

## OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO DE ORUJO DE UVA VARIEDAD MALVASÍA

MSc. Laura Soto<sup>1\*</sup>, Dra. María Berradre<sup>1</sup>, Dr. José Ortega<sup>2</sup>, Dr. Jorge Ortega<sup>3</sup>, MSc. Betzabé Sulbarán<sup>1</sup>, MSc. Graciela Ojeda de Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Alimentos. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Productos Naturales. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

<sup>3</sup>Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

\*Autor para la correspondencia. E-mail: [laurarsotoa@gmail.com](mailto:laurarsotoa@gmail.com)

Recibido: 3-6-2018 / Aceptado: 13-11-2018

### RESUMEN

El orujo presenta en su composición altos niveles de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes interesantes para su utilización en alimentos y/o en diferentes sistemas biológicos. Se optimizaron las condiciones para la extracción de compuestos fenólicos empleando método de superficie de respuesta (MSR) en orujo de uvas variedad Malvasía, en el estado Zulia, Venezuela. El contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó por el método de Folin Ciocalteu y la actividad antioxidante del extracto por el método ABTS. Se estudiaron los efectos de la concentración del solvente y la temperatura de extracción en la evaluación del contenido de compuestos fenólicos. Las condiciones más adecuadas resultantes por el MSR para el orujo de uvas proveniente de la variedad Malvasía fue a 92,09% de etanol y 65°C. El análisis químico del extracto optimizado reportó una actividad antioxidante de  $21,08 \pm 2,69$  mmol TEAC.100g<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** *Vitis Vinifera*, compuestos fenólicos, extracción, optimización, antioxidante.

## OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN GRAPE EXTRACT MALVASIA VARIETY

### ABSTRACT

The pomace presents high levels of phenolic compounds with interesting antioxidant properties for use in food and / or in different biological systems in its composition. The conditions for the extraction of phenolic compounds were optimized using the response surface method (MSR) in grape marc Malvasia variety, in Zulia state, Venezuela. The content of total phenolic compounds was quantified by the Folin Ciocalteu Method and the antioxidant activity of the extracts by the ABTS method. The effects of the concentration of the solvent and the temperature of extraction in the evaluation of the content of phenolic compounds were studied. The most suitable conditions resulting from the MSR for the grape marc coming from the Malvasia variety was 92.5% Ethanol and 65 °C. The chemical analysis of the optimized extract reported an antioxidant activity of  $21.08 \pm 2.69$  mmol TEAC.100g<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Vitis Vinifera*, phenolic compounds, extraction, optimization, antioxidant.



# OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO EXTRATO DE BAGAÇO DE UVA VARIEDADE MALVASÍA

## RESUMO

O bagaço apresenta em sua composição altos níveis de compostos fenólicos com interessantes propriedades antioxidantes para uso em alimentos e / ou em diferentes sistemas biológicos. As condições para a extração de compostos fenólicos foram otimizadas utilizando o método da superfície de resposta (MSR) no bagaço de uva variedade Malvasia, no estado de Zulia, Venezuela. O teor de compostos fenólicos totais foi quantificado pelo método de Folin Ciocalteu e a atividade antioxidante do extrato pelo método ABTS. Os efeitos da concentração do solvente e da temperatura de extração na avaliação do teor de compostos fenólicos foram estudados. As condições mais adequadas resultantes do MSR para o bagaço de uva proveniente da variedade Malvasia foram 92,09% de etanol e 65 ° C. A análise química do extrato otimizado relatou atividade antioxidante de  $21,08 \pm 2,69$  mmol TEAC.100g<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** *Vitis Vinifera*, compostos fenólicos, extração, otimização, antioxidante.

## 1. INTRODUCCIÓN

La uva es uno de los frutos con mayor producción mundial, se genera alrededor de 69 millones de toneladas anuales y cerca del 80% de ésta producción es destinado a subproductos como vinos, sangrías, jugos de uva entre otros. Sin embargo, a nivel industrial en la producción de vinos se genera millones de toneladas de residuo después de la maceración, conocido como orujo de uva (Fontana, Antonioli & Bottini, 2013). Los principales residuos son, por orden de importancia, residuos orgánicos (bagazos, semillas, pulpa, pieles, raspones y hojas), aguas residuales, emisión de gases de efecto invernadero (CO<sub>2</sub>, compuestos orgánicos volátiles) y residuos inorgánicos (tierras de diatomeas, perlita, arcillas, bentonita) (Teixeira *et al.*, 2014). Dentro de toda esta amplia posibilidad de residuos, es interesante desde un punto de vista de reutilización o valorización, el orujo ya que presenta en su composición altos niveles de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes interesantes para su utilización en alimentos y/o en diferentes sistemas biológicos. (Fontana *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos que se producen durante el metabolismo secundario y se acumulan en distintos órganos de la planta de vid. El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común; un anillo fenol que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. Basados en su esqueleto de carbono pueden ser clasificados en dos grupos: compuestos no-flavonoides (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos y estilbenos) y flavonoides (antocianinas, flavan-3-oles, y flavonoles), de los cuales los compuestos flavonoides son el grupo de interés en este estudio (Iacopini *et al.*,

2008; Katalinic *et al.*, 2010). Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas, mientras que los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos (Hanrly *et al.*, 2006; Marcano & Hasewaga 2002). A través de procedimientos de extracción con solvente, de preferencia alcohólicos, es posible obtener estos compuestos para su cuantificación (Lafka *et al.*, 2007). Para evaluar la actividad antioxidante de éstos compuestos existen diversos métodos, los más aplicados para la determinación de actividad antioxidante son ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica con un amplio rango de pH, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS•+ tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Berradre *et al.*, 2014). La principal vía de aprovechamiento de los orujos de uva es la alimentación animal y como abono en viñedos, debido a su valor nutricional. No obstante, en la actualidad, sólo un 3 % de la producción se destina a alimentación animal. Por ello, han emergido en los últimos años nuevas vías de valorización de los orujos de uva, entre las que destacan la obtención de compuestos bioactivos, principalmente polifenoles extraídos a partir de las pieles y semillas de uva, para su posterior aplicación (Martínez *et al.*, 2015). En esta investigación se optimizaron las condiciones de extracción de compuestos fenólicos contenidos en el orujo de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía, el cual es un desecho generado por la industria vitivinícola.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Muestra**

Se empleó el orujo de uva blanca variedad Malvasía (Hollejo, semillas, parte de raquis), generados durante la producción de vino. Se recolectaron de forma sistemática 10 Kg luego de la etapa de prensado. El orujo de uva fue proporcionado por la Granja: La Florida en febrero de 2017 (Cámara *et al.*, 2004).

Una vez recolectados 10 Kg del desecho luego de la producción del vino, se separó 1 Kg de orujo fresco para el desarrollo de los análisis proximales y 9 Kg de muestra de orujo secados y pulverizados para el resto de los análisis. Para el secado de la muestra se separaron por lotes de 3 Kg durante 7 días por exposición al sol. Posteriormente se realizó una molienda empleando un tamiz con apertura de partícula de 20 mesh (850 µm) almacenándose el polvo

en bolsas herméticas a temperatura ambiente y en un lugar seco hasta su posterior uso (Arvelález *et al.*, 2003).

## **2.2. Análisis proximal del orujo fresco**

Se evaluaron las variables: humedad (método AOAC, 7.007), grasa cruda (método AOAC, 7.055), fibra cruda (método AOAC, 7.061), cenizas (método AOAC, 7.009) y proteínas (método Kjeldahl AOAC, 7.015); en el orujo fresco. Cada variable evaluada se realizó por quintuplicado

## **2.3. Obtención de los extractos**

La extracción de los compuestos fenólicos derivados de la uva se realizó por medio de ultrasonido empleando como solvente etanol a diferentes concentraciones (100, 70 y 50%) a un tiempo de 40 min. La temperatura osciló entre 30, 40, 50 y 60°C. Se pesaron 0,5 g de muestra, se le agregaron 5 mL de solvente y se agitó (Vortex) por 2 minutos a una velocidad intermedia. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en un equipo de ultrasonido (Elma, Potencia 35KHz). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm (11200 fuerza g) por 5 min y se evaporaron a 50 °C hasta sequedad. Una vez evaporado totalmente el solvente, se taparon. El extracto puro obtenido se mantuvo a - 4°C, en envases ámbar por un máximo de 48 h (Guntero *et al.*, 2014).

## **2.4. Determinación del contenido de fenoles totales**

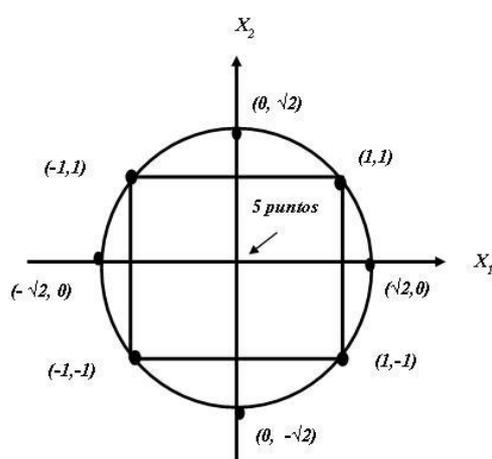
Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el método indicado por Amerine & Ought (1976) con algunas modificaciones. Se pesaron de 10 a 15 mg de los extractos secos y se disolvieron cada uno en 1 mL de etanol, sin realizar diluciones. La determinación se realizó empleando como solución patrón 1000 mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico (99%, Riedel de Häen) a partir de la cual se realizó la curva de calibrado en el intervalo de 100-1000 mg ácido gálico.L<sup>-1</sup>. La preparación de las soluciones patrón se realizó agregando 1580 µL de agua en tubos de ensayo, 20 µL de solución patrón o muestra y posteriormente se adicionó 100 µL de reactivo Folin. Se mezclaron uniformemente y se esperó 1 minuto antes de adicionar a cada uno 300 µL de una solución al 20 % de carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (J.T Baker); luego de esto, se dejaron reposar en la oscuridad, a 24 °C por dos horas para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrómetro UV-visible con arreglo de diodo (Thermo Scientific, Genesys 10S Uv-visible). Los resultados se expresaron en mg.L<sup>-1</sup> de equivalentes de ácido gálico (GAE, por sus siglas en inglés: Galic Acid Equivalents).

## **2.5. Diseño del experimento**

Un diseño central compuesto (DCC) se desarrolló para optimizar la extracción de compuestos fenólicos en orujo de uvas variedad Malvasía. El diseño fue implementado para evaluar el efecto de dos variables independientes: concentración de solvente etanol (%), ( $X_1$ ) y temperatura de extracción ( $^{\circ}\text{C}$ ), ( $X_2$ ). La selección y rango de estos dos factores se basaron en resultados previos a esta investigación. Se codificó cada variable a tres niveles: -1, 0, 1. Un total de 13 análisis aleatorios fueron asignados a partir del diseño central compuesto de segundo orden, los puntos centrales fueron repetidos 5 veces (**Tabla 1 y 2**). La **Figura 1** muestra el diseño en dos variables  $X$  (modelo  $2k$  con  $k: 2$ ), número factorial: 8 (4 puntos axiales y 4 puntos estrellas) y cinco puntos centrales para un  $\alpha: \sqrt{2}$  empleado para la optimización de las condiciones de extracción mediante MSR. Una vez obtenido el modelo de optimización se realizó su comprobación, para ello se emplearon dichas condiciones para realizar la extracción ( $n: 5$ ) de compuestos fenólicos. Los valores experimentales fueron comparados con el valor predicho y el error asociado entre ambos fue estimado.

**Tabla 1.** Diseño central compuesto para un factorial completo con tres niveles para la variedad Malvasía

c	Factor	Niveles			Centrales	$\pm 2,5$	$\pm 5$
$X_1$	Concentración de solvente (%)	100	70	50	92,5	90	95
$X_2$	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	40	50	60	60	65	55



**Figura 1.** Diseño central compuesto en dos niveles empleado para la optimización de las condiciones de extracción en orujo de uvas variedad Malvasía mediante MSR.

**Tabla 2.** Diseño experimental para el proceso de extracción empleando DCC de dos niveles en orujo de uvas variedad Malvasía

Extracción	Bloque	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentración del solvente (%)	Temperatura (°C)
1	1	-1	-1	90	60
2	1	1	-1	95	60
3	1	-1	1	90	70
4	1	1	1	95	70
5 <sup>a</sup>	2	α	0	94	65
6 <sup>a</sup>	2	-α	0	86	65
7 <sup>a</sup>	2	0	α	93	72
8 <sup>a</sup>	2	0	-α	93	58
9 <sup>b</sup>	3	0	0	92,5	65
10 <sup>b</sup>	3	0	0	92,5	65
11 <sup>b</sup>	3	0	0	92,5	65
12 <sup>b</sup>	3	0	0	92,5	65
13 <sup>b</sup>	3	0	0	92,5	65

<sup>a</sup> Puntos estrellas <sup>b</sup> Puntos centrales. Distancia axial α: 1,414

La **Tabla 2**, presenta el arreglo experimental el cual contemplo los 13 tratamientos, los cuales se realizaron por quintuplicado, para un total 65 ensayos. El análisis de regresión y las superficies de respuesta (MSR) para identificar las condiciones que tenían efecto significativo en la extracción de compuestos fenólicos así como los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.II (StartPoint Technologies, Inc). Se empleó como único solvente etanol por ser considerado uno de los más seguros en fines alimentarios, cabe destacar que el agua, aunque es el solvente universal considerado como seguro para muchas extracciones, se ha reportado mejores rendimientos de extracción con mezclas de solventes (Guntero *et al.*, 2014; Fontana *et al.*, 2013; Berradre *et al.*, 2014), por lo que para esta investigación se empleó etanol con concentraciones diferentes.

El modelo de regresión se llevó a cabo mediante análisis de varianza y test F con nivel de confianza del 95% para determinar si la respuesta predicha es estadísticamente significativa. Los datos experimentales obtenidos siguiendo los procedimientos anteriores se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo orden (**Ecuación 1**).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Donde Y es la respuesta, contenido de compuestos fenólicos, X<sub>i</sub> y X<sub>j</sub> son las variables independientes (factores) del estudio, β<sub>0</sub> es el término de intersección, β<sub>i</sub>, β<sub>ij</sub> y β<sub>ii</sub> son los coeficientes lineales, interactivos y cuadráticos, respectivamente.

La fase final del proceso de optimización es la validación de los resultados obtenidos, que consiste en la ejecución de los ensayos experimentales a las condiciones óptimas predichas, por la relación matemática obtenida a partir los datos experimentales y las superficies de respuesta. Una vez obtenidos los extractos a las condiciones óptimas, se calculó el error entre el valor predicho por el modelo y el valor obtenido experimentalmente para el contenido de compuestos fenólicos, utilizando la **Ecuación 2**.

$$\left| \text{Error (\%)} = \frac{\text{Valor predicho} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor predicho}} \right| \times 100 \quad (2)$$

## 2.6. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos bajo condiciones óptimas de extracción

La actividad antioxidante total del extracto optimizado se evaluó por el método ABTS reportado por Riece-Evans *et al.*, (1994), como patrón de referencia se empleó TROLOX. La generación química del radical ABTS<sup>•+</sup> se realizó a partir de la reacción de una solución de ABTS 7 mM con persulfato potásico 2,5 mM, ambos reactivos en una proporción de 1:1. Esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) durante un tiempo mínimo de 16 horas antes de comenzar las evaluaciones. Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup>, se diluye hasta alcanzar una absorbancia de 0,6- 0,7 a 750 nm (longitud de onda de máxima absorción), lo cual se logra mezclando aproximadamente 160  $\mu$ L de la solución de ABTS<sup>•+</sup> y 3000  $\mu$ L de etanol puro (Vit *et al.*, 2008; Kuskoski *et al.*, 2005). El radical generado fue estable por un periodo máximo de 24 horas, luego de este tiempo la absorbancia decae progresivamente y el radical no puede ser empleado para el análisis. La evaluación de la actividad antioxidante total en las muestras se realiza de acuerdo a la metodología descrita por Vit *et al.* (2008). Al radical ABTS<sup>•+</sup> generado se le determinó la absorbancia a 750nm (Abs cromóforo radical,  $t_{0\text{min}}$ ), se añaden 40  $\mu$ L de la muestra de extracto y se mide nuevamente la absorbancia a 750 nm transcurridos 5 minutos (Abs. Cromóforo radical + antioxidante,  $t_{5\text{min}}$ ).

La actividad antioxidante total (TAC) de la muestra se determinó de acuerdo a la **Ecuación 3**:

$$\text{TAC} = (\text{Abs. Cromóforo radical})_{t_{0\text{min}}} - (\text{Abs. Cromóforo radical} + \text{antioxidante})_{t_{5\text{min}}} \quad (3)$$

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis proximal del orujo de uvas variedad Malvasía

En la **Tabla 3** se presentan los resultados del análisis proximal realizado al orujo de uvas fresco para la variedad estudiada. El orujo de uva presentó un contenido de humedad que no excede del 40% m.m<sup>-1</sup>, encontrándose dentro del rango reportado por Hidalgo, (2002) (25%-45% m.m<sup>-1</sup>) y al valor reportado por Berradre *et al.*, (2014), cuyo valor es de 38,08% m.m<sup>-1</sup>, indicando que el orujo fresco proveniente de la cosecha directa generalmente contiene contenidos de humedad alto, lo cual coincide con este estudio, sin embargo, algunos autores reportan un contenido en humedad para el orujo de uva entre el 50 y 72% m.m<sup>-1</sup> dependiendo de la variedad de uva y del estado de madurez en el momento de su cosecha (Teixeira *et al.*, 2014).

El contenido de fibra cruda (18,36% m.m<sup>-1</sup>) es inferior al reportado por Hidalgo, (2002) debido a que en el fruto completo no debe exceder al 1% m.m<sup>-1</sup>, sin embargo, es similar al indicado por Berradre *et al.*, (2014) para la variedad Tempranillo, en la que se obtuvo 25,73% m.m<sup>-1</sup>. Los valores reportados dependiendo del material vegetal o del contenido de celulosa en el alimento comprenden entre un 5 y 20% m.m<sup>-1</sup>. En general, los constituyentes mayoritarios en este tipo de residuo, son sustancias pécticas con una concentración que oscila entre el 37 y 54 %, seguidos de celulosa con concentraciones que van desde el 27 % hasta el 37 % (Teixeira *et al.*, 2014). En cuanto al contenido de grasa cruda (**Tabla 4**), los resultados obtenidos para la variedad Malvasía se encuentra dentro del rango reportado por Maier *et al.*, (2009) para uva *Vitis vinifera* L. que va desde el 7% m.m<sup>-1</sup> hasta el 16% m.m<sup>-1</sup>. De igual forma, el contenido de grasa es inferior al reportado por Tseng & Zhao, (2013), donde reportan valores de 11,09% para orujo de uvas *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir. Esta diferencia entre los contenidos de grasa cruda puede atribuirse a la diferencia en el tamaño de las vacuolas que contienen la grasa en cada una de las variedades de uva, así como a factores agronómicos tales como la región de cultivo, las prácticas de fertilización, el riego, los ciclos de poda, estado fisiológico del fruto, entre otros cuidados (Maier *et al.*, 2009).

El contenido de cenizas o sustancias minerales presentes indicadas en la **Tabla 3** se encuentran por debajo de lo reportado por Deng *et al.*, (2011) (2,53 m.m<sup>-1</sup>) y por Hidalgo, (2002) entre el 2 y el 4% m.m<sup>-1</sup>, debido a que depende del contenido mineral de los suelos y del metabolismo de la vid, por ende, si el suelo es pobre en minerales esto se ve reflejado en el orujo. De igual forma, el contenido en cenizas del orujo estudiado se compara con los datos

obtenidos en el análisis elaborado por Frago, (2016), para este mismo subproducto en el cual se determina que éste es del 6,51%, siendo superior al obtenido en el presente estudio.

**Tabla 3.** Composición fisicoquímica del orujo de uvas (*Vitis vinifera*) de las variedades Malvasía

Componente	Variedad Malvasía (% m.m <sup>-1</sup> )
Humedad	38,23 ± 0,89
Fibra cruda	18,36 ± 0,71
Grasa cruda	7,16 ± 0,12
Cenizas	1,92 ± 0,11
Proteínas	10,75 ± 0,08
Carbohidratos	34,33 ± 0,01

\* El valor es el promedio de cinco observaciones independientes.

El contenido de proteínas obtenido, duplica el valor reportado (5,57 % m.m<sup>-1</sup>) por Berradre *et al*, (2014) y es similar a los valores reportados (10,38% m.m<sup>-1</sup>) por Tseng & Zhao, (2013) y Deng *et al*, (2011) cuyos valores oscilan entre 5,38 hasta 12,34% m.m<sup>-1</sup> para cinco variedades de uva, lo que permite inferir que este subproducto pueda ser empleado para fines alimentarios. Las proteínas están presentes en toda la pared celular en un 10% o más, el contenido de éstas puede variar en relación al estado de madurez del fruto, así como de los polisacáridos depositados en ella. Las proteínas de la pared celular poseen un papel estructural importante y son en algunos tejidos característicamente ricas en hidroxiprolina, la mayoría de las veces están unidas a glicosacáridos en las cadenas laterales como las glicoproteínas, algunos autores mencionan que la proteína de la pared celular forma parte del complejo de la fibra dietaria, lo que hace muy importante su detección para fines alimentarios (Frago, 2016).

### **3.2. Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos empleando el método de superficie de respuesta (MSR) en orujo de uvas variedad Malvasía**

Para optimizar las condiciones de extracción, se define el espacio de exploración, para ello se fijaron dos variables, concentración de solvente y temperatura de extracción. La cuantificación promedio del contenido de compuestos fenólicos totales en el extracto obtenido se presenta en la **Tabla 4**, donde se aprecia que el mayor contenido de compuestos fenólicos

para la variedad Malvasía se obtiene a concentraciones del solvente de 70 y 100% con temperaturas a 50 y 60°C.

**Tabla 4.** Contenido promedio de compuestos fenólicos totales de los extractos de orujo de uvas

Concentración de Etanol (%)	Temperatura (° C)	Malvasía
		mg GAE/g ± DE
100	30	2,63 ± 0,12
	40	1,49 ± 0,58
	50	14,22 ± 0,40
	60	13,43 ± 0,65
70	30	8,21 ± 0,56
	40	7,76 ± 0,99
	50	16,07 ± 0,94
	60	18,12 ± 0,64
50	30	2,61 ± 0,27
	40	6,76 ± 0,41
	50	12,9 ± 1,20
	60	14,03 ± 1,55

Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios anteriores en orujo y semilla de uvas (Guntero *et al*, 2014; Fontana *et. al*, 2013; Berradre *et. al*, 2014). Cabe destacar que, aunque se ha reportado rendimientos de extracción aceptables con el empleo de otros solventes como etanol acidificado con HCl, acetona y propanol, su toxicidad puede limitar su aplicabilidad con fines alimentarios, por esta razón este estudio se seleccionó como solvente etanol, variando la concentración del mismo debido a que resulta ser el más adecuado para su aplicación como aditivo en alimentos.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos con el diseño experimental se presenta en la **Tabla 5**. Los resultados indicaron que el efecto de la temperatura de extracción fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en la extracción de compuestos fenólicos en orujo de uva, la fuente tiempo se mantuvo constante a 40 min en las condiciones evaluadas sobre la variable respuesta, mientras que la concentración del solvente resultó ser no significativa.

El diseño de tratamientos, definido a un punto central codificado a tres niveles -1, 0, +1 se presenta en la **Tabla 6**, indicando la necesidad de optimizar las condiciones de extracción para el orujo de uvas ensayado, mediante un diseño central compuesto, el cual permite la obtención de un punto máximo u óptimo en función de la variable de respuesta.

**Tabla 5.** Análisis de varianza para la identificación de variables que afectan el proceso de extracción de compuestos fenólicos de orujo de uvas

Fuentes de variación	Contenido de compuestos fenólicos			
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Prob>F
A: %concentración de etanol	-0,562816	0,543581	-1,04	0,3069
B: Temperatura de extracción	45,145917	1,907386	23,67	<b>&lt;,0001</b>
AA	-0,000731	0,003129	-0,23	0,8165
AB	0,013663	0,005241	2,61	0,0129
BB	-0,437334	0,018652	-23,45	<b>&lt;,0001</b>

Nota: Se resaltan en negrita los efectos, con valor-P menor que 0,05, que son significativos.

**Tabla 6.** Definición de punto central codificado a tres niveles para el orujo de uva Malvasía.

Variables Naturales	Variables codificadas		
	-1	0	1
$\xi_1$ : Concentración	90	92,5	95
$\xi_2$ : Temperatura	60	65	70

En la **Tabla 7** se muestran los datos de las variables naturales ( $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ), variables codificadas ( $X_1$ ,  $X_2$ ) y la variable respuesta (Y), empleadas como diseño propuesto. Para la variable respuesta los valores obtenidos en este diseño estuvieron en el rango de 6,26 a 16,94 mg GAE.g<sup>-1</sup> extracto, el mayor rendimiento de compuestos fenólicos fue de 16,94 mg GAE.g<sup>-1</sup> extracto y se determinó empleando 92,5 % de concentración de etanol a 65° C por 40 min.

El análisis de varianza del modelo propuesto para la optimización se muestra en la **Tabla 8**, donde se puede observar que la curvatura fue significativa, lo cual indica que es necesario analizar los tratamientos para completar un diseño central compuesto, que estarán entre 88,96% a 65 °C y 92,5 % con un máximo de 72°C, definiendo las aristas entre estos puntos.

**Tabla 7.** Datos del diseño central compuesto para ajustar el modelo de optimización por MSR para el orujo de uva variedad malvasía

% concentración de etanol ( $\epsilon_1$ )	Temperatura de extracción ( $\epsilon_2$ )	$X_1$	$X_2$	mg GAE.g <sup>-1</sup> extracto
90	60	-1	-1	7,46
95	60	1	-1	6,26
90	70	-1	1	7,65
95	70	1	1	8,89
94	65	A	0	12,03
86	65	$-\alpha$	0	13,88
93	72	0	$\alpha$	9,26
93	58	0	$-\alpha$	6,68
92,5	65	0	0	15,89
92,5	65	0	0	16,94
92,5	65	0	0	15,26
92,5	65	0	0	12,95
92,5	65	0	0	16,91

**Tabla 8.** Análisis de varianza del modelo propuesto para ajustar el modelo de optimización por MSR para el orujo de uva variedad Malvasía.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Prob>F
A: % Etanol	1	1048,468	1048,468	3,89903	0,119538787
B: Temp (°C)	1	213,093	213,093	0,79245	0,423664833
AB	1	284,572	284,572	1,05826	0,36174793
Curvatura	1	18026,930	18026,930	67,03825	<b>0,001212009</b>
Error Puro	4	1075,621	268,905	-	-
Error Total	8	20648,683	-	-	-

Nota: Se resaltan en negrita los efectos, con valor-P menor que 0,05, que son significativos.

Se calculó un paso de 1 de medición posible para la concentración del solvente para la temperatura de extracción, como se puede observar en la **Tabla 9**, donde se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales de 15,89 mg GAE.g<sup>-1</sup> de extracto para 95% de etanol y 62,7° C (punto base +  $\Delta$ ); estos resultados permitieron estimar la zona de estudio más indicada con el fin de encontrar los valores óptimos. A partir del análisis de regresión múltiple se obtuvo un polinomio de segundo orden ajustado para el modelo propuesto, de acuerdo a la siguiente **Ecuación 4**:

$$Y: -39957+649,87X_1+314,54X_2-3,53X_1^2+0,009X_1X_2-2,437X_1^2 \quad (4)$$

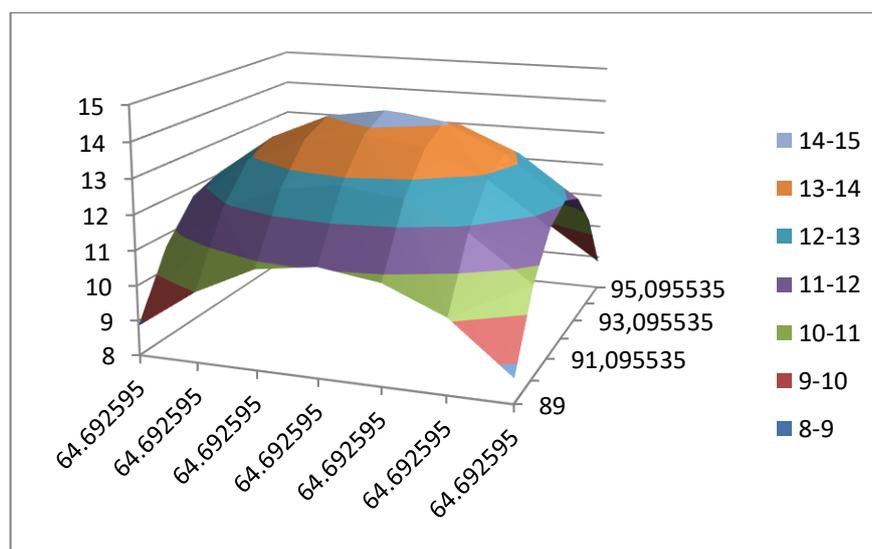
En la **ecuación 4** se muestra el modelo ajustado, de segundo orden para la variable compuestos fenólicos (mg GAE.g<sup>-1</sup> extracto) que representa un valor máximo y para fines

prácticos puede predecir el contenido de compuestos fenólicos que debe obtenerse al variar tanto la concentración del solvente como la temperatura de extracción para el orujo de uvas variedad malvasía.

La **Figura 2** ilustra la metodología de superficie de respuesta del modelo ajustado, donde se observa un efecto sobre ambos parámetros, con una pronunciada pendiente, lo que indica un marcado efecto cuadrático, adicionalmente se muestra una tendencia a incrementar la respuesta de efecto cóncavo, con un punto máximo de rendimiento de 14,28 mg GAE.g<sup>-1</sup> extracto a 92,09 % de etanol y 65° C.

**Tabla 9.** Datos del método del ascenso más pronunciado para la variedad Tempranillo.

Pasos	Variables Naturales		Variables Codificadas		Respuesta (y)
	Concentración (%) ( $\xi_1$ )	Temperatura (°C) ( $\xi_2$ )	$x_1$	$x_2$	mg GAE. g <sup>-1</sup>
Base	92,5	65	0	0	15,26
$\Delta$	2,5	5	1	-0,45082	
Base+ $\Delta$	95,00	62,7	1	-0,45082	15,89



**Figura 2.** Diseño central compuesto ajustado por MSR para la extracción de compuestos fenólicos en orujo de uva variedad Malvasía.

Zhang & Zhu, (2015), determinaron el contenido de polifenoles en orujos de uva tinta variedad Cabernet Sauvignon y orujo de uva blanca Chardonnay resultando 69,83 y 58,15mg GAE.g<sup>-1</sup> de extracto seco respectivamente, siendo superiores a lo reportado en este estudio (14,92 GAE.g<sup>-1</sup> extracto seco). El contenido de compuestos fenólicos en el extracto de orujo de uvas (*Vitis vinifera*) se ve afectado por parte del proceso de vinificación. En la elaboración de vinos

blancos como los de Malvasía la maceración no ocurre, por lo que el contenido de compuestos fenólicos en el orujo de estas variedades permanece sin alteraciones, lo que explica que las variedades blancas tengan mayores compuestos fenólicos (Berradre *et. al*, 2013; Antonioli *et. al*, 2015). Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos obtenido en este estudio fue similar al rango reportado (16-54,6 mg GAE.g<sup>-1</sup>) por Aspe *et al.*, (2015) en el cual se optimizó la extracción de compuestos fenólicos de la piel y semillas de uva *Vitis vinifera* cv. País, por MSR, evaluando la influencia del tiempo de extracción y la relación sólido-líquido (S.L<sup>-1</sup>).

### 3.3. Comprobación del modelo optimizado para la extracción de compuestos fenólicos en orujo de uvas variedad Malvasía.

Para comprobar la aplicabilidad del modelo obtenido se realizó la extracción de compuestos fenólicos bajo las condiciones optimizadas, los resultados se muestran en la **Tabla 10**. En todos los casos analizados, los valores obtenidos presentaron DER menores al 5% y el error absoluto entre el valor predicho y el valor experimental fue menor al 5% para ambas variedades.

**Tabla 10.** Comprobación del modelo de MSR para la extracción de compuestos fenólicos en orujo de uvas variedad Malvasía y Tempranillo

Extracto de orujo de uvas	Condiciones de extracción	Rendimiento de extracción (%)	Valor predicho (mg GAE.100g <sup>-1</sup> )	Valor experimental (mgGAE.100g <sup>-1</sup> )	%Error
Malvasía	% Etanol: 92,5 Temp: 65° C	5,27 ± 0,47	1428	1492 ± 1,63	4,48

Los resultados son el promedio ±DS de 5 determinaciones realizadas de forma independiente.

La MSR representa una técnica de optimización para hacer eficientes los tratamientos experimentales. Lo que permite reducir costos en tiempo y experimentación, por lo que actualmente es aplicada ampliamente en distintas áreas. Alarcon, (2015), evaluó los datos generados por el proceso de optimización empleando MSR en el proceso de extracción de antocianinas a partir del maíz morado, utilizando el método espectrofotométrico para la determinación de antocianinas. De la validación experimental se desprende que el proceso de optimización logró identificar adecuadamente los valores óptimos de los parámetros que influyen en el proceso de extracción de las antocianinas del maíz morado, por lo que se concluye que el método de superficie de respuesta aplicado, es una herramienta eficaz para

la optimización de variables múltiples con un manejo estadístico de alto nivel y con resultados muy cercanos a la perfección.

### 3.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos optimizados empleando MSR

Los resultados de la actividad antioxidante total obtenidos mediante el ensayo ABTS son expresados en mmol TEAC.100g<sup>-1</sup> (actividad antioxidante equivalente a Trolox). En la **Tabla 11** se observa la actividad antioxidante del extracto optimizado por MSR, donde se muestra que el resultado obtenido confirma que los compuestos fenólicos son los responsables de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante obtenida resultó ser mayor a los valores reportados por otros autores (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008), en la pulpa de uva (12,44 mmol TEAC.100 g<sup>-1</sup> de pulpa). De igual forma, Molina *et al.*, (2010) evaluaron la actividad antioxidante de las pieles de 4 cultivares de uva (*Vitis vinifera L.*) de mesa, dos verdes (Perlette y Sugra One) y dos rojas (*Flame* y *Red Globe*) y de una variedad industrial roja (*Carignane*) empleando el método de estabilización de radicales libres ABTS. La mayor actividad correspondió a los cultivares de *Carignane*, *Red Globe* y *Perlette* con valores entre 54,75 – 59,50 mgET.mL<sup>-1</sup>, que comparados con el resultado obtenido en este estudio se encuentran por debajo (527,61 mgET.mL<sup>-1</sup>).

**Tabla 11.** Actividad antioxidante de los extractos optimizados por MSR.

Orujo de Uva	Actividad antioxidante (mmolTEAC.100g <sup>-1</sup> ) ± DE
Malvasía	21,08 ± 2,69

Los resultados son el promedio ±DS de 5 determinaciones realizadas de forma independiente.

En el presente estudio la materia vegetal comprende todo el desecho generado del proceso de vinificación, esto es piel, semilla y parte del raquis, mientras que la mayoría de los trabajos analizan estas fracciones por separado, por lo que no contemplan todos los compuestos fenólicos presentes. Sin embargo, se ha reportado mayor actividad antioxidante en solo una fracción, Samavardhana *et al.*, (2014) determinaron la actividad antioxidante en las semillas de uva de la variedad reina negra (*Vitis vinifera L.*), resultando 313,49 μmol TEAC.g<sup>-1</sup>, el cual es superior al obtenido en la presente investigación (210,80 μmol TEAC.g<sup>-1</sup>). Algunos reportes indican que la concentración de compuestos fenólicos en la uva, así como la actividad antioxidante total, varía significativamente con la variedad y tipo de tejido del fruto,

además de que dicha actividad varía con la producción (Molina *et al.*, 2010). No obstante, el valor obtenido en este estudio permite inferir su aplicación en el área medicinal y alimentaria.

#### 4. CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas de extracción para el mayor contenido de compuestos fenólicos empleando MSR en orujo de uvas variedad Malvasía se obtuvo a una concentración de etanol del 92,09% y a una temperatura de extracción de 65° C.

El extracto de orujo de uva optimizado presentó análisis proximal y actividad antioxidante similar a la reportada en la literatura para este tipo de subproducto, lo que sugiere su posible utilidad en alimentos.

#### 5. REFERENCIAS

- Arveláez, A., Mieres, A., Hernández, C. (2003). Diseño experimental aplicado a la extracción de aceite de la almendra del corozo (*Acrocomia aciculata*). Revista Facultad de Agronomía (LUZ), 20: 174 – 177.
- A.O.A.C. (1980). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13a edición. Washington, DC, Estados Unidos de America. Association of Official Analytical Chemists. Pp: 125-133.
- Alarcón, C. 2015. Optimización de parámetros de extracción de antocianinas del maíz morado (*Zea mays* L.) por el método de superficie de respuesta y verificación experimental. Tesis de maestría. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Unidad de posgrado de la Facultad de Ingeniería y Metalurgia. Ayacucho-Perú.
- Amerine, M., Ough. (1976). Análisis de vino y mostos. Zaragoza. España. Editorial Acribia. Pp: 90-91.
- Antoniolli, A., Fontana, A., Piccoli, P. y Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grapepomace of the cv. Malbec. Food Chemistry. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>
- Aspe, E., Fuentes, R. y Fernández, A. (2015). Microwave Assisted Extraction of Phenolics Compounds from Grape *Vitis vinifera* cv. País. A Comparison with Maceration. Journal of Medical and Bioengineering. 4 (3): 192-197.
- Berradre, M., Arias, N., Ojeda de R., G., Sulbarán, B., Fernández, V. y Peña, J. (2014). Actividad antioxidante del aceite de semillas de uva *Vitis vinifera* de la variedad Tempranillo. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 31: 393-406.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M. (2004). Toma y tratamiento de muestras. Primera Reimpresión. Madrid, España. Editorial Síntesis 114.
- Deng, Q., Penner, M. y Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine 1 grape pomace skins. Food Research International. 2011, 44: 2712–2720.
- Frago, S. (2016). Extracción y determinación de aromas en orujo de uvas. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, España.
- Fontana, A., Antoniolli, A. y Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. J. Agric. Food Chemistry 61: 8987–9003.
- Guntero, V., Longo, M., Ciparicci, S.; Martini, R. y Andreatta, A. (2014). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. CAIQ. Buenos Aires, Argentina.

## Optimización de las Condiciones de Extracción de Compuestos Fenólicos en el Extracto de Orujo de Uva Variedad Malvasía

- Harnly J., Doherty R., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Bhagwat S. y Gebhardt S. (2006). Flavonoid content of US fruit, vegetables and nuts. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 54. 9966–9977.
- Hidalgo J. (2002). Tratado de enología. Tomo II. Madrid, España. Grupo mundi-prensa. Pp: 1333-1334.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. (2008). Catequin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal Food Composition Analytical*. 21, 589-598.
- Katalinic, V., Smole M., S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Mladen, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinic, P., Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grapeskin extracts of 14 Vitisviniferavarieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119, 715–723
- Kuskoski, M. E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de alimentos*. Campinas, 25 (4): 726 – 732.
- Lafka, T-I., Sinanoglou, V., Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*. 104: 1206–1214.
- Maier, T., Schieber, A., kammerer, D. y Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 1 (12): 551-559.
- Marcano D. y Hasegawa M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Segunda Edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Pág. 137.
- Martínez, G., Rebecchi, S., Decorti, D., Domingos, J., Natolino, A., Del Rio, D. y Fava, F. (2015). Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chemistry*. 261–270. <http://doi.org/10.1039/C5GC01558H>.
- Molina, D., Medina, L., González, G., Robles, R. y Gámez, E. (2010). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. *Journal of Food*, 8:1: 57-63.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expresión of results. *Food Research International*. 41: 274-285.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Papaganda, G. (1994). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26: 933-956.
- Samavardhana, K., Supawititpattana, P., Jittrepotch, N., Rojsuntornkitti, K. y Kongbangkerd, T. (2014). Effects of extracting conditions on phenolic compounds and antioxidant activity from different grape processing byproducts. *International Food Research Journal* 22(3): 1169-1179.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., García-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(9): 15638-15678.
- Tseng, A. y Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry* 138: 356–365.
- Vit, P., Gutiérrez, M., Titera, D., Bednar, M. (2008). Mielles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 42: 237-245.
- Zhang S y Zhu MJ. (2015). Characterization of Polyphenolics in Grape Pomace Extracts Using ESI Q-TOF MS/MS. *Journal of Food Science and Nutrition*. 1: 001.