes ya que la suma de sus factores debe ser siempre igual a la unidad (Gutiérrez & De La Vara, 2012), lo que permite optimizar y minimizar el número de ensayos.

Los modelos matemáticos obtenidos a partir del diseño de mezclas permiten diferenciar el rendimiento y la eficiencia en la extracción de acuerdo a la selección de los disolventes y/o mezclas que pueden ser atribuidas a propiedades químicas, como el efecto de las fuerzas de atracción y repulsión entre las moléculas de la mezcla, y a propiedades físicas como la tensión superficial y viscosidad.

Las características de calidad del diseño con mezclas dependen de las proporciones con las que participan los ingredientes y no de la cantidad absoluta de ellos. Los objetivos del diseño de experimentos con mezclas (Gutiérrez & De La Vara, 2012) principalmente se basan en poder determinar cuáles de los ingredientes de la mezcla o interacciones entre ellos tienen mayor influencia sobre una o varias respuestas de interés, así como modelar las respuestas de interés en función de las proporciones de los componentes de la mezcla y usar modelos que permitan determinar en qué porcentaje debe participar cada uno de los ingredientes para lograr que la fórmula tenga las propiedades deseadas.

El experimento con mezclas se debe plantear en función de lo que se conoce del problema y del objetivo por alcanzar, por lo que las mezclas que se probaran para que, al analizar los resultados, se logren responder las preguntas planteadas. Es decir, no se trata de producir las formulaciones que se le ocurran al experimentador y llevar a cabo una investigación a prueba y error, sino aplicar una metodología de planeación, con el apoyo de herramientas matemáticas que permitan modelar las variables de interés, con ello se podría asegurar obtener conocimientos y soluciones reales (Gutiérrez & De La Vara, 2012). Es por ello que el diseño de mezclas podría evaluar la influencia de la presencia de los solventes en la extracción de compuestos antioxidantes, debido a que se ha encontrado que el tipo y el rendimiento del antioxidante extraído varían según los efectos ejercidos por el solvente (Rezaie *et al.*, 2015), lo que resulta interesante de estudiar. Además, para poder entender mejor el desarrollo de los experimentos con mezclas, y con ello conocer sus regiones experimentales, se utilizan los llamados simplejos (simplex), es decir, figuras que permiten dibujar q componentes usando $q - 1$ dimensiones. Los cuales se utilizan para representar geoméricamente las regiones experimentales en experimentos con mezclas (Gutiérrez & De La Vara, 2012).

A partir de esto, las regiones experimentales que representan geoméricamente un diseño de experimentos con mezclas varían en función de sus componentes, es decir, para dos componentes la región experimental es un segmento de recta, para tres componentes es un triángulo, para cuatro componentes es un tetraedro y para más de cuatro componentes es un hipertetraedro. En los diseños de mezclas las regiones mencionadas son al mismo tiempo las regiones de operabilidad, ya que cualquier mezcla posible es un punto del simplex (Gutiérrez & De La Vara, 2012).

Sin duda el principal objetivo del diseño de experimentos con mezclas es cuantificar la influencia que tienen los diferentes componentes sobre la respuesta, tanto en forma individual como en su acción conjunta con otros componentes. Se trata de modelar esta respuesta para predecirla en cualquier formulación posible y utilizar los modelos con el propósito de encontrar la composición de la mezcla que proporcione mejores resultados (optimizar) (Gutiérrez & De La Vara, 2012).

El diseño de mezclas se ha utilizado para mejorar diversas áreas de procesos industriales, tal es el caso de la industria alimentaria, en donde se busca encontrar la mezcla adecuada de componentes o ingredientes para la elaboración de un producto final, y esto está reportado en varios estudios, por ejemplo, en el estudio de Gaviria *et al.* (2010) el cual analiza la viscosidad de los lácteos como variable de respuesta, el objetivo es

definir una mezcla óptima de los ingredientes estabilizantes que componen la bebida láctea llamada Kumis. Otro estudio más que se enfocó en la utilización del diseño de mezclas, fue el reportado por Lobato Calleros *et al.*(1997) (Gutiérrez & De La Vara, 2012)en el cual se deseaba saber qué componentes como la grasa vegetal influían más en las características de los quesos, así como conocer cuál era la combinación óptima para lograr la mejor dureza y elasticidad posible. Por otro lado, en la industria de la construcción es donde más se han encontrado aplicaciones, por ejemplo, el estudio de las mezclas de micro-pavimento, que entre sus características principales se pueden mencionar que suministra la resistencia necesaria a las fuerzas abrasivas del tránsito vehicular (Robati *et al.*, 2013). De manera general se pudo observar a partir de las referencias consultadas, que un alto contenido de disolvente, como el agua, en el diseño de mezclas, es necesaria para optimizar procesos, particularmente cuando se tratan de extracciones de diferente naturaleza, así como el uso de otros disolventes, los cuales pueden ser económicos y respetuosos con el medio ambiente además de ser muy adecuados, particularmente para su uso en la industria alimentaria (Jelley *et al.*, 2016).

Como parte esencial en el estudio del diseño de mezclas es importante destacar que el uso de los gráficos de superficie respuesta, son un medio gráfico que permiten ayudar en el problema de estudiar el efecto de las interacciones de los componentes de la mezcla, pues son de gran interés a la hora de investigar la influencia de las variables de respuesta.

Cabe mencionar que los dos tipos básicos de diseños para estudiar el efecto de los componentes de la mezcla sobre la respuesta son a través de los medios gráficos del simplex-reticular (simplex-lattice) y el simplex con centroide (simplex-centroide). El diseño simplex reticular $\{q, m\}$ considera q componentes y permite ajustar un modelo estadístico de orden m (Ecuación 1.1). Los puntos del diseño consisten en todas las posibles combinaciones de componentes o mezclas que se forman al considerar que las proporciones pueden tomar los $m+1$ valores entre cero y uno (Gutiérrez & De La Vara, 2012) dados por:

$$x_i = 0.1/m, 2/m \dots m/m \quad (1.1)$$

El otro diseño básico es el Simplex-Centroide que se aplica con pocos componentes y

consiste en $2q - 1$ puntos definidos como: las q mezclas puras, puntos medios definidos por cada dos vértices del simplex, los centroides de las caras definidas por cada tres vértices del simplex y el centroide global. Por ejemplo, el simplex con centroide para $q = 3$ incluye las mezclas x_1, x_2, x_3 (Gutiérrez & De La Vara, 2012) (Ecuación 1.2).

$$(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0)(0, 1, 0)(0, 0, 1)(1/2, 1/2, 0)(1/2, 0, 1/2)(0, 1/2, 1/2)(1/3, 1/3, 1/3) \quad (1.2)$$

Una vez obtenidos los resultados experimentales de un diseño de mezcla es necesario ajustar y seleccionar un modelo estadístico adecuado que permita investigar el efecto de los componentes sobre la variable respuesta. En ocasiones resulta que el modelo cuadrático no es suficiente para describir la respuesta, entonces se puede recurrir a ajustar el modelo cúbico especial (Gutiérrez & De La Vara, 2012) (Ecuación 1.3).

$$\bar{y} = \sum_{1 \leq i \leq n} \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq n} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{1 \leq i < j < k \leq n} \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \dots \beta_{123\dots n} x_1 x_2 x_3 \dots x_n \quad (1.3)$$

En el modelo cúbico, los términos tales como $x_i x_j (x_i - x_j)$ permiten mezclas tanto con sinergia como con antagonismo a lo largo del lado $x_i - x_j$. El término cúbico especial $x_1 x_2 x_3$ cuantifica el efecto de la mezcla ternaria en el interior del simplex (Gutiérrez & De La Vara, 2012). Son varios los estudios (Tabla 1.5) que han aplicado el uso de modelos matemáticos que les permita optimizar diferentes parámetros, tal es el caso del estudio de extracción eficiente de flavonoides de *Flos Sophorae Immaturus* con solventes eutécticos profundos compactados y sostenibles, realizado por Wang *et al.* (2019), donde se optimizaron parámetros de extracción asistida por microondas basada en solvente eutéctico profundos (DES-MAE), las variables de respuesta fueron tres factores (temperatura, relación líquido-líquido y tiempo) las cuales tuvieron un efecto significativo en los rendimientos de extracción de seis flavonoides diana. El efecto de la interacción de las tres variables sobre los rendimientos de extracción de los seis flavonoides se explicó mediante el uso de gráficos de superficie de respuesta tridimensionales (3D), en donde se pudieron apreciar las interacciones de la temperatura de extracción y la relación líquido-sólido en los rendimientos de extracción de los flavonoides Rutin e Isorhamnetin.

Tabla 1.5. Estudios reportados que aplican modelos matemáticos para la optimización de diferentes parámetros de extracción

Disolvente	Modelo	Optimización	Variables	Materia prima	Autor
Eutéctico	Modelo cuadrático	Extracción de seis flavonoides diana	Temperatura, relación líquido-líquido y tiempo	Flos Sophorae Immaturus	(Wang <i>et al.</i> , 2019)
Eutéctico	Modelo cuadrático	Esterificación enzimática libre de solventes	Cantidad de enzima, temperatura de reacción y actividad de agua.	Enzima Candida rugosa lipasa	(Pätzold <i>et al.</i> , 2019)
Eutéctico	Modelo cuadrático	Porcentaje y proporción molar	Proporción molar, temperatura y tiempo	Pectina de Averrhoa bilimbi	(Shafie <i>et al.</i> , 2019)

Otro estudio que también se apoyó en la optimización de la esterificación enzimática libre de solventes en la mezcla de reacción del sustrato eutéctico, fue el estudiado por Pätzold *et al.* (2019), en el que las variables descritas fueron las interacciones de la cantidad de enzima y la temperatura que afecta la formación del producto de la esterificación catalizada por la enzima, y la actividad de agua. Con el apoyo de un gráfico de superficie respuesta, se pudo observar que el gradiente de color del mapa de calor mostró áreas de baja formación de éster y las áreas de alta formación de producto. En general, la reacción de esterificación se mejora a temperaturas elevadas y con una alta cantidad de enzimas. Además, el rendimiento de la esterificación dependió también de las variables planteadas como la actividad de agua y la temperatura. Con ello se comprobó que la optimización de la reacción mediante la aplicación de un diseño estadístico de experimentos fue un método poderoso aplicado a la esterificación catalizada. Un último estudio en el que se determinaron las condiciones óptimas fue el descrito por Shafie *et al.* (2019), donde el porcentaje de disolventes eutécticos profundos (DES), la temperatura de extracción de 80°C, el tiempo de extracción de 2.5 h, y la relación molar de componentes de DES, mostró ser la condición óptima que produjera mayor pectina.

II.OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Optimizar el tipo de disolvente y/o sus mezclas (puras, binarias y ternarias) en la extracción de compuestos fenólicos de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) mediante la aplicación de un modelo de regresión Cúbico-Especial.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar un diseño de mezclas siguiendo el método de Simplex-Centroides para la selección del tipo de disolvente en la extracción de compuestos fenólicos de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) y su actividad antioxidante.
- Optimizar mediante el desarrollo de un modelo Cúbico-especial obtenido a partir del diseño de mezclas del proceso de extracción de compuestos fenólicos de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) y su actividad antioxidante.
- Evaluar la cinética de extracción del contenido fenólico total y su actividad antioxidante con el disolvente (o su mezcla) que mayor rendimiento tenga.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología del presente estudio se llevó a cabo mediante el siguiente plan de trabajo mostrado en la Figura 3.1. En la etapa preliminar se desarrolló todo lo relacionado con la puesta en marcha de equipos y técnicas usadas. Para la Etapa 1 se utilizó al diseño Simplex-Centroide con tres puntos interiores añadidos para poder establecer las proporciones de los disolventes puros, las mezclas binarias y ternarias así como para la designación del número de ensayos a realizar. Posteriormente se llevaron a cabo las extracciones convencionales establecidas, para después cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT) y determinar su actividad antioxidante (AA), por medio de la metodología de Folin-Ciocalteu, DPPH y ABTS, respectivamente. Finalmente en la Etapa 2, con la ayuda del ajuste del modelo cúbico de regresión especial, se seleccionó al disolvente que presentó las mejores interacciones de extracción óptima, para así finalmente, obtener las cinéticas de extracción a diferentes tiempos, con la finalidad de evaluar el comportamiento de las mismas.

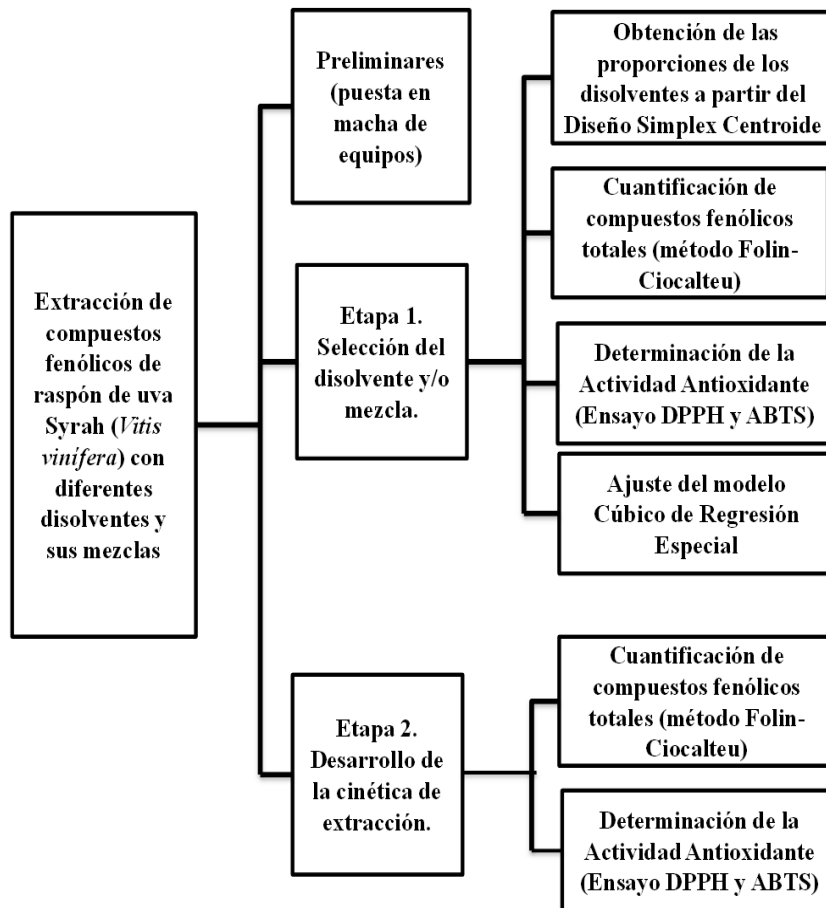


Figura 3.1. Plan de trabajo.

3.1. Preparación de la materia prima

La matriz sólida de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) se sometió a un proceso de secado de 45°C por un lapso de 24 horas, posteriormente se molió y tamizo hasta obtener un tamaño de partícula de 500 micras, se almaceno en un recipiente cerrado y cubierto asegurando su protección a la luz.

3.2. Diseño de mezclas para la selección del tipo de disolvente

La elección de los disolventes utilizados para optimizar el proceso de extracción convencional se realizó con base a su naturaleza polar relativa de cada uno de los disolventes. Con lo cual se determinó un diseño experimental (diseño Simplex-Centroide y tres puntos interiores añadidos), para determinar las condiciones y el número de ensayos a realizar.

Para obtener las proporciones de los disolventes lo más adecuado fue emplear un diseño de mezclas, donde los factores son los disolventes y por lo tanto, sus niveles son dependientes, debido a que la suma de los factores siempre deber ser igual a 1, la experimentación se sujetó bajo esa condición mostrada en la Ecuación 3.1, en donde P representa el número de componentes de la mezcla (Montgomery, 2007). Los diferentes tratamientos que se llevaron a cabo se describen en la Tabla 3.1, los cuales se realizaron por triplicado.

$$\sum_{i=1}^P x_i = 1 \quad (3.1)$$

La Tabla 3.1 detalla las distintas combinaciones de los disolventes etanol, agua y acetona, que se estudiaron. Las proporciones de los disolventes variaron de 0, 1/4, 1/2 y 1, estos incrementos se usaron para abarcar de forma uniforme el rango de combinaciones de los disolventes, por lo que se lograron un total de diez tratamientos.

Tabla 3.1. Tratamientos del diseño experimental de mezclas.

Tratamiento	Proporciones de los disolventes		
	Etanol	Agua	Acetona
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/2	1/4	1/4
8	1/4	1/4	1/2
9	1/4	1/2	1/4
10	1/3	1/3	1/3

Finalmente se seleccionó un diseño Simplex-Centroide añadiendo tres puntos interiores al diagrama ternario (Figura 3.2), el cual se utilizó para evaluar el efecto de los disolventes (etanol, acetona y agua) de manera más específica y eficiente, sobre las variables de respuesta (CFT y AA). Donde los vértices representados por los puntos 1, 2 y 3 son cada uno de los disolventes puros, los puntos 4, 5 y 6 muestran las mezclas binarias, mientras que los puntos interiores (7, 8, 9 y 10) representan las mezclas ternarias; el punto central (10) contiene proporciones iguales de cada disolvente. Con estos puntos interiores añadidos se incrementa la capacidad del modelo para un correcto ajuste de los datos.

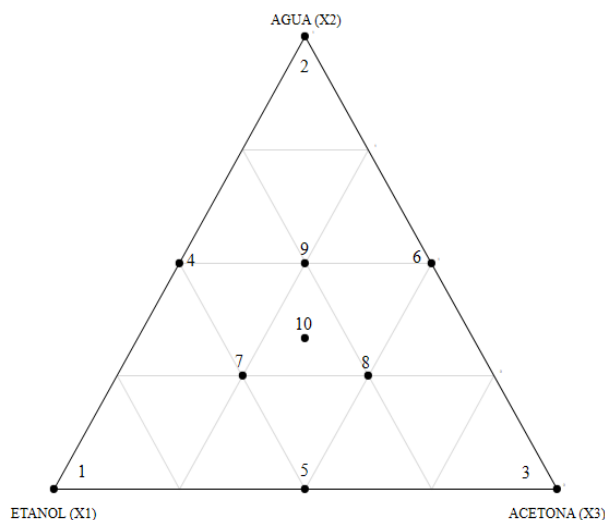


Figura 3.2. Diseño Simplex-Centroide y tres puntos interiores añadidos para los tres componentes del sistema de mezcla.

3.3. Extracción convencional de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó a partir de las muestras de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) obtenida de la industria vitivinícola San Juanito SPR de RL ubicada en la ciudad de Tequisquiapan, Querétaro.

El equipo de extracción se montó utilizando mezcladores (vasos de precipitados de 100 ml forrados) y agitadores magnéticos del mismo tamaño. De este modo los vasos de precipitados fueron colocados dentro de un baño a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, se utilizó una relación sólido-líquido de 5 g de muestra por 100 mL de disolvente. Los disolventes utilizados fueron etanol, acetona, agua y las mezclas de estos mismos (mezclas binarias y ternarias), así como también se estableció una agitación de 8 rpm en un lapso de 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm, a 4°C y 15 minutos. Todas las extracciones se realizaron por triplicado y se almacenaron en frascos de color ámbar de 120 mL, a una temperatura de 4°C , hasta su posterior análisis.

3.4. Cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT)

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por la metodología colorimétrica Folin-Ciocalteu descrito por Raza *et al.* (2013). En un tubo de ensayo se mezclaron 100 mL del extracto con 200 mL de reactivo Folin y 2 mL de agua desionizada. Esta mezcla se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente, después se agregó 1 mL de Carbonato de sodio al 20% y se prosiguió a incubación por una hora en oscuridad y a temperatura ambiente, para finalmente leer su absorbancia con espectrofotómetro a un pico de absorbancia de 765 nm. La cuantificación de compuestos fenólicos totales se midió con respecto a una curva de calibración de ácido gálico (AC) y los resultados se expresaron en mg EAG/100 g de muestra seca (m.s.). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.5. Determinación de la actividad antioxidante (AA)

■ MÉTODO DPPH

Con el método DPPH, descrito por Dubie *et al.* (2013) se determinó la capacidad antioxidante, se colocaron en un tubo de ensayo 1.5 mL del extracto más 1.5 mL de la solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), esta mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar en la oscuridad durante un lapso de 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 515 nm con la ayuda de un espectrofotómetro. La actividad captadora de radicales libres de cada muestra se expresó como el porcentaje de inhibición del DPPH reducido y se calculó de acuerdo a la Ecuación 3.2.

$$\%Inhibición = \left[1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] \quad (3.2)$$

■ MÉTODO ABTS

Se empleó el método ABTS descrito por Ozgen *et al.* (2006). Primero se formó una disolución con el compuesto ABTS a una concentración de 7 mM con persulfato de potasio y se diluyó en agua desionizada, posteriormente se incubó por 18 horas en

refrigeración y en oscuridad. Para su posterior uso, el radical ABTS formado se diluyó con etanol para obtener una absorbancia entre 0.7 y 0.8 a una longitud de onda de 734 nm. Finalmente se realizaron las absorbancias de las muestras, añadiendo 100 mL del extracto mas 900 mL del radical ABTS a 734 nm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron por medio de una curva de calibración en mg de Trolox/100 g de muestra seca (m.s.).

3.6. Desarrollo de la cinética de extracción

En la realización de la cinética de extracción se colocaron 5 gramos de muestra, más 100 mL de la mezcla binaria optima (40% acetona y 60% agua) en los mezcladores designados. Se mantuvo una velocidad de agitación de 8 rpm., bajo una temperatura constante de 25 ± 1 °C, bajo diferentes tiempos de extracción (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 80 y 120 min), posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm, 4 °C y 15 minutos en una centrífuga (UNIVERSAL320 R, Hettich Lab, Alemania). La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu empleando Ácido Gálico como estándar, así como el uso de los radicales DPPH y ABTS en la determinación de la actividad antioxidante. La expresión de la concentración se reportó mg/100g de muestra seca. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*).

Los resultados de la caracterización del raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*) se aprecian en la Tabla 4.1. Se puede observar que el % de humedad fue de 21.8 ± 1.5 , en la literatura se reporta un contenido de humedad de 16 % (Pardo & Perona, 2005), los cuales son similares con los datos reportados en este trabajo, es importante señalar que este contenido de humedad puede verse influenciado en gran medida por el tipo de cultivar a analizar, debido a que el raspón es considerablemente húmedo, dado que se recolecta en verde y en la etapa del despallado se mantiene en contacto con el mosto de las uvas durante unos minutos. Por ello, su contenido de humedad puede variar hasta un 55 % o 80 % (Barros, et al., 2015). Esta humedad tiende a ser reducida cuando el raspón es separado del proceso, con lo cual la humedad tiende a bajar del 15-20 % (Senovilla & Giraldo, 2005).

El pH encontrado en el raspón de uva obtuvo un valor de 4.3 el cual es relativamente similar al reportado por Moreno & Peinado (2012), quienes reportan un pH de 4.5. Esta variedad de raspón tiende a ser mayormente ácido, debido al tipo de uva Syrah.

Tabla 4.1. Caracterización del raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*)

Análisis	Valor	Referencia
%Humedad	21.8 ± 1.5	$16.0 \pm 0.0^*$
pH	4.3	4.5**

Fuente: (Pardo & Perona, 2005)*,(Moreno & Peinado, 2012)**

4.2. Evaluación de la influencia del solvente y sus mezclas sobre el contenido total de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante

Con el fin de estudiar las interacciones y el comportamiento entre los disolventes puros (acetona, agua, etanol) y sus mezclas (binarias y ternarias) sobre el contenido de compuestos fenólicos obtenidos a partir del raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*), se realizaron una serie de tratamientos con proporciones diferentes de disolventes, los cuales fueron previamente descritos en el apartado de Materiales y Métodos (Tabla 3.1).

Los resultados obtenidos se representaron en un gráfico Simplex-Centroide (Figura 4.1A) mostrando que existieron zonas con diferentes colores que van desde colores rojos claros hasta rojos oscuros, además se obtuvieron zonas de tonalidades en amarillo y en verde. Todos los colores muestran un grado de interacción entre los disolventes y los compuestos fenólicos. Por lo tanto, las zonas de colores verdes representan interacciones débiles o bajas, por lo que se pudo observar que estas interacciones correspondieron principalmente a los disolventes en estado puro, así como en la mezcla etanol-acetona. Para el color amarillo, este representa interacciones intermedias, siendo muy baja su presencia en el gráfico Simplex-Centroide. Sin embargo, los colores rojos muestran una alta interacción entre los disolventes en la obtención de los compuestos fenólicos, por lo que los colores rojos claros muestran una elevada interacción, como es el caso de las mezclas binarias etanol-agua y agua-acetona, mientras que la interacción es aún más intensa para el rojo oscuro, el cual correspondió a la mezcla ternaria (etanol-agua-acetona) y teniendo una ligera tendencia a la mezcla agua-acetona.

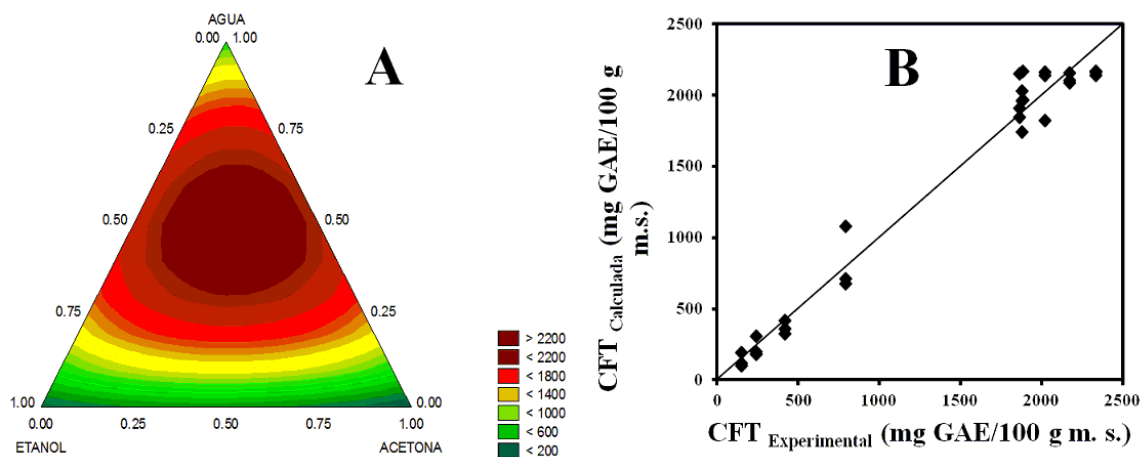


Figura 4.1. Simplex-Centroides obtenido a partir del diseño de mezclas (A) y ajuste de los datos experimentales contra los calculados del modelo cúbico de regresión especial para la evaluación de los Compuestos Fenólicos Totales (B).

A partir de los resultados obtenidos con el modelo cúbico de regresión especial, se dedujo que el mejor sistema para la extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) del raspón de uva, fue etanol-acetona-agua a una proporción de 0.25-0.75-0.50, donde se presentaron valores considerablemente altos de CFT (2037.33 ± 189.076 mg GAE/100 g m.s.), probablemente esto se deba a que la naturaleza de los solventes aumenta la permeabilidad del tejido celular, mejora la transferencia de masa y mejora la recuperación de los compuestos solubles en agua. La mezcla de disolventes orgánicos y agua se utiliza en general para la extracción de componentes fenólicos valiosos (Baydar *et al.*, 2006). Se ha encontrado que el etanol es uno de los disolventes más comúnmente utilizados para la extracción de fracciones ricas en antocianina de materiales vegetales (Cacace & Mazza, 2002) ya que el etanol posee protones dissociables que lo hacen un disolvente de naturaleza prótica, además de que la principal ventaja de usar al etanol como solvente, para la extracción de polifenoles en comparación con otros solventes orgánicos, es que es más seguro para el consumo humano y, por lo tanto, permite su uso en industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas (Xia *et al.*, 2011). A diferencia de los otros disolventes (etanol y agua) próticos polares, la acetona es un disolvente aprótico polar, en la que no residen átomos de hidrógeno unidos a sus átomos de oxígeno, por lo cual no puede formar enlaces de hidrógeno entre sus moléculas, sin em-

bargo, el átomo de oxígeno es fuertemente electronegativo de su grupo carbonilo tiene la capacidad de poder formar uniones de hidrógeno con moléculas de alcohol y agua, razón por la cual es altamente soluble en estos disolventes (Gennaro, 2003; Rezaie *et al.*, 2015). Por tal razón los grupos OH de los compuestos fenólicos también participan en la formación de enlaces de hidrogeno (Carey *et al.*, 2003), con lo cual se contribuye a aumentar la solubilidad en mezclas de solventes agua-acetona o agua-etanol. Debido a que la acetona posee pares de electrones no compartidos, también resulta ser un buen agente de solvatación de cationes de Sodio y Potasio (Tabla 1.1) presentes en el raspón de uva Syrah (Dupont & George, 2007). Un ejemplo del estudio de la acetona fue el descrito por Labarbe *et al.* (1999) donde la extracción de compuestos fenólicos de peso molecular alto (Taninos) se extrajeron mejor con acetona acuosa. Es por ello que uno de los principales factores que afectan la eficiencia de extracción es el tipo de disolvente y ésta es la razón por la que la elección del disolvente suele ser el primer parámetro que se determina en la creación del protocolo de la extracción.

Por otro lado, a partir del Simplex-Centoride, se obtuvo el modelo matemático el cual mostró coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) y con efectos sinérgicos para las muestras puras de etanol (239.58) y agua (793.21), siendo mayor para agua, mientras que para la muestra pura de acetona (150.35) no fue significativo. Para el caso de las mezclas binarias, etanol-acetona, etanol-agua y acetona-agua, los coeficientes de correlación fueron significativos con valores de 892.17, 5457.48 y 6194.03, respectivamente, siendo mayor en la mezcla de acetona-agua. Finalmente, en la mezcla ternaria (etanol-acetona-agua) su coeficiente de correlación significativo fue de 10420.28. Asimismo, a partir del modelo se optimizó el mayor contenido de compuestos fenólicos, por lo que la mezcla acetona-agua en un porcentaje de relación de 40-60 % obtuvo los valores máximos (2022.633 mg GAE/100 g m.s.) de compuestos obtenidos de la extracción. Lo que indica que existió en dicha mezcla un efecto sinérgico de los disolventes durante la extracción de los CFT. Este efecto de sinergismo se puede deber a la capacidad que tienen los disolventes de formar uniones de hidrógeno con el agua y los grupos OH de los compuestos fenólicos extraídos por la alta polaridad del agua y para el caso de la acetona, respectivamente, ya que en conjunto favorecen la obtención de los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Estudios preliminares han demostrado que la acetona permite solvatar compuestos fenólicos de alto peso molecular como Taninos, proantocianidinas y flavonoles (Mokrani *et al.*, 2016; Rezaie *et al.*, 2015).

Un estudio similar que reporta la aplicación del Simplex-Centroide en la extracción

de compuestos fenólicos monoméricos de subproducto de uva (orujos, pieles, semillas y tallos) Sauvignon Blanc (Jelley *et al.*, 2016) mostró que el sistema de solvente óptimo para la extracción de quercetina 3-O-glucósido, fue el que se encontró alrededor de la proporción de 40:50:10 (acetona: agua: etanol). Mientras que otra región similar de extracción óptima fue alrededor de 50:50:0 (acetona, agua y etanol) para la extracción de catequina y epicatequina. Con ello al comparar dichos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se pudo ver que existió dicho sinergismo, principalmente, entre los solventes acetona y agua, además de que se pudo observar que este tipo de modelos permiten la optimización de la extracción de compuestos fenólicos.

Una vez realizada la optimización de la extracción de compuestos fenólicos, se validó la eficiencia del modelo con el ajuste de los datos mostrados en la Figura 4.1B del modelo de regresión matemático el cual ajustó de manera adecuada la relación entre los datos experimentales y los calculados, obteniendo un coeficiente de determinación $R^2 = 0.974$, que describe la bondad de su ajuste.

Con el fin de evaluar la calidad de los compuestos fenólicos extraídos en el presente trabajo, se valoró la actividad antioxidante de los mismos. A partir del estudio de la actividad antioxidante mediante el método DPPH, mostrados en el gráfico Simplex-Centroide (Figura 4.2A) se muestran las zonas donde existieron actividades débiles, marcadas con colores en su mayoría verdes y una pequeña franja amarilla para las muestras binarias de etanol-acetona, etanol-agua y acetona-agua. De la misma forma, la mezcla ternaria, etanol-agua-acetona no presentó una actividad relativamente importante, pues mostró zonas de coloración verdes. Se pudo distinguir que las zonas que sí presentaron una apariencia relativamente importante, fueron aquellas sombreadas de una coloración rojo claro y rojo oscuro perteneciente a las muestras tratadas con disolventes puros como el etanol y acetona en mayor medida y solo una mínima franja en la muestra de agua pura.

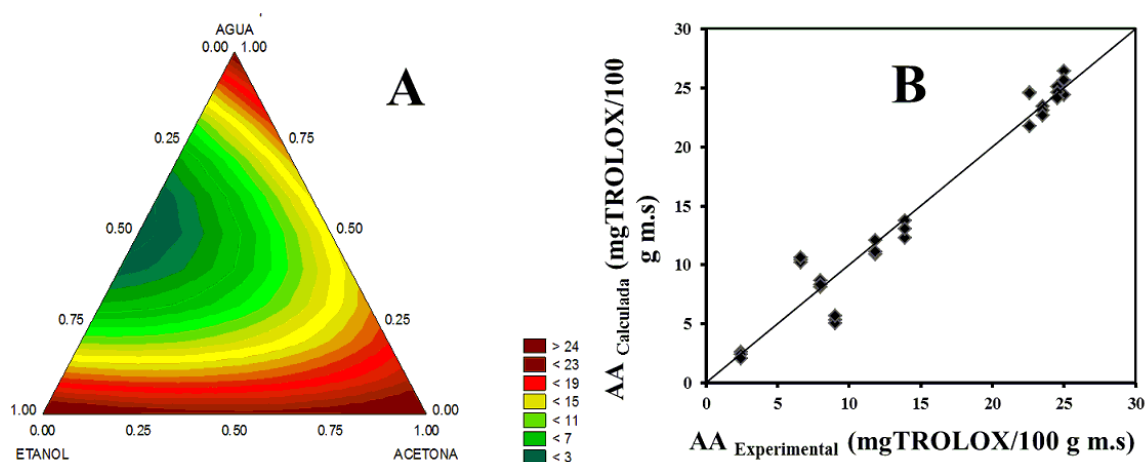


Figura 4.2. Simplex-Centroides del modelo cúbico de regresión especial que describe la superficie respuesta de la actividad antioxidante(A) y grafico de regresión, donde se visualiza el ajuste de los datos experimentales contra los calculados por medio de la prueba DPPH (B).

El modelo matemático planteado para esta prueba obtuvo coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) y con comportamiento sinérgico para las muestras puras tratadas con etanol (25.03), acetona (24.57) y agua (23.54), mientras que para las mezclas binarias, etanol-acetona, etanol-agua y acetona-agua sus coeficientes de correlación fueron de 8.67, 87.43 y 40.61, respectivamente, pero con un comportamiento antagónico. La muestra ternaria etanol-agua-acetona obtuvo un coeficiente de correlación de 31.39 con un comportamiento antagónico, por lo que no favorecieron la actividad de los compuestos de interés. Sin embargo, la mezcla etanol-agua a una proporción de 0.4-0.6 obtuvo el valor máximo (35.11 mg TROLOX/100 g m.s.) de AA durante la extracción. Debido a que el modelo matemático obtuvo un ajuste de los datos experimentales contra los calculados de $R^2 = 0.950$ se determinó que el ajuste del modelo es debidamente correcto, tal como se muestra en la Figura 4.2B.

Por último, la AA fue también evaluada mediante el método ABTS. Se identificó el comportamiento del Simplex-Centroides para ABTS (Figura 4.3A) observando que las coloraciones que se visualizan fueron en su mayoría tonalidades rojas oscuras y rojas claras en las zonas que se evaluaron con las muestras puras de agua y etanol, así como las mezclas binarias de etanol-acetona, etanol-agua y acetona-agua, además de la mezcla ternaria (etanol-agua-acetona). Lo anterior indica que existió una eleva-

da actividad para dicha mezclas, lo anterior podría atribuirse a que el radical ABTS puede solubilizarse en medios acuosos y orgánicos, midiendo compuestos de naturaleza hidrófila y lipófila presentes en los compuestos de interés, por lo que realiza una amplia evaluación de los compuestos fenólicos de diferente naturaleza lipídicos e hidrofílicos (Arnao, 2000). También es posible apreciar una zona en la que no se obtuvo una actividad elevada, ya que su posición se encontró dentro de las franjas de coloración verde-amarillo, que fue únicamente para las muestras tratadas con el disolvente puro de acetona, tal efecto podría deberse a su baja afinidad relativa en comparación con las de los solventes puros de agua y etanol.

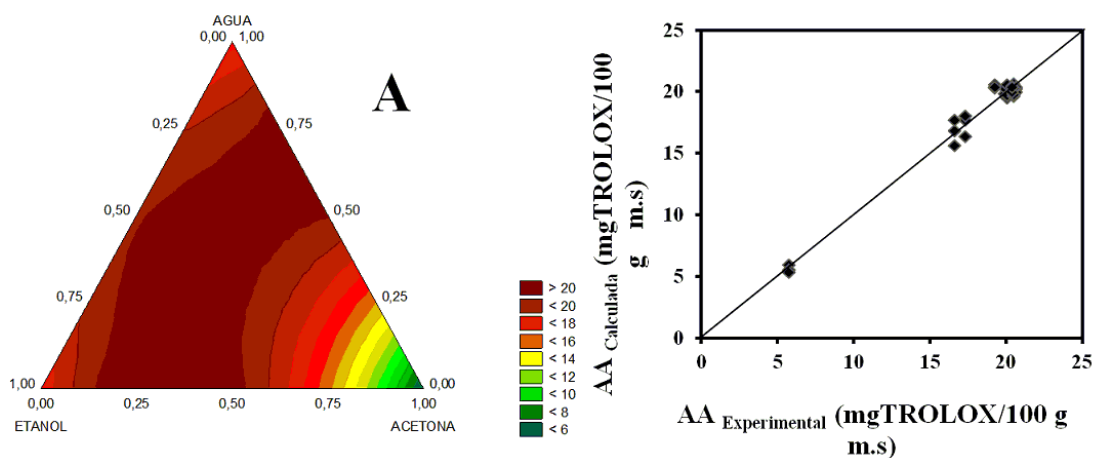


Figura 4.3. Simplex-Centroid del modelo cúbico de regresión especial que describe la superficie respuesta de la actividad antioxidante (A) y grafico de regresión, donde se visualiza el ajuste de los datos experimentales contra los calculados por medio del ensayo ABTS (B).

De este modo, el modelo matemático obtuvo coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) para las muestras puras de etanol (17.29), acetona (5.74) y agua (16.62), mientras que para las mezclas binarias, etanol-acetona, etanol-agua y acetona-agua también fueron significativas con un coeficiente de correlación de 35.79, 11.76 y 35.53, respectivamente. Tanto los solventes puros como las mezclas binarias mostraron un comportamiento sinérgico, sin embargo, en la mezcla ternaria (etanol-acetona-agua) su coeficiente de correlación significativo fue de 55.95 pero con efecto antagónico. A pesar de ello la mezcla acetona-agua en un porcentaje de relación de 30-70 % obtuvo

los valores máximos (20.82 mg TROLOX/100 g m.s.) de AA obtenidos durante la extracción. Lo que indica que existió en dicha mezcla un efecto sinérgico de los solventes durante la cuantificación de la AA. El modelo matemático describió de manera adecuada la relación entre los datos experimentales y los calculados obteniendo un valor de $R^2= 0.979$ tal como se muestra en la Figura 4.3B, donde se puede apreciar que el ajuste de los datos fue adecuado.

La utilización de los dos métodos DPPH y ABTS determino la capacidad de los extractos obtenidos a partir del diseño de mezclas Simplex-Centroide en la extracción de los CFT. Los resultados obtenidos para el ensayo de DPPH (Figura 4.2) y ABTS (Figura 4.3) mostraron que el sistema que obtuvo un mayor contenido de AA en el ensayo de DPPH fue etanol puro, con un valor promedio de 25.48 ± 1.02 mg TROLOX/100 g m.s., mientras que para ABTS el valor más alto fue en la mezcla ternaria (etanol-agua-acetona) con un valor de 20.43 ± 0.120 mg TROLOX/100 g m.s. Finalmente, las diferencias encontradas en los resultados obtenidos entre ambas técnicas pueden estar relacionadas con la manera en como los radicales ABTS y DPPH trabajan, ya que el radical libre DPPH solo se puede disolver en medios orgánicos (especialmente en medios alcohólicos) y no en medios acuosos, lo cual resulta ser una limitación importante cuando se trata de interpretar antioxidantes hidrófilos (Arnao, 2000), ya que suele ser afín a compuestos lipolíticos, caso contrario al ABTS, el cual considera compuestos lipolíticos e hidrofílicos en su reacción, lo que puede llevar a tener diferencias entre ambas técnicas. Por lo tanto, es importante evaluar la AA mediante el uso de dos métodos.

De forma general, los valores de AA obtenidos y presentados en este trabajo son similares a los reportados por Franco-Bañuelos *et al.* (2017), quien encontró en muestras de uva Petite Syrah, valores de 38.25 mg TROLOX/100 g. de muestra fresca para ABTS y 429.64 mg TROLOX/100 g. de muestra fresca para el ensayo DPPH. Se puede apreciar que existen ciertas diferencias entre los valores reportados, los cuales se puede deber al peso fresco de la muestra de uva Petite Syrah en comparación con el peso seco del raspón de uva Syrah. Cabe destacar que el raspón corresponde únicamente a la parte leñosa fermentada que forma el esqueleto del racimo, mientras que el grano de uva está integrado por hollejo, pula y pepitas, lo cual incrementa el contenido de compuestos con una mayor AA.

4.3. Cinética de extracción óptima

Una vez optimizado y seleccionado el tipo de disolvente a utilizar en el proceso de extracción, se obtuvieron los compuestos fenólicos a diferentes tiempos de procesamiento para conocer la máxima cantidad extraíble de dichos compuestos, además de evaluar su actividad antioxidante. Para ello, se utilizó la mezcla binaria acetona-agua en un porcentaje de relación del 40-60 %. Así, en la Figura 4.4 se puede apreciar la evolución del contenido de compuestos fenólicos en función del tiempo (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 80 y 120 min), encontrándose un aumento total del 67 % hasta alcanzar el equilibrio de la extracción.

Se puede observar que en los primeros minutos (1, 3 y 5 min) la extracción no muestra grandes incrementos, sin embargo, a partir del minuto 10, se comenzaron a marcar diferencias significativas ($p < 0.05$) hasta el minuto 80, pasando de 1873.93 ± 123.74 a 4583.97 ± 271.17 mg GAE/100 g m.s., siendo un aumento del 59 %, aproximadamente. En este sentido, los valores obtenidos durante este intervalo de tiempo pudieron verse mayormente influenciados por la difusión y el tiempo de exposición del tratamiento (Porto & Natolino, 2017) que presento la mezcla binaria (acetona-agua), pues debido a los movimientos convectivos dentro del proceso de extracción por la agitación, el disolvente pudo promover la disminución de la resistencia a la transferencia de masa (Chan *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2007), mejorando así la extracción.

Finalmente, del minuto 80 al 120 se observó un comportamiento ligeramente constante, no mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos tiempos, lo que indica que posiblemente se alcanzó un equilibrio termodinámico en la extracción, solo aumentando un 6 %, por lo que se agotan los compuestos a extraer.

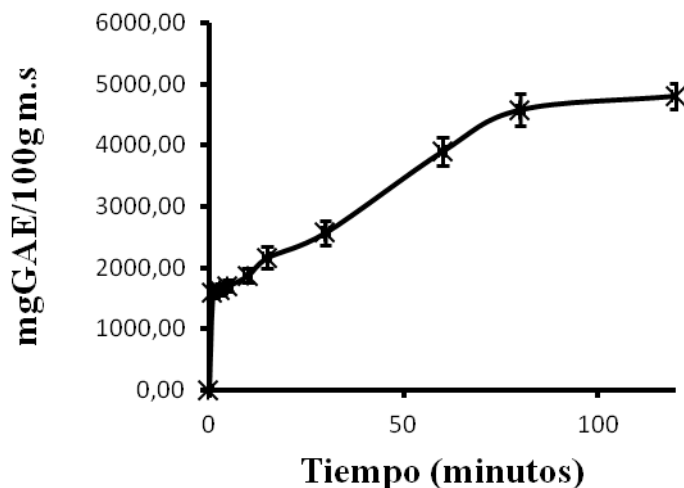


Figura 4.4. Cinética de extracción de compuestos fenólicos totales a diferentes tiempos de extracción.

Se ha encontrado un estudio con resultados similares a los obtenidos en este trabajo, en el que Porto & Natolino (2017) reportan que los polifenoles de semilla de uva (*Vitis vinífera*) extraídos con fluidos supercríticos mostraron que con un 15% de codisolvente (SC-CO₂) y después de 200 minutos, la extracción les permitió obtener un valor de 4940 mg de GAE/100 g de m.s. Al comparar su resultado con el obtenido en el presente trabajo a 120 minutos (4807.43 mg de GAE/100 g de m.s.), se puede observar que el tiempo de extracción es menor y que los valores tienden a estar en un intervalo semejante. Con lo cual se podría inferir que la optimización de la mezcla de disolventes resulta ser práctica y menos costosa en comparación con la técnica de fluidos supercríticos, que tiende a requerir mayor energía y costos elevados de proceso.

Por otro lado, el comportamiento de las cinéticas de extracción para la validación de su actividad antioxidante, mediante la prueba con ABTS (Figura 4.5 A) mostró un incremento del 87% durante el proceso de extracción, obteniendo valores desde 5.64 ± 1.12 hasta 43.14 ± 0.54 mg Trolox/100g m.s. A partir del minuto 5 y hasta el minuto 60 se puede distinguir el mayor incremento en la actividad antioxidante siendo del 75%, para finalmente alcanzar el equilibrio. Lingua *et al.* (2016) ha reportado para esta prueba valores de 62.04 ± 2.6 mg Trolox/100g m.s en muestras de orujo de uva Syrah (*Vitis vinífera*) con un tiempo de agitación de 200 minutos, valores cercanos

a los presentados en éste trabajo. Para los resultados obtenidos con la prueba de DPPH (Figura 4.5 B) estos mostraron que se produjo un incremento del 76 % durante el transcurso de la extracción. Así, transcurrido el tiempo desde el minuto 1 hasta el minuto 120, se obtuvieron máximos valores de 70.77 ± 2.20 mg Trolox/100g m.s., siendo ligeramente mayores a los reportados por Lingua *et al.* (2016) quien obtuvo 53.29 ± 21 mg Trolox/100g m.s., en muestras de orujo de la misma variedad de uva para el método DPPH.

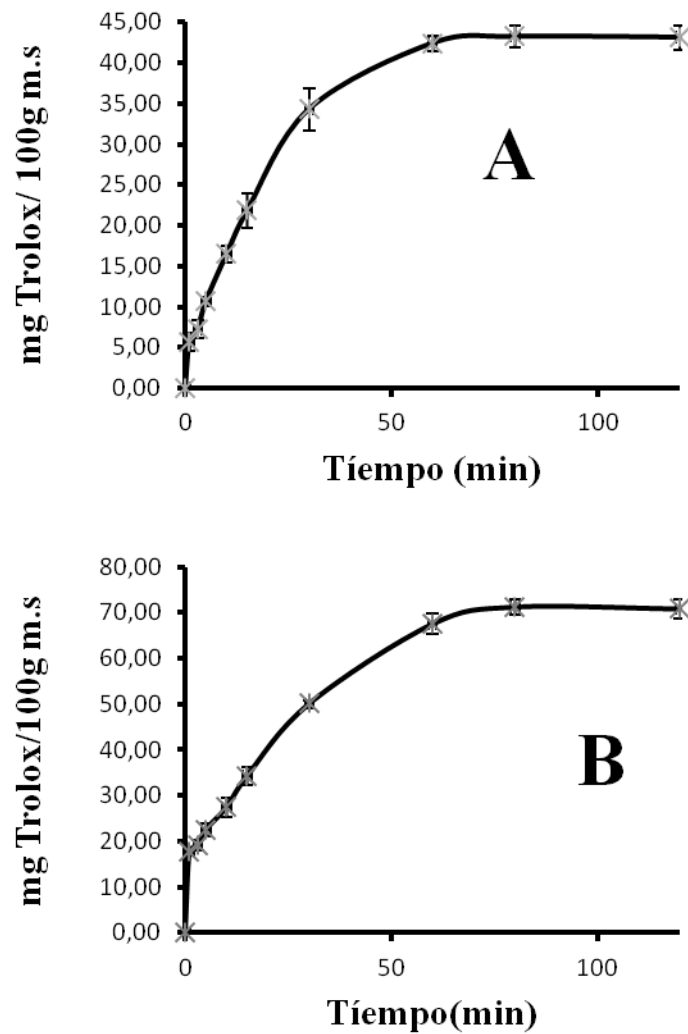


Figura 4.5. Cinéticas de extracción de la actividad antioxidante mediante la técnica ABTS (A) y DPPH (B) bajo diferentes tiempos de extracción.

En resumen la utilización de los dos métodos empleados ABTS y DPPH resultó ser una herramienta eficaz, para la cuantificación de la actividad antioxidante de raspón de uva Syrah (*Vitis vinífera*). Aunque se apreciaron diferencias en cuanto al contenido, se puede distinguir que con DPPH se cuantificó mayor AA (70.77 ± 2.20 mg Trolox/100g m.s.) en comparación con ABTS (43.14 ± 0.54 mg Trolox/100g m.s.) y esto en parte se puede inferir a la selectividad de reacción de cada radical, se conoce que DPPH puede reaccionar con polifenoles como las catequinas y proantocianidinas, pero no con ácidos fenólicos (Kaneda *et al.*, 1995; Mareček *et al.*, 2017), mientras que el ABTS reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado (Pérez-Nájera *et al.*, 2013; Roginsky & Lissi, 2005). A pesar de ello, el utilizar dos métodos de validación, hace posible que se complementen el uno con el otro, para proporcionar mayor información sobre el contenido de la actividad antioxidante.

V.CONCLUSIONES

- Con la implementación del diseño Simplex-Centroide (DSC) de la Metodología de Superficie de Respuesta se pudo construir el diagrama ternario en el cual se posicionaron los diez puntos de mayor prioridad que representaron todas las posibilidades de mezcla de los tres disolventes (etanol, agua y acetona) evaluados en busca de extraer el mayor contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.
- A partir del Simplex-Centroide se obtuvieron coeficientes que ayudaron a describir el fenómeno de interacciones, con los cuales se pudo construir el modelo de regresión cubico especial, el cual se utilizó para poder ajustar el proceso de extracción y con ello la optimización del mismo.
- Con el estudio de la cinéticas de extracción se pudo observar el comportamiento del proceso de extracción a partir de la selección del mejor disolvente y/o su mezcla que en este caso fue la mezcla binaria agua-acetona (60-40 %), con ello se pudo apreciar que el comportamiento se vio afectado en función de las variables de temperatura, relación de disolvente y tiempo. Además de que a partir de los comportamientos de las cinéticas se pudieron apreciar los puntos de control en el proceso de extracción, ya que estos ofrecen un panorama de las variables (tiempo, temperatura y agitación) que afectan directamente el proceso.

Bibliografía

- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788.
- Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *The Royal Society of Chemistry*, 29-56.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419-421.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Bataglion, G., da Silva, F., Eberlin, M., & Koolen, H. (2015). Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. *Food chemistry*, 180, 280-287.
- Baydar Nilgun, G., Sagdic, O., Gulcan, O., & Cetin, S. (2006). Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera*L.) seed extracts. *Food Science Technology*.
- Bettiga, L. J., Golino, D. A., Mcgourty, G., Smith, R. J., Verdegai, P. S., & Weber, E. (2003). Wine Grape Varieties in California. Publication University of California. *Division of Agriculture and Natural Resources*.
- Bocco, A., Cuvelier, M.-E., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2123-2129.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: LWT. *Food Science and Technology*, Vol. 28, no. 1., 25-30.
- Cabildo Miranda, M., García Fraile, A., López García, C., & Santa María Gutiérrez, M. D. (2011). *Química orgánica*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J. agric. food chem.*
- Cantú, G. R., Palomo, L. L., Nery, F. S., López, L., & Barajas Bermúdez, L. (2012). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas* 14(2) , 48-56.

- Carey, F. A., & Robert, M. (2003). *Organic chemistry*. McGraw-Hill.
- Castillo García, E., & Martínez Solís, I. (2007). Manual de fitoterapia. *Elsevier Masson*.
- Chan, C.-H., Rozita, Y., & Ngoh, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical engineering* 92(6), 1169-1186.
- D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-istituto superiore di sanita*, 43(4), 348.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dubie, J., Stancik, A., Morra, M., & Nindo, C. (2013). Antioxidant extraction from mustard (brassica juncea) seed meal using high-intensity ultrasound. *Journal of food science*, 78(4), E542-E548.
- Dupont, D. H., & George, W. G. (2007). *Química orgánica experimental*. Editorial Reverte S A.
- Eva, G. C. (2004). Compuestos fenólicos. un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista offarm* 23(6), 80-84.
- Franco, D., Pinelo, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2007). Processing of rosa rubiginosa: Extraction of oil and antioxidant substances. *Bioresource technology*, 98(18), 3506-3512.
- Franco-Bañuelos, A., Contreras-Martínez, C. S., Carranza-Téllez, J., & Carranza-Concha, J. (2017). Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de uvas no nativas para vino cultivadas en zacatecas, México. *Agrociencia* 51(6), 661-671.
- Gallego, N. V., & Leria, P. C. (2018). *Elaboración de vinos, otras bebidas alcohólicas, aguas, cafés e infusiones. hotr0209*. IC Editorial.
- Gaviria, P. M., Restrepo, D. A., & Suárez, H. (2010). Utilización de hidrocoloides en bebida láctea tipo kumis. *Vitae* 17.1, 29-36.
- Gennaro, A. R. (2003). *Remington farmacia volumen uno*. Panamericana.
- González, C. G., & Lise, A. V. (2013). *Gráficos estadísticos y mapas con r*. Ediciones Díaz de Santos.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Jara-Palacios, M. J., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of syrah wines from a warm climate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(12), 2663-2671.

- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
- Gutiérrez, H., & De La Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México: McGraw-Hill.
- Hernández, A. G. (2010). *Tratado de nutrición, segunda edición Vol. 2*. Ed. Médica Panamericana.
- Hidalgo, T. J. (2006). *La calidad del vino desde el viñedo*. Mundi-Prensa.
- Ibarz, A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Mundi Prensa.
- Jelley, R. E., Herbst-Johnstone, M., Klaere, S., Pilkington, L. I., Grose, C., Martin, D., Barker, D., Fedrizzi, B. (2016). Optimization of ecofriendly extraction of bioactive monomeric phenolics and useful flavor precursors from grape waste. *Acs sustainable chemistry engineering*.
- Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H., & Koshino, S. (1995). Reducing activity and flavor stability of beer. *Technical quarterly of the master brewers association of the americas*, 32, 90-94.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito, Chihiro., Furukawa, H. (2000). Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(9), 3865-3871.
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P. (2014). Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different french grape varieties. *Molecules*, 482-506.
- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J.-M., & Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of agricultural and food chemistry* 47(7), 2719-2723.
- Lamarque, A. (2008). *Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica/Theoretical and practical organic chemistry*. Editorial Brujas.
- Liazid, A. G., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food chemistry*, 124(3), 1238-1243.

- Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food chemistry*, 208, 228–238.
- Lobato-Calleros, C., Vernon, C., Guerrero, L., Soriano, M., & Escalona, B. (1997). *Efecto del tipo de grasa sobre las características texturales instrumentales y sensoriales*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En *In: Desarrollo y transversalidad serie lasallista investigación y ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of cereal science* 73, 40-45.
- Martínez, R. T. (2015). *Evaluación de la viabilidad del uso de ultrasonidos de potencia para la extracción de compuestos fenólicos a partir de la cascara de mango manila (Mangifera indica L.)*. Tesis de Maestría no publicada, Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.
- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica L.*) fruit. *Separation and purification technology*, 162, 68–76.
- Montgomery, D. (2007). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa wiley.
- Moreno, J., & Peinado, R. (2012). *Enological chemistry*. Elsevier.
- Naveda González, G. F. (2010). Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (*Ruda Graveolens*), con alto contenido de polifenoles. *QUITO/EPN*.
- Oriol, S. M. (2003). *LA CULTURA DEL VINO: Una guía amena para pasar de iniciado a experto en vino*. Amat.
- Ortega, D. C., Bustamante, R. M., Gutiérrez, R. D., & Correa, E. A. (2015). Mixture experiments in industrial formulations. *DYNA*.
- Ozgen, M., Reese, R., Neil, T., Artemio, Z., Scheerens, J. C., & Miller, A. R. (2006). Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2 a-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem*, 54, 1151-1157.

- Pardo, M. A., & Perona, J. P. (2005). Utilización de raspon de uva en la elaboración de sustratos específicos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer . *ITEA, Vol. 101 (1)*, 59-69.
- Pätzold, M., Weimer, A., Liese, A., & Holtmann, D. (2019). Optimization of solvent-free enzymatic esterification in eutectic substrate reaction mixture. *Biotechnology Reports*.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, A. (2014). Phenolic compounds in food . *Bolivian Journal of Chemistry*.
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomeli, M., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia, 15(3)*, 18-22.
- Piñero, Z., Guerrero, R., Fernández-Marin, M., Cantos-Villar, E., & Palma, M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of stilbenoids from grape stems. *Journal of agricultural and food chemistry, ACS Publications, 61 (51)*, 12549-12556.
- Porto, D. C., & Natolino, A. (2017). Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- Rajha, H., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International, 65*.
- Raza., Asad., Ansari., & Tariq, M. (2013). Spectrophotometric Determination of Citalopram in Pharmaceuticals Using Folin-Ciocalteu Reagent. *Asian Journal of Chemistry, 25*, 8913-8916.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay . *Free Radical Biology and Medicine. 26*, 1231-1237.
- Rebolo López, S. (2007). *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con DO: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra*. Univ Santiago de Compostela.
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., & Golmohammadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties . *Food Chemistry 173*, 577-583.

- Robati, M., Carter, A., & Perraton, D. (2013). Repeatability and reproducibility of microsurfacing mixture design tests and effect of total aggregates surface areas on the test results . *Australian Journal of Civil Engineering*, 11.
- Roginsky, V., & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food . *Food Chemistry*, 92 (2) , 235-254.
- Ross, K., Beta, T., & Arntfield, S. D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113(1), 336–344.
- Senovilla, A., & Giraldo, G. (2005). *Revalorización Energética de los Residuos de la Industria Vitivinícola*. Proyecto Final de Carrera.
- Shafie, M. H., Yusof, R., & Gan, C.-Y. (2019). Deep eutectic solvents (DES) mediated extraction of pectin from Averrhoa bilimbi: Optimization and characterization studies . *Carbohydrate Polymers* , 216, 303–311.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects a review. *Journal of functional foods, Elsevier*, 18, 820-897.
- Sun, B., & Spranger, M. (2005). Review: quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciencia Tec. Vitit.*, 20(2), 59-89.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal Volumen I . *Universitat Jaume*.
- Tomás Merlos, A. (2012). Comportamiento y caracterización de nuevas variedades de uva para vinificación en el Altiplano . *Programa De Innovación Tecnológica, Viticultura*, 44.
- Vega Romero, G. (2016). *Evaluación del efecto del ultrasonido de potencia en las propiedades de equilibrio y transporte de masa en la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de tamarindo (Tamarindus Indica L.) En soluciones etanol-agua*. Tesis de maestría no publicada, Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). Phenolic compound biochemistry . *Springer*.
- Villa, P. (2018). *Cultivar la vid* . Parkstone International.
- Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & González-Aguilar, G. A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of ‘Hass’ avocado. *Food Research International, Elsevier* 44, 1231-1237.

- Wang, G., Cui, Q., Yin, L.-J., Zheng, X., Gao, M.-Z., Meng, Y., & Wang, W. (2019). Efficient extraction of flavonoids from Flos Sophorae Immaturus by tailored and sustainable deep eutectic solvent as green extraction media . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Elsevier, 170*, 285-294.
- Xia, D., Wu, X., Shi, J., Yang, Q., & Zhang, Y. (2011). Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity . *LWT-Food Science and Technology, Elsevier, 44*, 347-349.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, Xingqian., Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food chemistry*.