



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE ICA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE ICA

**FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Línea de investigación: CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**

**COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE EXTRACTOS DE LA UVA, ORUJO Y SEMILLAS DE VITIS
LABRUSCA, OBTENIDOS CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS**

MARITZA ELIZABETH BARRIGA SANCHEZ

Código ORCID: 0000-0001-8146-0575

AÑO ACADEMICO 2020

RESUMEN

El orujo, subproducto de la industria vitivinícola del Perú, no tienen valor agregado, sin embargo, contiene compuestos bioactivos con actividad antioxidante que podrían ser aprovechados. El objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de compuestos fenólicos (CF) y capacidad antioxidante (CA) de la uva, orujo y semilla de la uva Borgoña negra de Sunampe-Chncha. Para ello, la uva y orujo fueron secados a 45 °C, de una porción del orujo se separó la semilla. Se realizó la caracterización química, se determinaron la proteína, grasa, ceniza y humedad de la uva, orujo, semilla, según la metodología de la FAO (1986), posteriormente siguiendo los experimentos sugeridos por un diseño full factorial usando el software Minitab se realizaron las extracciones convencionales con etanol y luego las extracciones con líquido presurizado, utilizando agua subcrítica (AS) y etanol(PLE). A los extractos obtenidos se realizaron 3 análisis: la determinación de compuestos fenólicos, por el método Folin-Ciocalteu según Singleton *et al.*, la capacidad antioxidante utilizando el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) según la metodología de Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) y la actividad antioxidante por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant power) utilizando la metodología de Benzie y Strain (1996). Los resultados indicaron que hay un efecto de la concentración de etanol en la cantidad de CF extraídos de la semilla, orujo y uva, y al utilizar la técnica de líquidos presurizados utilizando etanol a 50 % hay un efecto positivo de mayor extracción de CF, con mayor capacidad antioxidante en la uva y el orujo, en el caso de la semilla, la solución de 70 % de etanol logra los mayores contenidos de CF y capacidad antioxidante. Finalmente se concluye que el extracto de orujo y de semilla de uva borgoña negra tienen contenidos considerables de CF y capacidad antioxidante para su potencial utilización como insumo en alimentos funcionales o nutraceuticos, es decir, el orujo podría ser aprovechado, reduciendo los subproductos de la elaboración de vino y así, lograr un uso sustentable del recurso uva y contribuir con la economía circular.

Palabras Clave: Orujo , vitivinícola, Borgoña negra, capacidad antioxidante.

Abstract

The pomace, a by-product of the Peruvian wine industry, has no added value, however, it contains bioactive compounds with antioxidant activity that could be used. The objective of this study was to determine the content of phenolic compounds (CF) and antioxidant capacity (CA) of the grape, pomace and seed of the Black Burgundy grape of Sunampe-Chncha. For this, the grape and pomace were dried at 45 °C, from a portion of the pomace the seed was separated. The chemical characterization was carried out, the protein, fat, ash and moisture of the grape, pomace, seed were determined, according to the methodology of FAO (1986), later following the experiments suggested by a full factorial design using the Minitab software, they were carried out the conventional extractions with ethanol and then the extractions with pressurized liquid, using subcritical water (AS) and ethanol (PLE). Three analyzes were carried out on the obtained extracts: the determination of phenolic compounds, by the Folin-Ciocalteau method according to Singleton et al., The antioxidant capacity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil) according to the methodology of Brand- Williams, Cuvelier, and Berset (1995) and the antioxidant activity by the FRAP method (Ferric Reducing Antioxidant power) using the methodology of Benzie and Strain (1996). The results indicated that there is an effect of the ethanol concentration on the amount of CF extracted from the seed, pomace and grape, and when using the pressurized liquid technique using 50% ethanol there is a positive effect of greater CF extraction, with greater antioxidant capacity in the grape and pomace, in the case of the seed, the 70% ethanol solution achieves the highest CF content and antioxidant capacity. Finally, it is concluded that the extract of pomace and black burgundy grape seed have considerable content of CF and antioxidant capacity for its potential use as an input in functional or nutraceutical foods, that is, the pomace could be used, reducing the by-products of the

elaboration of wine and thus, achieve a sustainable use of the grape resource and contribute to the circular economy.

Key Words: Marc, viticulture, Borgoña, antioxidant capacity

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	2
I.- INTRODUCCIÓN.....	6
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
2.1. Problema Identificado	6
2.2. Preguntas de Investigación General y Específicas	7
2.4. Justificación e Importancia.....	7
3.5. Objetivo General y Específicos	8
2.7. Impacto de la Investigación.....	8
III.- ESTADO DEL ARTE	9
3.1. Antecedentes	9
3.2. Marco Teórico.....	11
3.3. Definiciones	19
IV. METODOLOGÍA APLICADA	21
4.1. Tipo y Nivel de la Investigación.....	21
4.2. Diseño de Investigación	21
4.3. Hipótesis General	21
4.4. Hipótesis Específicas	21
4.5. Variables.....	21
4.6. Operacionalización de Variables.....	22
4.7. Población – Muestra	24
4.8. Recolección de la información	28
V. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
5.1. Descripción de los resultados	35
5.2. Análisis de los Resultados	38
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
6.1. Comparación de resultados con otros estudios similares	45
6.2. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de algunos compuestos bioactivos extraídos con diferentes compuestos	10
Tabla 2.- Composición proximal y contenidos de Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) del orujo y semilla <i>Vitis labrusca</i> (Borgoña negra).....	27
Tabla 3.- Contenido de cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn) y calcio (Ca) de orujo, semilla y uva <i>Vitis labrusca</i> (Borgoña negra)	28
TABLA 4. Contenidos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos obtenidos por maceración con etanol (15, 32.5, 50 y 70 %) a partir de la uva, orujo y semilla desgrasada de <i>Vitis labrusca</i> (borgoña negra). n =3	30
TABLA 5. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos obtenidos con agua subcrítica y con liquido presurizado a partir de la uva, orujo y semilla de uva <i>Vitis labrusca</i> (borgoña negra)	31
Tabla 6. Composición proximal promedio del orujo y semilla en 100 g muestra.....	33
Tabla 7. Contenidos promedio de calcio, hierro cobre y zinc en mg/ 100 g de muestra seca.	33
Tabla 8. Contenido promedio de metales pesados cadmio y plomo.....	33
Tabla 9.- Valores promedio de CF y capacidad antioxidante en DPPH y FRAP, con diferentes técnicas de extracción	34
Tabla 10- Análisis del diseño factorial de CF, factor A: concentración de etanol: 4 niveles, 15, 32.5, 50 y 70 % de etanol. Factor B: matriz: 3 niveles, uva, semilla, orujo	36
Tabla 11. Correlación lineal de los extractos etanolicos, los CF vs capacidad antioxidante: IC 50, CAET	38
Tabla 12 . Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos con diferentes concentraciones etanol	39
Tabla 13 .- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de capacidad antioxidante en IC 50 de extractos etanólico	39

Tabla 14 .- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de capacidad antioxidante en DPPH en unidades de ET/g extracto.....	40
Tabla 15.- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de capacidad antioxidante con la técnica Trolox en unidades ET / g de muestra.....	40

FIGURAS

Figura 1. A. Estructura de compuestos fenólicos simples. B. Estructuras representativas de flavonoides. C. Estructura química de un tanino	8
Figura 2. Diagrama de Presión en función de la temperatura, región Supercrítica.....	15
Figura 3 . Curva de extracción con CO ₂ supercrítico	16
Figura 4. Muestras Orujo (a) y uva (b) borgoña secos.....	21
Figura 5.-Extracción de aceite de semilla con CO ₂ supercrítico	25
Figura 6.- Extracción convencional	26
Figura 7. Extracción convencional del orujo de uva borgoña negra.....	26
Figura 8. Equipo extractor multisolvente Top Industrie	34
Figura 9. - Efecto de la concentración de etanol y las matrices (uva orujo y semilla) en la extracción de CF y capacidad antioxidante.....	38
Figura 10.- Interacciones de CF, DPPH, FRAP en uva, orujo y menillas y los efectos existentes entre las matrices y técnicas de extracción	41
Figura 11. A : Compuestos fenólicos de la uva. B: orujo y C: semilla. D: IC ₅₀	42
ANEXO 1. Matriz de consistencia	53
ANEXO 2.- Matriz de Operacionalización de Variables	56

I. INTRODUCCION

En la elaboración de 1 litro de pisco se utilizan de 6 a 7 kg de uva (PNUD, 2004) y 1 kg de uva para la producción de 0.75 L de vino (Lima, 2015). Luego de las producciones de vino y pisco se genera el orujo de uva que es arrojado fuera de las procesadoras, o lo queman ocasionando contaminación ambiental, sin embargo, el orujo contiene compuestos fenólicos (CF).

Los CF presentan propiedades antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios y antimicrobianos (Daglia, 2012). Así mismo, en ensayos de intervención humana muestran evidencia de los efectos protectores de varios alimentos con contenidos de CF contra las enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración y el cáncer (Del Rio, y otros, 2013).

La extracción de CF de fuentes biológicas es un campo de interés creciente y es una parte integral de los métodos analíticos; algunos de los métodos comunes de extracción de CF son la extracción por maceración con solvente, la extracción por solvente acelerada, la extracción por fluido supercrítico, la extracción por ultrasonidos y la extracción por microondas (Roustray & Orsat, 2013)

Los artículos de investigación de temas de CF a nivel mundial, está en aumento considerable, que se refleja en el número de publicaciones (Ty'skiewicz, Konkol, & Rój, 2018).

El objetivo del presente proyecto fue determinar los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de uva, orujo y semilla obtenidos con fluidos presurizados y con etanol, compararlos para establecer la mejor técnica de extracción.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Problema identificado

En la elaboración de 1 litro de pisco se utilizan de 6 a 7 kg de uva y 1 kg de uva para la producción de 0.75 L de vino generándose elevadas cantidades de orujo, en la actualidad no se le da un valor agregado a este subproducto, luego de las producciones de vino y pisco el orujo de uva es arrojado fuera de las procesadoras, o lo queman ocasionando contaminación ambiental.

Sin embargo, el orujo contiene compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos con actividad antioxidante, la tendencia a nivel mundial es consumir antioxidantes para disminuir el estrés oxidativo y también alimentos y bebidas con antioxidantes naturales o fibra entre otros, una alternativa es estudiar al orujo de uva borgoña negra de Chincha para confirmar el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante y proponerlo como insumo de alimentos funcionales.

2.2 Preguntas de investigación general y específicas

Pregunta general

¿En qué medida los extractos de la uva borgoña y el orujo, obtenidos con agua subcrítica y fluido presurizado tienen compuestos fenólicos y actividad antioxidante?

2.3 Preguntas específicas

- 1.-¿Cuál de los extractos de uva, orujo, semilla o vino tiene mayor contenido de CF?
- 2.- ¿Cuál de los extractos de uva, orujo, semilla o vino tiene mayor capacidad antioxidante?

2.4. Justificación e importancia: El vino Borgoña es muy reconocido y consumido en el Perú, un buen porcentaje de la producción se realiza en

Chincha, donde se genera orujo sin valor agregado. La variedad de Uva es un híbrido *Vitis labrusca* L. conocido en otros países como uva Isabella, las uvas en general tienen compuestos bioactivos en la piel, pulpa y semilla, por lo que sería importante determinar los compuestos bioactivos (compuestos fenólicos) y la actividad antioxidante para demostrar que el orujo de las bodegas de Chincha, subproducto de la elaboración del vino, contienen compuestos fenólicos con un valioso contenido de antioxidantes. Por otro lado, la técnica amigable al medio ambiente conocida como técnica verde, recién se está aplicando en Perú y sería importante realizar las extracciones con fluidos presurizados del orujo, uva y semilla, con esos nuevos conocimientos se lograría finalmente sustentar que el orujo podría usarse como un insumo en alimentos funcionales, por ejemplo, en galletas.

2.5. Objetivo general

Determinación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de uva, orujo y semilla obtenidos con fluidos presurizados y con etanol.

2.6. Objetivos específicos

1. Comparar los contenidos de compuestos fenólicos de las extracciones con la técnica verde de fluidos presurizados, con agua subcrítica y con etanol de la uva, orujo, semilla y vino.
2. Comparar la actividad antioxidante de las extracciones con líquidos presurizados y con etanol de la uva, orujo, semilla y vino.

2.7. Impacto de la investigación

Impacto de la investigación a nivel social.-

El orujo obtenido de la elaboración del vino, posee valor nutritivo, es fuente de fibra, y de antioxidante, las empresas podrían crear una nueva línea de procesamiento, no desperdiciarían al orujo y podrían darle valor agregado

como insumo en productos de panadería, como galletas o panes o mermelada, entre otros.

Impacto en la investigación y en los resultados enfocado a medio ambiente y desarrollo sostenible.-

El conocimiento generado de uso del orujo, residuo de la elaboración de vino de Borgoña (Isabella), permitiría dar un valor agregado a un residuo o subproducto de la industria alimentaria, disminuyendo la generación de residuos y permitiendo un uso sostenible del recurso (uva) además de implementarse una nueva línea de producción en las bodegas de vino, se estaría realizando una de las estrategias de la economía circular

III ESTADO DEL ARTE

3.1. Antecedentes

En estudios realizados con la técnica de maceración, con residuos de la producción de pulpa de uva Isabella en Colombia, cuantificaron los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de los escobajos y las semillas, encontraron $22,08 \pm 0,20$ y $10,62 \pm 0,17$ mg de EAG/g y actividad antioxidante $0,29 \pm 0,01$ y $0,63 \pm 0,01$ mg muestra/ml de extracto (IC50), respectivamente (Ruales Salcedo, et al., 2017).

En México obtuvieron extractos de orujo de uva utilizando metanol por maceración y Soxhlet, concluyen que el extracto obtenido por maceración presentó el doble del contenido de CF que el extracto obtenido por Soxhlet (García-Becerra et al., 2016). En Argentina, estudiaron las semillas de vid Cabernet Sauvignon provenientes de vinificaciones, realizaron la maceración en agua destilada a 90°C , alcohol metílico al 70% a 30°C , acetona al 75% a 30°C y alcohol etílico al 20% a 30°C , el solvente más efectivo fue el agua a 90°C , seguido por el de acetona, obtuvieron 12,587 y 7,268 mg mg de CF/g de materia seca respectivamente. (Paladino S. C., 2000)

Ferri et al (2015), recuperaron CF del orujo húmedo y seco de uva roja (*Vitis vinífera L*) mediante digestiones enzimáticas y extracciones a base de etanol. Primero realizaron la digestión enzimática para establecer cuáles eran las enzimas óptimas, separaron la fase acuosa y las congelaron a -20°C , posteriormente la fase sólida fue llevada a incubación con 30 ml de etanol al 95% (v / v) a 24°C durante la noche en un agitador orbital a 150 rpm. Concluyen que las enzimas Fungamyl y Celluclast son las más efectivas para mejorar la liberación de CF del orujo húmedo.

Franco-Bañuelos et al (2017) estudiaron el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de las uvas no nativas para vino cultivadas en Zacatecas, México, el contenido de compuestos fenólicos fue

significativamente mayor en las variedades rojas Rubired y las blancas Furmint. Las variedades Petite Syrah y Rubired de uva roja, tuvieron potencial antioxidante significativo ($p \leq 0.05$) alto y estuvo asociado con su contenido alto de compuestos bioactivos.

En el Perú, se realizaron la determinación de la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos por el método de maceración en la mayoría de estudios de investigación. Contreras (2019), obtuvo los extractos de las semillas de 7 variedades de uva del Valle de Cañete: Quebranta, Italia, Uvina, Borgoña blanca, Moscatel, Red Globe y Borgoña negra, seleccionadas del orujo, luego del proceso de vino realizó la extracción por maceración con metanol:agua (1:1) y acetona:agua (70:30), obteniendo resultados en el rango de IC_{50} entre 0.21 a 0.55 mg semilla/ml de extracto, en el ensayo ABTS- análisis de capacidad antioxidante- obtuvo 1292.94 a 660.4 $\mu\text{Mol Equiv Trolox/g}$ de semillas, en la prueba de FRAP obtuvo 451.19 a 225.01 $\mu\text{Mol Equiv Trolox/g}$ de semillas.

En otro estudio, se determinaron los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante de extractos de orujo de *Vitis vinifera L.* var. Italia y Negra criolla de residuos vitivinícolas, siguiendo la técnica por maceración en agua - etanol (50%), a diferentes temperaturas y tiempos, por 48 horas a temperatura ambiente y durante 3 horas a 40 °C, resultando que el extracto de la variedad Negra Criolla obtenida al ambiente durante 48 horas presentó una mayor cantidad de fenoles de 89.17 ± 0.41 mg GAE/1g de extracto seco (ES) y capacidad antioxidante de 183 $\mu\text{g ES/mL}$ (Torres, 2018).

Otro estudio, fue realizado con la uva (*Vitis labrusca L.*) de diferentes estados de maduración, pintón maduro y sobremaduro del distrito de San Antonio de Cumbaza de San Martín, se realizó la extracción en las proporciones siguientes: para la piel (0,5; 1; 2g), pulpa (8g) y semilla (0,5 y 1g), en la maceración utilizaron como solvente a 10 mL etanol/agua al 70:30 v/v, durante 24 horas en agitación constante, reportó valores de 165; 12 y

3003 mg EAG/100 g en la piel, pulpa y semilla respectivamente (Rivera , 2013)

Torres, 2015, estudio la optimización de las condiciones de extracción de CF a partir de cáscara de uva variedad Quebranta de Ica, de los residuos obtenidos después del proceso de vinificación, en las extracciones convencionales evaluó la proporción de etanol (0 – 80% v/v), tiempo (5 – 300 minutos) y temperatura (30 – 90 °C), en la extracción por ultrasonido evaluó la amplitud (20 – 90%) y tiempo de irradiación (5 – 40 minutos), empleó una relación de muestra:solvente de 1:10 (1 g de cáscara de uva seca en 10 mL de solvente de extracción), los resultados indicaron 80 °C , 180 minutos se extrajo 15.6552 mg GAE/g de muestra seca. En la extracción por ultrasonido, la amplitud óptima fue 50% (14.26 ±0.0106) y 10 minutos, logrando 15.2472 mg GAE/g de muestra seca. Campomares, (2015) estudió el proceso de extracción supercrítica de compuestos fenólicos a partir del residuo de lías (sólido que se deposita en los recipientes) producidas durante la elaboración del pisco. Además, fue evaluada la eficiencia del proceso de extracción con fluidos supercríticos a través de la comparación con los métodos convencionales de extracción como la extracción soxhlet y sólido-líquido. La condición más favorable de extracción supercrítica fue 20 MPa y 40 °C y su rendimiento de extracción fue $10,3 \pm 0,2 \%$, b.s.

3.2. Marco Teórico

Los fenoles son compuestos orgánicos que están formados por uno o varios grupos funcionales hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático (anillo de benceno). Los fenoles son metabolitos secundarios, se localizan en las plantas y su concentración es variable. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la defensa ante los factores adversos del ambiente, entre otros (Paladino S. C., 2000).

Se clasifican en: a) Fenoles simples y Ácidos fenólicos (Figura 1 A).

b) flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas, (las antocianinas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios dentro de los flavonoides y son los componentes que otorgan los colores rojo, morado y azul presente en las frutas, vegetales y granos, particularmente en frutos, flores y hojas, dichos pigmentos son solubles en agua) en la Figura 1B se observan algunos de ellos. c) derivados del ácido hidroxicinámico (taninos), son los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas, tal como se puede observar en la Figura 1C (Cornejo, 2012).

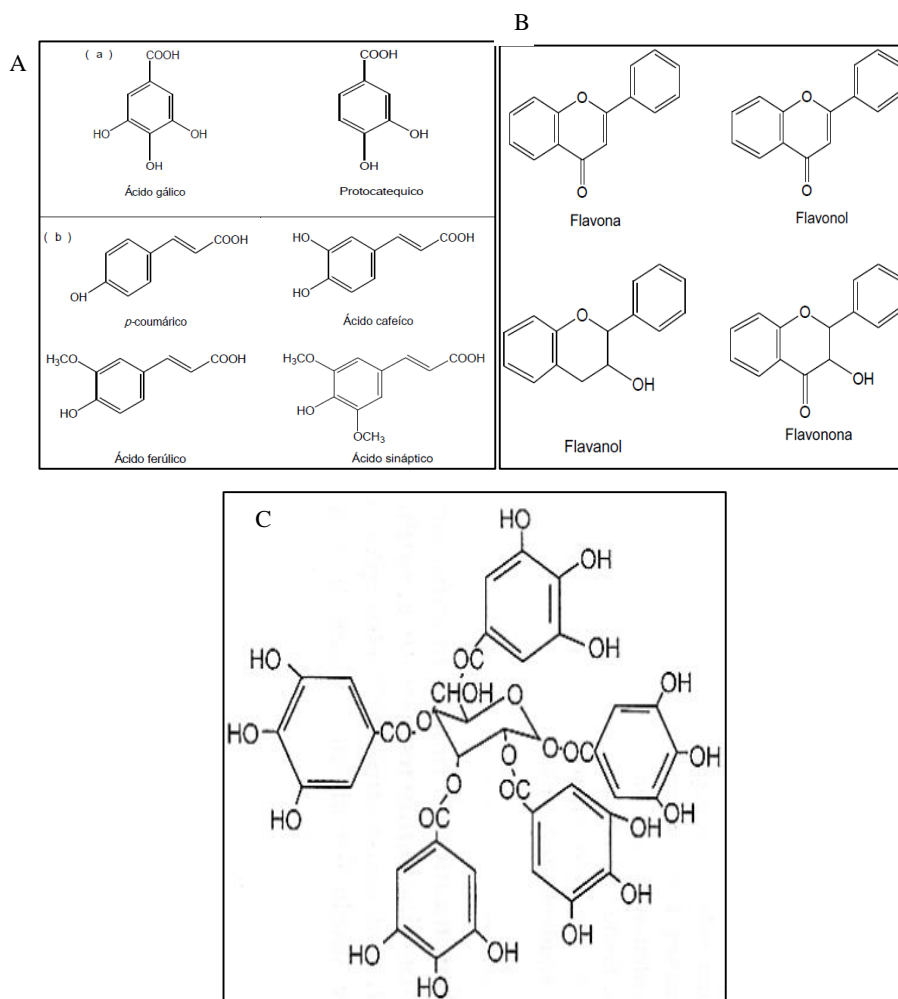


Figura 1. A. Estructura de compuestos fenólicos simples. B. Estructuras representativas de flavonoides. C. Estructura química de un tanino. Fuente. Balasundram et. Al., 2006.

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles. (Gimeno Creus, 2004). Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas (Gimeno Creus, 2004)

Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol .

Los CF tienen propiedades potenciales saludables para el organismo humano, principalmente como antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antihipertensivos y agentes antimicrobianos, también tienen actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica (Daglia, 2012).

Técnicas de extracción de compuestos bioactivos

Junto con los métodos convencionales, numerosos métodos nuevos han sido establecidos, pero hasta ahora no se considera un método único como estándar para extraer compuestos bioactivos de las plantas. Las eficiencias de los métodos de extracción convencionales y no convencionales dependen de los parámetros críticos: la naturaleza de la matriz vegetal; química de compuestos bioactivos y experiencia científica. (Azmir et al 2013).

Existen diferentes técnicas de extracción de compuestos bioactivos, una de las clasificaciones se muestra a continuación:

Técnicas de extracción convencional

La eficiencia de extracción de cualquier método convencional depende principalmente de la elección de solventes (Cowan, 1999). La polaridad del compuesto objetivo es el factor más importante para la elección del solvente. La afinidad molecular entre el solvente y el soluto, la transferencia de masa, el uso de co-solventes, la seguridad ambiental, la toxicidad humana y la viabilidad financiera también deben considerarse en la selección del solvente para la extracción de compuestos bioactivos (Azmir et al 2013). Algunos ejemplos de compuestos bioactivos extraídos usando diferentes solventes se dan en la Tabla 1.

Tabla 1.- Ejemplos de algunos compuestos bioactivos extraídos con diferentes solventes (Ref Cowan 1999)

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Dichloromethanol	Ether	Acetone
Anthocyanins	Tannins	Anthocyanin	Terpenoids	Terpenoids	Alkaloids	Flavonoids
Tannins	Polyphenols	Terpenoids	Flavonoids		Terpenoids	
Saponins	Flavonol	Saponins				
Terpenoids	Terpenoids	Tannins				
	Alkaloids	Flavones				
		Polyphenols				

Extracción sólido-líquido

Es una de las técnicas más utilizadas para la recuperación de fenoles de la uva. El SLE (Extracción sólido-líquido) se da mediante la transferencia de masa, el analito de una matriz sólida se difunde en el disolvente de extracción. Esta técnica de extracción puede llevarse a cabo mediante la aplicación de maceración, mezcla o agitación. La transferencia de masa y la eficiencia de extracción se puede aumentar cambiando el gradiente de concentración, los coeficientes de difusión y/o las

capas límite que son afectadas por el tipo de disolventes, el tamaño de partícula, la temperatura, tiempo, y la presencia de interferencias compuestas en la matriz (Azmir et al 2013).

Extracción por soxhlet

Consiste en colocar una pequeña cantidad de muestra seca en un dedal. El dedal se coloca en la cámara del sistema que va unido a un matraz de destilación que contiene el solvente, se prende la fuente de calor, el proceso consiste en alcanzar un nivel de desbordamiento del solvente que lava el dedal y luego es aspirado por un sifón que descarga el solvente nuevamente en el matraz de destilación, el proceso se repite hasta que la extracción del soluto de interés sea completada (Azmir et al 2013).

Extracción por maceración

Es una forma económica de obtener aceites y compuestos bioactivos (como los CF), en primer lugar, se realiza la molienda del materiales vegetal para lograr partículas pequeñas y aumentar el área de superficie. En segundo lugar, se coloca en un recipiente con tapa y se agrega un solvente, en tercer lugar, el líquido se filtra, el residuo se presiona para recuperar, movimientos ocasionales en la maceración facilitan la extracción porque aumenta la difusión para lograr el mayor rendimiento de extracción (Azmir et al 2013).

Hidrodestilación

Hay tres tipos de hidrodestilación: destilación de agua, destilación de agua y vapor y destilación directa de vapor (Vankar, 2004). En la hidrodestilación, primero, los materiales vegetales se empaquetan en un compartimento inmóvil; segundo, se agrega agua en cantidad suficiente y luego se lleva a ebullición. Alternativamente, se inyecta vapor directo en la muestra de la planta. La hidrodestilación implica tres procesos fisicoquímicos principales; Hidrodifusión, hidrólisis y descomposición por calor. A

una temperatura de extracción alta, pueden perderse algunos componentes volátiles. Este inconveniente limita su uso para la extracción de compuestos termolábiles (Azmir et al 2013)

Técnicas de extracción no convencional

Se utilizan numerosas técnicas de extracción para la extracción de fenoles de las bayas de uva, como la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción asistida por enzimas, extracción de líquido a presión, que también se conoce como extracción acelerada de solvente, extracción de fluido supercrítico (Tomaz, y otros, 2019)

Extracción asistida por ultrasonido

Se basa en la partición del analito entre la matriz sólida y el disolvente de extracción con la ayuda de ultrasonidos de alta frecuencia (20 a 100 kHz). Los sistemas piezoeléctricos convierten la energía eléctrica en energía sonora. Las ondas sonoras se propagan a través del medio (líquido) y, por lo tanto, causan ciclos de expansión y compresión. La eficiencia está influenciada por la relación muestra – solvente, tamaño de partícula, composición del solvente, tiempo, temperatura; esta técnica puede llevarse a cabo utilizando baños ultrasónicos o sondas ultrasónicas (Tomaz, y otros, 2019).

Extracción asistida por microondas

Se basa en la aplicación de energía de microondas. Las microondas son parte del espectro electromagnético con un rango de frecuencia de 0.3 a 300 GHz. El procedimiento de extracción comienza con la introducción de la muestra y un disolvente en el recipiente de extracción, que luego se cierra. Se colocan muestras en el carrusel del horno y se aplica la radiación MW de cierta potencia, es el paso preextracción. Al pasar las microondas a través del medio, se produce la absorción, la energía de

microondas se convierte posteriormente en energía térmica, las microondas calientan el líquido contenido dentro de las células de las muestras sólidas, con el aumento de la presión se produce la degradación de la pared celular, lo que a su vez aumenta la porosidad de la muestra, y permite una mejor penetración del disolvente de extracción en la matriz y aumenta la eficiencia de la extracción (Tomaz, y otros, 2019)

Extracción asistida por enzimas

Existen diferentes técnicas de extracción y muchas especies de matriz vegetal, la liberación de la pared celular es obligatoria. Este proceso permite la liberación del contenido intracelular al disolvente de extracción. La degradación del pozo celular se puede lograr por la acción de las enzimas, en la cual se puede aplicar numerosas enzimas; celulasas hemicelulasas, tanasas, pectinasas, etc. Los factores que influyen en la técnica son como el valor de pH, el tipo de enzima, la temperatura, la duración de la incubación, y la dosis de enzima afecta notablemente la eficiencia de EAE. Últimamente la técnica de extracción mencionada se ha vuelto muy popular debido al enfoque de bajo costo, alta eficiencia y amigable con el medio ambiente (Tomaz, y otros, 2019)

Extracción de líquido a presión (PLE)

Esta extracción también es conocida como extracción acelerada de solventes, en la cual se combina temperaturas elevadas (100 °C a 200 °C) y altas presiones (100 a 140 bar) para lograr una extracción rápida, eficiente y automatizada de los analitos de las muestras sólidas, como disolventes de extracción se utiliza disolventes orgánicos comunes o sus soluciones acuosas, la muestra se mezcla con un agente de secado, el más utilizado es la arena, el disolvente de extracción se puede aplicar metanol, agua. La temperatura elevada aumenta la velocidad de difusión y la solubilidad de los analitos, acelerando la extracción, y la presión

más alta facilita la extracción de los compuestos contenidos en los poros de la matriz (Tomaz, y otros, 2019).

Fluidos supercríticos (SFE)

La técnica limpia de extracción de aceite es con fluidos supercríticos, la primera extracción comercial con fluido supercrítico se realizó en Alemania en 1978, fue el descafeinado de café, dos años después Carlton y United Breweries en Australia desarrollaron el proceso de la extracción de sabor de lúpulo usando CO₂, otras aplicaciones fueron el descafeinado del té, extracción de aceites y grasas y extracción del alcohol en bebidas alcohólicas entre otros (Raventós, Duarte y Alarcón, 2002) se puede observar la región correspondiente a los fluidos supercríticos para varios solventes.

Se puede observar en la Fig 2, la región correspondiente a los fluidos supercríticos para varios solventes. Un FSC (líquido o gas) muestra propiedades únicas, diferentes al estado líquido o gaseoso bajo condiciones estándar y tiene la capacidad de disolver compuestos que puede disolver con dificultad o no puede disolver totalmente en el estado gaseoso o líquido. El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que no es tóxico, no inflamable, no corrosivo, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto separar compuestos termolábiles ayudando a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos. Las ventajas de los fluidos supercríticos son las siguientes: poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos, la ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea. Así mismo, la selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la

variación de las diferentes condiciones de operación temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico, el CO₂ supercrítico también ha sido usado en innumerables aplicaciones industriales que incluyen diferentes campos como: alimentos, agricultura, acuicultura, pesticidas, procesos microbianos, petroquímica y farmacéutica (Raventós et al., 2002; Goodship & Ogar. 2004).

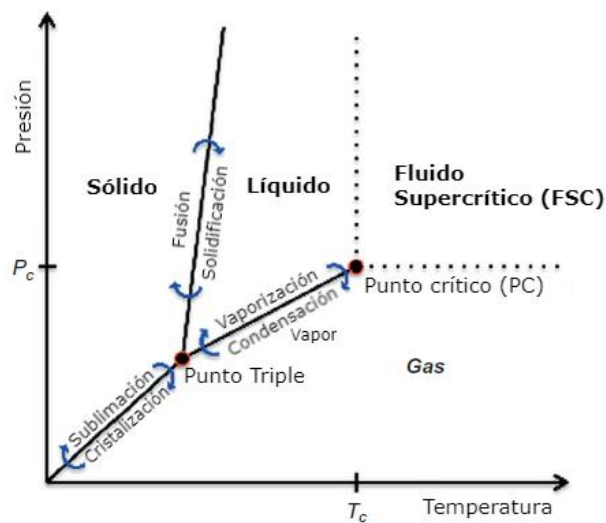


Figura 2. Diagrama de Presión en función de la temperatura, región Supercrítica . *Fuente.* Larissa P. Cunico and Charlotta Turner (2017)

Da Silva et al (2016) mencionan que la curva de extracción con CO₂ supercrítico se divide en tres etapas, tal como se observa en la Figura 3, las cuales están controladas por diferentes mecanismos de transferencia de masa:

- a) Periodo de extracción constante (CER, siglas en inglés Constant Extraction Rate), donde la superficie externa de las partículas está cubierta con soluto y la convección es el mecanismo dominante de transferencia de masa;
- b) Periodo de caída de la extracción (FER: siglas de Falling Extraction Rate), donde aparecen un quiebre en el contenido de

aceite de la superficie externa y el mecanismo de difusión comienza, operando en forma combinada con la convección;

c) Tasa de extracción baja (LER: Low Extraction Rate) o período controlado por difusión (DC), donde la capa externa de aceite prácticamente desapareció y la transferencia de masa se produce principalmente por difusión dentro de las partículas sólidas.

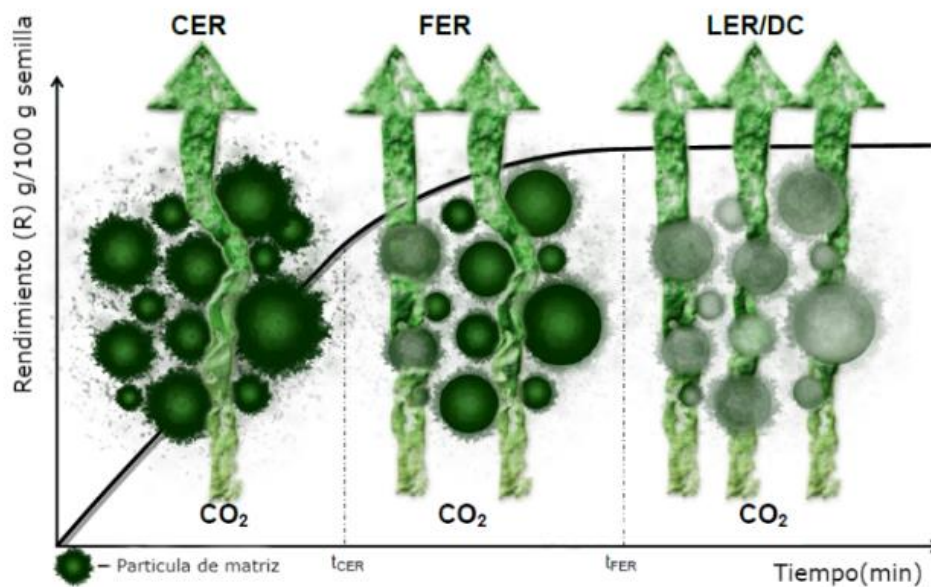


Figura 3 . Curva de extracción con CO₂ supercrítico. Fuente. Da Silva et al., 2016.

3.3. Definiciones

Subproducto de la producción Vitivinícola. - es el orujo, obtenido luego de la elaboración del vino, contiene: semilla, piel, hollejo.

Fluido o liquido presurizado.- es cualquier sustancia a una temperatura y presión menor a su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos y de disolver mejor que en su condición atmosférica.

Extracción con fluido supercrítico. - extracción de compuestos de interés usando solventes en condiciones supercríticas.

Oxidación.- en bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrogeno (deshidrogenación) y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otros de reducción.

Antioxidantes.- son sustancias que disminuyen la generación de productos oxidados en un sistema de reacciones de radicales libres, estos se oponen a la acción del oxígeno y de ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo.

Radicales libres. - son especies químicas con electrones desapareados en su capa de valencia, esta característica les permite participar en reacciones de cadena que comprende inicio, propagación y terminación. En los sistemas biológicos, los radicales libres suelen ser moléculas orgánicas o inorgánicas de vida corta, por lo mismo muy reactivas que se forman como producto del metabolismo y pueden causar efectos deletéreos sobre los componentes celulares: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, así como sus derivados. En análisis de determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante se utilizan radicales libres sintéticos como el DPPH.

Compuestos fenólicos, metabolitos secundarios producidos por las plantas (Daglia, 2012) .

IV. METODOLOGÍA APLICADA

4.1. Tipo y Nivel de la Investigación

El tipo de investigación es aplicada, el nivel es descriptiva y correlacional, debido a que mide las variables y se estima su correlación.

4.2. Diseño de Investigación

El diseño es experimental, se realiza la recolección de datos en un solo corte de tiempo, considerándose un diseño transversal. Se utilizó el programa Minitab versión 17 para el diseño full factorial con dos factores.

4.3. Hipótesis General

Uno de los extractos de uva, orujo o semilla de uva borgoña negra tienen mayor actividad antioxidante y compuestos fenólicos.

4.4. Hipótesis Específicas

H: Los extractos obtenidos con líquidos presurizados utilizando etanol permite extraer mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con la extracción convencional y agua subcrítica.

H: Los extractos obtenidos con líquidos presurizados utilizando etanol permite obtener extractos con mayor capacidad antioxidante que los obtenidos con la extracción convencional y agua subcrítica.

4.5. Variables

Para los dos primeros objetivos específicos:

Las variables independientes: Técnicas de extracción, 3 niveles: convencional, agua subcrítica y líquido presurizado utilizando solución de etanol.

Variables dependientes:

Compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

4.6. Operacionalización de Variables

Variable : Técnicas de extracción de compuestos fenólicos

Definición conceptual:

- ✓ Extracción con agua subcrítica .- donde las sustancias son disueltas en agua, la cual es capaz de modificar su poder de disolución bajo condiciones superiores a su temperatura de ebullición y $< 374\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a presión $> 70\text{ bar}$ y $< 220.5\text{ bar}$. El estado es líquido.
- ✓ Extracción con líquido presurizado utilizando etanol.- el etanol es menos polar que el agua facilitando la extracción de los compuestos fenólicos la constante dieléctrica es diferente al agua..
- ✓ Extracción con maceración con etanol.- extracción más simple y económica, el etanol facilita la extracción de los CF polares

Definición operacional:

- ✓ Extracción con agua subcrítica.- Se programará el extractor multisolvente con parámetros de operación de temperatura y presión
- ✓ Extracción con líquido presurizado utilizando etanol.- se programará el extractor multisolvente con parámetros de operación de temperatura y presión,
- ✓ Maceración con etanol.-Se somete la muestra previamente a diferentes concentraciones de etanol, 15, 32.5, 50 y 70% de etanol durante 2 horas a la misma proporción muestra: etanol, la concentración que permita $>CF$ se utilizará en diseño factorial

Dimensiones :

- ✓ Extracción con extractor multisolvente: Temperatura $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, presión subcrítica 120 bar
- ✓ Extracción con líquido presurizado utilizando etanol: Tiempo 120 min . Etanol a 50% con uva y orujo y de 70% de etanol para semilla.
- ✓ Maceración con etanol: Proporciones etanol a 50% con uva y orujo y de 70% de etanol para semilla uva borgoña.

Indicadores:

- ✓ Extracción agua subcrítica, Extracción con líquido presurizado y Maceración con etanol: Cantidad de EAG expresado en equivalente de

ácido gálico/ g muestra; actividad antioxidante : DPPH IC₅₀, FRAP umol
ET/g muestra

Variable : Compuestos fenólicos (extracto)

Definición conceptual:

Estructuras de vegetales, desde monómeros simples a complejos asumen color rojo, marrón verde, gris o coloración negra, las tonalidades de color depende de los taninos, el ion metal específico, pH y la concentración del complejo fenólico. (M. Oke and G. Paliyath. 2006).

Definición operacional:

Para la cuantificación de compuestos fenólicos, se usará un espectrofotómetro UV visible verificado, con reactivos ACS y materiales de vidrio verificados, cada análisis tendrá duplicados.

Dimensiones:

mg EAG/g de semillas de uva Borgoña, mg EAG/g de orujo y mg EAG/g de uva Borgoña

Indicadores

Acido gálico, contenido en mg por cada g de muestra.

Variable : Actividad antioxidante

Definición conceptual:

Habilidad para estabilizar los radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos que son como agentes quelantes.

Definición operacional:

Para el método DPPH, donde se utiliza el radical sintético DPPH, en la cuantificación de compuestos fenólicos, se usará un espectrofotómetro UV visible verificado, con reactivos ACS y materiales de vidrio verificados, cada análisis tendrá duplicados

Dimensiones:

Captación de DPPH, medición de la capacidad de dar electron, por parte del extracto en estudio a los radicales libres del DPPH

Indicadores

Valores en unidades de IC₅₀

4.7. Población – Muestra

La muestra de uva y orujo fue donada por la bodega de Lomo Largo de Sunampe, Chincha. Se recibieron 10 kg de uva y 50 kg de orujo de uva borgoña negra en marzo del 2020, se guardaron en refrigeración, luego fue trasladado a las instalaciones del Cite agroindustrial Ica.

Preparación de la muestra

El orujo y la uva borgoña fueron (Figura 1a y b) secados en una estufa (Venticell, LSIS-B2V), luego se trituraron, se envasaron al vacío con la selladora (Multivac, C200) y se guardaron en refrigeración hasta su posterior análisis (Figura 4a y b). Una porción de orujo seco se utilizó para separar la semilla.

Se realizó la extracción del aceite de la semilla con CO₂ supercrítico, utilizando el equipo de multisolvente (Top industrie, 2802 0000).

Por separado, se trituraron las muestras de orujo y semilla desgrasada y se pasaron por el tamiz de 0.71 mm, previamente a cada una de las extracciones.

Las matrices utilizadas en el diseño experimental fueron la uva seca, el orujo y la semilla desgrasada.

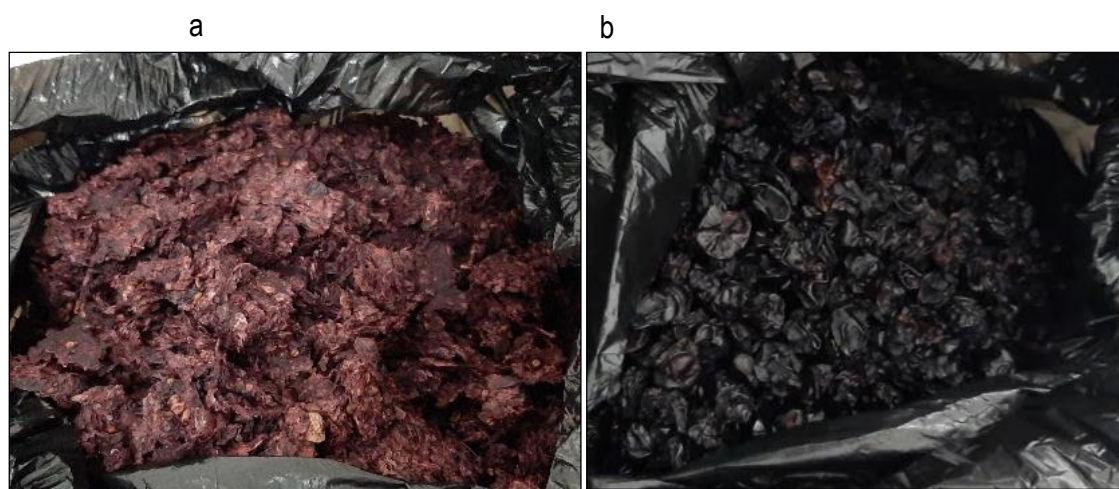


Figura 4. Muestras Orujo (a) y uva (b) borgoña secos

4.8. Recolección de la información a través del trabajo de campo o experimentos en laboratorio

Se realizaron los siguientes análisis a las muestras:

Composición proximal

Se realizó la determinación de la composición proximal del orujo y semilla. El ensayo de cenizas se realizó según la metodología de FAO-Food and Nutrition. Paper. PP 228 T 14/7 (1986), grasa según el método soxhlet (Buchi E-800, Suiza), la determinación de proteína cruda por el método Kjeldahl y la humedad según la FAO-Food and Nutrition. Paper. PP 205 T 14/7 (1986) los resultados se muestran en la Tabla 2.

Minerales

Los minerales de las muestras de orujo, semilla y uva, fueron determinados con un espectrómetro de absorción atómica (PerkinElmer, Aanalyst 800) según metodología BOE (1991), las concentraciones de los estándares fueron para Ca (Merck, 999 ± 2 mg/L, Alemania), Fe (Accustandardy, 1000 μ g/mL, USA), Cu (Accustandardy, 1000 μ g/mL, USA), Zn (Accustandardy, 1000 μ g/mL, USA). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Metales pesados

Los contenidos de Plomo (Merck, 1000 mg/L, Alemania) y Cadmio (Merck, 1000 mg/L, Alemania) de las muestras de orujo y semilla fueron determinados en un espectrómetro de absorción atómica (PerkinElmer, Aanalyst 800). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Cuantificación de compuestos fenólicos

Se preparó la curva de calibración según la técnica Folin Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela, 1999), las concentraciones de la curva fueron 50, 100, 200, 300 y 400 ppm de ácido gálico (Figura 5). Se empleó el espectrofotómetro UV-VIS (Thermoscientific modelo Genesys 180, USA) se registraron las lecturas de las absorbancias y los resultados se

expresaron en unidades de mg EAG/ml extracto. EAG: Equivalente a ácido gálico.

Se determinó la actividad antioxidante in vitro siguiendo dos métodos:

Reducción de radicales libres con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Se realizó el ensayo según la técnica de extracción de Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). Para la curva de calibración se preparó la solución madre del Trolox a una concentración de 2.5 mg/ml, se diluyó a una concentración de 0.1 mg/ mL y se prepararon los puntos de 50 µL, 150 µL, 300 µL, 500 µL, 600 µL, se completó con agua desionizada a 1500 µL, y se agregó 1500 µL de reactivo de DPPH, se agitó y se dejó reposar por 1h en oscuridad a temperatura ambiente para su lectura a 518 nm.

Para el extracto en estudio, se diluyó de acuerdo a la capacidad de antioxidante del mismo, se prepararon los puntos de 100 µL, 250 µL, 400 µL, 600 µL, 900 µL, se siguió el procedimiento para la curva, se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro UV-VIS a 518 nm. Los resultados se expresan en dos unidades, en mg TE/mg extracto y IC₅₀ en mg extracto/mL.

Ferric Reducing Antioxidante power (FRAP)

Se siguió el método de Benzie y Strain (1996), se preparó la curva de calibración con Trolox en las concentraciones de 0.10 mM, 0.20 mM, 0.40 mM, 0.50 mM y 0.60 mM, se añadió el reactivo FRAP y se realizaron las lecturas con el espectrofotómetro UV-VIS. Se registraron las absorbancias. Para el extracto en estudio, este se diluyó, se añadió 270 µL de agua desionizada y 2,7 mL reactivo FRAP, se agito vigorosamente y se dejó reposar en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, luego se realizó la lectura de las absorbancias en el espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm. Los resultados se expresaron en µmol TE/g muestra. TE: Equivalente a Trolox.

Diseño estadístico

Se realizó el diseño Full factorial con el programa estadístico Minitab, de dos factores: Factor A: concentración de etanol: 4 niveles, 15, 32.5, 50 y 70 % de etanol. Factor B: matriz: 3 niveles, uva, semilla, orujo.

Luego de encontrar la concentración de etanol a la cual se logra extraer mayor cantidad de CF y capacidad antioxidante, se realizó un segundo diseño Full factorial, de dos factores: Factor A: Tipo de extracción, 3 niveles: Convencional, Extracción con agua subcrítica (AS) y PLE con etanol y Factor B: matriz: 3 niveles, uva, semilla, orujo. Es necesario precisar que el tipo de extracción "convencional" se refiere a la concentración de etanol a la cual se encontró mayor contenido de F y capacidad antioxidante.

Extracciones

Extracción de grasa de la semilla: Se realizó la extracción de aceite de semilla de uva borgoña con CO₂ supercrítico utilizando el equipo extractor multisolvente a 190- 200 bar, 33 C y 50 g de CO₂ /min. La extracción del aceite se realizó durante 3h.

Extracción convencional de compuestos fenólicos.

La muestra de uva, semilla previamente desgrasada y orujo fueron pesadas en tubos falcón y luego se agregó soluciones de etanol 15, 32.5, 50 y 70 %, preparados a partir de alcohol absoluto, manteniendo la relación muestra: solvente de 7:100, se realizaron las extracciones por triplicado, haciendo un total de 36 tubos, la maceración de las muestras se realizaron en agitación con ayuda del rotador de tubos (Dragon Lab, MX-RLPro) a temperatura ambiental (20 a 22 °C), los extractos obtenidos fueron centrifugados (Eppendorf AG, centrifuge 5804 R) para su posterior análisis de CF y capacidad antioxidante

Extracciones con líquidos presurizados.

Las matrices fueron: orujo, semilla desgrasada y uva borgoña con el equipo extractor Multisolvente, para la extracción con AS, se pesó en la celda de

extracción 29.18 ± 1.40 g de muestra, alternando la muestra con perlas de vidrio para dispersar la muestra, el agua fue absorbida con la bomba cosolvente la proporción muestra: solvente fue de 1:32 respectivamente, a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta llegar a 170 ± 10 bar, se mantuvo esas condiciones durante 2 horas, se realizó la colecta del extracto y se enfrió con baños de hielo. Para la extracción con líquidos presurizados se utilizó etanol, en la concentración de etanol que se obtuvo la mayor cantidad promedio de CF y capacidad antioxidante de la extracción convencional. El peso de la muestra, temperatura, presión y tiempo de extracción fueron similares a lo utilizado en la extracción con AS. Se realizó la colecta del extracto y se enfrió con baños de hielo.

La extracción previa de aceite de semilla de uva se realizó con CO_2 supercritico (Fig 5), previo a la extracción de compuestos fenólicos. La extracción convencional se realizó en tubos, en agitación con el rotator (Fig 6) , los extractos obtenidos en las extracciones convencionales, con diferentes concentraciones de etanol se muestran en la figura 7



Figura 5.-Extracción de aceite de semilla con CO_2 supercritico



Figura 6.- Extracción convencional

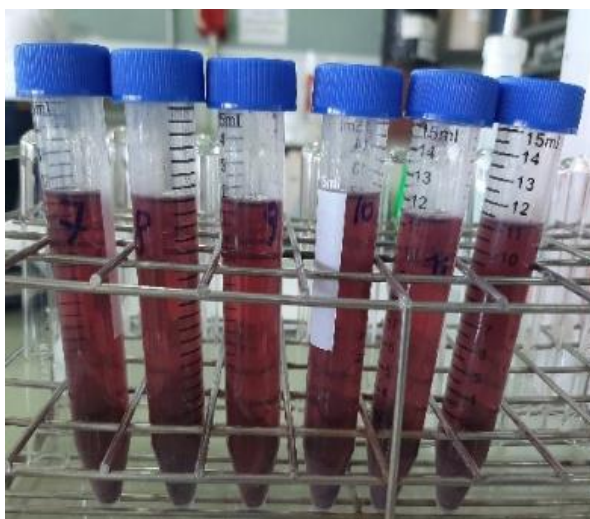


Figura 7. Extracción convencional del orujo de uva borgoña negra

Se analizaron las muestras, obteniéndose la composición proximal y los contenidos de Pb y Cd (Tabla 3), los contenidos cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn) y calcio (Ca) de orujo, semilla y uva *Vitis labrusca* (borgoña negra) (Tabla 4).

Los compuestos fenólicos y actividad antioxidante obtenidos según los experimentos del diseño full factorial con diferentes concentraciones de etanol se observan en la Tabla 5 y con diferentes técnicas de extracción de compuestos fenólicos (Tabla 6).

Tabla 2.- Composición proximal y contenidos de Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) del orujo y semilla *Vitis labrusca* (borgoña negra).

Denominación de la Muestra	Ensayo Solicitado (Metodología)	Resultados
ORUJO	Determinación de Cenizas	4,86 %
	FAO-Food and Nutrition. Paper, PP 228 T 14/7,1986	5,03 %
ORUJO	Determinación de Grasa Cruda	10,78%
	LABS-ITP-FQ-003-2009, Rev.00, 2009	10,46%
ORUJO	Determinación de Proteína Cruda	10,33%
	LABS-ITP-FQ-001-2009, Rev.00, 2009	10,94%
ORUJO	Determinación de Humedad	10,86%
	FAO-Food and Nutrition. Paper, PP 205 T 14/7,1986	10,67%
ORUJO	Determinación de Cadmio por Absorción Atómica	0,016 mg/Kg
	LABS-ITP-FQ-004-09, 2009	0,012 mg/Kg
ORUJO	Determinación de Plomo por Absorción Atómica	0,282 mg/Kg
	LABS-ITP-FQ-007-09, 2009	0,282 mg/Kg
SEMILLA	Determinación de Cenizas	8,17 %
	FAO-Food and Nutrition. Paper, PP 228 T 14/7,1986	8,02 %

SEMILLA	Determinación de Grasa Cruda	11,05 %
	LABS-ITP-FQ-003-2009, Rev.00, 2009	11,07 %
SEMILLA	Determinación de Proteína Cruda	10,98 %
	LABS-ITP-FQ-001-2009, Rev.00, 2009	11,14 %
SEMILLA	Determinación de Humedad	8,03 %
	FAO-Food and Nutrition. Paper, PP 205 T 14/7,1986	8,35 %
SEMILLA	Determinación de Cadmio por Absorción Atómica	0,010 mg/Kg
	LABS-ITP-FQ-004-09, 2009	0,009 mg/Kg
SEMILLA	Determinación de Plomo por Absorción Atómica	0,024 mg/Kg
	LABS-ITP-FQ-007-09, 2009	0,028 mg/Kg

Tabla 3.- Contenido de cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn) y calcio (Ca) de orujo, semilla y uva *Vitis labrusca* (borgoña negra).

Denominación de la Muestra	Ensayo Solicitado (Metodología)	Resultados
ORUJO	Determinación de Cobre	10,71 mg/Kg
		10,54 mg/Kg
ORUJO		0,411 mg/g

	Determinación de Calcio	0,408 mg/g
ORUJO	Determinación de Hierro	108,20 mg/Kg
		108,74 mg/Kg
ORUJO	Determinación de Zinc	7,93 mg/Kg
		7,49 mg/Kg
SEMILLA	Determinación de Cobre	8,49 mg/Kg
		8,50 mg/Kg
SEMILLA	Determinación de Calcio	1,27 mg/g
		1,25 mg/g
SEMILLA	Determinación de Hierro	25,84 mg/Kg
		25,56 mg/Kg
SEMILLA	Determinación de Zinc	7,97 mg/Kg
		6,92 mg/Kg
UVA	Determinación de Cobre	3,05 mg/Kg
		3,12 mg/Kg
UVA	Determinación de Calcio	0,220 mg/g
		0,211 mg/g
UVA	Determinación de Hierro	12,58 mg/Kg
		13,46 mg/Kg
UVA	Determinación de Zinc	2,00 mg/Kg
		2,07 mg/Kg

TABLA 4. Contenidos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos obtenidos por maceración con etanol (15, 32.5, 50 y 70 %) a partir de la uva, orujo y semilla desgrasada de *Vitis labrusca* (borgoña negra). n =3

Muestra	N° extracciones	Extracción convencional	CFT	FRAP	IC50	TEAC
			mg EAG/ g muestra	μ mol TE/g muestra	mg extracto/mL	μmol TE/g extracto
Uva	1	EtOH 15%	7.83	38.38	0.4502	37.51
	2	EtOH 15%	9.48	34.97	0.5247	32.19
	3	EtOH 15%	8.59	38.21	0.4560	37.04
	1	EtOH 32.5 %	9.07	39.30	0.3980	42.44
	2	EtOH 32.5 %	8.28	35.08	0.4891	34.53
	3	EtOH 32.5 %	8.27	39.34	0.4687	36.04
	1	EtOH 50 %	8.97	42.08	0.3816	44.26
	2	EtOH 50 %	8.22	34.86	0.4296	39.31
	3	EtOH 50 %	8.65	35.29	0.4757	35.50
	1	EtOH 70 %	8.19	28.81	0.4868	34.70
	2	EtOH 70 %	8.11	29.90	0.5126	32.95
	3	EtOH 70 %	9.29	33.17	0.5161	32.73
Orujo	1	EtOH 15%	4.26	39.31	0.1697	112.06
	2	EtOH 15%	4.73	38.01	0.1931	98.48
	3	EtOH 15%	4.37	37.29	0.2125	89.51
	1	EtOH 32.5 %	4.51	63.24	0.1147	165.83
	2	EtOH 32.5 %	4.63	53.87	0.1187	160.24

	3	EtOH 32.5 %	4.62	54.59	0.1118	170.03
	1	EtOH 50 %	8.06	58.89	0.0805	236.28
	2	EtOH 50 %	7.58	55.70	0.0774	245.79
	3	EtOH 50 %	8.40	63.79	0.0828	229.59
	1	EtOH 70 %	7.58	53.91	0.0862	220.66
	2	EtOH 70 %	7.83	53.87	0.0950	200.19
	3	EtOH 70 %	7.49	51.43	0.0937	202.90
Semilla	1	EtOH 15%	9.75	58.60	0.0260	773.70
	2	EtOH 15%	9.15	64.31	0.0327	615.09
	3	EtOH 15%	9.48	46.35	0.0198	872.76
	1	EtOH 32.5 %	20.83	144.11	0.0163	1236.18
	2	EtOH 32.5 %	12.86	99.69	0.0112	1537.32
	3	EtOH 32.5 %	17.10	109.51	0.0169	1191.72
	1	EtOH 50 %	20.99	137.90	0.0146	1375.73
	2	EtOH 50 %	15.89	118.17	0.0074	2322.96
	3	EtOH 50 %	18.55	123.27	0.0117	1713.00
	1	EtOH 70 %	21.75	183.97	0.0124	1625.76
	2	EtOH 70 %	19.53	192.35	0.0091	1890.00
	3	EtOH 70 %	26.87	183.22	0.0129	1562.67

TABLA 5. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos obtenidos con agua subcrítica y con líquido presurizado a partir de la uva, orujo y semilla de uva *Vitis labrusca* (borgoña negra).

Muestra	N° extracciones	Condición	CFT	FRAP	IC50	TEAC
			mg EAG/ g muestra	μ mol TE/g muestra	mg extracto/mL	μmol TE/g extracto
Orujo	1	Agua subcrítica	16.36	43.99	0.1403	124.98

	2	Agua subcrítica	17.69	49.31	0.1487	117.92
	3	Agua subcrítica	18.25	47.74	0.1691	108.10
Uva	1	Agua subcrítica	6.80	18.16	0.2831	63.53
	2	Agua subcrítica	7.25	19.06	0.3283	54.78
	3	Agua subcrítica	6.32	17.57	0.3049	58.98
semilla	1	Agua subcrítica	31.21	235.09	0.0052	3098.42
	2	Agua subcrítica	29.68	196.43	0.0065	2495.46
	3	Agua subcrítica	26.08	207.21	0.0083	2230.22
Orujo	1	PLE EtOH 50%	45.12	267.03	0.0256	746.28
	2	PLE EtOH 50%	49.54	301.66	0.0308	620.68
	3	PLE EtOH 50%	35.14	299.19	0.0267	715.90
Uva	1	PLE EtOH 50%	18.09	104.46	0.1404	125.87
	2	PLE EtOH 50%	17.87	91.26	0.1472	120.06
	3	PLE EtOH 50%	17.38	90.65	0.1534	115.25
semilla	1	PLE EtOH 70%	61.84	533.34	0.0071	2471.24
	2	PLE EtOH 70%	67.14	522.19	0.0064	2753.26
	3	PLE EtOH 70%	62.25	494.24	0.0076	2333.36

V. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. Descripción de los resultados

La composición proximal muestra mayor contenido de cenizas en la semilla en comparación con el orujo (Tabla 7), esto se refleja en un contenido mayor de minerales como el calcio entre otros (Tabla 8), EL contenido de humedad de la uva fue de 17 %.

Tabla 6. Composición proximal promedio del orujo y semilla en 100 g muestra.

	Humedad (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)
Orujo	10.77± 0.13	10.62 ± 0.23	10.64 ± 0.43	4.95 ± 0.12
Semilla	8.19± 0.23	11.06±0.01	11.06± 0.11	8.10 ± 0.11

Tabla 7. Contenidos promedio de calcio, hierro cobre y zinc en mg/ 100 g de muestra seca.

	Ca	Fe	Cu	Zn
Orujo	40.95 ± 0.21	10.85±0.04	1.06±0.01	0.77±0.03
Semilla	126.00 ±1.41	2.57 ± 0.02	0.85± 0.01	0.74±0.07
Uva	21.55 ± 0.64	1.30 ± 0.06	0.31 ± 0.01	0.20 ± 0.01

Los contenidos de cadmio y plomo, metales pesados, son bajos (Tabla 9)

Tabla 8. Contenidos promedio de metales pesados cadmio y plomo.

	Plomo (ug/g muestra seca)	Cadmio (ug/g muestra seca)
Orujo	0.282± 7X10-5	0.014 ±0.003
semilla	0.026±0.003	0.0095±7x10-4

Diseño estadístico

Los resultados obtenidos de CF y capacidad antioxidante en DPPH, expresado en 2 unidades con la finalidad de comparar con los resultados de otros autores y FRAP, obtenidos en los experimentos del diseño full factorial, se observan en la Tabla 9. Los valores son el promedio de 3 determinaciones y la desviación estándar. Para la extracción con líquidos presurizados se utilizó el equipo extractor multisolvente (Figura 8)



Figura 8.. Equipo extractor multisolvente Top Industrie

Tabla 9 .- Valores promedio de CF y capacidad antioxidante en DPPH y FRAP ,con diferentes técnicas de extracción

Matriz	Técnica de extracción	CFT mg EAG/ g muestra	IC50 mg extracto/mL	DPPH μ mol TE/g extracto	FRAP μ mol TE/g muestra
Uva	EtOH 15%	8.63 \pm 0.83	0.477 \pm 0.0414	35.58 \pm 2.95	37.18 \pm 1.92
	EtOH 32.5 %	8.54 \pm 0.46	0.4519 \pm 0.0478	37.67 \pm 4.20	37.91 \pm 2.45
	EtOH 50 %	8.61 \pm 0.38	0.429 \pm 0.0471	39.69 \pm 4.39	37.41 \pm 4.05

	EtOH 70 %	8.53±0.66	0.5052±0.0160	33.46±1.08	30.63±2.27
	AS	6.79±0.47	0.3054±0.0226	59.1±4.38	18.26±0.75
	PLE EtOH 50%	17.78±0.36	0.147±0.0065	120.39±5.32	95.46±7.80
Orujo	EtOH 15%	4.45±0.24	0.1918±0.0214	100.02±11.36	38.2±1.02
	EtOH 32.5 %	4.59±0.07	0.1151±0.0034	165.37±4.91	57.23±5.21
	EtOH 50 %	8.01±0.41	0.0802±0.0027	237.22±8.14	59.46±4.07
	EtOH 70 %	7.63±0.18	0.0916±0.0048	207.92±11.12	53.07±1.42
	AS	17.43±0.97	0.1527±0.0148	117±8.48	47.01±2.73
	PLE EtOH 50%	43.27±7.37	0.0277±0.0027	694.29±65.53	289.29±19.32
Semilla	EtOH 15%	9.46±0.30	0.0262±0.0065	753.85±129.97	56.42±9.18
	EtOH 32.5 %	16.93±3.99	0.0148±0.0031	1321.74±188.01	117.77±23.34
	EtOH 50 %	18.47±2.55	0.0113±0.0036	1803.9±480.11	126.45±10.24
	EtOH 70 %	22.72±3.77	0.0115±0.0020	1692.81±173.66	186.52±5.07
	AS	28.99±2.63	0.0066±0.0016	2608.03±444.91	212.91±19.95
	PLE EtOH 50%	63.74±2.95	0.007±0.0006	2519.28±214.03	516.59±20.14

5.2 Análisis de los resultados

Análisis factorial de las extracciones con diferentes concentraciones de etanol y matrices (uva, orujo y semilla)

El análisis factorial, indica un efecto de la muestra (p value =0) y de la concentración de etanol (p value =0) sobre los valores de CF y capacidad antioxidante (DPH y FRAP), así como un efecto combinado de la muestra y la concentración de etanol sobre los valores de CF y CA (Tabla 8) el R^2 del modelo fue de 97.30 indicando que el 97.30 de los datos se adecuan al modelo factorial.

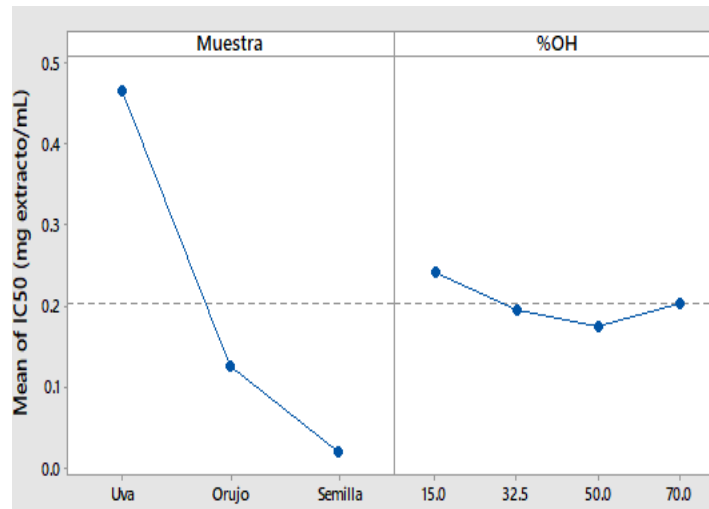
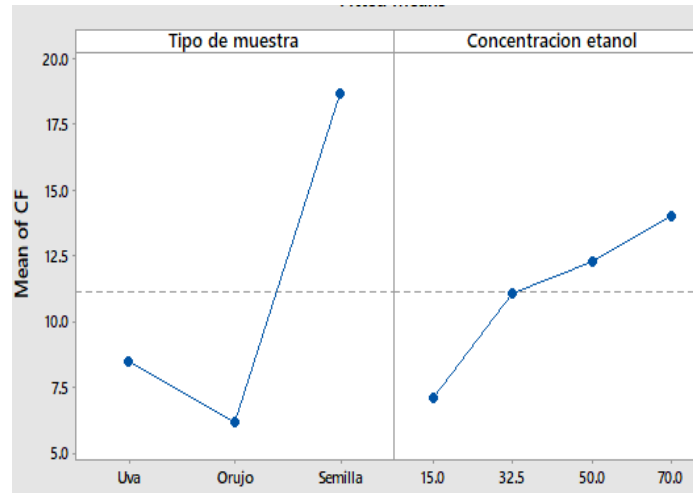
Así mismo, existe evidencia estadística que con las soluciones de 50% y 70 % se lograron extraer cantidades superiores al promedio de CF, Valores FRAP y CET (DPPH) en uva, orujo y semilla, además, que la semilla

presentó valores de CF y valor FRAP superiores que los valores promedio del orujo y la uva (Fig 9)

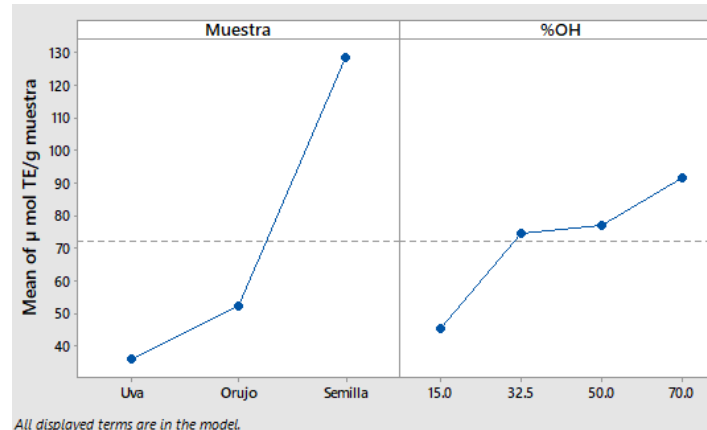
No existe correlación lineal entre la concentración de etanol y los CF obtenidos ($R^2= 0.182$), tampoco entre los CF y la capacidad antioxidante FRAP ($R^2=0.505$) para la uva y ni para el orujo (Tabla 11), pero, para la semilla la correlación lineal fue significativa entre los CF y la capacidad antioxidante de FRAP ($R^2=0.994$) y los CF y IC50 ($R^2=0.972$).

Tabla 10- Análisis del diseño factorial de CF, factor A: concentración de etanol: 4 niveles, 15, 32.5, 50 y 70 % de etanol. Factor B: matriz: 3 niveles, uva, semilla, orujo

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	11	1523.03	138.458	78.51	0
Linear	5	1290.15	258.029	146.31	0
Muestra	2	1060.94	530.471	300.79	0
%OH	3	229.2	76.401	43.32	0
2-Way Interactions	6	232.89	38.815	22.01	0
Muestra*%OH	6	232.89	38.815	22.01	0
Error	24	42.33	1.764		
Total	35	1565.36			



All displayed terms are in the model.



All displayed terms are in the model.

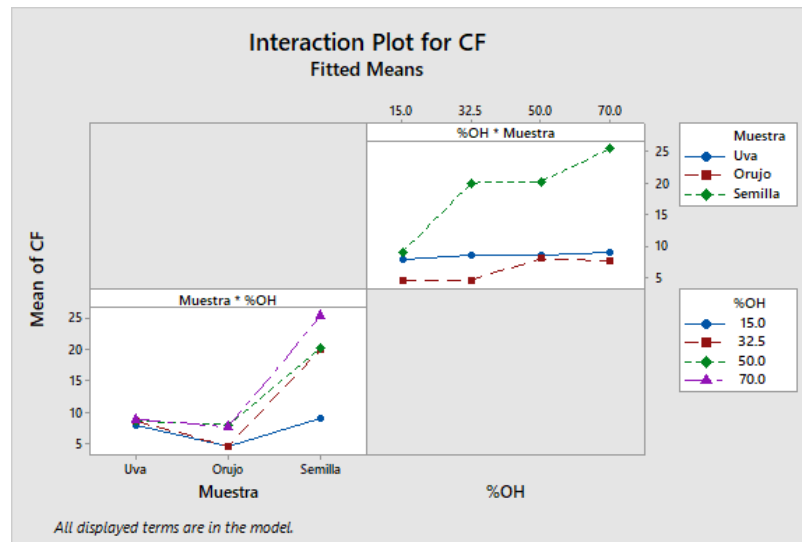


Figura 9. - Efecto e interacción de la concentración de etanol y las matrices (uva orujo y semilla) en la extracción de CF y capacidad antioxidante

Tabla 11. Correlación lineal de los extractos etanolicos, los CF vs capacidad antioxidante: IC 50, CAET

		Correlaciones				
		CF	FRAP	IC50	CAET	%OH
CF	Correlación de Pearson	1	,994**	-,972*	,982*	,920
	Sig. (bilateral)		,006	,028	,018	,080
	N	4	4	4	4	4
FRAP	Correlación de Pearson	,994**	1	-,941	,969*	,946
	Sig. (bilateral)	,006		,059	,031	,054
	N	4	4	4	4	4
IC50	Correlación de Pearson	-,972*	-,941	1	-,983*	-,859
	Sig. (bilateral)	,028	,059		,017	,141
	N	4	4	4	4	4
CAET	Correlación de Pearson	,982*	,969*	-,983*	1	,937
	Sig. (bilateral)	,018	,031	,017		,063
	N	4	4	4	4	4
%OH	Correlación de Pearson	,920	,946	-,859	,937	1
	Sig. (bilateral)	,080	,054	,141	,063	
	N	4	4	4	4	4

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Análisis factorial de las extracciones de 3 matrices (uva, orujo y semilla) y 3 técnicas de extracción (convenciona, AS y PLE con etanol). El análisis de

varianza del diseño full factorial, muestra un efecto de la matriz (uva, orujo, semilla) y de la técnica de extracción sobre los valores de CF y capacidad antioxidante de los extractos, así como un efecto combinado de los dos factores, los coeficientes de regresión de los análisis de varianza para la los CF, DPPH (umol/g extracto), DPPH (umol ET / ml) y FRAP fueron 98.03, 98.05, 98.89 y 99.5 respectivamente. Los análisis de varianza obtenidos con el Minitab se observan en las Tablas 12, 13, 14 y 15.

La semilla contenía mayor valor promedio de CF en comparación con el orujo y la uva, y la técnica de PLE permitió en las 3 matrices encontrar la mayor cantidad de CF (Fig 10)

Tabla 12.- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos con diferentes concentraciones etanol

Fuente	GL	SC Sec.	Ajust.	Ajust.	F	P
Matriz	2	3405.1	3405.1	1702.5	178.59	0
Tecnica extraccion	2	4205.3	4205.3	2102.6	220.56	0
Matriz*Tecnica extraccion	4	931.5	931.5	232.9	24.43	0
Error	18	171.6	171.6	9.5		
Total	26	8713.5				

Tabla 13 .- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de capacidad antioxidante en IC 50 de extractos etanolicos

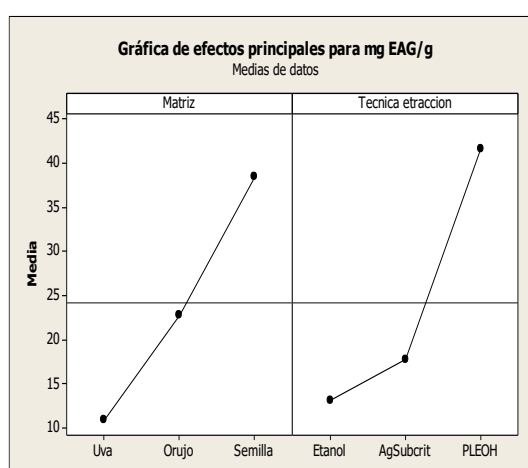
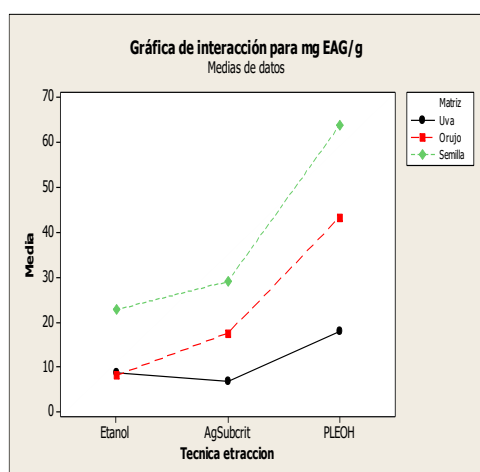
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Matriz	2	0.391409	0.391409	0.195704	584.82	0
Tecnica extraccion	2	0.066031	0.066031	0.033015	98.66	0
Matriz*Tecnica extraccion	4	0.0775	0.0775	0.019375	57.9	0
Error	18	0.006024	0.006024	0.000335		
Total	26	0.540963				

Tabla 14 .- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de capacidad antioxidante en DPPH en unidades de ET/g extracto

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Matriz	2	25857266	25857266	12928633	417.93	0
Tecnica extraccion	2	942248	942248	471124	15.23	0
Matriz*Tecnica extraccion	4	1153595	1153595	288399	9.32	0
Error	18	556829	556829	30935		
Total	26	28509937				

Tabla 15 .- Análisis de varianza del diseño factorial de los datos de capacidad antioxidante con la técnica Trolox en unidades ET / g de muestra

Fuente	GL	SC Sec.	Ajust.	Ajust.	F	P
Matriz	2	305184	305184	152592	1052.68	0
Tecnica extraccion	2	256742	256742	128371	885.59	0
Matriz*Tecnica extraccion	4	66499	66499	16625	114.69	0
Error	18	2609	2609	145		
Total	26	631035				



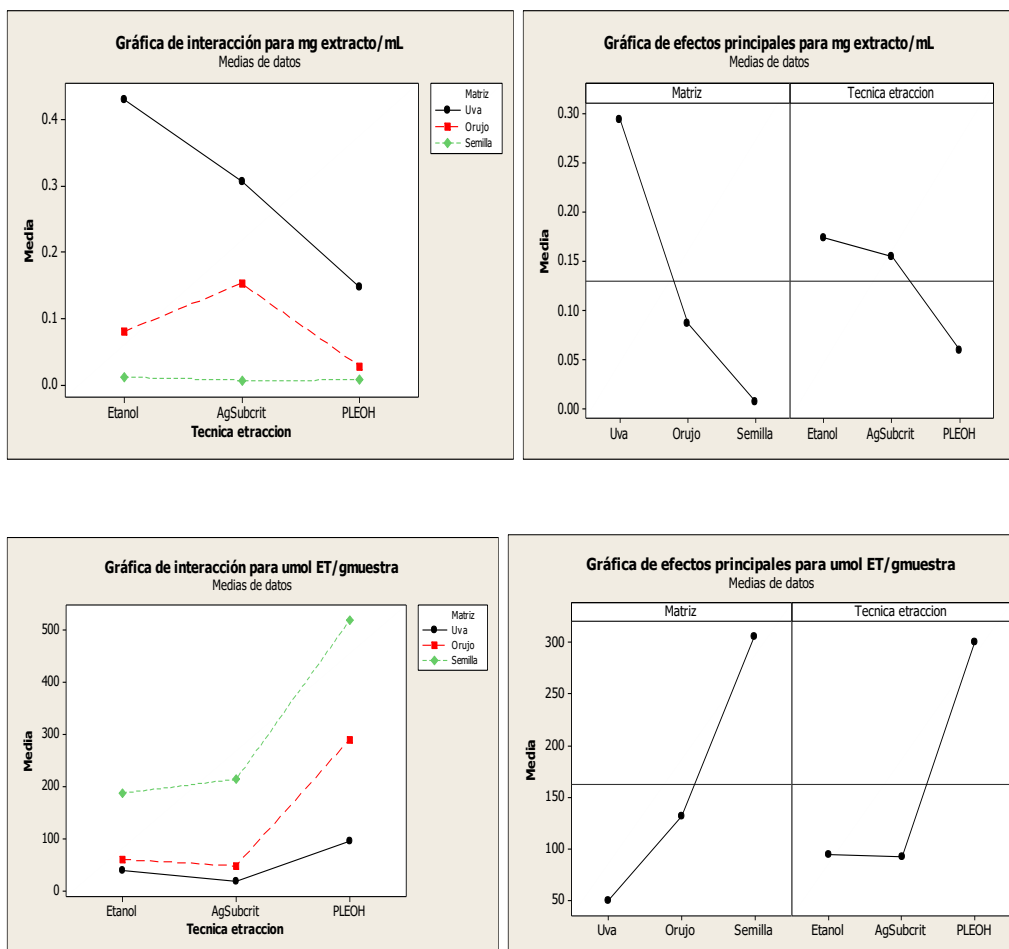


Figura 10.- Interacciones de CF, DPPH, FRAP en uva, orujo y menillas y los efectos existentes entre las matrices y técnicas de extracción.

Luego de hacer las pruebas de comparaciones múltiples entre las diferentes técnicas de extracción para cada tipo de matriz (Fig 5 A, D y G), existe diferencia significativa en los contenidos promedio de CF de los extractos de uva obtenidos con etanol a 50% con AS y PLE, el mismo comportamiento se observa con los valores promedio de capacidad antioxidante, siendo evidente una mayor eficiencia con la técnica PLE. En el caso del extracto de orujo, no hubo diferencia significativa en los contenidos promedio de CF ni FRAP obtenidos con etanol y con AS (Fig B y H). Los contenidos promedio de CF y FRAP de los extractos de semilla obtenidos con etanol y AS, no presentaron diferencia significativa pero si presentaron diferencia con el correspondiente al PLE (Fig 5 C e I), los IC_{50}

menores de todos los tratamientos, correspondieron a los extractos obtenidos con As y con PLE en semilla (Fig 5 D, E y F), los menores valores indican superior actividad antioxidante.

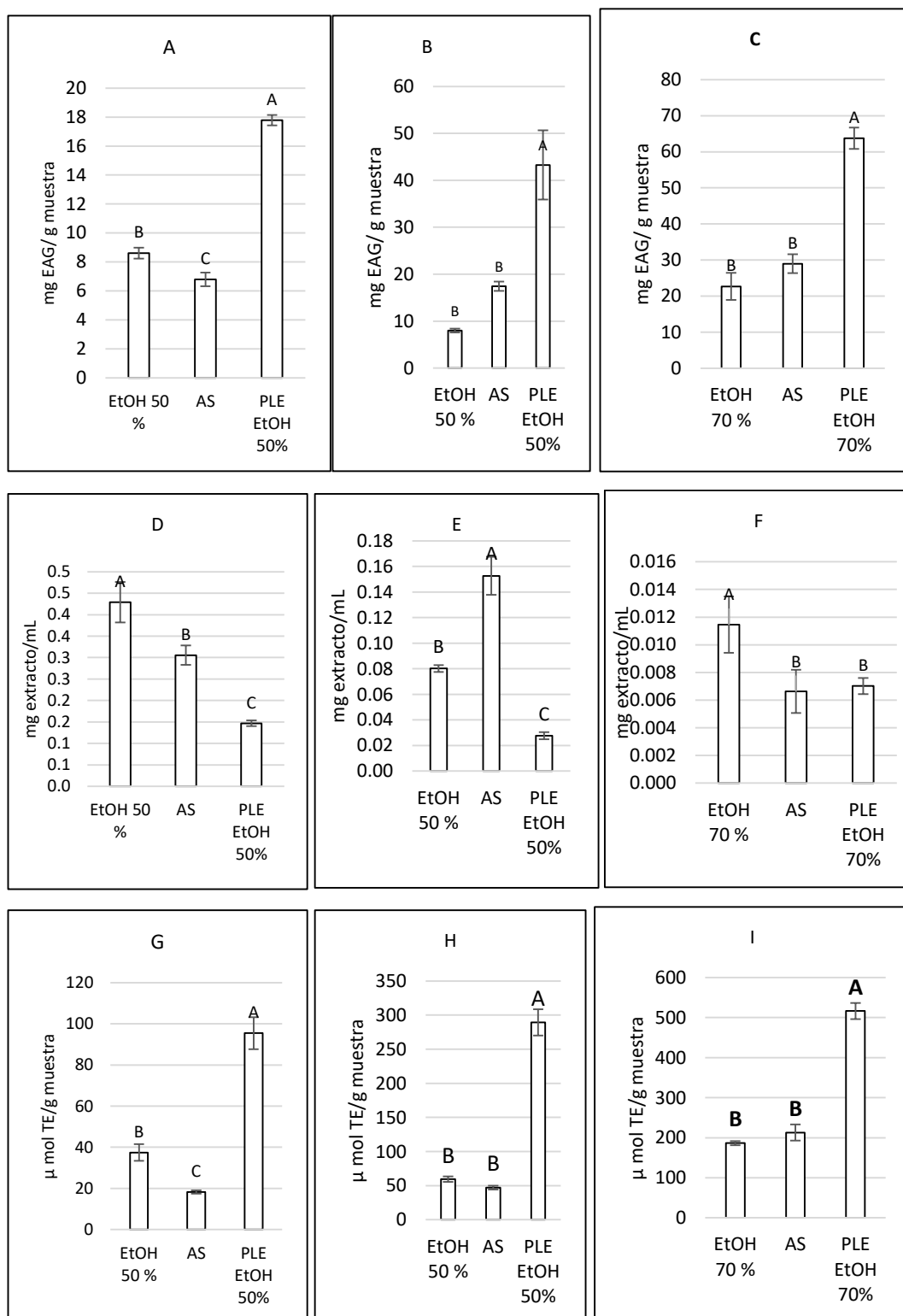


Figura 11. A : Compuestos fenólicos de la uva. B: orujo y C: semilla. D: IC50

uva, E: IC50 orujo, F: IC50 semilla. G: FRAP de uva, H: FRAP de orujo y I:
FRAP de semilla.

VI DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. Comparación de resultados con otros estudios similares

Semilla

En el presente trabajo se encontraron valores superiores de CF en los extractos de semilla utilizando la extracción convencional con etanol al 70 %, con AS y PLE , en comparación con lo reportado por Ruales Salcedo, Rojas-González, & Cardona-Alzate, (2017), en extractos de semillas, subproducto de la producción de pulpa de uva Isabella en Colombia ($10,62 \pm 0,17$ mg de EAG/g), con actividad antioxidante $0,63 \pm 0,01$ mg muestra/ml de extracto (IC₅₀), en semillas y también que lo obtenido por Paladino (2000) en las semillas de vid Cabernet Sauvignon provenientes de vinificaciones extraídas con agua a 90°C y acetona (12,587 y 7,268 mg de EAG/g de materia seca respectivamente).

En este trabajo se encontró mayores valores de capacidad antioxidante con DPPH y FRAP en los extractos obtenidos con PLE que lo encontrado por Contreras (2019), en semillas de 7 variedades de uva del Valle de Cañete: Quebranta, Italia , Uvina, Borgoña blanca, Moscatel, Red Globe y Borgoña negra, seleccionadas del orujo del proceso de vino, IC₅₀ en el rango de 0.21 a 0.55 mg semilla/ml de extracto, en el ensayo de FRAP se obtuvo 451.19 a 225.01 μ Mol EAG/g de semilla, pero el CF fue similar (63.23 mg EAG/g de semilla).

Gonzales (2018) estudió compuestos fenólicos de semillas de uva (*Vitis vinífera*) variedad Malbec, subproducto de la industria vitivinícola, Ica-Perú, obtuvo 40,3 mg EAG/ g de semilla. Valor inferior que lo encontrado con PLE en este trabajo, pero superior al encontrado con AS y con la extracción convencional utilizando etanol de 15, 32,5, 50 y 70 %.

UVA

Los extractos de la uva borgoña negra del presente trabajo presentó menor contenido de CF y capacidad antioxidante (Tabla 4) que los extractos de uva logrados con metanol por Franco-Bañuelos, Contreras-Martínez, Carranza-Téllez, & Carranza-Concha (2017) en las variedades rojas Rubired (6.076 mg EAG /1g) y las blancas Furmint (2.18 mg EAG/1 g). Las variedades Petite Syrah y Rubired de uva roja, presentaron valores de 17.165 $\mu\text{mol ET /g}$ uva fresca y 0.64.5 $\mu\text{mol ET/g}$ uva fresca respectivamente. Estas diferencias podrían explicarse por la distinta zona de cultivo y distinta variedad de uva.

ORUJO

Los CF obtenidos en el orujo de uva borgoña negra estuvo en el rango de 4.45 a 43.27 EAG/g de orujo, valores superiores a lo encontrado por Torres (2018) en los extractos de orujo de *Vitis vinífera* L. de la variedad Negra Criolla ($89.17 \pm 0,41$ mg EAG/1g de extracto seco) y que Dueñas (2017) quien estudió la optimización de las condiciones de extracción de CF a partir de cáscara de uva variedad Quebranta, encontrando 15.65 mg EAG/g de muestra seca

6.2 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El orden de mayor a menor capacidad antioxidante en las matrices estudiadas fue el siguiente semillas>orujo> uva, señalándose a la semilla como una fuente potencial de compuestos bioactivos.
- La técnica de extracción convencional utilizando alcohol es mas eficiente a 50 % y 70 %, pero se logra extraer mayor cantidad de compuestos fenólicos con el equipo extractor de fluidos presurizados utilizando etanol.
- El orujo y la semilla de uva Borgoña negra, subproducto de la industria vitivinícola tiene actividad antioxidante, siendo un potencial insumo para elaboración de alimentos funcionales.
- Se recomienda utilizar el orujo o semilla en la sustitución de harina para la elaboración de productos tipo galleta o panes, debido a que también contiene proteína y macronutriente como el calcio.
- Se recomienda realizar pruebas de utilización del orujo como insumo en bebidas como el yogurt.
- Otra sugerencia es estudiar el aceite de la semilla de uva, en este trabajo se encontró un 11 % de contenido de aceite, por bibliografía se conoce que las semillas contienen acido linoleico, ácido grasos esencial para el desarrollo del sistema nervioso en niños.

REFERENCIAS

- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., . . . Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(2013), 246-436. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bagchi, D., Garg, A., Krohm, R. L., Bagchi, M., Bagchi, D. J., Balmoori, J., & Stohs, S. J. (1998). Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmac*, 30(5), 771-776. doi:doi: 10.1016/s0306-3623(97)00332-7.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203. doi:DOI: 10.1016 / j.foodchem.2005.07.042
- Barriga-Sánchez, M., Churata, A., & Tinoco, Ó. (2018). Optimización del rendimiento de la extracción de aceite de semillas de *Vitis vinifera* con CO₂ supercrítico. *Rev Soc Quim Perú*, 84(2), 217-227.
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. Obtenido de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es
- Contreras, D. E. (2019). Determinación de Capacidad Antioxidante y Fenoles Totales en Semillas de *Vitis vinifera* L. "Vid", del Valle de Cañete. *Para optar el título profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias*. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho, Perú.
- Cornejo, F. (2012). Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) por microondas y métodos convencionales.

- Maestría en Nutrición humana*. Universidad autónoma de Querétaro, México.
- Cotacallapa, M. R. (2017). Aprovechamiento de los residuos industriales vitivinícolas para la obtención de etanol y compost. *Proyecto de Investigación*. Universidad Nacional de Moquegua, Moquegua, Perú.
- Cunico, L. P., & Turner, C. (2017). Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids. *Green Solvents*, 155-214. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00007-3>
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Food biotechnology*, 23, 174-181. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Del Rio, M., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892. doi:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3619154/>
- Dueñas, J. A. (2017). Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido. *Tesis para optar el grado de Magister en Química*. Universidad Católica del Perú, San Miguel, Perú.
- Farías, A. M. (2015). Extracción Supercrítica de Compuestos Fenólicos a partir de Lías Obtenidas de los Residuos de la Producción de Pisco. *Tesis para la obtención del título en Ingeniería de Alimentos*. Universidad Peruana Union, Lima, Perú.
- Fernández, D. (2013). Aprovechamiento de orujo de uva borgoña negra (*Vitis labrusca*) en bolsa filtrante. *Para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
- Franco-Bañuelos, A., Contreras-Martínez, C., Carranza-Téllez, J., & Carranza-Concha, J. (2017). Total phenolic content and antioxidant capacity of non-native wine grapes grown in zacatecas, Mexico. *Agrociencia*, 51(6), 661-671.

doi:file:///F:/2020/Articulos%20Internet/BA%C3%91UELOS%202017.%20CONTENIDO%20DE%20FENOLES%20TOTALES%20Y%20CAPACIDAD%20ANTIOXIDANTE%20DE%20UVAS%20NO%20NATIVAS%20PARA%20VINO%20CULTIVADAS%20EN%20ZACATECAS,%20MEXICO.pdf

- García-Becerra, L., Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., & Vinardell, P. (2016). Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry*, *194*(2016), 1081-1088. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.131
- Gimeno, E. (Junio de 2004). Compuestos fenólicos. *Ámbito Farmacéutico Nutrición*, *23*(6), 80-84. doi:file:///F:/2020/Articulos%20Internet/Gimeno%202004.%20Compuestos%20fen%C3%B3licos.pdf
- Gonzales, M. (2018). Determinación de ácidos grasos, compuestos fenólicos y efecto gastroprotector se semillas de uva (*Vitis vinífera*) variedad malbec, sub producto de la industria vitivinícola, Ica-Perú. *Tesis para optar el grado de Magister en Química*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- Goodship, V., & Ogar, E. (2004). Informes de revisión de Rapra. *Procesamiento de polímeros. Fluidos supercríticos*, *15* (8), 135.
- Guzmán, D. E., Contreras, J. E., & Suarez, Y. M. (2018). Utilización de los compuestos fenólicos del orujo de uva borgoña en la elaboración de bebidas. *Tesis para optar el título de Ingeniero de Alimentos*. Universidad Nacional del Callao, Callao, Perú.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, *125*, 288-306. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012
- Lima, J. L. (2015). Estudio de caracterización de la cadena de producción y comercialización de la agroindustria vitivinícola: estructura, agentes y prácticas. 1-209. Obtenido de <https://www.odepa.gob.cl/wp->

content/uploads/2017/12/AgroindustriaVitivinicola.pdf.

- Ferri, M., Bin, S., Vallini, V., Fava, F., Michelini, E., Roda, A., Minnucci, G., Bucchi, G., Tassoni, A. Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities, *New Biotechnology*, Volume 33, Issue 3, 2016, Pages 338-344, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.004>
- Nunes, X. P., Souza, F., Guedes, J. R., & Almeida, S. (2012). Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*.
- Paladino, S. C. (2000). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis Vinifera* L.). *Tesis presentada para acceder al grado académico de Magister en Alimentos*. Universidad Nacional de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis, Argentina.
- PNUD. (Marzo de 2004). *La Uva y el Pisco Potencialidades Productivas*. Obtenido de Programa de la Naciones Unidas para el Desarrollo: http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/PNUD/Pub_UvaPisco.pdf
- Raventós, M., Duarte, S., & Alarcón, R. (2002). Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. *Food Science and Technology International*, 8(5), 269-284. doi:<https://doi.org/10.1106/108201302029451>
- Rivera, C. (2016). Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante en la uva (*Vitis labrusca*) en tres estados de madurez del distrito de San Antonio de Cumbaza-San Martín. *Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias*. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú.
- Roustray, W., & Orsat, V. (2013). Preparative Extraction and Separation of Phenolic Compounds. In: Ramawat K. Mérillon JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_55
- Ruales-Salcedo, A. V., Rojas-González, A. F., & Cardona-Alzate, C. A.

- (2017). Obtención de compuestos fenólicos a partir de residuos de uva isabella (*Vitis labrusca*). *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, Edición Especial(2)*, 72-79. doi: 1909-9959 . doi://dx.doi.org/10.18684/bsaa(v15)EdiciónEspecialn2.580
- Saed, N., Khan, M. R., & Sabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *Complementary and Alternative Medicine*, 12:221. Obtenido de <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/221L>.
- Sandoval, M., Lazarte, K., & Arnao, I. (2008). Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (uva). *An Fac med*, 69(4), 250-259. Obtenido de [file:///E:/2020/Articulos%20Internet/Sandoval%20et%20al.,%202008.%20HEPATOPROTECCI%C3%93N%20ANTIOXIDANTE%20DE%20LA%20C%C3%81SCARA%20Y%20SEMILLA%20DE%20Vitis%20vinifera%20L.%20\(uva\).pdf](file:///E:/2020/Articulos%20Internet/Sandoval%20et%20al.,%202008.%20HEPATOPROTECCI%C3%93N%20ANTIOXIDANTE%20DE%20LA%20C%C3%81SCARA%20Y%20SEMILLA%20DE%20Vitis%20vinifera%20L.%20(uva).pdf)
- Tomaz, I., Huzani, N., Preiner, D., Stupi, D., Andabaka, Z. E., Maleti, E., . . . As'perger, D. (2019). Métodos de extracción de polifenoles de uvas: extracciones de polifenoles de uva. *Elsevier Inc*, 10, 151-167. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00010-4>
- Toro, N., & Suárez, L. (2012). Obtención y caracterización del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (Uva Isabella) y evaluación de su actividad antioxidante. *Tesis para optar el título de Químico Industrial*. Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Torres, A. (2018). Determinación de compuestos Fenólicos y su Capacidad Antioxidante de extractos de orujo (Epicarpo) de *Vitis vinífera* L. var. Italia y Negra criolla de residuos vitivinícolas como fuente de principios bioactivos aprovechables. *Para optar el título profesional de Biólogo*. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
- Ty'skiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). La aplicación de la extracción de fluidos supercríticos en Aislamiento de compuestos fenólicos de naturales. *Molecules*, 23, 27. doi:<file:///C:/Users/LUIS%20GUSTAVO/Downloads/Tykiwic%C2%B4Katarizina2018%20%20Reviw.aplicacion%20de%20SFE%20%20>

CF%20de%20materiales%20de%20plantas%20naturales.%20(1).p
df

Vankar, P. S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources.
Resonance, 30-41. Obtenido de
file:///C:/Users/Luis%20Ochoa/Downloads/Vankar%202004.%20Ac
eites%20esenciales.%20tecnicas%20de%20hidrodestilacion.pdf

ANEXO 1.- Matriz de consistencia

Problema científico de investigación		Objetivos de la investigación	Variables Proceso de operacionalización		Hipótesis clasificación	Justificación de la investigación	
General	¿En qué medida los extractos de la uva borgoña y el orujo, obtenidos con agua subcrítica y fluido presurizado tienen compuestos fenólicos y actividad antioxidante?	Determinación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de uva, orujo y semilla obtenidos con fluidos presurizados y con etanol	Las variables independientes: Técnicas de extracción, 3 niveles: convencional, agua subcrítica y líquido presurizado utilizando solución de etanol. Variables dependientes: Compuestos fenólicos, capacidad antioxidante		Hipótesis general: Uno de los extractos de uva, orujo o semilla de uva borgoña negra tienen mayor actividad antioxidante y compuestos fenólicos.	La variedad de Uva es un híbrido <i>Vitis labrusca</i> L. conocido en otros países como uva Isabella, las uvas en general tienen compuestos bioactivos en la piel, pulpa y semilla, por lo que sería importante determinar los compuestos bioactivos (compuestos fenólicos) y la actividad antioxidante para demostrar que el orujo de las bodegas de Chíncha, subproducto de la elaboración del vino, contienen compuestos fenólicos con un valioso contenido de antioxidantes. Por otro lado, la técnica amigable al medio ambiente conocida como técnica verde, recién se está aplicando en Perú y sería importante realizar las extracciones con fluidos presurizados del orujo, uva y semilla, con esos nuevos conocimientos se lograría finalmente sustentar que el orujo podría usarse como un insumo en alimentos funcionales, por ejemplo, en galletas	
	Específico 1	.-¿Cuál de los extractos de uva, orujo, semilla o vino tiene mayor contenido de CF?	Comparar los contenidos de compuestos fenólicos de las extracciones con la técnica verde de fluidos presurizados, con agua subcrítica y con etanol de la uva, orujo, semilla y vino.	Definición conceptual	Definición operacional	Los extractos obtenidos con líquidos presurizados utilizando etanol permite obtener extractos con mayor capacidad antioxidante que los obtenidos con la extracción convencional y agua subcrítica.	
				CF: estructuras de vegetales, desde monómeros simples a complejos asumen color rojo, marrón verde, gris o coloración negra.	Compuestos fenólicos/g de muestra		
Específico 2	¿Cuál de los extractos de uva, orujo, semilla o vino tiene mayor capacidad antioxidante?	Comparar la actividad antioxidante de las extracciones con líquidos presurizados y con etanol de la uva, orujo, semilla y vino	Actividad antioxidante : Habilidad para donar átomos de hidrógeno, electrones (Amarowicz et al 2004)	Actividad captadora de radicales DPPH Capacidad antioxidante equivalente Trolox	Los extractos obtenidos con líquidos presurizados utilizando etanol permite obtener extractos con mayor capacidad antioxidante que los obtenidos con la extracción convencional y		

					agua subcrítica.
--	--	--	--	--	------------------

ANEXO 2.- Matriz de Operacionalización de Variables

Variabl e	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Técnica s de extracci ón de compu estos fenólicos	Extracción con agua subcritica donde las sustancias son disueltas en agua, la cual es capaz de modificar su poder de disolución bajo condiciones superiores a su temperatura de ebullición y < 374 °C y a presión > 70 bar y < 220.5 bar. El estado es liquido. Extracción con liquido presurizado utilizando etanol, el etanol es menos polar que el agua facilitando la extracción de los compuestos fenólicos la constante dieléctrica es diferente al agua.. Extracción con	Extracción con agua subcritica Se programará el extractor multisolvente con parámetros de operación de temperatura y presión Extracción con liquido presurizado utilizando etanol se programará el extractor multisolvente con parámetros de operación de temperatura y presión, Maceración con etanol Se somete la muestra previamente a	Extracción con extractor multisolvente Temperatura subcritica T:, 120 °C, presión subcritica 120 bar Extracción con liquido presurizado utilizando etanol Tiempo 120 min. Etanol a 50% con uva y orujo y de 70% de etanol para semilla. Maceración con etanol Proporciones	Extracción agua subcritica Cantidad de EAG, equivalente de ácido gálico/ g de semilla. Actividad antioxidante DPPH IC 50, FRAP umol ET/g muestra Cantidad de ácido gálico/ g de semilla. Actividad antioxidante DPPH, FRAP umol ET/g muestra Maceración con etanol

	maceración con etanol, extracción mas simple y económica, el etanol facilita la extracción de los CF polares	diferentes concentraciones de etanol, 15, 32.5, 50 y 70% de etanol durante 2 horas a la misma proporción muestra: etanol, la concentración que permita >CF se utilizará en diseño factorial	etanol a 50% con uva y orujo y de 70% de etanol para semilla.	Cantidad de ácido gálico/ 100 g de semilla. Actividad antioxidante DPPH, FRAP umol ET/g muestra
Compuestos fenólicos (extracto)	<u>Componentes fenólicos</u> Estructuras de vegetales, desde monómeros simples a complejos asumen color rojo, marrón verde, gris o coloración negra, las tonalidades de color depende de los taninos, el ion metal específico, pH y la concentración del complejo fenólico. (M. Oke and G. Paliyath. 2006).	Para la cuantificación de compuestos fenólicos, se usará un espectrofotómetro UV visible calibrado, reactivos certificados y materiales de vidrio calibrados, cada análisis tendrá duplicados.	Compuestos fenólicos/100g de semillas de uva	Acido gálico
Actividad antioxidante	Habilidad para estabilizar los radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos que son como agentes quelantes	Actividad captadora de radicales DPPH. Para la cuantificación de compuestos fenólicos, se usará un espectrofotómetro	Captación de DPPH (medición de la capacidad de dar electrón a los radicales libres)	% inhibición DPPH

		UV visible verificado, reactivos certificados y materiales de vidrio calibrados, cada análisis tendrá duplicados		
--	--	---	--	--