



“Utilización de residuos de la industria alimentaria para su valorización como proteínas clarificantes y extractos antioxidantes”

Ignacio Cabezudo

Licenciado en Química

“Utilización de residuos de la industria alimentaria para su valorización
como proteínas clarificantes y extractos antioxidantes”

Ignacio Cabezudo

Licenciado en Química, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Departamento Tecnología, Área Procesos Biotecnológicos, y el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ-CONICET), dependientes de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, entre el 01/04/2014 y el presente, bajo la dirección de Diana Romanini y Carlos Boschetti. Además, contiene los obtenidos en la Facultad de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Reading, durante el período comprendido entre el 01/04/2014 y el 01/04/2015, en el grupo de la Dra. Paula Jauregi.

Nombres y firmas de los Directores y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dra. Diana Romanini.....

Co-Director: Dr. Carlos E. Boschetti.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Defendida:

La ciencia es un cementerio de ideas muertas, aunque de ellas puede salir la vida.

-Miguel de Unamuno

Agradecimientos

Sinceramente nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda, el amor y el compañerismo de aquellos que me rodearon durante estos cuatro años:

En primer lugar a mi directora, Diana, por estar cerca siempre que me hizo falta, en persona, o a la distancia. Por su paciencia, sus enseñanzas académicas o de la vida, por hacerme ver muchas veces que las cosas eran más simples o fáciles de lo que parecían, por su carácter tan pacífico. Por confiar en mí para trabajar con ella aunque no fuera biotecnólogo!

A mi otro director, Carlos, por sumarse a esta aventura y brindarnos todo su conocimiento desde el primer momento. Por su visita en Inglaterra, por ser capaz de hacer cosas terriblemente serias de forma alegre, sin perder el sentido del humor! Quiero agradecer a ambos por darme la oportunidad de crecer profesionalmente haciendo lo que me gusta y por apoyar cada una de mis ideas. El optimismo y confianza que depositaron en mí, por inculcarme el gusto por la enseñanza de la ciencia....

A Carla y Marcelo, por compartir sus primeros pasos en la ciencia conmigo, por tantas charlas divertidas y por todo lo que me enseñaron.

A toda la gente de Fisicoquímica, Procesos Biotecnológicos y Tecnología Química. Sí, tres lugares distintos! Lugares donde fui rotando para trabajar, y también conocer amigos invaluable, que compartieron sus días y se brindaron cuando me hizo falta algo. Es imposible nombrarlos a todos (son un millón), pero que sepan que los aprecio muchísimo.

A mis tutores, Pablo y Bery por sus consejos y enseñanzas.

A todos mis amigos de Reading y Quebec. Sin tantas cervezas compartidas con ustedes, este proceso hubiera sido más tortuoso. Por esos vínculos tan estrechos que se dan entre los extranjeros, y que yo, nacido y criado en Rosario nunca había vivido hasta entonces.

A mis viejos, Frasco y Liliana, a mi hermano Martín y mi sobrina Emma, por la paciencia, el ánimo y las risas para acompañar este camino. Pude

recurrir a ellos para festejar con cada buena noticia, y, cuando estuve ensimismado, para recibir su apoyo. Al Tío y la Guille, a mis abuelos y al resto de la familia, siempre en mi pensamiento...

Muchas gracias =)

Todo salió de vos, nunca nadie te enseñó nada. Todo se hizo para vos, pero hasta que se terminó no entendiste nada.

En el marco de esta tesis se produjeron las siguientes publicaciones, presentaciones a congresos, becas y premios:

Publicaciones Científicas:

2017 “Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review”, Waste management, DOI: 10.1016/j.wasman.2017.07.017

2016 “Astringency reduction in red wine by whey proteins”, Food Chemistry, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.12.052

2016 “Antioxidant dietary fiber recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace”, Food Chemistry, doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.039

Presentaciones en congresos:

2017 “Inmovilización de tripsina empleando un novedoso soporte de PET con polímeros bioinspirados”, XII Simposio Argentino de Polímeros, Argentina 2017.

2017 “Degradación de Aflatoxina B1 por extractos de Bacillus S. y Trametes V, seguimiento de reacción por HPLC y detección de productos por LC-MS²”, 9° Congreso arg. de Química Analítica, Argentina, 2017.

2017 “Optimización de la extracción de polifenoles antioxidantes del orujo de uva”, presentación oral, XXV Jornadas AUGM, Encarnación, Paraguay, 2017.

2016 “Reutilización de desechos de la industria vitivinícola mediante la producción y aplicación de la enzima tanasa” SAPROBIO 2016, Buenos Aires, Argentina 2016.

2016 “Agregado de valor al orujo de uva por optimización de la extracción de polifenoles”, VI Congreso CICYTAC, Cordoba, Argentina 2016.

2016 “New insights into betalactoglobulin - polyphenol interactions: towards wine astringency reduction applications”, Congreso Bioiberoamérica, Salamanca 2016.

2015 "Comparación de métodos para la extracción de antioxidantes de interés dietético y cosmético a partir de residuos de la uva", presentación oral, Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial (JorFyBI), Buenos Aires.

2014 "B-lactoglobulin to reduce astringency in wine", Total Food, Norwich England 2014.

Premios:

2015 Concurso Nacional de Innovaciones de Argentina (INNOVAR), 1er premio en la categoría de Alimentos, "Utilización de proteína de suero para reducir la astringencia del vino tinto, conservando sus propiedades terapéuticas".

Becas:

2017 Beca ELAP para realizar una pasantía de investigación y desarrollo en Quebec, Canadá, dentro del Centro de Agua, Tierra y Medio Ambiente (INRS-ETE).

2015 Beca CONICET tipo I para desarrollar investigación durante 5 años en marco de un doctorado.

2014 Beca Marie Curie Actions (Comisión Europea), para estudiar en la Universidad de Reading, Inglaterra. Proyecto: “Biotechnologies to Valorise the regional food Biodiversity in Latin America” (BiValBi) N°611493.

Indice

Objetivos	1
Capítulo 1: Introducción.....	2
1.1. Residuos del sector agroalimentario y posibilidades de aprovechamiento	3
1.1.1. Suero de leche, un subproducto de la industria quesera	5
1.1.2. Cascarilla de soja, un subproducto de la producción de aceite	7
1.1.3. Orujo de uva, un subproducto de la producción de vino.....	8
1.2. Los polifenoles, clasificación, extracción y detección.....	11
1.2.1. Extracción de PFs a partir de matrices vegetales	15
1.2.2. Determinación del contenido fenólico total	20
1.2.3. Análisis de PFs mediante cromatografía líquida, principios de funcionamiento	20
1.2.4. El espectrómetro de masas como detector en CLAE	22
1.2.5. Métodos de adquisición de espectros y espectrometría de masa/masa	24
1.2.6. Determinación de capacidad antioxidante por equivalentes de Trolox	25
1.3. Diseño experimental para optimización de un proceso	25
1.3.1. Selección de factores, <i>screening</i> por diseño factorial.....	27
1.3.2. Optimización del experimento	28
Capítulo 2: Utilización de proteínas de suero de leche para la reducción de la astringencia de vino tinto.....	30
2.1. Introducción	31
2.2. Materiales y métodos	35
2.2.1. Materiales	35
2.2.2. Preparación de suero y purificación de BLG	35
2.2.3. Contenido de proteínas totales.....	36
2.2.4. Análisis de proteínas de suero de leche por CLAE	36
2.2.5. Tratamientos proteicos realizados sobre el vino y determinación de astringencia	37
2.2.6. Perfil fenólico de vinos por CLAE.....	37
2.2.7. Purificación de de PFs de uva.....	38
2.2.8. Calorimetría de titulación isotérmica.....	38
2.3. Resultados	40
2.3.1. Reducción de astringencia en vino por adición de BLG	40
2.3.2. Identificación de compuestos fenólicos por CLAE	42
2.3.3. Análisis de trazas de proteínas en los vinos después de los tratamientos	43
2.3.4. Purificación de PFs por exclusión molecular y caracterización de la unión polifenol-proteína. 45	

2.4.	Conclusiones.....	50
Capítulo 3: Recuperación de fenólicos extraíbles y no extraíbles del orujo de uva por optimización de su extracción sólido-líquido		
3.1.	Introducción	52
3.2.	Materiales y métodos	55
3.2.1.	Materiales	55
3.2.2.	Caracterización de las muestras de OU.....	55
3.2.3.	Preparación de extractos de FE y FNE a partir de OU.....	55
3.2.4.	Determinación de contenido fenólico total (CFT).....	56
3.2.5.	Determinación de actividad antioxidante (AA).....	56
3.2.6.	Diseño experimental	57
3.2.7.	Caracterización de PFs por CLAE-DAD.....	57
3.2.8.	Caracterización de PFs en extractos optimizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CLAE-EM)	58
3.3.	Resultados	60
3.3.1.	Análisis del orujo de uva y extracciones preliminares a temperatura constante	60
3.3.2.	Diseño experimental para optimizar la extracción de FE Y FNE.....	63
3.3.3.	Correlación entre CFT y la AA en los extractos.	72
3.3.4.	Optimización simultánea de la temperatura y el tiempo de extracción de FE y FNE usando la función deseabilidad (D).....	73
3.3.5.	Análisis de los polifenoles extraídos por CLAE-DAD usando estándares	77
3.3.6.	Identificación de fenólicos en los extractos optimizados por CLAE-EM	79
3.4.	Conclusiones.....	85
Capítulo 4: Optimización de la extracción de polifenoles con actividad antioxidante de cascarilla de soja mediante hidrólisis alcalina		
4.1.	Introducción	87
4.2.	Materiales y métodos	89
4.2.1.	Materiales	89
4.2.2.	Caracterización de la cascarilla de soja y extracción de las muestras	89
4.2.3.	Determinación de fenólicos totales	90
4.2.4.	Determinación de la actividad antioxidante	90
4.2.5.	Diseño experimental para el <i>screening</i> y optimización de la extracción	91
4.2.6.	Caracterización de polifenoles y cuantificación por CLAE	92
4.2.7.	Análisis de PFs en extracto optimizado por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CL-EM).....	93
4.3.	Resultados y discusión	94

4.3.1.	Preparación de extractos de cascarilla de soja y elección del diseño experimental	94
4.3.2.	Diseño experimental: <i>screening</i> de la extracción de polifenoles.....	97
4.3.3.	Optimización de los factores seleccionados en la etapa de <i>screening</i>	102
4.3.4.	Uso de la función deseabilidad D para maximizar todas las respuestas.....	107
4.3.5.	Identificación de fenólicos por CL-EM.....	110
4.4.	Conclusiones.....	113
Capítulo 5: Extracción de polifenoles de cascarilla de soja mediante tratamientos fúngicos y enzimáticos		114
5.1.	Introducción	115
5.2.	Materiales y métodos	118
5.2.1.	Solución de elementos traza para FES	118
5.2.2.	Preparación de un cultivo en estado sólido de <i>A. oryzae</i>	118
5.2.3.	Tratamiento enzimático de la cascarilla de soja	119
5.2.4.	Determinación de contenido fenólico total y de actividad antioxidante.....	119
5.3.	Resultados	120
5.3.1.	Tratamiento de la cascarilla de soja con el hongo <i>A oryzae</i>	120
5.3.2.	Tratamiento enzimático de la cascarilla de soja	123
5.4.	Conclusión.....	125
Conclusiones finales.....		126
Resumen.....		128
Referencias.....		133

Objetivos

Para este trabajo de tesis se propuso un siguiente **objetivo general**:

Utilizar residuos de la industria alimentaria, como suero de leche, orujo de uva y cascarilla de soja, para su valorización como proteínas clarificantes y extractos antioxidantes.

Para la concreción de dicho objetivo general se plantearon tres **objetivos específicos**:

1. Evaluar la eficacia de la principal proteína del suero de leche, betalactoglobulina, en la reducción de la astringencia del vino tinto, y establecer una comparación con una proteína modelo, gelatina. Caracterizar la naturaleza de la interacción polifenol-proteína.
2. Optimizar la extracción de polifenoles extraíbles y no extraíbles del orujo de uva utilizando solventes tradicionales y alternativos. Analizar e identificar, de acuerdo al método de extracción, la composición química y el potencial antioxidante de los extractos obtenidos.
3. Optimizar la extracción de polifenoles a partir de cascarilla de soja empleando hidrólisis alcalina. Analizar, alternativamente, el potencial de métodos biológicos de liberación de dichos compuestos, empleando enzimas y hongos filamentosos.

Capítulo 1: Introducción

Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que pueden hacerse en un campo muy estrecho.

-Niels Bohr

1.1. Residuos del sector agroalimentario y posibilidades de aprovechamiento

La agroindustria combina el proceso productivo agrícola con el industrial para generar alimentos o materias primas semi-elaboradas destinadas al mercado. Entre los productos que se industrializan se encuentran las frutas, verduras, raíces, semillas, hojas, tubérculos, entre otros. Algunos se comercializan en fresco y otros son transformados en jugos, mermeladas, ensaladas, harinas, aceites, vinos, concentrados en polvo y conservas. Debido a dicho procesamiento, el sector agroalimentario constituye una fuente en crecimiento de contaminantes que se acumulan en el ecosistema. Los subproductos producidos son cortezas y/o semillas, pieles, y cualquier parte no comestible, desechos de difícil procesamiento para disposición, ya que poseen elevada carga orgánica y requieren un costo adicional para su tratamiento [1]. En este sentido, hay una tendencia mundial hacia la generación de residuos, derivada del procesamiento de productos comercializables, esto se puede ejemplificar mediante los desechos en el procesamiento de cereales, Tabla I.I [2].

El consumo de vegetales y frutas ha crecido significativamente, en gran parte debido a todas las propiedades saludables por las que son bien reputados [3]. Independientemente de los problemas ambientales planteados, los productos infrautilizados, subproductos y residuos representan una cantidad considerable de material potencialmente reutilizable y una fuente importante de energía. El material reutilizable puede estar constituido por azúcares, espesantes (pectinas y almidones), aceites esenciales, o sustancias bioactivas y/o antioxidantes [4].

Etapa	Ejemplos de pérdida/pérdida de alimentos
Procesamiento primario: limpieza, descascarillado, machacado, molido, envasado, remojo, aventamiento, secado, tamizado, molienda	Pérdidas en el proceso Pérdida de calidad por contaminación en el procesado

Tabla I.I: ejemplos de desperdicio en las primeras etapas de la cadena de suministro de cereales.

Para poder hacer frente a los problemas de alimentación y de contaminación del medio ambiente, una de las principales dificultades radica en encontrar tecnologías óptimas para el aprovechamiento de este material que supongan una mínima inversión y sean competitivos. De este modo gran parte de los residuos de la agroindustria podrían utilizarse en una variedad de procesos, mediante extracciones u otras transformaciones, para dar lugar a co-productos con mayor valor agregado [5]. La optimización y adecuación de las nuevas tecnologías para el procesado y aplicación integral de los residuos y productos infrautilizados de la agroindustria requiere de métodos propios para cada residuo. Asimismo, es interesante mantener la premisa de que todos estos productos continúen siendo biodegradables.

A continuación se presentan los residuos en los cuales trabajamos en la presente tesis. La elección de los mismos se debió a su producción a gran escala en nuestra región y a su ubicuidad en el país. Han sido objeto de nuestro estudio el suero de leche, el orujo de uva y la cascarilla de soja.

1.1.1. Suero de leche, un subproducto de la industria quesera

El suero de la leche se obtiene en el proceso de la elaboración de queso cuando a la leche líquida, previamente pasteurizada, se le añade cuajo (enzima que hace coagular la leche). El resultado es una masa blanda rica en proteína y grasa, que tras su maduración y pérdida de agua, podrá convertirse en queso. Para poder hacerlo, esa masa va a drenar el suero de la leche: un líquido de color amarillento y de sabor ácido pero agradable. Se trata, por tanto, de la parte que no se coagula por la adición del cuajo y que permanece en estado líquido, tras la precipitación y separación de la caseína de la leche. Constituye aproximadamente el 85 al 90% del volumen de la leche, y en caso de no ser aprovechado, el suero uno de los contaminantes más severos que existen a nivel ambiental [6]. El 47% del suero de leche se desecha en los ríos, lagos, acuíferos o en el subsuelo generando problemas de eutrofización acuática.

En nuestro país, la industria láctea tuvo, en los últimos años, un consumo interno de alrededor de 8.500 millones de litros equivalente de leche al año. Se pueden distinguir dos vías de destino, por un lado, la leche fluida, utilizada para la obtención de leche pasteurizada, esterilizada o chocolatada. Por el otro, el grueso de la leche cruda es dirigido a la elaboración de productos lácteos (74,6%). En los últimos años ha crecido la producción de quesos de pasta semidura (+15%) [7]. De hecho, del total de leche que se destina a la elaboración de productos, el mayor porcentaje es utilizado para la producción de quesos (55%), mientras que la elaboración de leche en polvo (entera y descremada) insume el 28% [7]. Estos datos, permiten entender la dimensión de la producción nacional, y en particular, la oportunidad con que se cuenta para el aprovechamiento de enormes cantidades de suero.

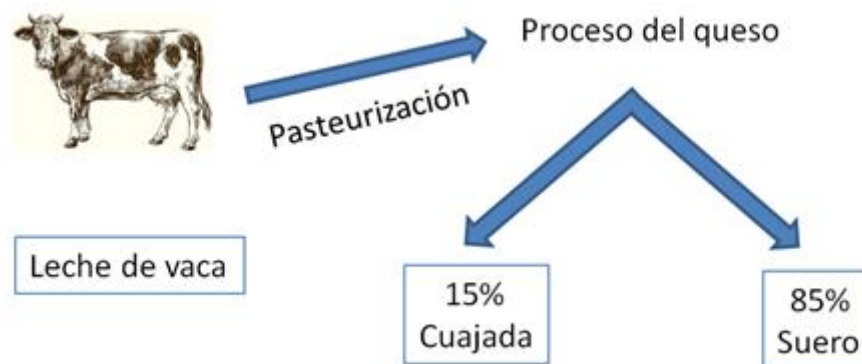


Figura 1.1: producción del queso y el co-producto suero de leche.

El lactosuero está constituido principalmente por lactosa (75%), un disacárido relativamente poco soluble, de bajo dulzor, que puede ser absorbida con dificultad por el sistema digestivo de algunas personas. También contiene calcio, sales minerales y proteínas lactoséricas de bajo peso molecular y solubles [8], Figura 1.1. Dichas proteínas, de muy elevada calidad, se pueden obtener mediante procesos como el intercambio iónico y microfiltración [9]. Las principales proteínas del suero de leche son: beta-lactoglobulina (BLG) y alfa-lactalbúmina, con una proporción de 3:1 [10]. Dichas proteínas son insolubles y no completamente asimilables por el tracto digestivo humano, pudiendo generar alergias debido al contenido de beta-lactoglobulina.

Por su potencial alergénico, pueden ser también interesantes las aplicaciones de BLG donde la misma no se utilice para consumo humano [10]. Una de las potenciales aplicaciones podría ser como clarificante en procesos productivos de bebidas fermentadas y jugos. La clarificación involucra la adición de un compuesto adsorbente, o clarificante, seguida por la sedimentación o precipitación de componentes parcialmente solubles de una bebida. Se pueden utilizar proteínas animales como caseína, gelatina, albúmina de huevo [11] o proteínas de plantas tales como gluten de trigo [12], entre otras. De varios estudios se desprende que la acción de las proteínas sobre los compuestos fenólicos del vino influye

en la claridad, las características sensoriales y la capacidad de envejecimiento. Los fenólicos han sido los atributos del vino más frecuentemente estudiados en respuesta a la clarificación [12,13] y su grado de modificación depende del agente clarificante utilizado y del perfil fenólico del vino mismo.

1.1.2. Cascarilla de soja, un subproducto de la producción de aceite

La soja es una legumbre anual, que puede llegar a medir entre medio y 1,5 metros de porte, que posee hojas grandes, trifoliadas y pubescentes. La *Glycine max* botánicamente pertenece al orden Rosaceae, y a la familia Leguminosae. La semilla contiene alrededor de 40% de proteínas y aproximadamente un 20% de lípidos (mayormente aceites) [14]. Existe una gran demanda, a nivel de insumo industrial o para la alimentación de animales y personas, tanto para las proteínas como para el aceite obtenidos de la semilla de dicha planta. En ese sentido, la soja es el grano del cual el hombre obtiene la mayor cantidad de productos, con múltiples aplicaciones para su vida y el medio. Además, es la principal fuente de proteína y aceite a nivel mundial y contiene algunos fitoquímicos beneficiosos como las isoflavonas [14].

Los Estados Unidos, seguido de Brasil, y Argentina, junto a China son los mayores productores de soja, responsables de aproximadamente 90% de la producción mundial. No debe sorprender, entonces, que la soja y sus derivados sean en la actualidad los productos de exportación de mayor volumen en Argentina, y el mayor generador de divisas [15]. Durante los últimos años ha habido una expansión de la frontera agrícola y un reemplazo de la superficie destinada a otras actividades. Además, los rindes por unidad de superficie se han mantenido en alza durante los últimos años. La cascarilla se produce cuando se extrae el aceite de soja con solventes, para obtener aceite y harina de soja, dado que es necesario eliminar la película que cubre el grano para la extracción (Figura 1.2). Por cada tonelada de semilla de soja procesada, aproximadamente el 5% de la masa total coincide con el subproducto en cuestión [16].

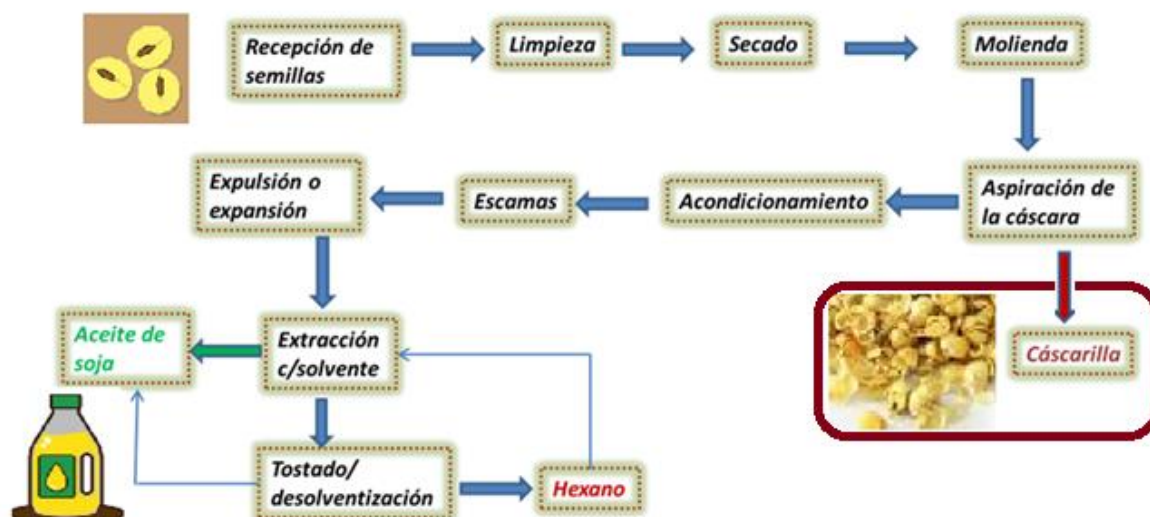


Figura 1.2: proceso de producción del aceite de soja, que da lugar al subproducto cascarilla.

En la actualidad, parte de la cascarilla de soja se utiliza como fuente de fibra para el ganado, sin embargo, grandes cantidades de la misma se desperdician [17]. En la literatura se pueden encontrar diversas de ellas, como la extracción de nanofibras de celulosa de cascarilla de soja y vaina de soja (otro residuo generado a partir de la actividad de cultivo de soja) [17].

1.1.3. Orujo de uva, un subproducto de la producción de vino

La producción de vino es una de las actividades agrícolas más importantes del mundo, y algunos de los países productores más competitivos son Italia, Francia, España, Estados Unidos, Australia, Argentina, Chile, Sudáfrica, China, Alemania y Portugal [18]. La vitivinicultura en Argentina manifestó un amplio y acelerado desarrollo, principalmente en las provincias andinas. Tradicionalmente el vino se produce en las provincias de Mendoza, San Juan, Salta, La Rioja, Córdoba, Catamarca y en las últimas décadas han comenzado a elaborarse en Neuquén, Río Negro, Entre Ríos, Chubut, Buenos Aires y Santa Fe. Mendoza es la provincia

más importante en lo que se refiere a producción de vinos argentinos en volumen de producción y exportación. Dentro de Mendoza, las principales áreas ocupadas por viñedos están en San Rafael, Agrelo, Luján de Cuyo y el Valle de Uco. Teniendo en cuenta toda la producción de uva, aproximadamente el 75% se utiliza en la elaboración del vino. La especie más comúnmente cultivada para la producción de vino es *Vitis vinifera* [19]. Los beneficios para la salud del vino se difundieron mayormente en la década de 1990 debido a la teorizada "paradoja francesa". En ese caso, se relacionó el alto consumo de vino en Francia con una baja prevalencia de enfermedades coronarias, en una población que tradicionalmente consume grandes cantidades de grasas saturadas y azúcar. Los estudios afirman que esta paradoja se debe a los compuestos fenólicos presentes en el vino [20].

El consumo de vino siempre ha ido en aumento y, junto a eso, la producción de orujo de uva. El orujo de uva es el principal residuo orgánico sólido de las industrias de bodega; como resultado de los procesos de prensado y/o fermentación. El orujo consiste principalmente en pieles y semillas de uva, que se separa del jugo en el paso de prensado (vino blanco), o del vino (vino tinto). Los procesos de vinificación se pueden ver en la Figura 1.3, en la producción del vino el jugo se convierte en vino sólo después de la fermentación. Adicionalmente, se producen las lías que son un material sólido que consiste en depósitos tales como levadura, partículas que precipitan, semillas, agentes clarificantes, entre otros, depositados en el fondo de los tanques de vino.

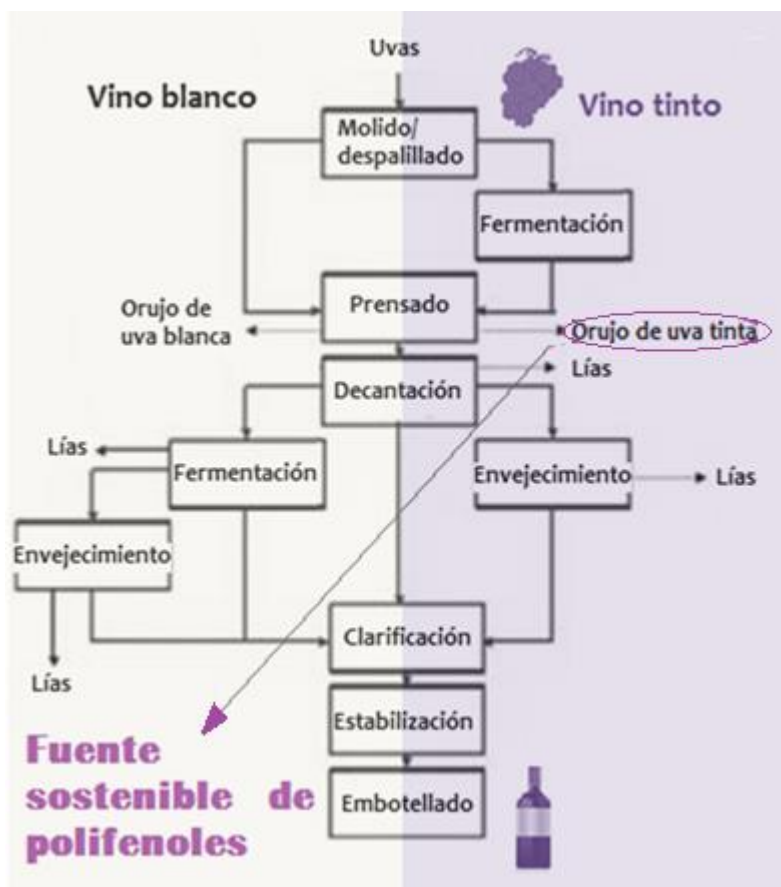


Figura 1.3: proceso de vinificación de uvas blancas y tintas.

La fermentación promueve alteraciones en la composición de carbohidratos y puede producir la liberación o degradación de polifenoles. Pese a esto, se comprobó que en el orujo de uva, se retiene una cantidad significativa de sustancias antioxidantes [21].

Sin embargo, la utilización del orujo de uva continúa siendo ineficiente, dado que se producen grandes cantidades de orujo durante un corto período de cosecha, lo que aumenta la concentración por área. La incineración o el descarte en el campo terrestre pueden ser perjudiciales para el medio ambiente, debido a que los compuestos fenólicos disminuyen el pH del orujo y aumentan la resistencia a la degradación biológica. Otros problemas ambientales incluyen: contaminación del agua superficial y subterránea, atracción de mosquitos, moscas y pestes que

pueden propagar enfermedades y el agotamiento de oxígeno en el suelo y aguas subterráneas por taninos y otros compuestos [22]. Los países tienen su propia política para gestionar los residuos. En España, el gobierno ofrece a las empresas vitivinícolas tres alternativas para la gestión del orujo: reciclar, valorizar o eliminar. Si se elige eliminarlo, se debe pagar una tasa de eliminación [19]. Estas políticas estrictas muestran la importancia de una gestión adecuada de residuos y la promoción de protocolos alternativos integrados, sostenibles y estandarizados. Este tipo de medidas podrían aplicarse en nuestro país en el futuro.

La creciente demanda de compuestos naturales sobre compuestos sintéticos, y el foco en las prácticas agrícolas sostenibles favorece el desarrollo del estudio de aprovechamiento. El orujo de uva y sus extractos, tienen potencial aplicación en alimentos funcionales, cosméticos, farmacéuticos y suplementos, debido a los principios activos antioxidantes que contiene [23].

1.2. Los polifenoles, clasificación, extracción y detección

Los polifenoles son uno de los componentes más activos que pueden encontrarse en los residuos de la industria agroalimentaria. Son metabolitos secundarios presentes en los vegetales, que pueden influir en la calidad nutricional y sensorial de los mismos. Más aún, son responsables de muchas de las cualidades antioxidantes y efectos benéficos [24]. Numerosos estudios han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles [25], que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras. Sin embargo, muchos residuos del procesamiento de frutas y vegetales, como el orujo remanente después de la vinificación todavía contiene altos niveles de polifenoles. De hecho, durante la vinificación se extrae sólo el 30-40% de los compuestos fenólicos [26].

Estructuralmente, los compuestos fenólicos contienen un anillo aromático, que tiene uno o más sustituyentes hidroxilo, y varían desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados

[27]. Los ácidos fenólicos tienen un grupo funcional de ácido carboxílico y se encuentran presente en plantas en sus formas libres o unidas a otros compuestos. Se pueden clasificar en dos subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos, incluyendo los ácidos p-hidroxibenzoico, protocatechuico, sirínico y vanílico. Por otra parte, ácidos hidroxicinámicos: gálico, cafeico, ferúlico, p-cumárico y sinápico, y los compuestos aromáticos que tienen una cadena lateral de tres carbonos (Figura 1.4) [24], [28].

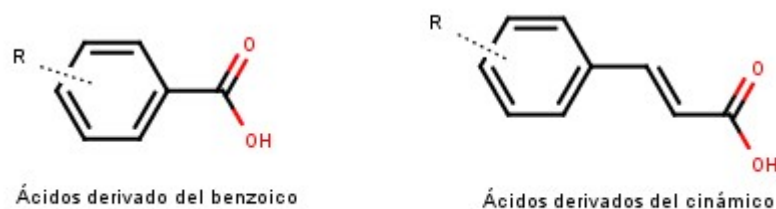


Figura 1.4: estructura general de los ácidos fenólicos.

Los flavonoides son encontrados en diversos alimento, como la soja. Uno de los más representativos es la quercetina, compuestos de bajo peso molecular con 15 átomos de carbono. La estructura consta de dos aromáticos que están unidos a través de 3 átomos de carbono, formando un puente, usualmente en forma de un tercer anillo heterocíclico [24]. En la Figura 1.5, se pueden observar las diferentes formas y distribución que tienen los flavonoides. Esta disposición de los grupos químicos le confiere a la molécula diferentes funciones. Dentro de este grupo existen subdivisiones que dependen de cómo se hallan los distintos grupos alrededor de la molécula central. Entre ellos podemos contar: flavanonas, isoflavonas y antocianinas. Las isoflavonas son definidos por la presencia de un doble enlace entre los átomos de carbono C2-C3, tienen un hidroxilo en el carbono C3. Generalmente se encuentran unidas a diferentes azúcares formando glicósidos, glucorónidos, galactósidos y diglicósidos. En la soja, por ejemplo, las principales son genisteína y

daidzeína, moléculas análogas a los estrógenos (estradiol) cuya eficacia ha valido para equilibrar la disminución de la producción de hormonas en el climaterio [29]. Las catequinas, como (+)-catequina se encuentran en los extractos del té (se les atribuye su actividad antioxidante [30]) y orujo, entre otros.

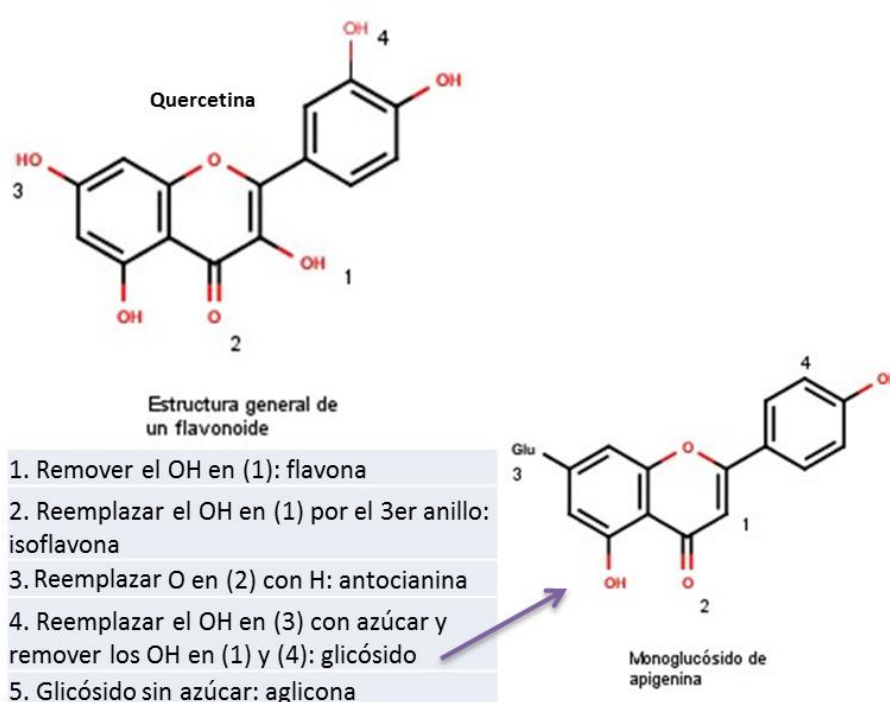


Figura 1.5: algunas estructuras generales de flavonoides.

Las antocianinas son responsables de aportar color a algunos vegetales (Figura 1.5). Su uso como colorante natural se ha incrementado debido a sus propiedades beneficiosas para la salud [24]. Son altamente susceptibles a las transformaciones químicas debido a la acción de agentes como la luz, la temperatura, el oxígeno, el pH, los solventes y los iones metálicos. Debido a esta característica, uno de los principales desafíos es su estabilización. En la piel de la uva se pueden encontrar los siguientes compuestos: 3-O-glucósidos de malvidina, petunidina, cianidina, peonidina y delphinidina [31].

Los estilbenos están formados por dos anillos aromáticos unidos mediante una molécula de etileno (Figura 1.6). Se encuentran en muy pocas cantidades en la dieta humana, el resveratrol, uno muy ocurrente, puede existir en sus formas isoméricas, cis y trans, siendo trans-resveratrol el compuesto de mayor actividad biológica (Figura 6). Este PF se encuentra relacionado con la prevención de enfermedades del corazón y con efectos benéficos para contrarrestar procesos inflamatorios [32]. Se encuentran en las plantas comestibles, especialmente en las uvas. Los estilbenos de uva más importantes son resveratrol-3-O- β -D-glucopiranosido, resveratrol, piceatanol y dímeros de resveratrol, encontrándose también algunas formas glucosiladas e isoméricas.

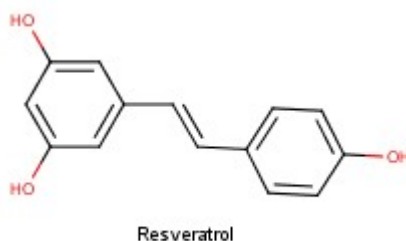


Figura 1.6: estructura del resveratrol, un estilbeno.

Los taninos, como el ácido tánico, son fenólicos de peso molecular relativamente alto, pueden ser clasificados en condensados e hidrolizables. Los hidrolizables son taninos derivados de la familia del ácido gálico, se pueden encontrar como polímeros de la glucosa con el ácido elágico, gálico u otros [24]. Los condensados, en cambio, son dímeros, oligómeros o polímeros del flavonoide catequina, también llamados procianidinas, Figura 1.7.

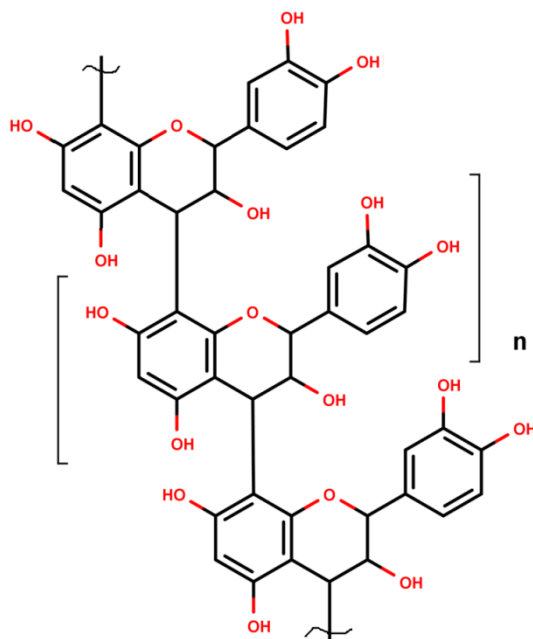


Figura 1.7: estructura química de una procianidina

En general los taninos tienen diversos efectos tales como, atrapar y encapsular metales, pueden servir para precipitar moléculas, y también por su efecto antioxidante [24], además son responsables del sabor astringente de frutas y bebidas [33].

1.2.1. Extracción de PFs a partir de matrices vegetales

Los polifenoles se encuentran en la matriz de las materias primas de origen vegetal y, para poder obtenerlos es necesario preparar extractos. La técnica de extracción más ampliamente reportada para polifenoles del orujo de uva es la extracción sólido-líquido por agitación mecánica.

De acuerdo al método de contacto entre el material rico en compuestos bioactivos con los solventes, las extracciones convencionales pueden ser realizadas de dos maneras: en forma discontinua o continua [34]. En extracción discontinua, se coloca una determinada cantidad inicial de materia prima en un recipiente. Si se va a aplicar temperatura alta, éste ha de permitir el reflujo del disolvente. Con este tipo de extracción se han elaborado gran cantidad de extractos, los cuales han permitido el estudio de polifenoles y su capacidad antioxidante en materiales diversos [35]. En

la extracción continua se hace pasar una corriente continua de solvente sobre una cantidad determinada de material sólido [34].

La eficiencia de extracción puede mejorarse principalmente mediante cambios en el tipo de disolvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción [24]. También pueden ser asistidas por ultrasonido, microondas, facilitadas por tensoactivos, entre otras técnicas. En general, la extracción convencional con solventes, utilizando una mezcla de agua con solvente orgánico, por ejemplo. Debido a la naturaleza polar de los polifenoles, se solubilizan fácilmente en medios próticos polares tales como soluciones hidroalcohólicas. Las soluciones acuosas de etanol, metanol o acetona son capaces de extraer más fenoles totales que un solvente orgánico puro [36]. En el caso de orujo de uva, cuando se compararon tres solventes (agua, agua: etanol (1: 1) y etanol) y tres métodos de extracción (asistida por microondas, asistida por ultrasonido y Soxhlet), los autores determinaron que tanto la técnica de extracción como la polaridad del disolvente influyen en el rendimiento de la extracción [37], dando a entender que es importante una evaluación de los factores para cada caso.

La extracción asistida por ultrasonido (ondas entre 20 kHz-10 MHz) ha sido utilizada para facilitar extracciones. Cuando una onda de sonido pasa a través de un medio elástico, induce el desplazamiento longitudinal de las partículas, se puede generar una burbuja de cavitación cerca de la superficie del material. Dicha burbuja colapsa durante el ciclo de compresión, y la alta temperatura y presión involucradas en el proceso, destruyen las paredes celulares de la planta y liberan su contenido soluble. Las principales ventajas son la reducción del tiempo de extracción, el bajo consumo de energía y la mejor calidad del extracto en comparación con la maceración convencional. La técnica ya fue utilizada para obtener fenólicos a partir de cascarilla de pistacho [38], [39]. También se ha utilizado ultrasonido para la recuperación fenólica de

pieles de uva, logrando altos rendimientos en cortos períodos de tiempo [40].

A pesar del gran número de estudios sobre la recuperación fenólica descritos utilizando solventes orgánicos (y sus mezclas de agua), se ha determinado que los compuestos fenólicos pueden unirse de forma covalente a polisacáridos complejos en las paredes celulares de matrices de alimentos [41]. Los métodos tradicionales de extracción suelen ser ineficientes para extraer estos "fenólicos no extraíbles o unidos (FNE)" [42]. Una cantidad considerable de compuestos fenólicos permanece en la matriz [43]. Como consecuencia, grandes cantidades de posibles sustancias promotoras de la salud podrían permanecer en el orujo. Los FNE, se unen covalentemente a componentes estructurales de la pared celular tales como celulosa, hemicelulosa (por ejemplo, arabinoxilanos), lignina, pectina y proteínas estructurales en forma de varillas como se describe gráficamente en la Figura 1.8 [43]. Estos fitoquímicos desempeñan funciones importantes en la pared celular ya que proporcionan barreras tanto físicas como químicas [44]. Los ácidos fenólicos, tales como los ácidos hidroxicinámico e hidroxibenzoico, forman enlaces éter con lignina a través de sus grupos hidroxilo en el anillo aromático y enlaces éster con carbohidratos estructurales y proteínas a través de su grupo carboxílico, tabla I.II [44].

Unión	Componente estructural de pared celular	Grupo reactivo del fenólico
Éter	Lignina	Hidroxilos del anillo aromático
Éster	Proteínas Carbohidratos estructurales	Ácido carboxílico

Tabla I.II: enlaces covalentes entre los fenólicos y los componentes de la pared celular

Las frutas y verduras tienen la mayoría de sus fitoquímicos en formas conjugadas libres o solubles. Los compuestos fenólicos unidos comprenden un promedio del 24% de los fenólicos totales presentes en estas matrices de alimentos [45]. Los ejemplos del contenido de FNE en la fruta madura de níspero y la planta de palma aceitera tienen un 20,7% y un 33,2% de contenido fenólico unido, respectivamente [46]. Se observan resultados similares al estudiar los perfiles fenólicos de las verduras. Las semillas de papas y de cáscaras de calabaza (comúnmente consumidas como refrigerio) tienen 39.9% y 21.1%, respectivamente [47]. Para liberar este tipo de compuestos, se pueden utilizar las reacciones de hidrólisis ácidas y alcalinas [48]. Las principales variables de estas hidrólisis químicas son la concentración de ácido/base, el tiempo de hidrólisis y la temperatura. El tratamiento ácido rompe los enlaces glicosídicos y solubiliza los azúcares, pero generalmente deja intactos los enlaces de los ésteres. La hidrólisis ácida a temperaturas elevadas provoca la pérdida de algunos compuestos fenólicos [49].

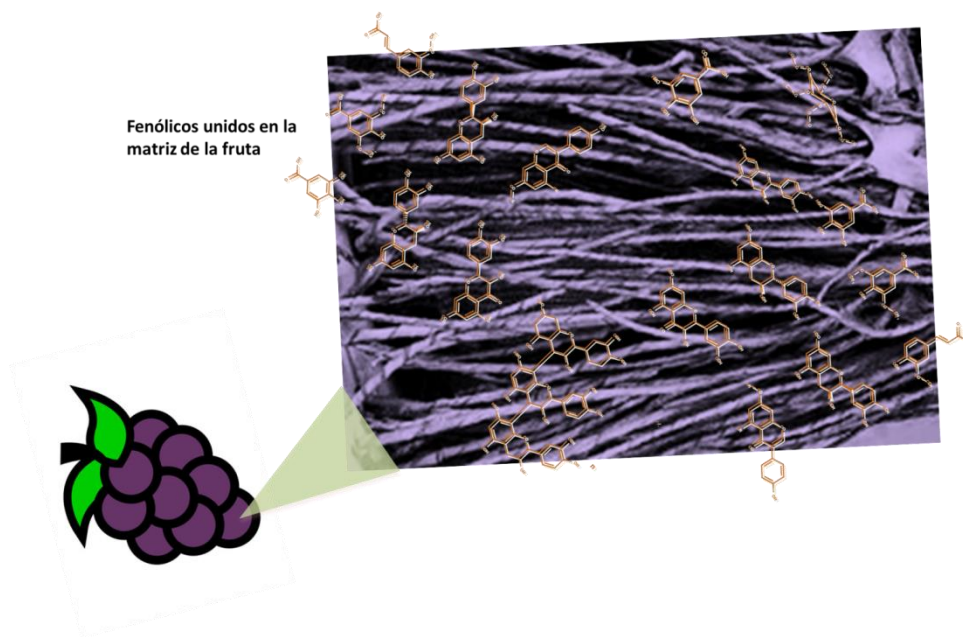


Figura 1.8: unión ente los FNE y componentes estructurales de la pared celular de una fruta.

Por otra parte, algunos autores reportan que los compuestos fenólicos se liberan mejor con hidrólisis alcalina que ácida, reduciendo su pérdida [50]. Los tratamientos alcalinos se usan comúnmente para extraer ácidos fenólicos unidos y otros compuestos relacionados de los granos de cereales [49]. La recuperación de compuestos fenólicos no extraíbles ya se ha estudiado en la hidrólisis alcalina del orujo de arándano. En ese caso, el tratamiento con hidróxido de sodio (1-4 M), durante períodos variables de tiempo, ha demostrado ser eficaz en la liberación de estos compuestos fenólicos unidos [51].

Otras alternativas para facilitar la liberación de polifenoles durante la extracción involucran el cultivo de hongos, o las enzimas producidas por los mismos. La fermentación en estado sólido (FES) involucra el empleo de un soporte sólido donde se desarrolla un microorganismo, como un hongo filamentoso, con bajo contenido de agua [52]. Los hongos son grandes productores de enzimas extracelulares, por eso la FES ofrece la posibilidad de procesar residuos agroindustriales que se pueden utilizar como

sustratos para la producción de enzimas, liberando PFs gracias a dichas enzimas (especialmente hidrolasas). Por otra parte, la hidrólisis enzimática, consiste en la adición de las enzimas puras (obtenidas generalmente a partir de hongos), sobre un residuo para facilitar la liberación PFs [53]. Estas enzimas desempeñan un papel en la desintegración de la matriz de la pared celular de la planta y, en consecuencia, facilitan la extracción de polifenoles [54], [55].

1.2.2. Determinación del contenido fenólico total

La cuantificación e identificación de productos naturales se puede realizar por diferentes métodos, uno de los más ampliamente aplicados para determinar cantidad de polifenoles totales es el de Folin-Ciocalteu (F-C). Se realiza mediante una solución de un amarillo intenso, o reactivo de F-C, que contiene una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato. La naturaleza de la reacción de este reactivo no ha sido realmente definida, pero es capaz de reaccionar con cualquier sustancia reductora, no sólo con fenólicos. Se asume que la reacción con el sustrato involucra una reducción reversible de uno o dos electrones. Durante el ensayo de F-C, la reacción entre los fenólicos y el reactivo se produce a básico (el pH aumenta por adición del carbonato de sodio), y en esas condiciones, se produce un anión fenolato, capaz de reducir el reactivo de F-C. Esta reacción da productos de color azul en solución. La intensidad del color azul se mide por A^{765} . La intensidad del color se relaciona directamente con la cantidad de polifenoles que se encuentran en la muestra [56]. Esa relación se logra generalmente mediante una curva de calibrado con ácido gálico, por eso el resultado de la medida está en equivalentes de dicho compuesto.

1.2.3. Análisis de PFs mediante cromatografía líquida, principios de funcionamiento

El ensayo de Folin-Ciocalteu se utiliza para la determinación de fenoles totales, pero para ahondar en el perfil fenólico de los extractos se requiere de una técnica más compleja [48]. En los últimos veinte años, la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se ha empleado

ampliamente para determinar y cuantificar cuáles son los compuestos fenólicos presentes en los vegetales. Esta técnica de separación está basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Un sistema de bombeo administra cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante tuberías y uniones para altas presiones. Generalmente, la separación se logra por “fase reversa”, empleando fases móviles polares y fases estacionarias no polares [57]. La fase estacionaria es generalmente C18, con un diámetro entre 2.1 y 5 mm y un tamaño de partícula de 3 a 5 μm .

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos a separar se inyectan en la fase móvil automáticamente mediante el uso de inyectoros automáticos, que constan de un carrusel para sostener los viales y un dispositivo de inyección, Figura 1.9. La fase móvil consiste usualmente en una mezcla de fases orgánica (metanol o acetonitrilo) y acuosa, y estos son acidificados por un ácido orgánico, acético o fórmico [58].

En cuanto a la detección, la mayoría de métodos de CLAE usados clásicamente y para usos de rutina requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector, Figura 1.9. A medida que los compuestos eluyen a través de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía [57]. Si el detector es un arreglo de diodos (DAD), se denomina a esta cromatografía CLAE-DAD.

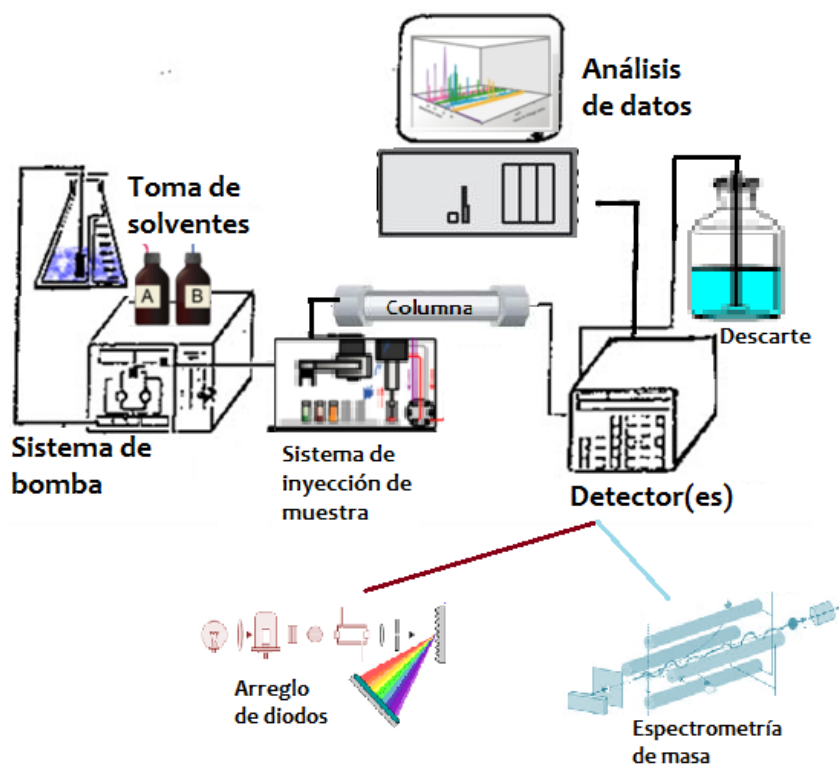


Figura 1.9: esquema y principio de funcionamiento de un CLAE.

1.2.4. El espectrómetro de masas como detector en CLAE

Los métodos de CLAE que utilizan detectores de luz UV-vis o que detectan propiedades fluorescentes de las muestras, tienen la particularidad de que no permiten obtener información sobre la estructura de los compuestos detectados. Para tal fin, se puede utilizar un CLAE acoplado a un espectrómetro de masas que puede establecer la estructura de los polifenoles separados. Este tipo de detectores se ha utilizado para determinar polifenoles en plantas, frutas y vegetales [24], extractos y residuos de agroindustrias como el orujo de uva [27], estableciendo la composición química y cuantificación, para el caso de que se disponga de estándares. La espectrometría de masas produce a partir de los analitos iones en fase gaseosa, y utiliza el movimiento de iones en campos

electromagnéticos para clasificarlos de acuerdo a la relación masa/carga de cada uno. Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes fundamentales:

- a) sistema de introducción de muestra, desde el cromatógrafo hasta el equipo,
- b) una fuente de ionización, en la cual se produce un haz de partículas ionizadas que vienen de la muestra,
- c) un analizador para separar las partículas ionizadas de acuerdo su la masa,
- d) un detector, donde los iones separados son acumulados y caracterizados [59].

La asociación entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas se hizo posible mediante el desarrollo de técnicas de ionización a presión atmosférica, que utilizan altos voltajes altos y nebulización para producir iones en fase gaseosa, producen poca fragmentación y tienen elevada sensibilidad. En ionización por electrospray, el eluyente se convierte en un aerosol cargado negativa o positivamente (dependiendo del ΔV en el capilar) y un flujo de gas inerte calentado ayuda a la evaporación del solvente. Las pequeñas gotas disminuyen su tamaño mientras la carga de la gota permanece constante. Este proceso se puede repetir muchas veces formando gotas pequeñas, que permiten el análisis de moléculas de naturaleza polar, que se pueden cargar positivamente, como una amina, o negativamente, como un ácido. Es una técnica de ionización blanda que no produce apenas fragmentación, es decir, se produce el ion $(M + H^+)$ en modo positivo y $(M - H^+)$ en negativo [59].

En cuanto a los analizadores utilizados, de tiempo de vuelo y el de triple cuadrupolo están entre los más usados. El de tiempo de vuelo utiliza como variable el tiempo que demora un ion generado y acelerado para llegar al electrodo colector, que está basada en su relación masa/carga. Los iones de la fuente son acelerados por un pulso de campo eléctrico. El de

cuadrupolo está formado por cuatro rodillos paralelos (cuadrupolo) por los cuales circula una corriente continua afectando la trayectoria de los iones moviéndose entre los rodillos. A través del filtro del cuadrupolo, solamente pueden pasar los iones que tengan una relación masa/carga específica. El resto es barrido como partículas descargadas.

1.2.5. Métodos de adquisición de espectros y espectrometría de masa/masa

Para la obtención de espectros de masas de forma rutinaria, se utilizan condiciones de baja resolución. Así, podemos obtener espectros de masas en los que se representan las relaciones masa/carga con una precisión en la primera cifra decimal. Cuando se requiere determinar la masa exacta de los iones detectados, se trabajará en alta resolución. En técnicas de EM/EM (acopladas a electrospray) es preciso seleccionar el ion a fragmentar, por lo que es necesario un estudio previo de la muestra en modo normal (EM) con el fin de observar los iones a fragmentar [60]. Teniendo en cuenta que al volatilizar e ionizar el analito de interés, va a ser seleccionada en relación a su m/z , la detección de ésta se producirá en forma aislada de cualquier otra especie neutra, o ionizada pero con un m/z distinto.

En los casos en los que se hace necesario un mayor grado de discriminación, como una matriz complicada o cuando la concentración del analito es muy baja, se puede filtrar la muestra en el analizador antes de que llegue al detector, y observar aquellos analitos de interés, utilizando fragmentación masa/masa (EM/EM). En el caso de los equipos de triple cuadrupolo, en un primer paso el eluyente previamente volatilizado e ionizado, pasa a través del primer cuadrupolo donde se enfoca un ion en relación a su m/z . Dicho ion precursor es transferido a un segundo cuadrupolo, donde interacciona con un gas de colisión y es fragmentado. Finalmente, el tercer cuadrupolo se focaliza en uno o varios de los iones producto de la fragmentación del ion precursor.

1.2.6. Determinación de capacidad antioxidante por equivalentes de Trolox

Debido a que los fenólicos son apreciados entre otras cosas por su actividad biológica antioxidante, es interesante correlacionar el contenido de fenoles con la actividad antioxidante de un extracto. Una de las formas de medir la actividad antioxidante es mediante el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) o ABTS, que puede ser oxidado a radical catión, ABTS^{•+} mediante el uso de persulfato de potasio dando una solución intensamente coloreada verde azulado. La presencia de antioxidantes en el medio produce una disminución de la intensidad de ese color y permite medir la capacidad antioxidante de la muestra mediante $A^{734 \text{ nm}}$. La absorbancia medida por reacción entre el ABTS^{•+} y el antioxidante se contrasta con una curva de calibrado preparada con soluciones de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), en las mismas condiciones. El resultado de este ensayo se expresa en capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox [61]. Este método frecuentemente elegido porque permite determinar la capacidad antioxidante distintos tipos de matrices como semillas [62], plantas medicinales [63] frutas y vegetales. Se destacan como las ventajas que posee el método, la solubilidad del radical en soluciones acuosas y orgánicas.

1.3. Diseño experimental para optimización de un proceso

Un experimento diseñado es una prueba donde se inducen cambios deliberados en las variables de entrada (o factores controlables, Figura 1.10) de un proceso o sistema, de forma tal que pueda permitir detectar las causas de la variación en la respuesta o salida [64]. Por lo general, realizamos primero experimentos para generar datos a partir del sistema en estudio, y entonces usamos la información provista por el experimento para arribar a nuevas teorías, que llevan a preparar nuevos experimentos, y así continuar.

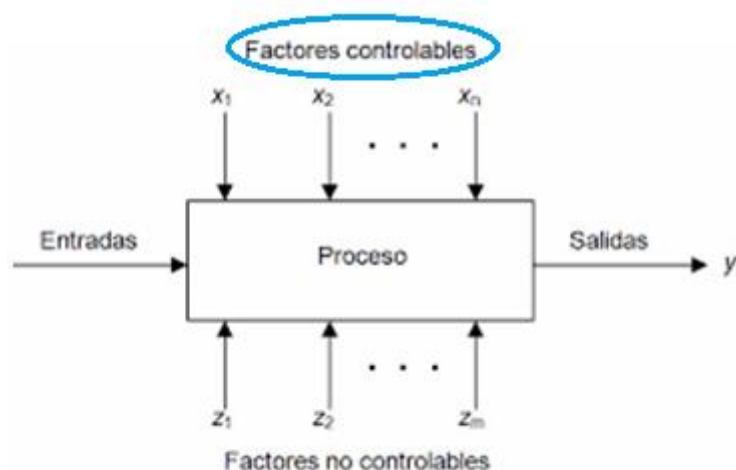


Figura 1.10: representación general de una transformación química.

Los diseños experimentales se utilizan frecuentemente para optimización de diferentes condiciones de un sistema, como ser mejorar el rendimiento de separación cromatográfica, u elevar la eficacia de una extracción [64]. Entre los factores controlables, algunos tienen efecto sobre la respuesta (significativos) y otros que no lo son. La aplicación del diseño es la forma más eficaz de identificar y optimizar los primeros. De esa forma, se puede lograr un resultado óptimo con menos ensayos experimentales [64, 65]. En la Figura 1.11 se presentan los pasos que se pueden emplear en este análisis:

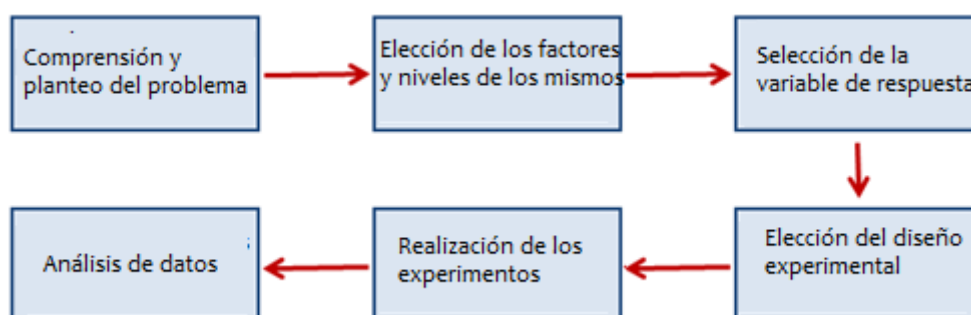


Figura 1.11: procedimiento para llevar a cabo un experimento diseñado.

1.3.1. Selección de factores, *screening* por diseño factorial

Los diseños factoriales pueden estudiar más de un factor en dos o más niveles. Se utilizan diseños factoriales de dos niveles para fines de *screening* que permitan determinar los efectos principales (factores sin interacción) y de interacciones dobles o triples de los factores considerados, utilizando un menor número de experimentos [64, 65]. En estos diseños, se incluyen combinaciones de diferentes niveles de factores, a partir de las cuales se pueden calcular los efectos de las interacciones entre factores. Tales diseños son más eficientes para tratar un gran número de variables que el realizar experimentos modificando una variable por vez. Generalmente, los factores se codifican, facilitando los cálculos y estandarizando las variables (eliminando las unidades de medida originales), e incrementando la precisión al estimar los coeficientes del modelo.

Para determinar los efectos relativos de un factor, se recomienda el análisis de nivel de factor codificado porque los coeficientes del modelo son adimensionales y, por tanto, directamente comparables [64]. El análisis de varianza (ANOVA) puede ser la base para el análisis de un diseño factorial y para el ajuste del modelo. Los diseños factoriales se clasifican en dos categorías; diseño factorial completo y diseños factoriales fraccionales [66].

Un diseño factorial completo de dos niveles podría ser útil para el *screening* cuando es necesario estudiar pocos factores [67], en él se incluyen todas las combinaciones posibles de las variables de entrada y sus niveles. El diseño factorial completo se define por 2^n , siendo n el número de factores [66]. Cada factor tiene dos niveles: "alto" y "bajo" que se expresan como '+1' y '-1'. Para evaluar un número relativamente grande de factores, se necesitan muchos experimentos, lo que no es factible económica ni prácticamente. Los efectos de los factores sobre una respuesta pueden ser estudiados bajo un enfoque económico y práctico mediante un estudio factorial fraccional [68]. El factorial fraccional es un subconjunto representativo de un diseño factorial completo. Una fracción

del diseño factorial completo permite obtener la información deseada con una precisión suficiente, puede examinar f factores en dos niveles mediante la realización de 2^{F-V} experimentos ($V = 1, 2, 3, \dots, n$) [64, 67, 69].

1.3.2. Optimización del experimento

El enfoque de diseño de experimentos generalmente comienza por un *screening* para seleccionar los factores importantes y continúa con un paso de optimización para encontrar las condiciones óptimas para ajustar los factores. La optimización por superficie de respuesta puede ayudar para refinar gráficamente los modelos después de haber determinado los factores que son significativos utilizando un diseño de screening. La respuesta gráfica (la superficie) es la representación de una respuesta matemática (la ecuación que contiene los términos). Cuando se incluyen términos de interacciones entre factores (la ecuación se vuelve un poco más compleja), esto permite modelar la curvatura en la respuesta.

Hay dos tipos principales de diseños de superficie de respuesta: diseño central compuesto (DCC) o diseño de Box-Behnken (DBB), Figura 1.12. Los DCCs se utilizan cuando se pretende aplicar un experimento secuencial, ya que estos diseños permiten incluir información de un diseño factorial de un screening que lo preceda [65, 69]. Los diseños de Box-Behnken tienen generalmente menos puntos (requieren menos experimentos) que los DCC y, por consiguiente, resulta menos costoso ejecutarlos para un mismo número de factores.

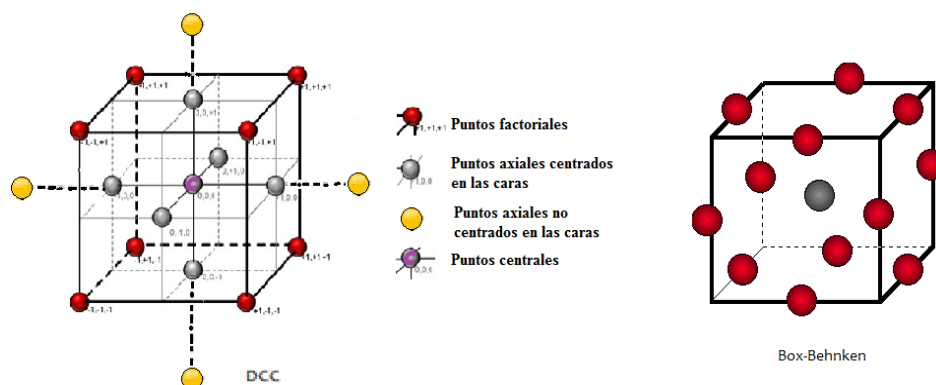


Figura 1.12: diseño DCC centrado en las caras y DBB.

Podemos establecer una comparación entre Box-Behnken (alternativa más económica) y central compuesto en términos de número de factores y experimentos. Por ejemplo, si un experimento tiene 4 factores continuos, el estudio del mismo requerirá 31 DCC y 27 utilizando DBB, no es una gran diferencia. En cambio, aumentando el número de factores a 7, el número de experimentos de DBB baja mucho respecto de DCC, requiriendo 152 experimentos para un DCC y 62 para un DBB. Estos diseños siempre tienen 3 niveles por factor, a diferencia de los DCCs, que pueden tener hasta 5. Los diseños de Box-Behnken tienen combinaciones de factores que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental, Figura 1.12, y requieren al menos tres factores continuos (contra 2 para un DCC). El diseño BB es útil para evitar experimentos que se encuentran en condiciones extremas porque las combinaciones entre el nivel más alto y más bajo para cada factor no son incluidas.

Capítulo 2: Utilización de proteínas de suero de leche para la reducción de la astringencia de vino tinto

Creemos que no hay color, pensamos que no es dulce, pensamos que no es amargo, pero en realidad hay átomos y el vacío.

- Demócrito

2.1. Introducción

El vino tinto es una bebida rica en compuestos fenólicos, que han demostrado ser responsables de muchos de sus beneficios para la salud. Las actividades biológicas atribuidas a dichos compuestos son variadas: antioxidante, preventiva del cáncer, antiinflamatoria y antihipertensiva, entre otras [25]. Además de la clasificación presentada en el capítulo uno, se muestra una clasificación simple de los polifenoles en la Figura 2.1. Podemos distinguir a los taninos como polifenoles de elevada polimerización, de peso molecular mayor a 500 Da, y que tienen la capacidad de precipitar a la gelatina en solución. En el vino, los taninos son responsables de algunas propiedades sensoriales no deseadas, como opacidad del producto, excesiva coloración y turbidez por combinarse con proteínas del vino, disminución de la estabilidad en solución a largo plazo. Además le confieren al vino la propiedad sensorial de astringencia, una sensación de sequedad o aspereza en la boca, asociada con las interacciones entre los polifenoles de vino y ciertas proteínas de la saliva ricas en prolina. La capacidad de precipitar proteínas es la característica definitoria de los compuestos conocidos como taninos.

La definición de taninos como "compuestos fenólicos solubles en agua que tienen pesos moleculares entre 500 y 3000 con capacidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas" aún nos proporciona una comprensión muy útil de compuestos químicamente muy diversos [70]. Proteínas como la caseína, gelatina, albúmina de huevo, entre otras, pueden ser utilizadas para reducir la astringencia de una bebida o clarificarla. En el proceso de producción del vino, estas proteínas son utilizadas para influenciar la claridad, las características sensoriales y la capacidad de envejecimiento de los vinos, debido a su importancia, se ha comenzado a explorar otras fuentes naturales de compuestos capaces de reducir astringencia [71].

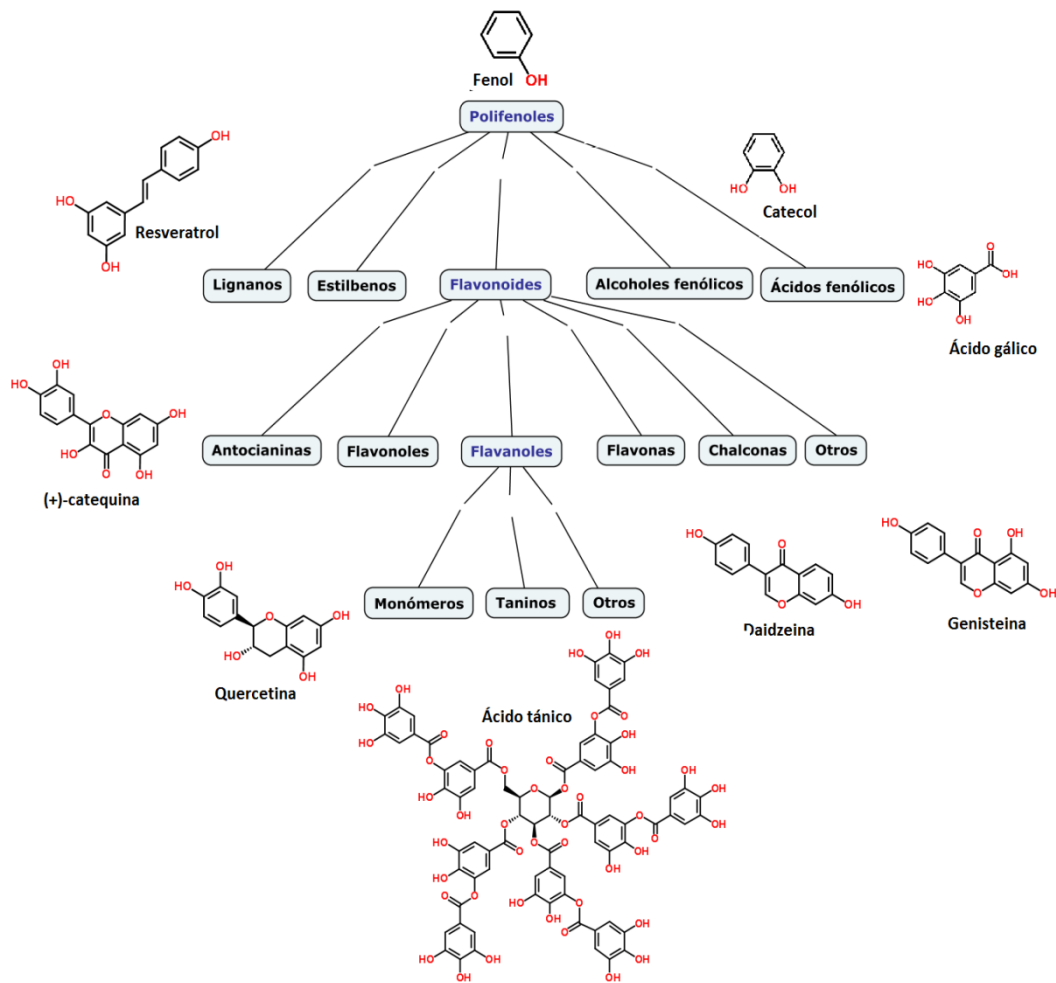


Figura 2.1: clasificación de polifenoles.

El suero de leche tiene relativamente bajo valor comercial y representa una alternativa para la obtención de proteínas que pueden interactuar con los compuestos fenólicos. La adición de leche al té, por ejemplo, resulta en la formación de complejos entre proteínas de la leche y las catequinas del té, sin afectar la biodisponibilidad de dichos compuestos [72]. Las proteínas del suero, en particular la beta-lactoglobulina (BLG), ha sido capaz de interactuar con los polifenoles en el té y ha complejado otros polifenoles modelos [73]. Pese a esto, dicha proteína nunca ha sido aplicada a la reducción de la astringencia de bebidas. La BLG es una pequeña proteína globular de 18.350 Da, que posee una región hidrofóbica que muestra una afinidad intermedia por moléculas como los polifenoles. Esta proteína tiene algunas ventajas tecnológicas para su

aplicación en vino: es económica, de calidad alimentaria y no tóxica, capaz de solubilizar y proteger moléculas hidrofóbicas biológicamente activas en medios acuosos.

El mecanismo de interacción entre fenoles y proteínas de la saliva implica un mecanismo de múltiples pasos. Primero, se produce una atracción hidrofóbica reversible entre los polifenoles y las proteínas de conformación desordenada, para dar un complejo soluble. En segundo lugar, más polifenoles son añadidos al complejo y se produce el entrecruzamiento de los péptidos. Finalmente, al continuar la agregación, hay una separación de fases y precipitación de los complejos insolubles, Figura 2.2 [74]. Algo similar podría ocurrir con otras proteínas que precipitan polifenoles.

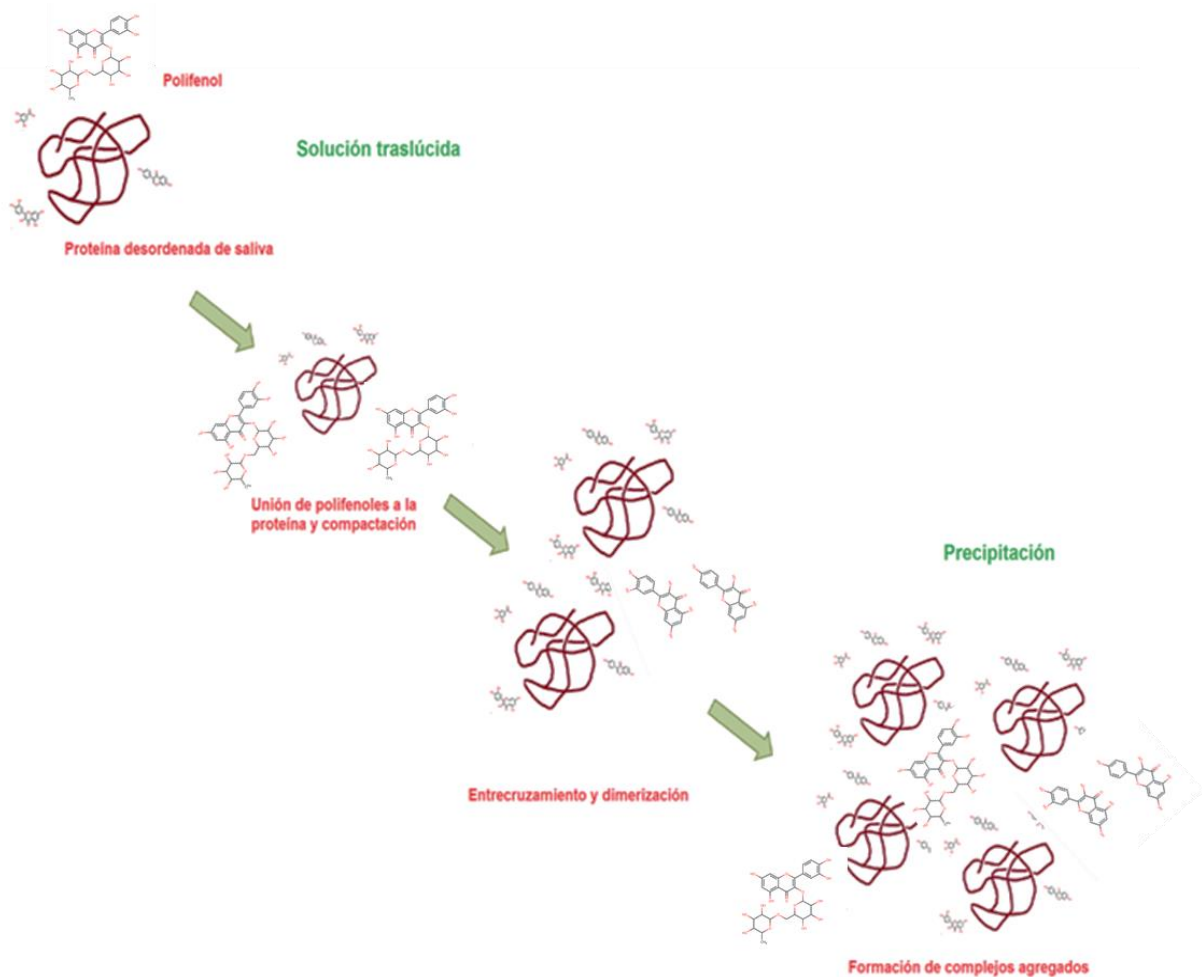


Figura 2.2: esquema propuesto para explicar el mecanismo de interacción entre polifenoles y proteínas que da lugar a la precipitación de los complejos agregados.

La afinidad de unión de complejos proteína-tanino podría estar correlacionada negativamente con la digestibilidad y la capacidad antioxidante [75]. Además, al aplicar un agente proteico al vino, parte de los polifenoles precipitan y se pierden. El mantenimiento de las propiedades beneficiosas del vino justifica el estudio de las interacciones fenol-proteína [76].

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, la betalactoglobulina bovina (BLG), albúmina de suero bovina (BSA), solución de ácido bicinconínico (ácido bicinconínico), solución de sulfato de cobre, DEAE Sepharose®, cuajo, ovoalbúmina, ácido tánico, ácido tartárico, monofosfato de potasio, difosfato de potasio, hidróxido de sodio, sodio cloruro, ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético (TFA), metanol, etanol, metilcelulosa, sulfato de amonio, acetonitrilo, catequina, epicatequina, ácido gálico y gelatina de piel bovina de grado B se adquirieron de Sigma-Aldrich (Dorset, UK). Membranas de microfiltración de hoja plana (0,45 micras), filtros para jeringa PVDF (0,45 m) se obtuvieron de Millipore Corporation (Bedford, Reino Unido). La enzima proteasa N 'Amano' de Bacillus subtilis se adquirió de Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japón). Sephadex LH-20 proveniente de GE Healthcare Lifesciences, Buckinghamshire, Reino Unido. La leche pasteurizada descremada y el vino tinto "La Chasse" Merlot (grado alcohólico 13%, 2012, Francia) fueron comprados en el supermercado.

2.2.2. Preparación de suero y purificación de BLG

La leche descremada se calentó a 35 °C en un baño de agua y luego se agregó cuajo (0,3 mL/litro de leche). La mezcla se agitó suavemente durante 2 minutos utilizando el mismo baño de agua con agitación orbital. Se detuvo la agitación y se dejó incubar durante una hora. Luego, el coágulo de caseína se cortó en cuadrados pequeños para permitir que el lactosuero restante drene, incubando durante 20 minutos adicionales. A continuación, el coágulo se recogió y se filtró para drenar la mayor parte del suero mediante vacío. El suero se centrifugó a 3200 RCF durante 10 min y se filtró el último residuo de caseína. A continuación, el suero de leche dulce fue fraccionado para obtener BLG purificada [77]. Una membrana de nitrocelulosa se colocó en una celda de concentración Amicon de 150 mL agitada magnéticamente. Se añadieron 100 mL de suero de leche (pH 6,4) y 10 mL de resina de dietilaminoetanol sefarosa pre-hinchada a la celda y se agitó durante 10 min. La mezcla se filtró a través de la membrana, con la ayuda de presión de aire. La resina se lavó con buffer

fosfato de potasio 10 mM a pH 6,5 y se eluyeron las proteínas indeseadas con buffer fosfato de potasio 10 mM a pH 4,5. Para obtener la fracción enriquecida de BLG, la misma fue desorbida y eluida con buffer fosfato de potasio 10 mM a pH 4,5, conteniendo NaCl 0,5 M. El contenido total de proteína se analizó por ácido bicinconínico, y se utilizó CLAE para el análisis cualitativo de las proteínas.

2.2.3. Contenido de proteínas totales

En primer lugar, la muestra o estándar (100 μ L) se mezcló con 2 mL de reactivo ácido bicinconínico. En segundo lugar, la mezcla se calentó a 37°C durante 30 min, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, se determinó la absorbancia de todas las muestras, con un espectrofotómetro a $\lambda = 562$ nm, midiendo todas las muestras en menos de 10 min. El blanco se preparó reemplazando proteína con agua y se utilizó albúmina de suero bovino como estándar para realizar la curva de calibrado.

2.2.4. Análisis de proteínas de suero de leche por CLAE

Las principales proteínas de suero de leche (BLG, alfa-lactalbúmina, albúmina de suero bovino) se pudieron identificar usando HPLC, por un método adaptado a partir del trabajo de Thoma [78]. Las muestras de contenido proteínico total conocido se filtraron a través de un filtro PVDF de 0,45 μ m y se analizaron mediante un HPLC Dionex con una bomba P680, un inyector de muestra automatizado ASI-100, un compartimiento de columna termostatizado TCC100, un detector de arreglo de diodos PDA-100 con columna C-18 (250 \times 4.6 mm). Se utilizó un gradiente de disolvente A (0,1% de TFA en agua) y disolvente B (0,08% de TFA en ACN) de la siguiente manera: B 0-45% entre 0-60 min, B 45-70% entre 60-65 min, 70% B entre 65-75 min, y finalmente 0% B entre 75-90 min. La temperatura de la columna se ajustó a 40 ° C. El caudal fue de 0,8 mL/min, el volumen de inyección fue de 50 μ l y la absorbancia de las muestras se registró a 214 y 280 nm.

2.2.5. Tratamientos proteicos realizados sobre el vino y determinación de astringencia

Las muestras de vino (4 mL) y la solución de proteína (1 mL) se mezclaron en pequeños frascos mediante agitador vortex, de forma tal de obtener concentraciones de proteína final en la mezcla de 0,1 - 0,5 mg/mL. Para determinar astringencia, se utilizaron soluciones de ácido tánico de concentración (0,2 - 1,0 g/L) y de ovoalbúmina de (0,4 - 3,2 g/L). Para solubilizar dichos estándares, se preparó una solución similar a vino en composición usando etanol, ácido tartárico y el hidróxido de sodio para ajustar el pH a 3,5 [79]. Para cada concentración de ácido tánico de la curva o muestras de vino, se prepararon tubos con 200 µL de solución de concentración creciente de ovoalbúmina, como se describe. A cada tubo se añadieron 200 µL de solución de ácido tánico o muestra de vino. Los tubos se prepararon por triplicado, se agitaron en vórtex, y después de 10 min, las muestras fueron centrifugadas a 11700g durante 10 min. Los sobrenadantes resultantes (0,1 mL) se diluyeron con agua destilada (4,9 mL) y por último, la absorbancia se midió a 280 nm [79].

2.2.6. Perfil fenólico de vinos por CLAE

Las muestras de vino se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro. Un volumen de 30 µL de cada una fue inyectado en el sistema cromatográfico, consistente en un CLAE Hewlett-Packard 1100 equipado con desgasificador, bomba cuaternaria y detector de matriz de arreglo de diodos (Agilent Technologies). La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 Nova Pak (250 × 4.6 mm; tamaño de partícula 5 µm; 30°C), equipado con un guarda-columna Phenomenex Cyano (4 × 3 mm). Se emplearon dos fases móviles: A (agua: MeOH: ácido fórmico, 95:4,9:0,1% v/v) y B (acetonitrilo: ácido fórmico, 99.9: 0.1, v/v), y el gradiente fue: 5 % B (min 0); 31% B (26 min); 50% B (34 min); 90% B (38 min) y 5% de B (42 min). El flujo de solvente fue de 0,8 mL/min. Cada muestra se llevó a cabo por triplicado y la detección procedió a 280, 320, 365 y 520 nm. La presencia de ácido fórmico en los disolventes de elución para mantuvo el pH por debajo de 2.5, asegurando que las antocianinas están presentes como una sola especie (catión flavilio). Algunos

compuestos mayoritarios fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención y espectros de UV con aquellos de estándares puros.

2.2.7. Purificación de de PFs de uva

Los taninos se aislaron de orujo de uva por cromatografía en Sephadex LH-20 (Deaville, Green et al. 2007). El orujo de uva (3 g) se disolvió en 25 mL de metanol:agua (1:1) bajo una corriente de nitrógeno durante 60 min a 50 °C. La solución se centrifugó (1400 RCF), y se aplicó a una columna con 1.8 g de Sephadex hidratado con 15 mL de metanol:agua (1:1). Las dimensiones de la columna fueron 6 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro. Los polifenoles de tipo catequinas monoméricas fueron eluidas en parte con el solvente de extracción de orujo, y luego mediante la adición de 50 mL de metanol/agua (1: 1, v/v). En segundo lugar, una fracción de tanino se eluyó con acetona/agua (7: 3, v/v; 30 mL). Acetona y metanol fueron evaporados en vacío a 35 °C de las fracciones y luego la fase acuosa se congeló y se liofilizó durante 2 h. Las catequinas (132.2 mg) y taninos (32.2 mg) aislados se almacenaron a -20 °C hasta preparar soluciones y medir por CTI.

2.2.8. Calorimetría de titulación isotérmica

Para investigar la naturaleza de la interacción, se utilizó un calorímetro ITC200 (MicroCal, Northampton, MA 01060 EE.UU). En un experimento típico, soluciones de gelatina y BLG (macromoléculas) en buffer pH 4,00 (0,2mg/mL) se colocaron en la celda (206 µL) y soluciones de polifenol (ligandos) en buffer pH 4,00 (3-8,8 mg/mL) fueron cargados en la jeringa de inyección, a 25 °C y se midieron los cambios de entalpía asociados con las interacciones proteína-fenol. Los taninos se titularon en la celda de muestra como una secuencia de 33 inyecciones de 1,2 µL. Para permitir que la temperatura se equilibre, se separaron dos inyecciones sucesivas por un tiempo de 250s. El contenido de la celda de muestra se agitó durante todo el experimento a 800 rpm para asegurar una buena mezcla y el pH fue comprobado después de la preparación de las soluciones. Todas las soluciones se desgasificaron previamente durante 10 min para evitar que las burbujas afectaran las mediciones y se controló el peso de las soluciones, asegurando que el buffer acetato no se hubiera evaporado. Las mediciones se hicieron por duplicado y los datos preliminares

se obtuvieron como una diferencia de calor ($\mu\text{cal}/\text{seg}$) vs tiempo. Los experimentos de control incluyeron calores de dilución de la titulación de soluciones de tanino sobre buffer, buffer sobre proteína y buffer sobre buffer, los dos fueron despreciables. Se utilizó el software ORIGIN Microcal para el ajuste iterativo de curvas de unión, ajustando las funciones termodinámicas ΔG° y ΔS° , el modelo y los parámetros de unión polifenol-proteína de acuerdo a las siguientes ecuaciones,

$$Q = (Vc\Delta H^\circ / 2K) \left[1 + K[L]_T + nK[M]_T - \sqrt{(1 + K[L]_T + nK[M]_T)^2 - 4nK^2[M]_T[L]_T} \right]$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

$$\Delta S^\circ = \frac{(\Delta H^\circ - \Delta G^\circ)}{T}$$

donde Vc es el volumen de la celda, $[L]_T$ es la concentración de ligando total y $[M]_T$ la concentración de la macromolécula total [80]

2.3. Resultados

2.3.1. Reducción de astringencia en vino por adición de BLG

Las muestras de suero se prepararon mediante una combinación de intercambio iónico y microfiltración y la astringencia se evaluó mediante un método de análisis desarrollado por Llaudy et al [79] que se basa en la precipitación de los taninos por ovalbúmina. Se decidió evaluar la astringencia por este método debido a que los autores reportaron una buena correlación entre el método de análisis y la evaluación sensorial de la astringencia en diferentes vinos. En nuestro trabajo, se modificaron los volúmenes de estándar necesarios para la preparación de las muestras y de la curva de calibración.

Realizamos tratamientos con proteínas sobre un vino de variedad *Merlot*, por ser uno de los cultivares tintos más extendidos y, en cuanto a sus propiedades sensoriales, uno de los más astringentes. El color transparente y brillante del vino comercial se volvió ligeramente turbio después de la adición de las proteínas, indicando la formación del complejo entre las proteínas y polifenoles [81]. El método de precipitación de ovoalbúmina utilizado para la estimación de la astringencia condujo a una disminución en la medida de A280 nm, debido a la precipitación de los taninos. Se preparó una gráfica que relaciona la concentración de albúmina con el logaritmo (Log) de la absorbancia [79]. La pendiente de las ecuaciones obtenidas a partir de las curvas logarítmicas aumentó con la concentración de ácido tánico (Figura 2.3). La curva de calibrado obtenida a partir de la concentración de ácido tánico y la pendiente fue lineal (coeficiente de regresión igual a 0,998).

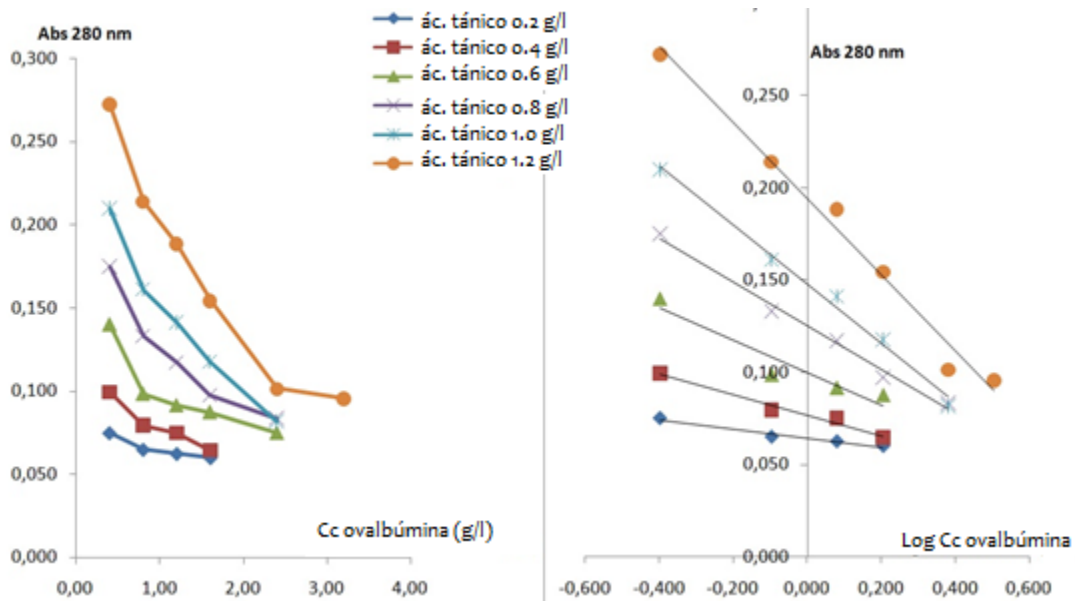


Figura 2.3: curva de calibrado del método analítico para astringencia, a) Abs280 vs concentración de ovalbúmina para las soluciones de estándar de ácido tánico, b) Abs280 vs Log concentración ovalbúmina.

La astringencia del vino control, sin tratar, fue de 0.535 mg/mL, dentro del rango de valores informado por Llaudy (0.112-0.566 mg/mL). La BLG fue utilizada en concentraciones de 0.1 y 0.5 (mg/mL), que pueden ser utilizadas comercialmente en clarificación de vinos por proteínas, donde, por ejemplo, la dosis máxima recomendada de caseína es 0,6 mg/mL [13]. La adición de BLG condujo a una disminución significativa en la astringencia del vino tinto comercial a las dos concentraciones de proteína estudiadas, expresadas en porcentaje de reducción del 19% (0,1 mg/mL) y 26% (0,5 mg/mL). La BLG estándar y la purificada tuvieron eficacias similares en la reducción de la astringencia y la reducción de la astringencia por BLG fue similar a la de la gelatina.

La reducción de la astringencia de estas proteínas fue comparable a la reportada [13] para el caseinato de potasio, un agente clarificante comercial que cuando se añadió a 0,6 mg/mL produjo una reducción de la astringencia del 19% en el vino. Se han reportado numerosos polifenoles capaces de interaccionar con diferentes tipos de proteínas, como la albúmina de suero bovino y albúmina- α amilasa humana [75]. Los taninos tienen mayor afinidad

por proteínas, polipéptidos y polímeros, cuánto más grandes y más altos en contenido de prolina sean, mejor. Además, favorece la interacción una estructura de proteína poco compacta, desenrollada tal como gelatina, mientras que la afinidad es más baja para las pequeñas proteínas globulares [82]. Pese a ésto, en nuestro trabajo pudimos demostrar que BLG, una proteína globular relativamente pequeña, fue capaz de interactuar con polifenoles para reducir la astringencia de manera similar a la gelatina.

2.3.2. Identificación de compuestos fenólicos por CLAE

Algunos fenólicos modelo representativos pudieron ser identificados en el vino empleado, utilizamos fenoles estándar para detectar cambios en su concentración cuando el vino se trata con BLG. Se analizaron, en orden de elución, los siguientes estándares: ácido gálico, catequina, ácido caféico, epicatequina y ácido p-cumárico (Figura 2.4a) de los cuales los primero 3 pudieron ser detectados en las muestras de vino analizadas. La Figura 2.4b muestra el perfil de CLAE de los polifenoles en el vino tinto antes y después de ser tratado con BLG y gelatina, utilizando un método adecuado para visualizar antocianinas y polifenoles de tamaño pequeño a medio. En general se observan pocos cambios respecto del cromatograma control, los tratamientos proteicos no alteraron los picos de fenólicos modelos detectados en el vino. En cambio, toda la región del espectro asociada a los taninos baja aproximadamente un 25% en altura de picos (y concentración), para ambos tratamientos proteicos. Estos datos abonan la teoría de que las antocianinas no son afectadas por el tratamiento en la misma medida que los taninos, como se puede observar por la reducción de astringencia producida. Un resultado similar había sido informado para gelatina [83], en ese caso la extensión de la interacción entre procianidinas y proteínas aumentaba con el grado de polimerización de la procianidina y la concentración de la proteína.

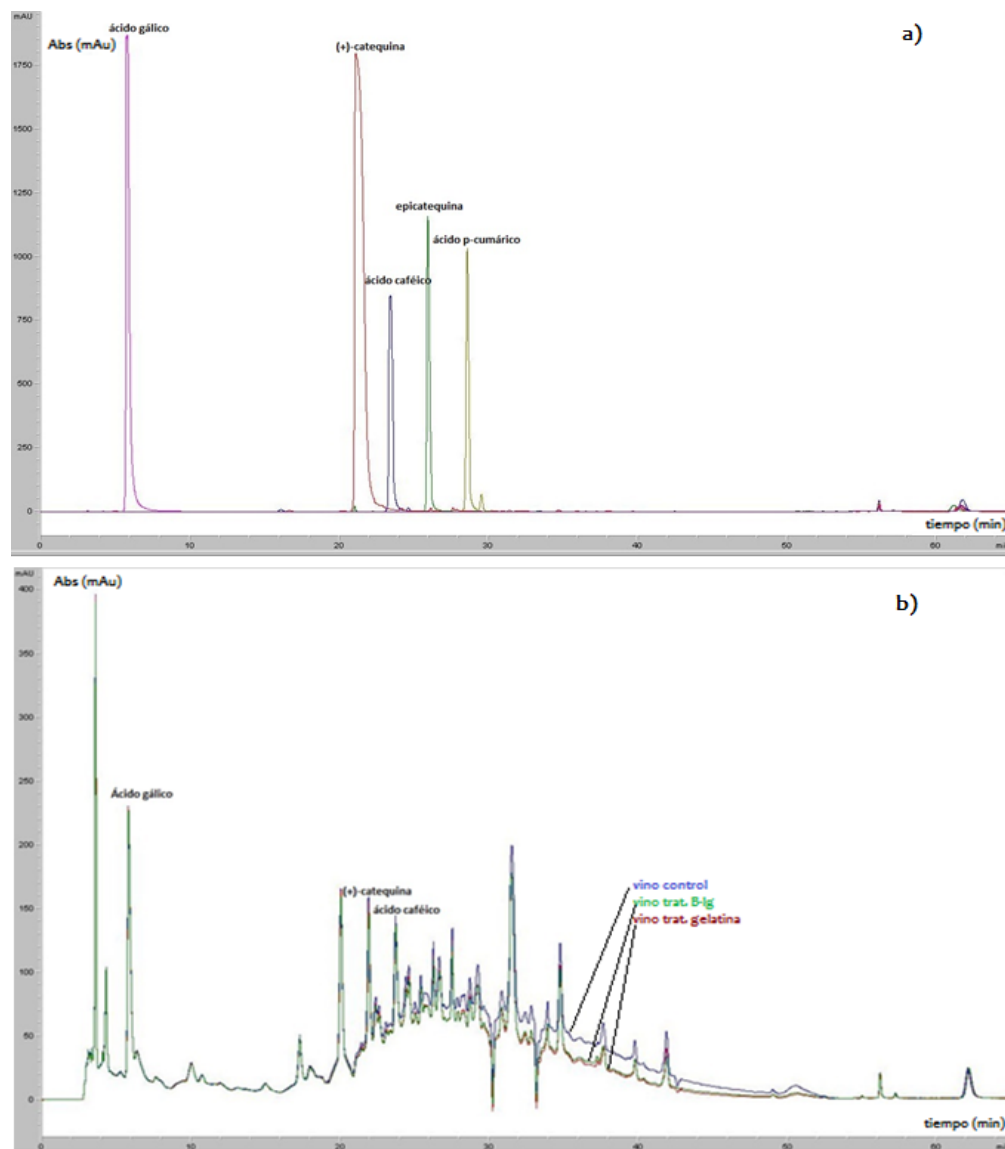


Figura 2.4: perfil de elución por HPLC de a) estándares utilizados para identificar polifenoles en el vino, b) superposición de las A280 obtenidas en los cromatogramas de vino control (azul), vino tratado con BLG (verde) y vino tratado con gelatina (rojo).

2.3.3. Análisis de trazas de proteínas en los vinos después de los tratamientos

Bajo una nueva directiva de la comunidad europea vigente desde 2012, los fabricantes de vino deben informar en su etiqueta los vinos que contengan más de 0,25 mg/L de residuos potencialmente alergénicos [84]. Para evitar la posibilidad de que exista un riesgo alergénico para los consumidores de vino derivada de su utilización, se evaluó la presencia de proteína residual en el

vino tinto. Para demostrar la ausencia de residuos del tratamiento, se disolvió la proteína BLG purificada en vino sintético, a la concentración utilizada en el tratamiento del vino y se analizó por CLAE su señal a diferentes concentraciones, Figura 2.5a. Luego, una muestra de vino se trató con BLG purificada en concentración 0,4 mg/mL de proteína. En la Figura 2.5b, se puede observar la muestra tratada y filtrada, en la cual no se pudo detectar señal de BLG (t.r. = 61 min). Se pudo demostrar que no hay residuos proteicos, ya que al preparar sucesivas diluciones, encontramos que el límite de detección de la BLG estuvo por debajo de 0.04 mg/mL, concentración a la cual aún pudimos visualizar claramente el pico de la proteína.

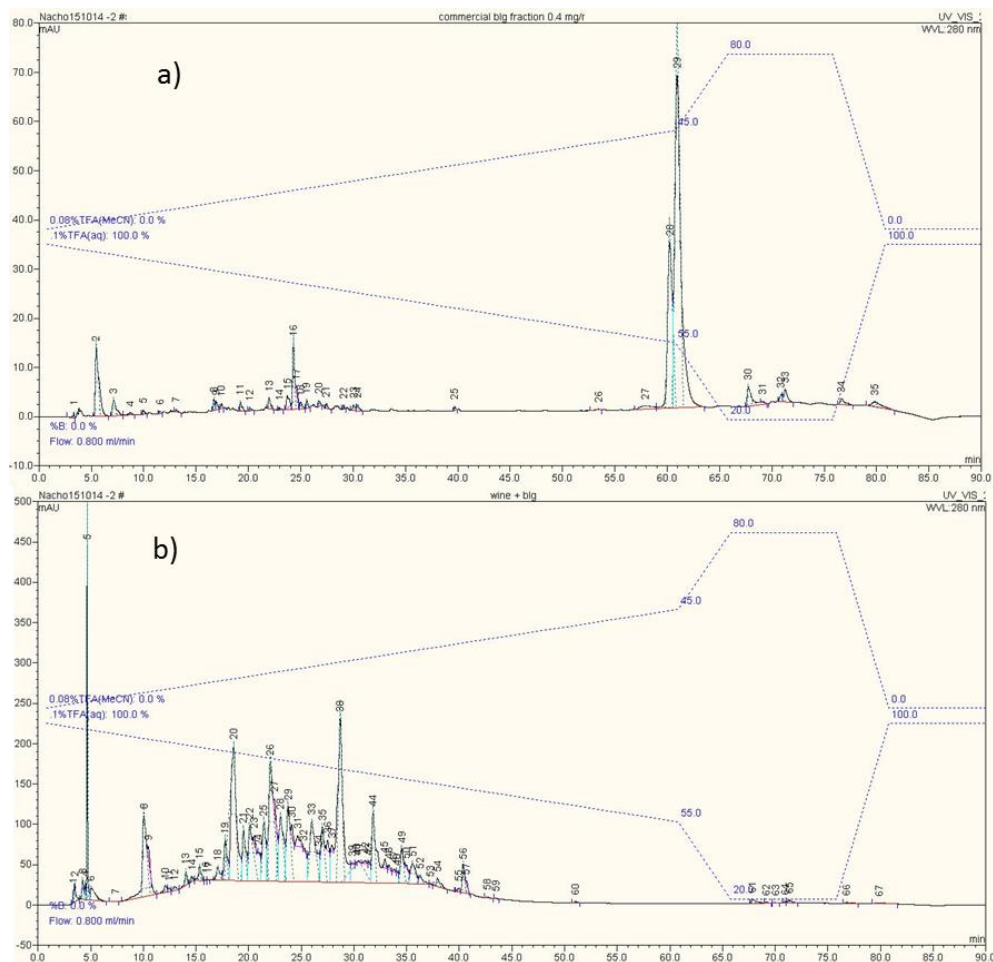


Figura 2.5: a) solución de BLG (0.4 mg/mL) en vino sintético, b) Vino tratado con BLG y filtrado.

2.3.4. Purificación de PFs por exclusión molecular y caracterización de la unión polifenol-proteína.

Se purificaron dos fracciones de compuestos a partir de un concentrado de vino, mediante cromatografía en Sephadex LH-20. Los cromatogramas obtenidos al analizar estos compuestos purificados por CLAE se encuentran en la Figura 2.6. La primer fracción (no tánica), fue obtenida por elución con metanol:agua y presenta unos pocos picos puros de t.r. bajos, polifenoles polares (PFPs), de relativamente bajo PM [85]. De acuerdo con el análisis por HPLC y comparación con estándares, detectamos algunos compuestos benéficos para la salud, como (-)-epicatequina y ácido p-cumárico. Siguiendo el método de purificación de Deaville, en la fracción final, eluida con acetona:agua, no hay dichos PFPs, sino una compleja mezcla de taninos purificados (TPs) [85].

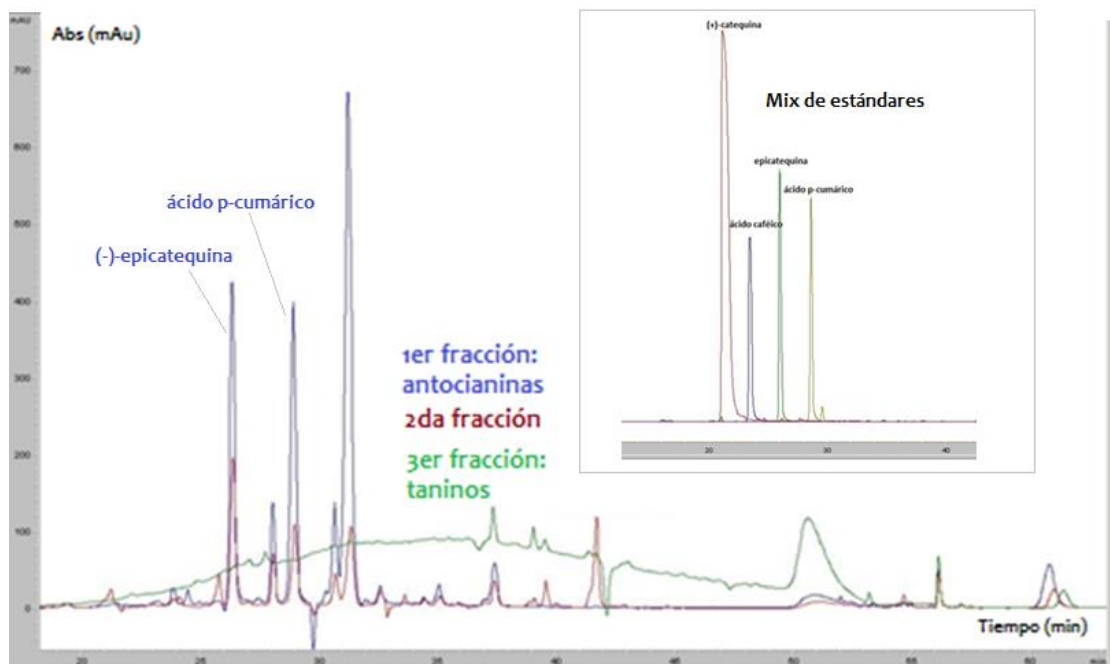


Figura 2.6: Detección de las distintas fracciones obtenidas en la purificación de antocianinas y taninos a partir de residuos de vino ($A = 280 \text{ nm}$).

Se utilizó CTI para estudiar la interacción de BLG y gelatina frente a los polifenoles purificados, sus ventajas son su sensibilidad elevada y la detección “universal” de interacciones que permite. CTI ya había sido utilizado para la medición de las interacciones entre proteínas y taninos, inclusive utilizando mezclas de fenólicos como ligandos en lugar de fenoles puros [33], [85], [86]. En este caso obtenemos información sobre un promedio de las interacciones que tienen lugar.

Se pudieron detectar interacciones apreciables para los taninos aislados, tanto con BLG como con gelatina, lo que demuestra una significativa afinidad de unión. Los valores obtenidos cuando los datos se ajustaron a un modelo de unión -de *n* sitios independientes y equivalentes- sugirieron en algunos casos una relación tanino:proteína elevada con una afinidad intermedia. Las isothermas de unión para la interacción de los taninos con proteínas se representaron gráficamente como cambios de entalpía vs relación molar fenol:proteína (Figura 2.7). Las constantes de unión en equilibrio (K) obtenidas para la interacción de taninos (10 mg/mL) con gelatina (0,2 mg/mL) fue de $2,17 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, Figura 2.7a y 2.7b, y la estequiometría de unión de 12,2 : 1. Debido a la alta viscosidad provocada por la gelatina en solución y la causada por la formación de complejos de tanino-gelatina, el equilibrio termodinámico entre las inyecciones se produjo lentamente, y los tiempos de equilibrio fueron aumentados. En el caso de la titulación de BLG con TPs, se utilizaron las mismas concentraciones y la constante de equilibrio obtenida fue de $2,71 \times 10^4$, con una estequiometría de 62,2 : 1 se obtuvieron para la reacción (Tabla II.I). En ambos casos, las afinidades resultaron intermedias.

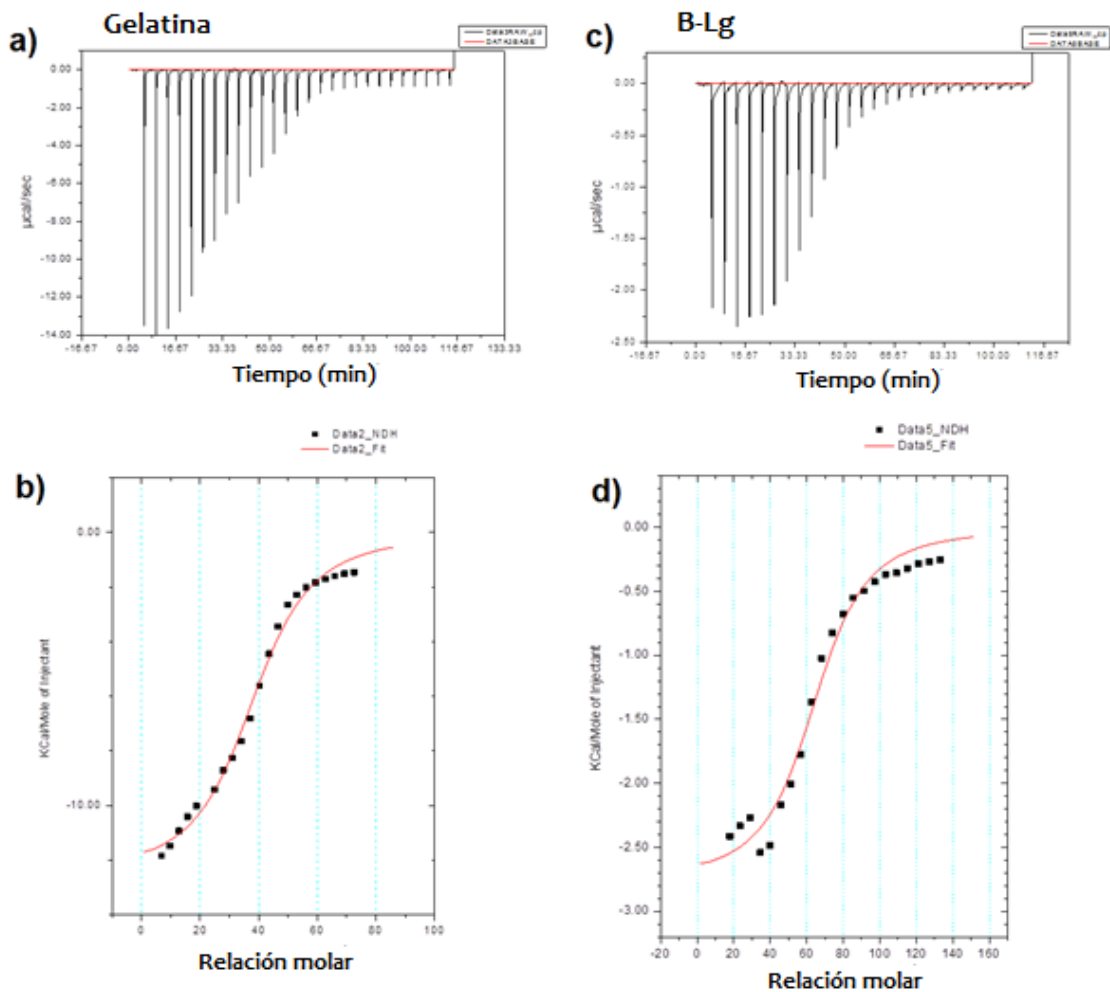


Figura 2.7: la curva de titulación a) e integración de la curva b) corresponden a las titulaciones de gelatina (0,2 mg/mL) usando TPs (10 mg/mL). La curva e integración c) y d) corresponden a las titulaciones de BLG (0,2 mg/mL) con TPs (10 mg/mL).

Por último, se midieron las interacciones de las proteínas seleccionadas y PFPs. Esta vez, no hubo interacción de los polifenoles con BLG o gelatina, lo que indicaría una baja afinidad de unión para ambos casos (Figura 2.8). Como puede observarse, Tabla II.I, un alto número de PFPs se unen inespecíficamente a ambas proteínas pero con muy baja afinidad (constantes de orden 10^1). Existe una mera adsorción física y no una unión específica ligando-macromolécula.

Muestras (jeringa/celda)		n	k (M ⁻¹)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol K)
TPs (10mg/mL)	Gelatina (0,2mg/mL)	12,2	2,17 10 ⁴	-7,10	-3,96
TPs (10mg/mL) +NaCl (200mM)	Gelatina (0,2mg/mL) + NaCl (200mM)	0,0388	3,76 10 ³	-	-
PFPs (10mg/mL)	Gelatina (0,2mg/mL)	20,5	1,91 10 ¹	-	-
TPs (10mg/mL)	BLG (0,2mg/mL)	62,2	2,71 10 ⁴	-13,9	-28,5
TPs (10mg/mL) +NaCl (200mM)	BLG (0,2mg/mL)+ NaCl (200mM)	44,7	1,93 10 ⁴	-11,7	-19,6
PFPs (10mg/mL)	BLG (0,2mg/mL)	19,3	2,68 10 ¹	-	-

Tabla II.I: Parámetros de unión y funciones termodinámicas de TPs y PFPs a gelatina y BLG determinados por ITC.

Los valores negativos obtenidos de ΔH (formación de enlaces) y ΔS (disminución del desorden) para ambas proteínas interaccionando con TPs, demuestran una naturaleza mayoritariamente electrostática de la interacción. El aumento de la fuerza iónica del medio por adición de NaCl 200mM provocó en ambos casos la disminución del número de moléculas unidas y de la afinidad de las proteínas por los TPs. Estos resultados son coherentes con el carácter electrostático de la interacción y muestran una mayor influencia de inhibición sobre el sistema TPs-gelatina que en TPs- BLG.

La BLG mostró un muy alto número de sitios de unión de muy baja afinidad, lo que indicaría que los PFPs podrían estar recubriendo la superficie de la proteína de un modo inespecífico, formando complejos incapaces de precipitar. Esto constituye otra evidencia de que el tratamiento puede mantener las propiedades terapéuticas del vino. En algunos casos se ha observado que BLG

puede aumentar la solubilidad de ciertos compuestos en vino, el resveratrol ha aumentado su solubilidad al complejarse con la misma [87].

2.4. Conclusiones

La proteína predominante del suero de leche, BLG, fue capaz de reducir considerablemente la astringencia del vino tinto, en concentraciones de entre 0,1 y 0,5 mg/mL en vino. Al comparar las estructuras de BLG con gelatina, el mayor peso molecular, la riqueza en prolina y la conformación desplegada podrían llevar a pensar que gelatina podría ser un poco más efectiva. Pese a ello, el tratamiento con BLG fue tan efectivo como la gelatina, que ya ha sido utilizada en tratamientos de vino tinto. Además BLG cumplió su función en niveles de concentración del mismo orden que la caseína, y, al igual que la ovalbúmina, no dejó trazas luego de su utilización en vino y filtración. Las medidas de afinidad por CTI confirmaron que la BLG interacciona con los taninos de forma similar que la gelatina y demostró ser un poco más selectiva, al reaccionar en menor medida con otros polifenoles de interés. Los resultados muestran que las proteínas de suero de leche pueden ser utilizadas como potenciales agentes reductores de la astringencia de vino tinto.

Capítulo 3: Recuperación de fenólicos extraíbles y no extraíbles del orujo de uva por optimización de su extracción sólido-líquido

El sol a cuyo alrededor giran tantos planetas... No se olvida de madurar un racimo de uvas

– Galileo

3.1. Introducción

La producción de vino es una de las actividades agrícolas más importantes del mundo, y algunos de los mayores productores son Francia, Italia, Estados Unidos, España, Argentina, Australia, Chile, Sudáfrica, China y Alemania [18]. Cuando las uvas, generalmente *Vitis vinífera*, son procesadas para la elaboración de vino tinto, las pieles y semillas están en contacto con el caldo de fermentación durante varios días y parte de los PFs son extraídos. Sin embargo, el residuo que queda después de la fermentación, llamado orujo de uva (OU), aún contiene altos niveles de polifenoles (PFs) [36]. Aproximadamente el 20% de las uvas procesadas se descarta en forma de OU. Por ende, la industria del vino produce millones de toneladas del mismo, que representan un problema de gestión de residuos, tanto en aspectos ecológicos como económicos [19]. La transformación deja una cantidad sustancial de residuos en forma de piel, semilla y pulpa que se descartan principalmente o se utilizan como fertilizante, previo compostado del mismo para bajar su bioactividad en los suelos (por su alta carga de PFs). Sin embargo, debido a su riqueza en dichos compuestos de alto potencial antioxidante, el OU podría ser explotado para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria [20], [88]. Algunos autores reseñaron los componentes funcionales del OU centrándose en su composición y propiedades biológicas [28].

La extracción de polifenoles depende de diversas condiciones de extracción (tiempo, solvente, relación solvente/muestra, tamaño de partícula) de acuerdo con la accesibilidad de los polifenoles en las diferentes matrices [89]. Los solventes tradicionales, como los solventes orgánicos de baja toxicidad, están entre los más utilizados para la liberación de polifenoles. Sin embargo, sin una fracción de agua, la acetona o metanol no permiten obtener un nivel óptimo de antioxidantes en los extractos desechos de uva en un trabajo sobre semillas de uva [90]. Además, las mezclas acuosas de etanol fueron mejores que un solvente mono-componente para la

extracción de semillas moscatel, es por eso que se prefiere el uso de mezclas de solvente orgánico con agua [91].

Preparando extractos “tradicionales” como los descritos en el párrafo anterior, se ha encontrado que una cantidad considerable de PFs quedan sin extraer y caracterizar. Estos compuestos fenólicos no extraíbles (FNE), podrían estar unidos a ésteres o atrapados formando enlaces con proteínas, polisacáridos, o paredes celulares [42]. Algunos de los trabajos donde se hace extracción de FNE incluyen la liberación de procianidinas de orujo de arándano [11] o de cáscaras de papa utilizando hidrólisis alcalina para liberar los compuestos unidos [12]. En estos casos se obtuvieron rendimientos más altos de FNEs que de extraíbles. Recientemente, se utilizó la hidrólisis alcalina para liberar los FNE a partir de residuos del coliflor [93]. Sin embargo, aún la gran mayoría de estudios sobre OU se han centrado casi exclusivamente en solventes que permiten la recuperación de compuestos extraíbles.

En Argentina se producen aproximadamente 1.600.000 toneladas de uva en 228.575 hectáreas de viñedos. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo a partir de orujo de uvas argentinas. Para la caracterización de los PFs y actividad antioxidante de extractos de OU Malbec, se han preparado extractos hidroalcohólicos [94]. Durante la última década, la variedad que más ha crecido en superficie en Argentina ha sido la variedad tinta Syrah, que representa aproximadamente un 6% de la superficie total de uva cultivada. Esta variedad es extensamente cultivada en la provincia de San Juan y también en San Rafael, regiones típicas representativas de la producción de esta uva.

En este trabajo se investigaron los extractos de pulpa de uva de San Rafael, para optimizar la obtención de PFs antioxidantes. El objetivo del estudio fue evaluar los factores de extracción (solvente, temperatura, tiempo) para obtener FE y FNE. También se realizó una optimización para encontrar las condiciones que maximizaran los rendimientos de las

respuestas, buscando a su vez, que los valores de tiempo y temperatura fueran mínimos. Una vez obtenidos extractos optimizados se caracterizaron sus PFs por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales

Los estándares usados para propósitos de identificación y cuantificación con CLAE-DAD: (+)-catequina, ácido gálico, quercetina, trans-resveratrol y ácido tánico se adquirieron de Saporiti Argentina y Sigma-Aldrich. Los solventes de calidad HPLC utilizados fueron de Sintorgan y J.T. Baker, el agua usada para tal fin fue de calidad milliQ. El orujo de uva tinta Syrah (*Vitis vinifera L.*) fue donado por BordeRío Bodega & Viñedos, Victoria, Entre Ríos, Argentina.

3.2.2. Caracterización de las muestras de OU

Las uvas de la variedad Syrah se obtuvieron de "Finca La Rosendo", San Rafael, provincia de Mendoza, Argentina. Las semillas y pieles de uvas, residuos de la elaboración del vino se secaron durante 4-5 días al sol, eliminando los tallos remanentes de forma manual. El análisis de contenido de materia seca fue realizado mediante el protocolo PROMEFA-v2 AOAC, 1990 N° 130.15 y N° 167.03, proteína bruta por AOAC, 1998 N° 976.05, fibra detergente neutro por método de Tecnología ANKOM 6-2011, validado con método de referencia ISO 16472:2006, fibra detergente ácida por ANKOM 5-2011 validado con método de referencia ISO 13906:2008, lignina detergente ácida por PROMEFA V2 para equipo ANKOM. Luego, OU fue molida hasta un tamaño de partícula adecuado y uniforme de entre 0,991-3,327 mm, utilizando un molino de laboratorio y tamices. Se almacenó hasta su uso a temperatura ambiente en la oscuridad, para evitar la degradación de PFs [95].

3.2.3. Preparación de extractos de FE y FNE a partir de OU

Utilizamos EtOH : H₂O (1:1) para la extracción de los FE y NaOH 2M para la liberación de los FNE, manteniendo todos los balones bajo atmósfera de N₂ durante las extracciones y cubiertos de papel de aluminio, para evitar la oxidación. La relación de solvente a sólido fue de 10:1, usando generalmente 1,5 g OU, en un balón de 50 mL. Las muestras de extracto fueron filtradas utilizando un filtro de jeringa para eliminar los sólidos

antes de diluir y realizar determinaciones de CFT y AA. Para determinar un rendimiento de extracto crudo de los extractos obtenidos en las condiciones optimizadas fueron estabilizados (sólo en el caso de los NaOH 2M), evaporados (sólo en el caso de los EtOH : H₂O (1:1)), y liofilizados (en ambos casos). Luego los rendimientos pesados fueron informados respecto de 100 g de muestra de OU seca.

3.2.4. Determinación de contenido fenólico total (CFT)

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (F-C) [96], cuyo reactivo contiene una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, la reacción con el sustrato involucra una reacción de reducción reversible de uno o dos electrones. Se preparó una curva de calibración usando ácido gálico como estándar (50 a 250 µg/mL). Las soluciones estándar se prepararon en buffer acetato, pH = 4, 200 mM y las muestras se diluyeron también en este solvente para tener un medio común independiente del solvente de extracción. Para que se produzca la reacción de color, se añadieron 1 mL de reactivo de F-C (dilución 1/10 en agua) a 20 µL de estándar o muestra, se agitó brevemente con vortex y se añadieron 500 µl de solución de carbonato de 7 % P/V. Después de mezclar en vortex, las muestras se colocaron en un baño de agua 40 °C durante 10 min. Finalmente, las muestras se enfriaron a T_{amb} en un baño de agua durante 5 min y se midió su Abs⁷⁶⁵ por triplicado. Los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico g (EG)/100 g muestra OU seca (M).

3.2.5. Determinación de actividad antioxidante (AA)

Se utilizó el ensayo de decoloración de radical [2,2'-azinobis-(ácido3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] (ABTS) [61]. El método se basa en la medición de capacidad antioxidante por equivalente de Trolox (CAET). El catión radical ABTS^{•+} fue generado por combinación con persulfato de potasio en un matraz y se dejó en agitación durante la noche. La extensión de la decoloración como porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} se determinó como una función de la concentración y se calcula en relación a la reactividad de Trolox como antioxidante estándar, en las mismas

condiciones. Las muestras se diluyeron apropiadamente en buffer de acetato pH = 4 200 mM, y las soluciones estándar se prepararon también en este buffer. Los resultados se expresan en mmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g M.

3.2.6. Diseño experimental

Habiendo determinado de forma preliminar que los factores en estudio afectan a las respuestas, se utilizó Design-Expert 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) para preparar un diseño experimental y analizar los datos. Para optimizar las respuestas CFT y AA, en base a los factores de extracción solvente, tiempo y temperatura, se utilizó un diseño hexagonal de Doehlert. El diseño supuso la realización de 10 experimentos, combinando seis puntos axiales y cuatro repeticiones del punto central, Figura 3.1. El valor óptimo se pudo establecer mediante la aplicación de la función deseabilidad de Derringer (D), donde los diferentes criterios se utilizaron de forma simultánea para todas las respuestas y factores en estudio.

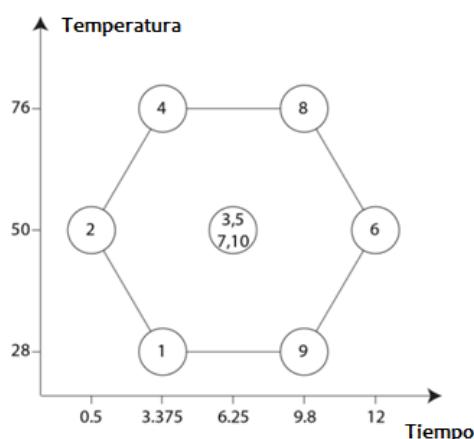


Figura 3.1: diseño hexagonal utilizado para la optimización de la extracción de PFs.

3.2.7. Caracterización de PFs por CLAE-DAD

Las muestras de los extractos obtenidos en las condiciones optimizadas fueron analizadas por CLAE-DAD. Para tal fin, las muestras alcalinas (5

mL) se colocaron en tubos de centrifuga de 15 mL y después se estabilizaron mediante la adición de 5 mL de HCl (1,4 M). Luego, las muestras alcalinas e hidroalcohólicas se centrifugaron durante 5 min a 3000 RPM y los sobrenadantes se filtraron (0,45 μ m) e inyectados en el sistema cromatográfico. Los polifenoles en los extractos fueron separados e identificados mediante un sistema Dionex Ultimate 3000 CLAE (Dionex, Germering, Alemania), con una columna C18 Zorbax Eclipse XDB (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m; Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Como fases móviles, se utilizaron Agua milliQ con ácido acético al 1% (A) y MeOH (B), en el siguiente gradiente: 0 min, 10% B; 25 min, 27% B; 40 min, 50% B; 45 a 54 min, 80% B; 54,1 a 59 min, 10% B. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y para el detector de arreglo de diodos se usó un rango de adquisición de 200 a 600 nm. La temperatura del horno de columna fue de 35 °C y el volumen de inyección de 20 μ L para extractos hidroalcohólicos, 10 μ L para extractos alcalinos y entre 1-5 μ L para compuestos estándar preparados en concentraciones entre 0.02 y 1 mg/mL. La identificación y cuantificación de polifenoles se basó en la comparación de los tiempos de retención (t.r.) y los valores máximos de absorbancia de picos detectados en las muestras con los obtenidos por inyección de patrones puros. Las muestras se cuantificaron mediante el uso calibración externa pico a pico con patrones puros diluidos a las concentraciones adecuadas.

3.2.8. Caracterización de PFs en extractos optimizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CLAE-EM)

Para permitir la identificación de PFs y tener mayor conocimiento en cuáles pueden ser liberados al preparar cada extracto, y relacionarlos con la AA observada, las muestras optimizadas fueron analizadas por CLAE-EM. Para tal fin, las muestras se prepararon de forma similar a la sección 3.2.7 previo a su inyección y la separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna Hypersil gold C18 (100 x 2,1 mm x 3 μ m, Thermo Scientific). La fase móvil utilizada fue la mezcla de NH₄Ac (A) 5 mM y metanol (B). El gradiente fue de la siguiente forma: 0 - 3 min, se utilizaron

15% de B; de 3 - 8 min, 85% de B y finalmente entre 8,1 y 15 min un 15% de B. El caudal utilizado fue de 0,25 mL/min, la temperatura de columna de 40 ± 1 °C y el volumen de inyección, 10 μ l. El sistema de detección por EM comprendió una fuente de ionización por electrospray acoplada a espectrómetro de masas triple cuádrupolo Quantum Access TSQ (Thermo Scientific, Mississauga, Ontario, Canadá). La ionización por electrospray se estableció en polaridad positiva y la presión del gas de colisión fue de 15 mTorr, en el intervalo de 50-500 m/z. La identificación de un compuesto siguió los principios de medición de la masa de los iones padres, así como aparición de los fragmentos correspondientes y su coincidencia en tiempo de retención (t.r.).

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis del orujo de uva y extracciones preliminares a temperatura constante

Los residuos de semillas y pieles de uvas Syrah de San Rafael, Mendoza, Argentina se secaron durante 4-5 días al sol, eliminando los tallos remanentes de forma manual. Dicho residuo fue analizado previo a la extracción de fenólicos, se detectó un contenido de materia seca de 92,38 %, proteína bruta de 10,03 %, fibra detergente neutro de 27,03%, fibra detergente ácida 22,35 % y lignina detergente ácida de 14,98%.

Previo a las extracciones, el OU fue molido hasta un tamaño de partícula adecuado y uniforme de entre 0,991-3,327 mm, utilizando un molino de laboratorio y tamices. Se almacenó hasta su uso a temperatura ambiente en la oscuridad, para evitar la degradación de PFs [95]. Para el análisis de los extractos preparados, la determinación de fenoles se realizó por Folin-Ciocalteu, usado en el control de rutina de productos alimenticios, también empleado en la industria del vino, donde el ácido gálico se emplea como estándar [97]. Se compararon los valores en su correlación con la actividad antioxidante de los extractos. Para determinar la actividad antioxidante, se utilizó el método CAET, que se ha aplicado al estudio de extractos de alimentos [98]. La adición de nuestros extractos a la solución ABTS induce una rápida disminución de la densidad óptica a 734 nm. A mayor concentración de antioxidante, menor la cantidad remanente de ABTS (mayor disminución del color), y más alta fue la actividad de eliminación de radicales libres en dicho extracto.

Algunos autores extrajeron orujo de uva con solvente hidroalcohólico llevando a rendimientos máximos interesantes de CFT [99]. Otros, reportan que, en muchas matrices vegetales, los fenólicos no extraíbles (FNE), obtenidos con hidrólisis alcalina o ácida, se encuentran en una proporción mucho mayor que los extraíbles. En cuanto a la relación de solvente a sólido, se conoce que a una relación más alta, mayor será la cantidad total de sólidos obtenidos, en consistencia con los principios de

transferencia de masa [34]. Otros autores reportaron que una proporción de solvente:muestra de 9:1 (v:p), fue el más adecuado para la máxima extracción de compuestos fenólicos, independientemente del solvente de extracción [99].

En nuestro trabajo, mantuvimos un valor de 10:1 (v:p) en todas las extracciones, tanto preliminares (a temperatura constante) como del diseño de experimentos posterior. Preparando extractos a temperatura constante (50 °C), determinamos la capacidad de ambos solventes para obtener extractos ricos en PFs, mediante extracciones de OU Syrah. Se obtuvieron muestras a distintos tiempos, para cada solvente, las extracciones presentaban diferentes escalas de tiempo, entre 0 y 700 min para NaOH 2M y entre 0 y 22 h para EtOH : H₂O (1:1).

Se puede observar valores relativamente altos en muy poco tiempo, tanto para FE como para FNE de OU. Comenzando por los FE, cuando se extrajo el orujo usando EtOH : H₂O (1:1), por cinco minutos, se obtuvieron 0,91 EAG/100 g OU, un 24% del CFT máximo (3,80 EAG/100 g OU). La AA, por su parte fue de 8,0 mmol ET/ 100 g OU (36% de la actividad antioxidante máxima, 22,0 ET/100 g M), Figura 3.2a y 3.2c. En 30 min, se obtuvo el 57% del CFT máximo en este solvente, y se alcanza el 64% de la actividad antioxidante. Es decir, a partir de cierto punto, tiempos prolongados de extracción no llevan a la obtención de rendimientos muy superiores. En el trabajo de Spigno sobre extractos hidroalcohólicos de OU, se pudo observar la degradación aparente de PFs en extractos de este tipo, tras 20 h de extracción [36]. En nuestro caso, el proceso de degradación no se produce en este solvente, sino que el valor aumenta, aunque muy lentamente después de las 10 h, hasta alcanzar un valor máximo en 22 h.

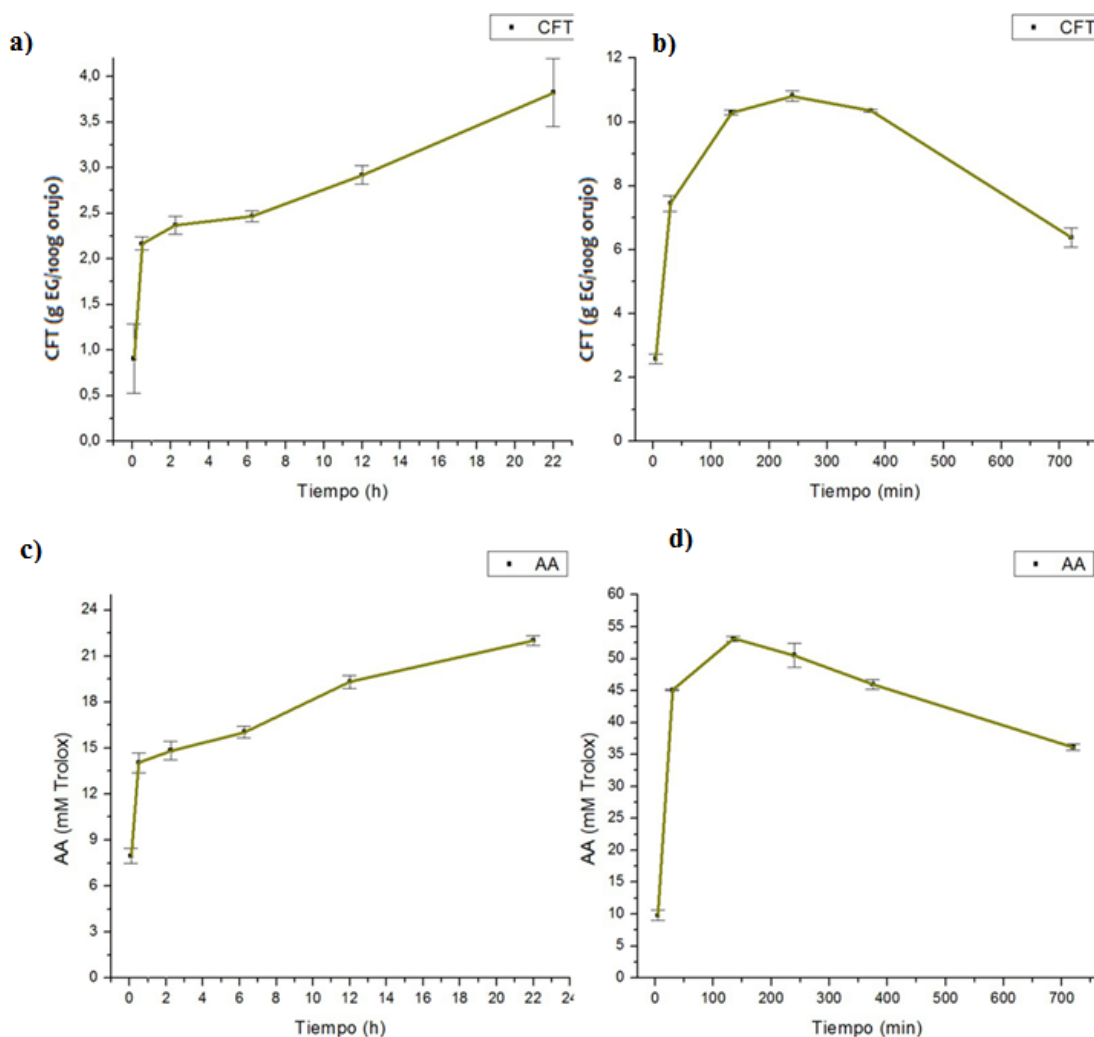


Figura 3.2: a) CFT y c) AA en virtud de la extracción con EtOH : H₂O (1:1) a 50 °C. b) Valores de CFT y d) AA usando NaOH 2M a 50 °C.

En la Figura 3.2b y 3.2d se observan las respuestas en la extracción en solvente alcalino. Cuando se utilizó NaOH 2 M por cinco minutos, se obtuvieron 2,6 EAG/100 g (24% de la más alta extracción fenólica), y se obtienen 9,8 ET/100 g muestra (18% de la actividad máxima antioxidante). Los valores de actividad antioxidante obtenidos en cinco min son comparables con EtOH : H₂O (1:1). Lógicamente, ese valor a tiempo bajo tiene poca dependencia del solvente utilizado, ya que no es suficiente para producir hidrólisis que libere los fenólicos unidos en gran medida. En 30 min (a 50 °C), se obtiene el 69% del valor más alto de CFT

y el 85% de la AA máxima. Esta última opción sería probablemente la más prometedora, por eficiente y medioambientalmente amigable de este solvente, entre las estudiadas preliminarmente. Es evidente que un tiempo de extracción de 200 min fue suficiente para obtener el máximo de AA a esa temperatura. El aumento adicional del período de extracción da lugar a procesos que consumen tiempo excesivo, donde se beneficia la degradación. En el trabajo de White, la hidrólisis alcalina utilizando NaOH ya se había aplicado anteriormente para liberar procianidinas en frutas de la misma familia, en un trabajo sobre orujo de arándanos secos. En dichos extractos se produjo una depolimerización de fenoles, aumentando los rendimientos reduciendo los tiempos de extracción [51]. Para corroborar estas observaciones y optimizar la extracción de FE y FNE a partir de OU de uvas Syrah, llevamos a cabo un diseño de experimentos.

3.3.2. Diseño experimental para optimizar la extracción de FE Y FNE

Los métodos de prueba y error, o procedimientos de optimización sistemática para la extracción de antioxidantes consumen mucho tiempo y sólo permiten arribar a un valor óptimo *aparente* de las variables en estudio. Usando esos métodos, el ajuste de las condiciones del experimento se realiza de forma secuencial de a un parámetro de extracción por vez, en lugar de tomar en cuenta a todos al mismo tiempo. Por otra parte, en esos casos, la información relativa a la sensibilidad de la respuesta con respecto de los factores y la posible interacción entre dichos factores no está disponible.

En cambio, empleando diseño de experimentos, podemos llegar a un resultado óptimo *verdadero*, en menos tiempo y menor número de experimentos, teniendo en cuenta todos los factores a la vez. Las metodologías de optimización de respuesta se han aplicado a la caracterización fenólica de las variedades de uva champán, mostrando buena correlación entre el modelo y los resultados experimentales independientes [100]. También se han utilizado para optimizar la

extracción de compuestos fenólicos a partir de uvas en la matriz de *Vinho verde* [101]. En otro caso, se aplicó un diseño de optimización factorial 2^2 para estudiar el efecto de la temperatura y del caudal de solvente en el rendimiento de polifenoles de uva [71].

Utilizamos un diseño hexagonal de Doehlert (Figura 3.1, materiales y métodos). Este diseño tiene algunas características interesantes, si se compara con uno central compuesto, ya que proporciona la posibilidad de elegir un número diferente de niveles para cada factor. Por ese motivo evaluamos tres niveles de temperatura y cinco niveles de tiempo [102]. Por inspección visual de las Figura 3.2, se podría asumir que los dos factores evaluados influyeron en la respuesta CFT, el solvente de extracción, y tiempo de extracción. Ya habíamos determinado en un trabajo previo que la temperatura afectaba la extracción y sería incluida en el diseño.

Al ser el solvente de extracción una variable que afecta el rango del tiempo, debieron realizarse dos diseños independientes. Teniendo en cuenta la diferencia en la escala de tiempo para cada solvente, se eligieron valores apropiados en cada diseño; por otra parte, los valores de la variable temperatura fueron los mismos en ambos diseños. Asimismo, el diseño hexagonal también fue común a ambos solventes, combinando cuatro repeticiones del punto central y seis axiales. En nuestro diseño usamos distintos rangos de tiempo en base a los resultados preliminares, reduciendo un poco la escala de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en cada solvente. Para la extracción alcalina, se utilizó 30-240 min, y para la hidroalcohólica, 0,5 a 12 h, evitando la estabilización de los valores o la descomposición de PFs antioxidantes anteriormente observadas. Además, conservamos la relación solvente: sólido (10:1). Los valores obtenidos experimentalmente para las dos respuestas analizadas se muestran en la Tabla III.1a (extractos hidroalcohólicos), Tabla III.1b (extractos alcalinos) y Figura 3.3.

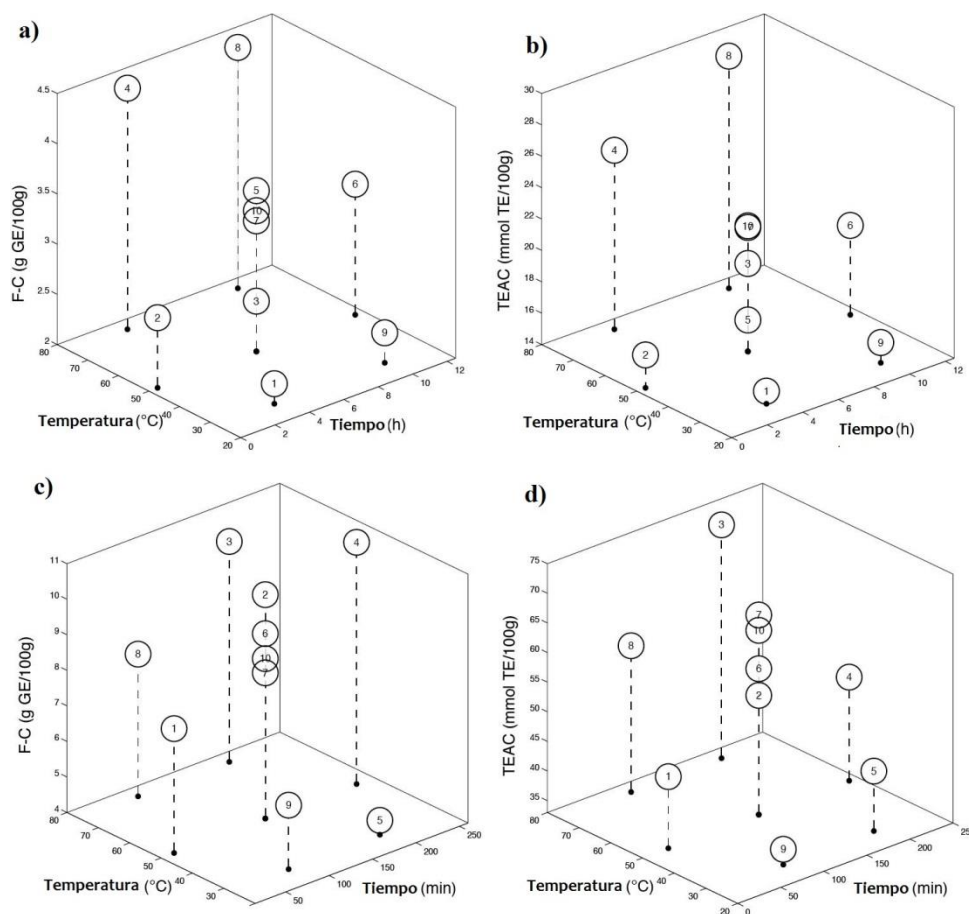


Figura 3.3: valores de las respuestas del diseño en a) CFT y b) AA en EtOH:H₂O (1:1). c) CFT y d) TEAC en NaOH 2M.

Los rendimientos fenólicos para los extractos hidroalcohólicos en este trabajo fueron más altos que las encontradas en extracción continua de OU (1,7-2,2 g EAG/100 g M) [34]. También fueron superiores a otro proceso continuo, en un extractor vertical a escala de laboratorio que permitió la obtención de 1,53 g EAG/100 g OU [71]. En el caso de nuestro orujo de uva Syrah, los PFs antioxidantes en extractos alcalinos, recuperación de FNE, fue mucho mayor que la de FE obtenida mediante solvente hidroalcohólico. Más aún, el contenido de compuestos fenólicos fue relativamente alto respecto de los reportados para las semillas de uva (de 5,2 a 6,6 g EAG/100 g OU) [103], aun cuando en ese caso la extracción se vio favorecida por microondas. En el caso de seis residuos de

frutas de la India, se informaron valores de fenólicos que van desde 0,37 hasta 3,74 g EAG/100 g OU [104].

a. Extracción con EtOH : H2O (1:1)				
Exp	t (h)	Temp. (°C)	F-C (g EAG/100g OU)	AA (mmol ET/100g OU)
1	3,375	28	2,2	14,8
2	0,5	50	2,7	16,1
3	6,25	50	2,5	19,6
4	3,375	76	4,4	25,4
5	6,25	50	3,6	16,0
6	12	50	3,3	19,7
7	6,25	50	3,3	21,9
8	9,8	76	4,4	28,8
9	9,8	28	2,3	15,3
10	6,25	50	3,4	22,0

Tabla III.1a: resumen de las respuestas experimentales (CFT y AA) de los extractos preparados con EtOH : H2O (1:1).

b. Extracción con NaOH 2M				
Exp	t (min)	Temp. (°C)	F-C (g EAG/100g OU)	AA (mmol ET/100g OU)
1	30	50	7,5	45,1
2	135	50	10,3	53,1
3	187,5	76	10,2	72,4
4	240	50	10,8	50,5
5	187,5	28	4,4	43,1
6	135	50	9,2	57,6
7	135	50	8,1	66,7
8	82,5	76	8	57,7
9	82,5	28	5,8	35,6
10	135	50	8,5	64,1

Tabla III.1b: resumen de las respuestas experimentales (CFT y AA) de los extractos preparados con NaOH 2M.

En cuanto a la AA de los extractos preparados, también presentaron una importante capacidad de eliminación de radicales al ser medidos por CAET, desde 14,0 hasta 72,4 mmol ET/100 g OU. En el caso de los FNE del orujo Syrah, se encontró que tienen un gran potencial para aplicaciones antioxidantes. Los rendimientos obtenidos superaron la muchos de los informes reportados, el mismo ensayo de TEAC mostró diferencias significativas al analizar el perfil antioxidante en nueve variedades de uva españolas (22.5 - 59,4 mmol ET/100 g de OU) [105]. Esto también quiere decir que la capacidad antioxidante depende mucho de la variedad de uva. Además, en el caso de orujo de Pinot noir, se

reportaron valores de hasta 46,6 mmol Trolox/100 g [106], que tampoco fueron superiores a los hallados aquí.

En la extracción hidroalcohólica, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de las respuestas de acuerdo con el modelo lineal. En el caso de CFT, el valor de F de 18,8 implicó que el modelo lineal fue significativo, con una probabilidad del 0,15% que pueda deberse al ruido experimental. Valores de probabilidad $> F$ inferiores a 0,05 indican términos del modelo significativos, mientras que valores superiores a 0,1 indican términos del modelo no significativos. La temperatura (0,001) fue el único término importante que afecta a la CFT, pese a eso se mantuvo el factor tiempo para la construcción del modelo. La falta de ajuste ($\text{Prob} > F = 0,923$) no fue significativa en relación con el error puro. En el caso de la respuesta de la actividad antioxidante, el modelo lineal es significativo y la temperatura fue el único término significativo Tabla III.2a.

CFT, Extracción EtOH : H2O (1:1)			
ANOVA para modelo lineal			
Fuente	valor-F	Prob > F	
Modelo	18,798	0.0015	Significativo
tiempo	0,604	0.4625	
Temp.	29,684	0.0010	
Falta de ajuste	0,2	0.9230	No signif.

AA, Extracción EtOH : H2O (1:1)			
ANOVA para modelo lineal			
Fuente	valor-F	Prob > F	
Modelo	18,364	0.0016	Significativo
tiempo	3,257	0.1141	
Temp.	23,211	0.0019	
Falta de ajuste	0,236	0.9013	No signif.

Tabla III.2a: ANOVA de los modelos construidos para la superficie de respuesta en extracción hidroalcohólica.

Para el caso de la extracción de NaOH 2 M, la respuesta CFT fue mejor ajustada por un modelo cuadrático, Tabla III.2b. La temperatura, y temperatura² son los términos significativos del modelo y la falta de ajuste es no significativa. Además, el tiempo (Prob>F de 0,097) está en la zona límite de consideración, por lo que es conveniente considerarlo para el modelo de optimización La actividad antioxidante, en cambio, fue mejor

representada por el modelo lineal, con la temperatura siendo significativa para la extracción.

CFT, Extracción NaOH 2M			
ANOVA para modelo cuadrático			
Fuente	valor-F	Prob > F	
Modelo	8,419	0.0143	Significativo
tiempo	3,862	0.0970	
Temp.	17,507	0.0058	
Temp. cuadrada	9,205	0.0230	
Falta de ajuste	1,543	0.3650	No signif.
AA, Extracción NaOH 2M			
ANOVA para modelo lineal			
Fuente	valor-F	Prob > F	
Modelo	5,71	0.0338	Significativo
tiempo	1,423	0.2718	
Temp.	9,997	0.0159	
Falta de ajuste	2,174	0.2748	No signif.

Tabla III.2b: ANOVA de los modelos construidos para la superficie de respuesta en extracción alcalina.

Los residuos (errores de predicción) se evaluaron para asegurar la satisfacción de las hipótesis estadísticas correspondientes al análisis de la varianza. Se presenta el gráfico de probabilidad normal de los residuos

studentizados en la Figura 3.4. Un patrón no lineal indicaría una falta de normalidad en el término de error, sin embargo, no pudimos ver señales de problemas en los datos.

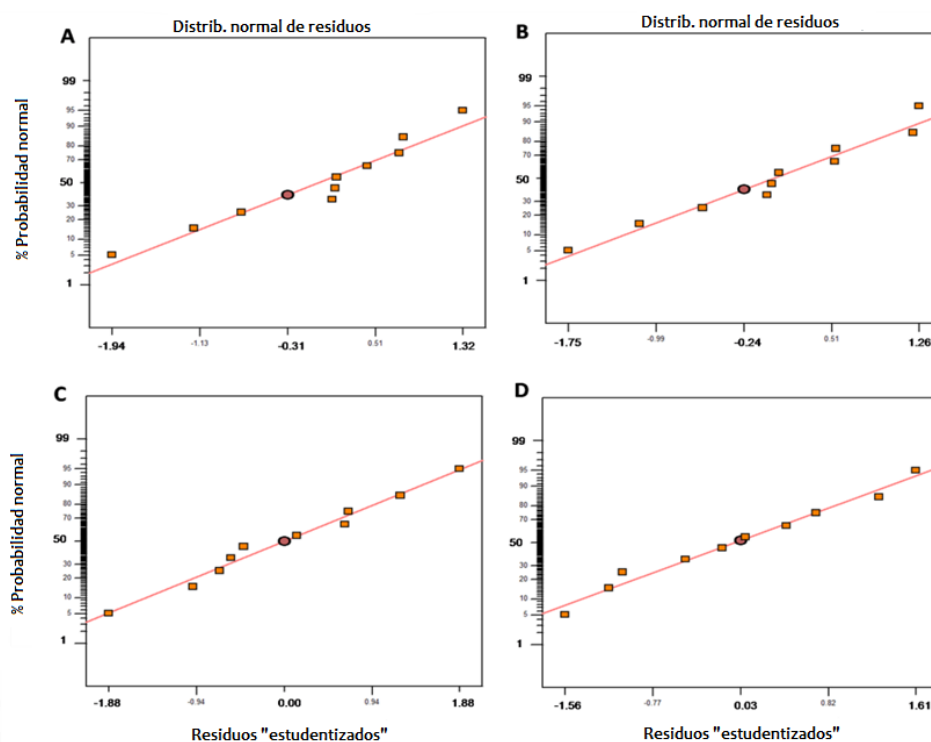


Figura 3.4: análisis de residuos de a) CFT y b) TEAC en EtOH : H₂O (1:1). c) CFT y d) TEAC en NaOH 2M.

Estos rendimientos, podrían ser mejorados si se estudia la mejor forma de pre-tratar los residuos de OU de cara a la extracción. Encontramos literatura que apoya la hipótesis de que el CFT puede variar en gran medida en función de pre-tratamientos empleados. Por ejemplo, tratamientos de secado más cuidadosos que el secado al sol podrían producir mayores rendimientos de CFT y AA [107]. Finalmente, el secado de los residuos de bodega en condiciones de temperatura no controlada, podría reducir el rendimiento de fenoles extraídos [95]. En dátiles, se

informó además que la AA y el CFT variaban entre los frescos y secados al sol, una parte de sus componentes antioxidantes se pierde durante el secado [108].

3.3.3. Correlación entre CFT y la AA en los extractos.

En los antecedentes, se demostró una correlación alta y significativa entre la actividad antioxidante y el CFT en muestras de OU [105]. Además, en el análisis de 12 vinos comerciales, CFT y AA también estuvieron altamente relacionados ($R^2 = 0,9268$), todo esto proporciona fuertes evidencias de que la fuente predominante de actividad antioxidante deriva de compuestos fenólicos en el vino [97]. Sin embargo, otros autores encontraron que en el caso de los extractos de fenólicos extraíbles, el extracto hidroalcohólico mostró el mayor CFT, pero no exhibió la mayor actividad antioxidante. En ese caso, no se encontró buena correlación entre el CFT y la actividad antioxidante de los extractos [99].

En nuestro trabajo, una alta correlación entre el CFT y AA ya podía ser anticipada por la inspección de la Figura 3.2, donde ambas respuestas siguieron la misma tendencia en cada solvente. Evaluamos estadísticamente la correlación lineal de a pares de Pearson. Se confirma una alta correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante. En el caso hidroalcohólico, el valor de R^2 fue 0,893 (valor $p = 3.31 \times 10^{-9} < 0,01$), indicando que alta correlación, mientras que en el caso extractos alcalinos fue menor, con $R^2 = 0,681$ (valor $p = 3.31 \times 10^{-9} < 0,01$), en la Figura 3.5, se puede ver la relación lineal entre ambas respuestas. Curiosamente, las pendientes en ambas correlaciones lineales son similares, 5,6 y 5,7, es decir que ambas respuestas parecen mantener una relación con independencia del solvente. Esto se encuentra en concordancia con el trabajo de Spigno et al, donde el poder antioxidante (por el mismo ensayo CAET) estuvo altamente correlacionado con el CFT, y no fue influenciado por la proporción de agua en etanol [36].

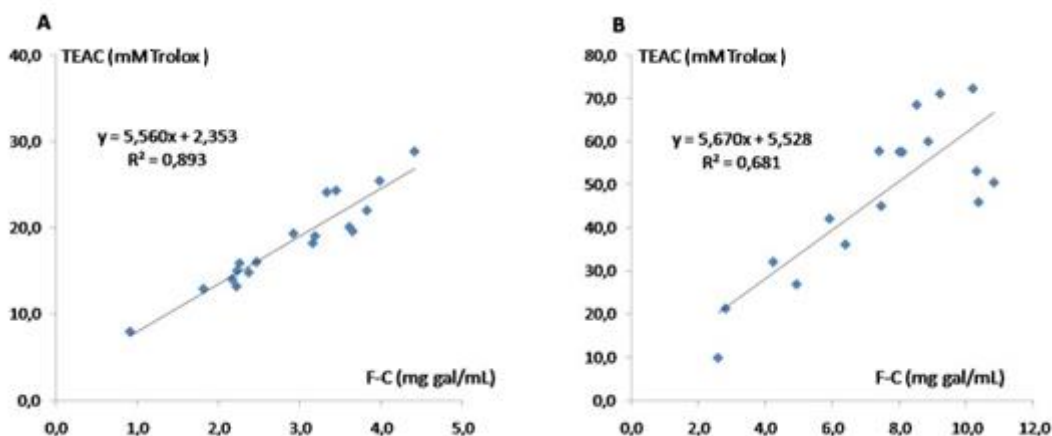


Figura 3.5 a) correlación lineal entre las respuestas AA y CFT en EtOH : H₂O (1:1). b) Correlación de las respuestas en NaOH 2M.

3.3.4. Optimización simultánea de la temperatura y el tiempo de extracción de FE y FNE usando la función deseabilidad (D)

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta [109], que ya fue utilizada para la optimización de la extracción de fibra antioxidante de OU [106], para la extracción de los polifenoles a partir de uvas rojas, entre otros ejemplos [13]. Varios criterios de toma de decisiones se pueden aplicar a la optimización de la extracción. Hay muchas formas en las que combinar los criterios individuales, una de las más utilizadas en optimización se conoce como función de deseabilidad (D) [111]. Dicha función se ha aplicado a la extracción de compuestos fenólicos, para la evaluación de temperatura de extracción, tiempo, y relación de sólido-líquido [110]. La función D permite optimizar los valores deseados de los factores y las respuestas de forma simultánea:

$$D = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{1/n}$$

donde D es el valor de la función de deseabilidad global, d_i es la función de deseabilidad parcial para cada una de las n respuestas y r_i es la importancia relativa asignada a la respuesta i. Con la meta de maximizar

las respuestas, conservar potenciales aplicaciones industriales, y tener en cuenta la sostenibilidad del proceso. Los criterios incluyen una cierta importancia mínima para minimizar el tiempo ($r_i = 1$) y la temperatura ($r_i = 1$), y para maximizar el valor de CFT ($r_i = 1$), y una importancia mayor para la AA ($r_i = 3$), porque consideramos que es la variable de mayor interés y aplicación.

Siguiendo las restricciones anteriormente mencionadas, se obtuvieron las curvas de superficie de la deseabilidad (Figura 3.6). Podemos confirmar que la extracción máxima se alcanza dentro del rango de condiciones consideradas. Los valores máximos de D se obtuvieron con tiempos de extracción y temperaturas intermedias.

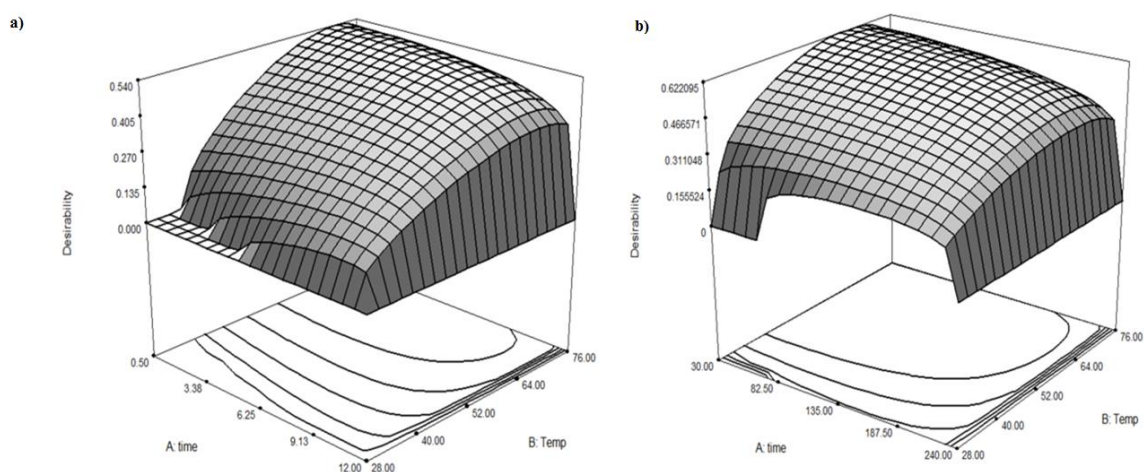


Figura 3.6: a) superficie de respuesta de la D en EtOH : H₂O (1:1) b) superficie de respuesta de la D en NaOH 2M.

La optimización se llevó a cabo para obtener los valores de los factores y las respuestas en la Tabla III.3 a). Para el solvente hidroalcohólico, bajo los criterios elegidos, el modelo sugiere una temperatura de 70,7 °C y un tiempo de 37 minutos. Eso permitiría obtener valores predichos de 4,1 g EAG/100 g OU y 22,8 mmol ET/100 g OU, y una deseabilidad de 0,54. Un valor aparentemente bajo de deseabilidad está relacionado con la

búsqueda de condiciones que son antagónicas entre sí. Por ejemplo, minimizar la temperatura está en contra de maximizar la actividad antioxidante. Sin embargo, esta deseabilidad en apariencia baja permite obtener un valor de AA del 80% del máximo. Sin embargo, dicho valor máximo, 28,8 mmol ET/100 g OU, sólo se puede alcanzar utilizando condiciones extremas dentro del rango, de 76 °C y 21 h de la extracción. Cuando se realizaron experimentos independientes fijando los valores optimizados de ambos factores, se obtuvieron respuestas de 3,9 g EAG/100 g OU y 22,8 mmol ET/100 g OU. Esto implica que efectivamente valores altos en contenido de compuestos fenólicos y en capacidad antioxidante se pudieron obtener en tiempos de extracción notablemente cortos, y temperaturas moderadas. Además, para comprobar el supuesto de que la temperatura es el factor de mayor importancia, hicimos una predicción usando una temperatura inferior. Cuando se utilizó el mismo tiempo de optimización, 37 min, y 60 °C, se obtuvieron valores de 3,7 g EAG/100 g OU y 22,0 mmol ET/100 g OU, en concordancia con la predicción.

Finalmente, se llevó a cabo la optimización de la extracción alcalina, Tabla III.3b. El modelo predijo que una temperatura de 63,5 °C y un tiempo de 30 minutos permiten al proceso rendir valores de 8,5 g EAG/100 g OU y 61,3 mmol ET/100 g OU, con una $D = 0,62$. Cuando se utilizaron dichos parámetros, se obtuvieron 8,5 g EAG/100 g OU y 61,4 mmol ET/100 g OU, en excelente acuerdo con los valores previstos. Además, se preparó un extracto usando 30 min y una menor temperatura: 56 °C. Esto permitió obtener 8,4 g EAG/100 g OU y 58,7 mmol ET/100 g OU, de acuerdo con la predicción. Se confirma el buen poder predictivo del modelo preparado.

a. Criterios de optimización para ambos solventes				
Factor/respuesta	Objetivo	ri		
Tiempo	minimizar	1		
Temperatura	minimizar	1		
CFT	maximizar	1		
AA	maximizar	3		
b. Factores optimizados para EtOH : H₂O (1:1)				
	tiempo (min)	Temp (°C)	F-C	TEAC
Optimización	37	71	4,1	22,8
Experimental	37	71	3,9	22,8
c. Factores optimizados para NaOH 2M				
	tiempo (min)	Temp (°C)	F-C	TEAC
Optimización	30	64	8,5	61,3
Experimental	30	64	8,5	61,4

Tabla III.3: a) criterios de optimización elegidos b) optimización de la D en EtOH : H₂O (1:1) y c) optimización de D en NaOH 2M.

Podemos confirmar que la extracción máxima se alcanza en el rango de condiciones consideradas. Los valores máximos de D se obtuvieron con tiempos de extracción y temperaturas intermedias, y permitiendo obtener valores de las respuestas muy cercanos de los máximos posibles. En la misma escala de tiempo de la extracción hidroalcohólica, y en una menor temperatura de extracción, el contenido de FNE excede en gran medida el contenido de FE. A pesar de esto, los sistemas de extracción presentados pueden ser adecuados para múltiples aplicaciones e incluso pueden ser complementarios entre sí.

Para determinar un rendimiento en masa del extracto crudo, los extractos obtenidos en las condiciones optimizadas fueron estabilizados (sólo en el caso del alcalino), evaporados (sólo en el caso del hidroalcohólico) y liofilizados (en ambos casos) para obtener un rendimiento de extracto crudo. En el caso hidroalcohólico, el rendimiento del extracto fue de 12,5 % p/p muestra mientras que en el caso alcalino fue de 54.4 % p/p muestra. Cuando se calculan los de g EAG/g extracto, el extracto alcalino resulta 15,6% puro en fenoles y el hidroalcohólico 31,2% (aproximadamente el doble de pureza). Esto implica que en el caso de los extractos alcalinos, la mejoría en el rendimiento de fenólicos viene acompañada por una mayor cantidad de compuestos co-extraídos (polisacáridos, proteínas y otros) de cara a una potencial aplicación. El uso de uno u otro solvente podría ser elegido tanto en función de las aplicaciones necesarias para el extracto, o la pureza de los antioxidantes.

3.3.5. Análisis de los polifenoles extraídos por CLAE-DAD usando estándares

Los PFs de las muestras de ambos métodos de extracción se caracterizaron por este método. Se identificaron un ácido hidroxibenzoico (ácido gálico), un flavanol (catequina (+)), un estilbeno (resveratrol), un flavonol (quercetina) y un tanino (ácido tánico) y se cuantificaron mediante CLAE-DAD. Se observaron diferencias entre los compuestos fenólicos en uno y otro extracto. En el extracto hidroalcohólico se observó una

composición variada de compuestos fenólicos en baja concentración. Todos los estándares evaluados, exceptuando el ácido tánico, pudieron detectarse (Figura 3.7, Tabla III.4). Esto se debe a que la extracción que permite obtener los fenólicos libres, permite además una buena conservación del estado original de la muestra, ya que no hay hidrólisis.

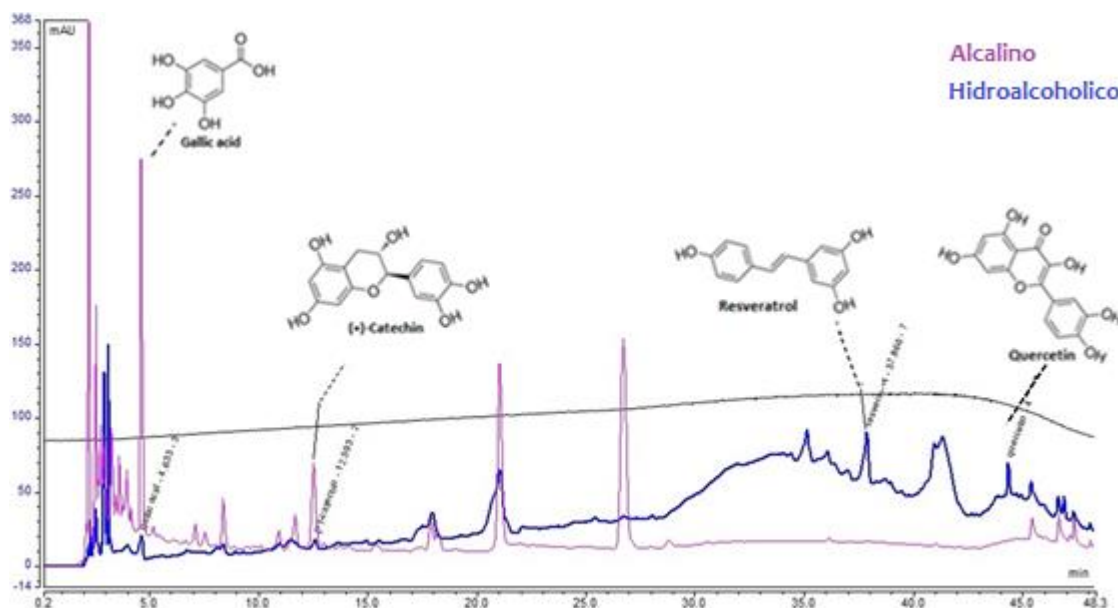


Figura 3.7: cromatograma del perfil fenólico en azul: EtOH : H₂O (1:1) y violeta: NaOH 2M (en gris se muestra la presión).

En el caso de los extractos alcalinos, sólo el ácido gálico y (+)-catequina se pudieron detectar (Figura 3.7, Tabla III.4). Sin embargo, pese a esta falta de variabilidad en su composición, el extracto alcalino demostró ser más rico en los PFs identificados. La concentración de ácido gálico fue 37 veces mayor que en el extracto hidroalcohólico, y el de (+)-catequina fue 28 veces mayor. Esto se debe probablemente a que las condiciones hidrolíticas en presencia de base fuerte están degradando PFs poliméricos a sus unidades monómericas.

Rendimiento extracto (mg/100 g OU)				
Clase	Compuesto	t.r. (min)	EtOH : H ₂ O (1:1)	NaOH 2M
Ácido hidroxibenzoico	Acido gálico	4,65	2.85	107.0
Flavanol	(+)-Catequina	12,6	8.79	243.0
Estilbeno	Resveratrol	37,7	0.806	n.d.
Flavonol	Quercetina	44,3	6.15	n.d.
Tanino	Acido tánico	45,3	n.d	n.d.

Tabla III.4: cuantificación de polifenoles en los extractos de OU Syrah.

3.3.6. Identificación de fenólicos en los extractos optimizados por CLAE-EM

En el caso de CLAE, se utilizó un número limitado de estándares para ser comparados e identificados en los espectros, brindando información cuantitativa sobre los mismos. Como estas mezclas complejas de compuestos contienen muchos otros fenólicos, cuya determinación es igualmente importante, se utilizó cromatografía acoplada a espectrometría de masa para profundizar el conocimiento sobre nuestros extractos de orujo. Para la separación por CLAE-EM², utilizamos nuevamente una fase estacionaria de C18 para la separación de polifenoles, al igual que para la separación por CLAE-DAD.

Para comenzar, se realizó una búsqueda de fenólicos de acuerdo a su ocurrencia en extractos de uva en base a la literatura existente. La ionización de los mismos se produjo mediante ionización por electrospray, que permite la detección de los analitos como iones moleculares evitando su fragmentación. Una vez detectados los iones padres que buscamos en

base a la literatura, éstos fueron confirmados por fragmentación en iones hijos, ya que los fragmentos de las moléculas más recurrentes pueden ser encontrados en la literatura [27], [112], [113].

Como ejemplo del procedimiento empleado, se pueden observar en la figura 3.8 los espectros que llevan la identificación de galato de (-)-epicatequina por CLAE-EM². Se determinó que el ion molecular correspondiente a dicho compuesto más un protón ($m/z = 443 \pm 0,5$) da lugar a un pico con un t.r. de aproximadamente 13,5 min, Figura 3.8a. Cuando se buscó el fragmento asociado con dicho ion molecular ($m/z = 291 \pm 0,1$), el mismo se puede observar en el mismo tiempo de retención (t.r.), Figura 3.8b.

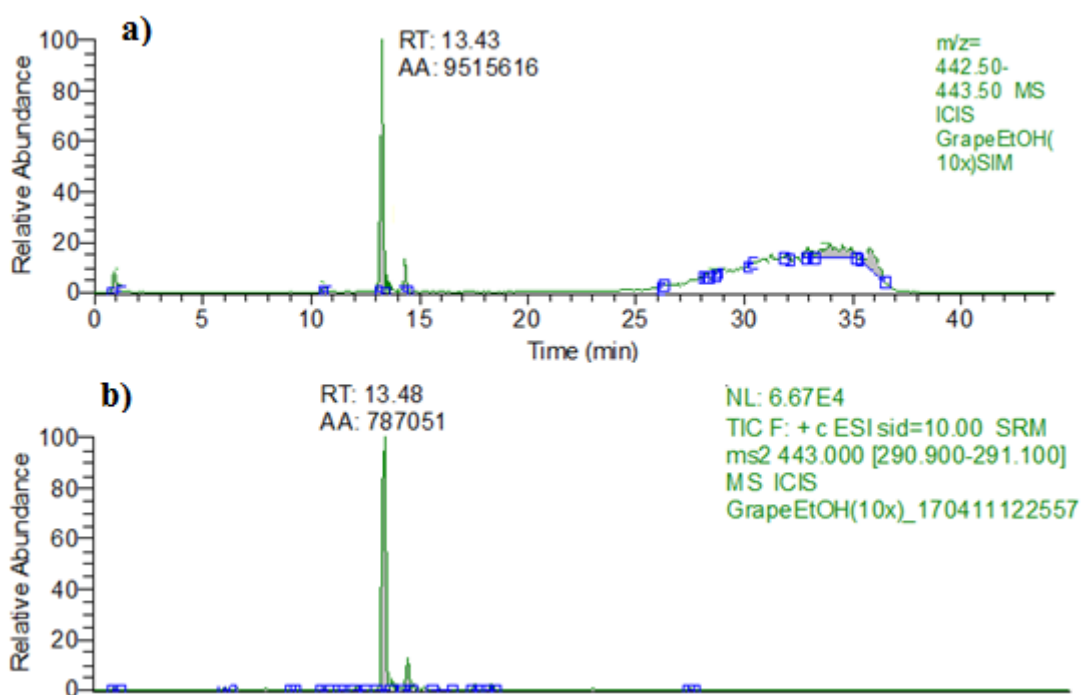


Figura 3.8: a) ion molecular del galato de (-)-epicatequina detectado por CLAE-EM; b) fragmento hijo originados a partir de dicho ion molecular.

Los analitos que fueron encontrados en el extracto alcalino se muestran en la tabla III.5, donde se incluyeron las relaciones masa-carga de los fragmentos obtenidos por disociación inducida por colisión en la detección EM². En dicho extracto, predominan los ácidos fenólicos, los ácidos 1-4 son derivados del ácido benzoico, mientras que 5-6 derivan del cinámico. Además, están presentes dos quercetinas glicosiladas (8-9) y un galato, entre otros flavonoides.

Nro.	Compuesto	t.r.	[M+H] ⁺	EM ²
<i>Ácidos fenólicos</i>				
1	Ácido gálico	2,3	171	127
2	Ácido protocatechuico	2,7	155	111
3	Ácido p-hidroxibenzoico	4,6	139	95
4	Ácido siríngico	9,4	199	155/184
5	Ácido p-cumárico	11,5	165	121
6	Ácido ferúlico	13,1	195	136/145
<i>Flavonoides</i>				
7	Galato de epicatequina	13,5	443	289
8	3-0-glucurónido- quercetina	16,3	479	301
9	3-0-galactosido- quercetina	16,8	465	301
10	Quercetina	25,6	303	151/179
11	Genisteína	25,7	271	153/243/215

Tabla III.5: polifenoles que pueden ser identificados en el extracto optimizado en NaOH 2 M por LC-EM2.

detectados en el extracto hidroalcohólico se ven en la tabla III.6. En dicho extracto, se detectaron menos ácidos fenólicos, predominando aquellos derivados del ácido benzoico, 1-4. Por otra parte, aparece una antocianina (11). Además, están presentes dos quercetinas glicosiladas (8-9) y un galato (7), además de que predominan otros flavonoles glicosilados (9-11). La detección de dos procianidinas (5-6), marca una diferencia con el extracto alcalino. De ahí se pudo inferir que las condiciones de extracción alcalinas hayan hidrolizado a las procianidinas.

Nro.	Compuesto	t.r.	[M+H] ⁺	EM ²
<i>Ácidos fenólicos</i>				
1	Ácido gálico	2,3	171	127
2	Ácido protocatechuico	2,7	155	111
3	Ácido p-hidroxibenzoico	4,6	139	95
4	Ácido sirínico	9,4	199	155/184
<i>Flavonoides y procianidinas</i>				
5	Procianidina B1	11,6	579	407/425
6	Procianidina B2	15,1	579	407/425
7	Galato de epicatequina	13,5	443	291
8	3-O-glucurónido-quercetina	16,3	479	301
9	3-O-ramnósido-quercetina	18,4	449	301
10	3-O-glucosido-isoramnetina	16,3	479	301
11	3-O-p-cumaroilglucosido-Petunidina	18	627	317
12	Daidzeína	25,6	255	137/227/199

Tabla III.6: polifenoles que pueden ser identificados en el extracto optimizado en etanol:agua (1:1) por LC- EM².

Algunos de estos productos serían productos de degradación de la hidrólisis parcial de PF más complejos en el medio alcalino de extracción. Además, debe tenerse en cuenta que cantidades de compuestos fenólicos “no extraíbles” que normalmente pueden escapar de la extracción por interacción con fibras dietéticas, proteínas y otros polímeros se pueden encontrar presentes en esta extracción alcalina [42], Figura 3.9.

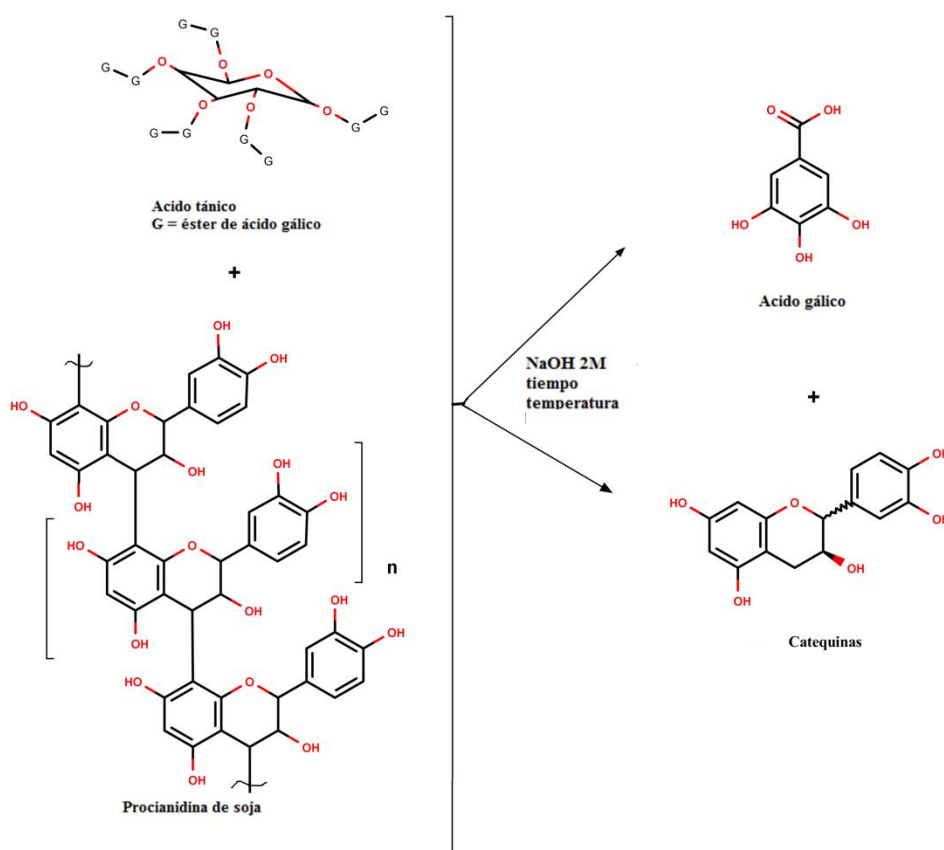


Figura 3.9: degradación por hidrólisis alcalina propuesta y productos detectados por CLAE-EM en extractos de orujo de uva.

Tanto en uno como en otro extractos de orujo optimizado, se pudieron detectar muchos compuestos existentes en la literatura y asociados con actividad antioxidante [27], [112], [113]. Los polifenoles de los extractos

fueron considerablemente diferentes de acuerdo al solvente, por ese motivo, la comparación de perfiles puede contribuir a la selección de extractos adecuados para distintos fines como alimentos funcionales o farmacéuticos, conservantes, u otros [114]. Debido a la complejidad de la muestra y la poca disponibilidad de estándares de referencia, la detección por espectrometría de masa demostró ser una herramienta indispensable para la identificación inequívoca de fenólicos.

3.4. Conclusiones

Cuando aplicamos la extracción hidroalcohólica a la obtención de compuestos fenólicos extraíbles, se observó un crecimiento las respuestas CFT y AA hasta estabilizarse. En la extracción alcalina de fenólicos no extraíbles, el contenido de fenólicos antioxidantes creció más rápidamente, dando valores mayores, hasta que los compuestos comienzan su degradación después de tres horas.

El análisis simultáneo de las condiciones en todos los factores de extracción se llevó a cabo gracias a la función de deseabilidad de Derringer. Se encontró un compromiso en la búsqueda de rendimiento de CFT y AA de los extractos, minimizando el tiempo y la temperatura. Se obtuvieron óptimos para cada solvente condiciones de temperatura y tiempo relativamente bajos que permitieron la obtención de altos valores de fenólicos antioxidantes, que fueron verificados experimentalmente. La selección del extracto preferido también se deberá hacer tomando en cuenta la potencial aplicación, se establecieron criterios básicos para la obtención de extractos a medida de la necesidad.

Sorprendentemente, cuando el análisis estadístico de optimización se llevó a cabo, una de las variables de extracción seleccionadas inicialmente, el tiempo, resultó ser no significativa para los modelos matemáticos utilizados. Esto destaca la necesidad de elaborar modelos estadísticos para interpretar los resultados, ya que la inspección visual de las gráficas puede ser engañosa.

Capítulo 4: Optimización de la extracción de polifenoles con actividad antioxidante de cascarilla de soja mediante hidrólisis alcalina

Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos.

– William Lawrence Bragg

4.1. Introducción

La soja (*Glycine max*) es la planta más cultivada en todo el mundo, con una producción de 96,2 millones de hectáreas, con 216,3 millones de toneladas de granos al año [115]. La cascarilla de soja (CS) representa el principal subproducto de la industria aceitera de soja y constituye alrededor del 8% del grano entero [116]. De acuerdo con estos datos, aproximadamente 17,3 millones de toneladas de cascarilla de soja se producen por año [117]. Los Estados Unidos, Argentina, Brasil, China e India son los mayores productores de soja del mundo y representan más del 90% de la producción mundial.

El interés específico por la composición de los productos de soja ha crecido debido a que se han reportado potenciales agentes anticancerígenos y otros agentes terapéuticos en la soja y productos relacionados. Entre los fitoquímicos polifenólicos con actividad antioxidante en soja, los más abundantes son las isoflavonas [118]. Las isoflavonas son un grupo de fenoles heterocíclicos naturales abundantes en la soja. Las isoflavonas también se conocen como fitoestrógenos porque tienen actividad parecida a los estrógenos. Las tres principales isoflavonas presentes en la soja son la genisteína, daidzeína y glicitina [119]. Los alimentos de soja se sugieren para proporcionar un efecto protector sobre diversas partes del cuerpo, como el intestino, el hígado, la vejiga, la próstata, la piel y el estómago frente a el desarrollo del cáncer [120]. Además de su potencial terapéutico, cuando dichos antioxidantes son añadidos a productos alimenticios, particularmente aquellos con alto contenido de lípidos, estos antioxidantes naturales pueden aumentar la vida útil al retrasar el proceso de peroxidación lipídica. Existe una necesidad de identificar fuentes alternativas naturales y seguras de antioxidantes alimentarios con buenas propiedades nutricionales, y la búsqueda ha aumentado notablemente en los últimos años [38].

Después de su procesamiento, los subproductos agrícolas o partes no comestibles de los vegetales, como cascarilla de soja, pueden contener

altas cantidades de fenólicos, particularmente los no extraíbles (FNE). Dicho FNE pueden estar unidos a ésteres o atrapados dentro de proteínas, polisacáridos o paredes celulares y permanecen en el residuo después de la extracción convencional con solventes, que normalmente se descartan [42]. El estudio de FNE, ha recibido recientemente atención debido a que se descubrió que una cantidad considerable de compuestos fenólicos no se caracteriza debido a estas limitaciones de los métodos convencionales de extracción con disolventes. Sin embargo, se encontró que los niveles de FNE es muchas veces más alto que los de PFs extraíbles. En el presente capítulo, se analiza la extracción sólido-líquido de PFs a partir de cascarilla de soja. Un diseño de experimentos con cinco factores y tres respuestas, permitió llegar a extractos optimizados. Todos los PFs obtenidos a partir de cascarilla de soja con un rendimiento considerable en este capítulo fueron FNE, obtenidos por hidrólisis alcalina.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

La cascarilla de soja, *Glycine max*, fue cedida por la empresa Molinos Río de la Plata S.A. Los estándares usados para propósitos de identificación y cuantificación con CLAE-DAD: (+)-catequina, ácido gálico, quercetina, trans-resveratrol y ácido tánico se adquirieron de Saporiti Argentina y Sigma-Aldrich. Solvente MeOH de calidad HPLC, ácido acético glacial se compraron de Fisher Scientific. El agua de grado cromatográfico se preparó en el laboratorio usando un sistema Milli-Q Millipore (Milford, MA, EE. UU.).

4.2.2. Caracterización de la cascarilla de soja y extracción de las muestras

La cascarilla de soja, CS, se analizó previo a la extracción en su contenido de proteínas, fibras y lignina, entre otros valores nutricionales. El contenido de materia seca se analizó mediante el protocolo PROMEFA-v2 AOAC, 1990 N° 130.15 y N° 167.03, el de proteína bruta por AOAC, 1998 N° 976.05, fibra detergente neutro por método ANKOM 6-2011 validado con método de referencia ISO 16472:2006, fibra detergente ácido por ANKOM 5-2011 validado con método de referencia ISO 13906:2008 y lignina detergente ácido por PROMEFA V2 para equipo ANKOM. Luego, la cascarilla fue molida hasta un tamaño de partícula adecuado y uniforme de entre 0.21 y 2 mm, utilizando un molino de laboratorio y tamices. Se almacenó hasta su uso a temperatura ambiente en la oscuridad, para evitar la degradación de PFs [95]. La extracción se realizó utilizando soluciones de NaOH de diferentes concentraciones, con una relación solvente-sólido de 10:1 (mL:g), manteniendo los balones de extracción bajo nitrógeno y cubriéndolos con papel de aluminio para reducir la oxidación favorecida por la presencia de oxígeno o luz. Las muestras de extracto se centrifugaron y después se filtraron con jeringa y filtro de fluoruro de polivinilideno 0,45 um para eliminar los sólidos. Finalmente las muestras se diluyeron adecuadamente y los extractos se estabilizaron en una etapa,

usando solución buffer de ácido acético para evitar la interferencia del medio básico fuerte con las determinaciones.

4.2.3. Determinación de fenólicos totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, con modificaciones menores [96]. Para ello, se preparó una curva de calibración utilizando diluciones en serie de una solución de ácido gálico. Las soluciones se prepararon en buffer acetato 200 mM, pH = 4, y las muestras se diluyeron también en este buffer. Para producir la reacción de color, se añadieron 1 mL de reactivo F-C (previamente diluido 1:10 en agua destilada) a 20 μ l de patrón o muestra, y luego se añadieron 500 μ l de solución de Na₂CO₃ 7% P/V. Después de mezclar durante 5 s en un agitador vortex, las muestras se colocaron en un baño de agua a 40°C durante 10 min. Finalmente, se enfriaron a temperatura ambiente en baño de agua durante 5 min y se midió su Abs⁷⁶⁵ por triplicado. Los resultados se expresaron en g de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de CS seco.

4.2.4. Determinación de la actividad antioxidante

Se utilizó la capacidad antioxidante por equivalentes de Trolox mejorada (CAET). El ensayo se basa en la decoloración del 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) o ABTS [61]. En primer lugar, el catión radical de ABTS se generó por combinación de su solución con persulfato de potasio en un matraz que se dejó agitando durante la noche. Luego, cuando se mezcló con las muestras, se determinó su grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical en función de la concentración y se calculó en relación con la reactividad de Trolox. Las mismas diluciones de las muestras en buffer usadas para determinar fenólicos totales se utilizaron para preparar las soluciones de muestras y estándar en este ensayo. Se midió Abs⁷⁶⁵ en triplicados a 5 min (\pm 0,3 min) para todas las muestras, ya que podía haber variaciones significativas cuando se utilizaba un intervalo de tiempo mayor. Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (ET), en mmol ET/100 g CS seco.

4.2.5. Diseño experimental para el *screening* y optimización de la extracción

La primera etapa consistió en la identificación de variables (o factores) que son los que más afectan a la extracción de compuestos fenólicos (o “*screening*”). Utilizando software estadístico Minitab versión 17 (Minitab Inc.), se preparó un diseño factorial fraccional para determinar la influencia de 5 factores sobre las respuestas. Los factores y sus límites (codificados -1 y +1) fueron: concentración de NaOH (0,5 - 2 M), tiempo (30 - 180 min), temperatura (30 - 70 °C), tamaño de partícula (TP, 0.21 - 0.841 mm y 2 - 5 mm) y asistencia por ultrasonido (si/no), lo que representó un total de 16 ensayos. Se estudiaron tres respuestas: contenido de fenólicos totales (CFT), actividad antioxidante (AA) y la suma de las concentraciones de ácido gálico y (+)-catequina determinadas por CLAE, en una única respuesta (GCcc). Para cada respuesta, se probó la relevancia de cada factor, basada en la comparación de su valor-*p* respecto de valores críticos. Los factores se clasificaron como no significativos (valor-*p* superior a 0,1), significativo (valor-*p* entre 0,1 y 0,05) o muy significativo (valor-*p* inferior a 0,05).

A continuación, se optimizaron cuatro factores del *screening*: temperatura, tiempo, tamaño de partícula y concentración de NaOH. Para ello, se preparó un diseño central compuesto completo de 31 ensayos. Se consideraron tres niveles para cada factor, para niveles bajos, medios y altos (-1, 0, +1). Se mantuvieron los mismos intervalos del *screening* para cada factor, y se analizaron las tres respuestas. Los valores intermedios (codificados 0) fueron: NaOH (1,25 M), tiempo (105 min), temperatura (50 °C), tamaño de partícula (TP, 0.841-2 mm). A partir del análisis del diseño, se pudieron generar superficies de respuesta. Se utilizaron gráficos de contorno y superficies tridimensionales para visualizar la influencia de los factores en cada respuesta. Finalmente, se predijeron valores óptimos para maximizar las tres respuestas simultáneamente, mediante función deseabilidad (D). La validación del modelo se determinó mediante la

comparación de los resultados experimentales y los valores predichos en las condiciones optimizadas.

4.2.6. Caracterización de polifenoles y cuantificación por CLAE

Las extracciones de compuestos fenólicos optimizadas se analizaron por CLAE. Se colocaron muestras alcalinas (5 mL) en tubos de centrifuga y se estabilizaron mediante la adición de HCl diluido agregado gota a gota con agitación y en baño refrigerado para evitar la descomposición de PF. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5000 RPM y los sobrenadantes se filtraron (0,45 μm) antes de inyectar en el sistema de CLAE. Se identificaron y cuantificaron polifenoles en los extractos (ácido gálico, (+)-catequina, resveratrol, quercetina y ácido tánico) utilizando un sistema Dionex ultimate CLAE (Dionex, Germering, Alemania) y una columna Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 μm , Agilent, EEUU). Se usaron agua con ácido acético al 1% (A) y MeOH (B) como fases móviles. Los analitos se separaron usando siguiente gradiente: 0 min, 10% de B; 25 min, 27% de B; 40 min, 50% B; 45 a 54 min, 80% de B; 54,1 a 59 min, 10% de B. El flujo de fase móvil fue de 1 mL/min. Para cada muestra se adquirió un espectro entre 200 y 600 nm y la temperatura del horno de columna fue de 35°C. La identificación y cuantificación de los PF se basó en la comparación de los tiempos de retención y la máxima absorbancia de los picos detectados en las muestras con los obtenidos mediante la inyección de patrones puros. Las muestras se cuantificaron utilizando calibración externa pico a pico con patrones puros preparados a concentraciones similares a las muestras.

4.2.7. Análisis de PFs en extracto optimizado por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CL-EM)

Para permitir la identificación de PFs y tener mayor conocimiento en cuáles pueden ser liberados al preparar cada extracto, y relacionarlos con la AA observada, las muestras optimizadas fueron analizadas por CLAE-EM. Para tal fin, las muestras se prepararon de forma similar a la utilizada para 4.2.6 previo a su inyección. La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna Hypersil gold C18 (100 x 2,1 mm x 3 μ m, Thermo Scientific). La fase móvil utilizada fue la mezcla de NH₄Ac (A) 5 mM y metanol (B). Entre 0 - 3 min, se utilizaron 15% de B, de 3 - 8 min, 85% de B y finalmente entre 8,1 y 15 min un 15% de B. El caudal utilizado fue de 0,25 mL/min, la temperatura de columna de 40 \pm 1 °C y el volumen de inyección, 10 μ l. El sistema de detección por EM comprendió una fuente de ionización por electrospray acoplada a espectrómetro de masas triple cuádrupolo Quantum Access TSQ (Thermo Scientific, Mississauga, Ontario, Canadá). La ionización por *electrospray* se estableció en polaridad positiva y la presión del gas de colisión fue de 15 mTorr, en el intervalo de 50 - 500 m/z. La identificación de un compuesto siguió los principios de medición de la masa de los iones padres, así como ocurrencia y coincidencia en el tiempo de retención (t.r.) de los iones hijos.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Preparación de extractos de cascarilla de soja y elección del diseño experimental

La cascarilla de soja *Glycine max*, fue caracterizada previo a la extracción de fenólicos para determinar su contenido de proteínas, fibras y lignina, entre otros valores nutricionales. Se observó un contenido de materia seca de 91,9%, proteína bruta de 7,9%, fibra detergente neutro de 65,44%, fibra detergente ácido 46,4 % y lignina detergente ácido de 0,6 %. Los valores nutricionales de la cascarilla estuvieron entre los valores esperados del residuo. Esta cascarilla fue utilizada para preparar extractos en distintos solventes.

Los solventes más utilizados para extraer compuestos fenólicos de soja y otros desechos fueron relevados en la literatura, encontramos que metanol (o metanol acidificado), etanol, acetona y sus mezclas de agua estaban entre los más populares [121]–[123]. Cuando se evaluó se evaluó el contenido fenólico total y las actividades antioxidantes de 8 clases de leguminosas, la acetona ácida al 70% fue uno de los que mejor funcionó, mientras que el menos eficaz fue el etanol absoluto [124].

En nuestro propio muestreo de solventes, preparamos extracciones sólido:líquido, manteniendo siempre la relación solvente : soluto (10:1) fija, usando siempre 2h y 60 °C (sin ultrasonido). Evaluamos solventes de distinta polaridad y preparamos extractos preliminares evaluando sólo el CFT: con H₂O, se obtuvieron 0,149 equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de cascarilla de soja (0,149 EAG/100 g CS), con EtOH:H₂O (4:1) (0,088 EAG/100 g CS), acetona (0,058 EAG/100 g CS), acetona:H₂O (1:1) (0,134 EAG/100 g CS), metanol (0,037 EAG/100 g CS). En ningún caso proporcionaron una extracción relativamente alta de compuestos fenólicos; como la literatura lo indicaba, en algún caso las mezclas de agua y solvente orgánico fueron en principio mejores que los solventes puros [125].

En cambio, soluciones acuosas de NaOH sí permitieron obtener rendimientos interesantes, por eso fueron los solventes de elección para la extracción de fenólicos antioxidantes de CS en nuestro trabajo. Muchos autores reportan que, en algunos vegetales, los compuestos fenólicos se liberan mejor con hidrólisis alcalina, obteniendo los fenólicos no extraíbles (FNE) [50]. Las frutas y verduras tienen la mayoría de sus fitoquímicos en formas conjugadas libres o solubles y los FNE comprenden un promedio del 24% de los fenólicos totales presentes en ellos [45]. Los tratamientos alcalinos se usan comúnmente para extraer ácidos fenólicos unidos y otros compuestos relacionados de los granos de cereales [49]. Las ventajas adicionales de las soluciones alcalinas son su toxicidad reducida y aceptabilidad en las aplicaciones alimentarias, siempre que se haga una neutralización simple usando un ácido diluido.

Uno de los principales problemas para la búsqueda de extractos fenólicos con actividad antioxidante de los materiales biológicos es que las condiciones de extracción deben evitar la degradación por la luz o por la presencia de aire, especialmente en las condiciones de la extracción alcalina. La estabilidad de los PF y su reactividad pueden verse afectados por muchos factores, como el oxígeno, el SO₂, acetaldehído, elevada temperatura, el pH y la concentración de otras moléculas presentes [114]. Para evitar la oxidación por aire, los extractos se prepararon bajo atmósfera de nitrógeno, desde antes de ser calentados.

Con respecto a la elección de los métodos de análisis, los extractos de CS se evaluaron en base a su contenido fenólico total (CFT), actividad antioxidante (AA) y concentración de fenólicos determinados por CLAE. El CFT se midió en los extractos por el método de Folin-Ciocalteu que implica la oxidación de los compuestos fenólicos y la reducción del indicador de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico [96]. Para determinar la AA utilizamos el método de capacidad antioxidante por equivalentes de Trolox (CAET), donde los antioxidantes de la muestra reaccionan con el radical catión ABTS^{•+} (azul oscuro) decolorándolo de forma proporcional a

su capacidad antioxidante [61]. Finalmente, los compuestos fenólicos mencionados (GCcc) se determinaron mediante CLAE en los extractos preparados, comparando su tiempo de retención (t.r.) y perfil UV respecto de los de estándares puros. Basándose en su aparición en la mayoría de los extractos analizados, se cuantificaron dos de los compuestos fenólicos identificados para estudiar la extracción, ácido gálico y (+)-catequina (Figura 4.1).

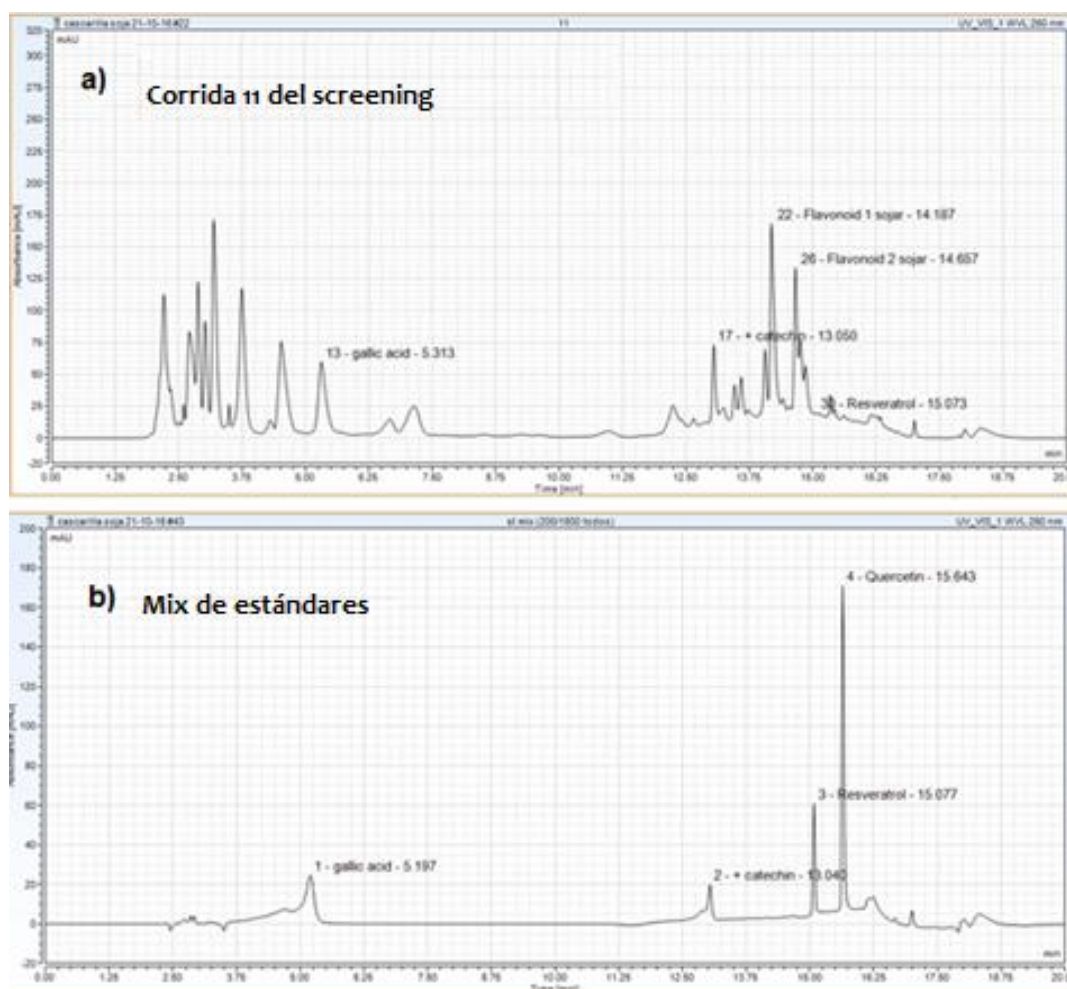


Figura 4.1: a) cromatograma del extracto número 11 del screening y b) cromatograma del mix de polifenoles modelo, incluyendo: ácido gálico (t.r. = 5,20 min), (+)-catequina (t.r. = 13,04 min), resveratrol (t.r. = 15,08 min) y quercetina (t.r. = 15,64 min).

4.3.2. Diseño experimental: *screening* de la extracción de polifenoles

La primera etapa del diseño de experimentos consistió en la identificación de variables (o factores) que afectan a la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes, también llamada etapa de *screening*. En la segunda etapa, se evaluaron los valores óptimos de dichos factores para la extracción. Finalmente, se predijo el valor óptimo de cada factor para dar valores elevados de las tres respuestas por separado, y finalmente para las tres respuestas simultáneamente, mediante el uso de una función de deseabilidad (D).

Para realizar el *screening* se utilizó un diseño factorial fraccional $\frac{1}{2}$, consistente en 16 experimentos para evaluar los efectos de: concentración de NaOH (0,5 - 2 M), tiempo (30 - 180 min), temperatura (30 - 70 °C), tamaño de partícula (TP, 0.21 - 0.841 mm y 2 - 5 mm) y asistencia por ultrasonido (US, con/sin), sobre las respuestas. De acuerdo con el software Minitab 17.1.0, determinamos que el diseño fraccional elegido, tuvo un poder de predicción similar a un factorial completo (llevando a cabo la mitad de experimentos). Diseños reducidos similares, como el de Plackett-Burman (menor número de experimentos posibles) ya habían sido utilizados para extracción de compuestos fenólicos de las uvas [101] y las semillas de espino [126]. Sin embargo, al utilizar dicho diseño, se asume que no existen interacciones entre los factores, que es algo que a priori se ignora (como en nuestro caso). Cuando una interacción es grande, los correspondientes efectos principales tienen poco significado práctico, ya que dicha interacción oculta el significado de los efectos principales.

La relevancia de los cinco factores se determinó relativa a tres variables respuesta: contenido de fenólicos totales (CFT), actividad antioxidante (AA) y concentración de dos polifenoles de gran ocurrencia en nuestros extractos alcalinas de PF, ácido gálico y (+)-catequina, determinados por CLAE y sumadas (GCcc). Para cada respuesta, se probó el contraste del valor-p de los factores respecto de valores críticos para determinar si eran

significativos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla IV.I.

Exp.	Temp.	t	NaOH	TP	US	CFT	AA	GCcc
1	-1	-1	-1	-1	1	0,314	0,611	34,5
2	1	1	-1	-1	1	0,584	1,617	50,7
3	-1	1	-1	1	1	0,378	0,643	47,2
4	-1	1	-1	-1	-1	0,475	4,932	14,7
5	1	-1	1	1	-1	0,392	1,014	38,4
6	1	-1	-1	-1	-1	0,403	1,025	50,9
7	-1	-1	1	1	1	0,433	0,995	n.d.
8	-1	1	1	1	-1	0,303	0,92	39,4
9	-1	-1	-1	1	-1	0,206	0,362	34,3
10	1	1	1	1	1	0,929	1,67	43,8
11	1	1	-1	1	-1	0,418	1,315	53,3
12	1	1	1	-1	-1	0,709	2,372	96,8
13	1	-1	1	-1	1	0,478	2,002	26
14	-1	1	1	-1	1	0,37	1,37	36,9
15	1	-1	-1	1	1	0,42	0,909	43
16	-1	-1	1	-1	-1	0,341	0,848	34,4

Tabla IV.I: valores de las respuestas para el screening, CFT está expresado en g EAG/100g CS; AA en (mmol ET/100 g CS); GCcc en mg/100 g CS.

El ensayo nro. 4 fue el único *outlier* excluido, debido a su mayor error y discordancia con el modelo. Los valores de fenólicos totales se hallaron entre 0,206 y 0,929 g EAG/100 g CS. No existen reportes previos de extracción de fenólicos antioxidantes a partir de CS. En el trabajo de Jokic, sobre semillas de soja entera molida (residuo más rico en PFs que nuestra CS), se investigó la influencia del solvente, la temperatura y el

tiempo de extracción. Una solución acuosa de etanol al 50%, permitieron a 80 °C después de 120 minutos obtener 0,432 g GAE/100g soja seca [122].

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó mediante la capacidad antioxidante por equivalentes de Trolox (ET), que osciló entre 0,362 y 2,372 mmol ET/100 g CS durante el *screening*, valores relativamente altos que confirmaron la potencialidad de este residuo para obtener PFs antioxidantes. Además, los valores de GCcc fueron de hasta 96.8 mg/100 g CS. Además, el *screening* sirvió para evaluar los efectos estandarizados de los cinco factores analizados sobre cada respuesta, Figura 4.2. En color rojo se observan los factores significativos y en azul los de menor significación estadística (afectan la respuesta en menor medida) o no significativos. Así mismo, se puede ver si su efecto es positivo sobre la respuesta (si el aumento de dicho factor conduce a un aumento de la respuesta), ubicándose a la derecha de la recta, o es negativo, ubicándose a la izquierda.

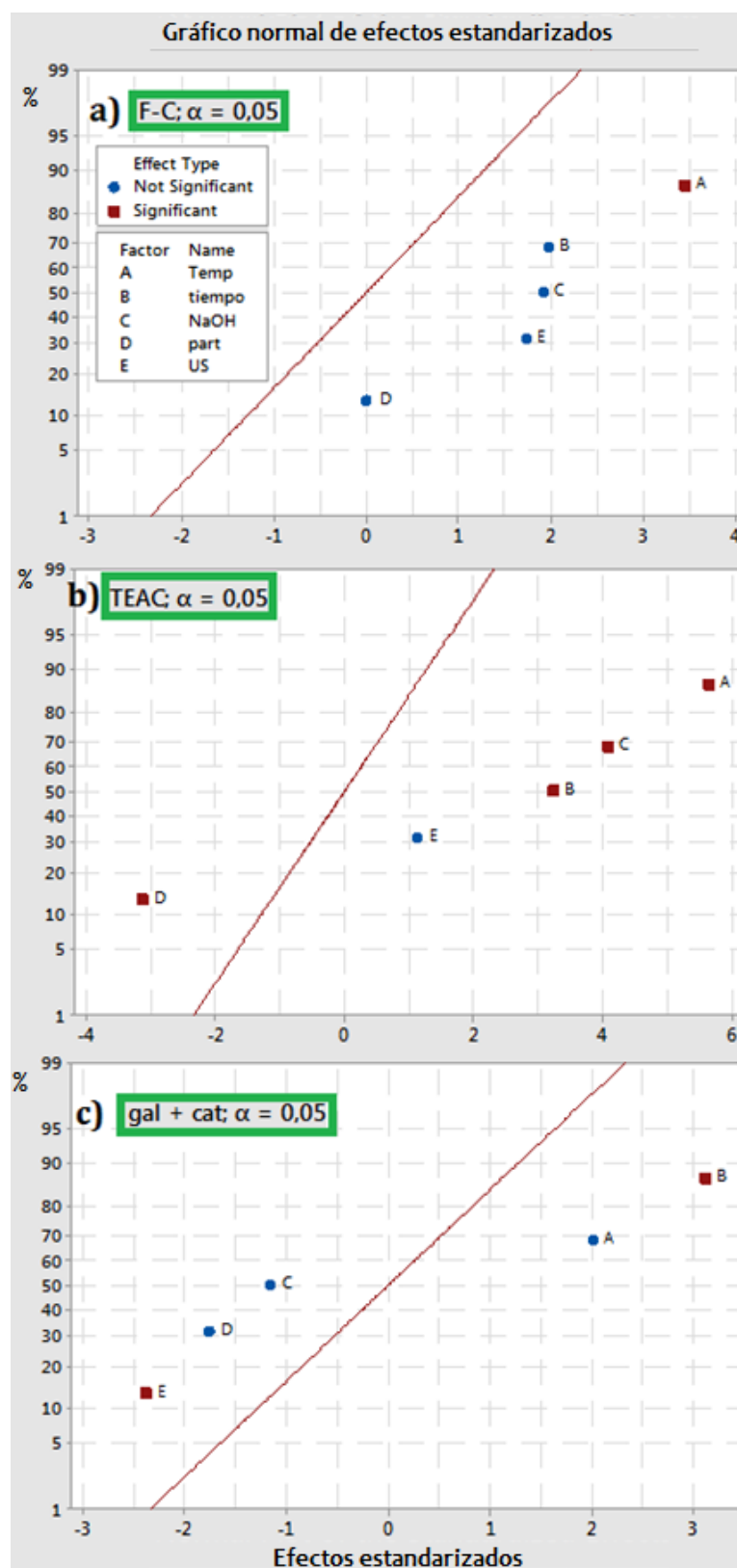


Figura 4.2: efectos estandarizados de cada factor para la respuesta a) CFT, b) AA y c) GCcc.

En el caso de CFT de los extractos de cascarilla, la temperatura fue muy significativa, ya que el aumento de la temperatura dio lugar a un gran incremento del CFT. En menor grado, el tiempo y la concentración de NaOH también fueron significativos y dieron lugar a aumentos del mismo (Figura 4.2a). Por otra parte, el resto de los factores que fueron analizados, el TP y el US no afectaron al CFT. El efecto significativo y positivo de la temperatura fue similar al observado por Gonzales sobre residuo de coliflor, donde CFT a 60 y 80 °C fueron ambas significativamente más altas que a 40° C [93]. Además, los efectos de temperatura y tiempo fueron similares a los observados en el trabajo de Jokic en extractos de soja entera. En el mismo, la extracción de polifenoles totales creció al aumentar la temperatura [122].

En cuanto a la respuesta actividad antioxidante de los extractos de CS, temperatura, tiempo y concentración de NaOH son significativos para favorecerla (Figura 4.2b). Curiosamente, la molienda de CS a un tamaño de partícula menor, puede disminuir la extracción de antioxidantes, pese al aumento de la superficie de contacto. Además, el efecto de US fue no significativo pese a que el mismo junto con la hidrólisis alcalina había servido para aumentar el rendimiento de FNE con actividad antioxidante en otro desecho [93].

Los efectos de los cinco factores sobre las tres respuestas pueden resumirse en la Tabla IV.II, el efecto fue muy significativo si α fue inferior a 0,05 (++) , significativo si estuvo entre 0,05 y 0,10 (+) y finalmente no significativo (n.s.) si su valor fue mayor que 0,10. Cuando un factor afecta negativamente una respuesta, lleva un signo negativo (- ó - -).

Respuesta	Factor				
	A: Temp.	B: tiempo	C: [NaOH]	D: TP	E: US
CFT	++	+	+	n.s.	n.s.
AA	++	++	++	--	n.s.
GCcc	+	++	n.s.	n.s.	--

Tabla IV.II: efecto de los distintos factores sobre las respuestas evaluadas.

Finalmente, para la concentración de ácido gálico y (+)-catequina (Figura 4.2c), el tiempo fue muy significativo, aumentando su concentración, mientras que el uso de US afectó su concentración de forma muy significativa pero negativa. La temperatura ayudó a su extracción, de acuerdo con la extracción fenólica general. En lo que respecta a la concentración de estos fenólicos, el TP y la [NaOH] no los afectaron en gran medida. Los compuestos ácido gálico y (+)-catequina tienen probada reputación como antioxidantes en la literatura, y su unión en una sola respuesta suma permitió que varios factores resultaran significativos (al ser analizados por separado, ningún factor resultó significativo).

4.3.3. Optimización de los factores seleccionados en la etapa de *screening*

Teniendo en cuenta el *screening* de las variables, los cuatro factores significativos, temperatura, tiempo, concentración de NaOH y TP se utilizaron para seguir adelante con la optimización de los mismos. Se seleccionaron los mismos intervalos para cada factor y se utilizó un diseño central compuesto completo, consistente en 31 experimentos, incluyendo puntos centrales como se ve en la Tabla IV.III. Diseños de experimentos

similares fueron usados para otros procesos de recuperación a partir de desechos [127], [128].

Exp.	Temp.	tiempo	NaOH	TP	CFT	AA	GCcc
1	-1	1	1	-1	0.370	1.37	36.9
2	-1	0	0	0	0.325	0.91	36.7
3	1	0	0	0	0.774	2.30	83.2
4	0	0	0	0	0.449	1.54	71.0
5	-1	1	1	1	0.303	0.92	39.4
6	0	0	0	0	0.476	1.65	67.4
7	-1	-1	-1	1	0.206	0.36	34.3
8	1	1	1	-1	0.709	2.37	96.8
9	1	1	1	1	0.929	1.67	43.8
10	-1	-1	1	-1	0.341	0.85	34.4
11	0	0	0	0	0.417	1.47	25.0
12	0	0	0	-1	0.448	1.61	33.8
13	1	1	-1	1	0.418	1.32	53.3
14	0	1	0	0	0.503	1.50	53.8
15	-1	-1	-1	-1	0.314	0.61	34.5
16	0	-1	0	0	0.290	1.04	30.5
17	0	0	0	0	0.447	1.52	25.5
18	0	0	-1	0	0.384	1.13	26.9
19	1	-1	-1	1	0.420	0.91	43.0
20	0	0	0	0	0.413	1.43	38.1
21	-1	-1	1	1	0.433	1.00	n.d.
22	0	0	0	0	0.487	1.64	51.5
23	1	1	-1	-1	0.584	1.62	50.7
24	1	-1	1	1	0.392	1.01	38.4
25	0	0	0	0	0.518	1.61	52.0
26	-1	1	-1	1	0.378	0.64	47.2
27	0	0	1	0	0.517	1.98	61.7
28	-1	1	-1	-1	0.364	0.82	86.6
29	0	0	0	1	0.367	0.93	22.1
30	1	-1	1	-1	0.478	2.00	26.0
31	1	-1	-1	-1	0.403	1.03	50.9

Tabla IV.III: valores de las respuestas para la optimización, CFT está expresado en g EAG/ 100g CS; AA en (mmol ET/ 100 g CS); GCcc en mg/ 100 g CS.

El análisis ANOVA de cada una de las respuestas en todos los experimentos permitió obtener superficies de respuesta que se ajustaron a

modelos estadísticamente significativos. Las gráficas de superficie de respuesta (Figura 4.3) presentan más claramente cómo influyen estas variables en los resultados de la extracción. Estas superficies representan las respuestas CFT, AA y GCaa cuando se trazan contra diferentes pares de factores. De haberlo, un punto máximo en la superficie representa las condiciones para la extracción óptima (cuando se encuentra en el intervalo estudiado). Un alejamiento de este punto, en cualquier dirección, disminuye el valor de la respuesta. La influencia de las variables en las respuestas pudo confirmar y mejorar la información del *screening*.

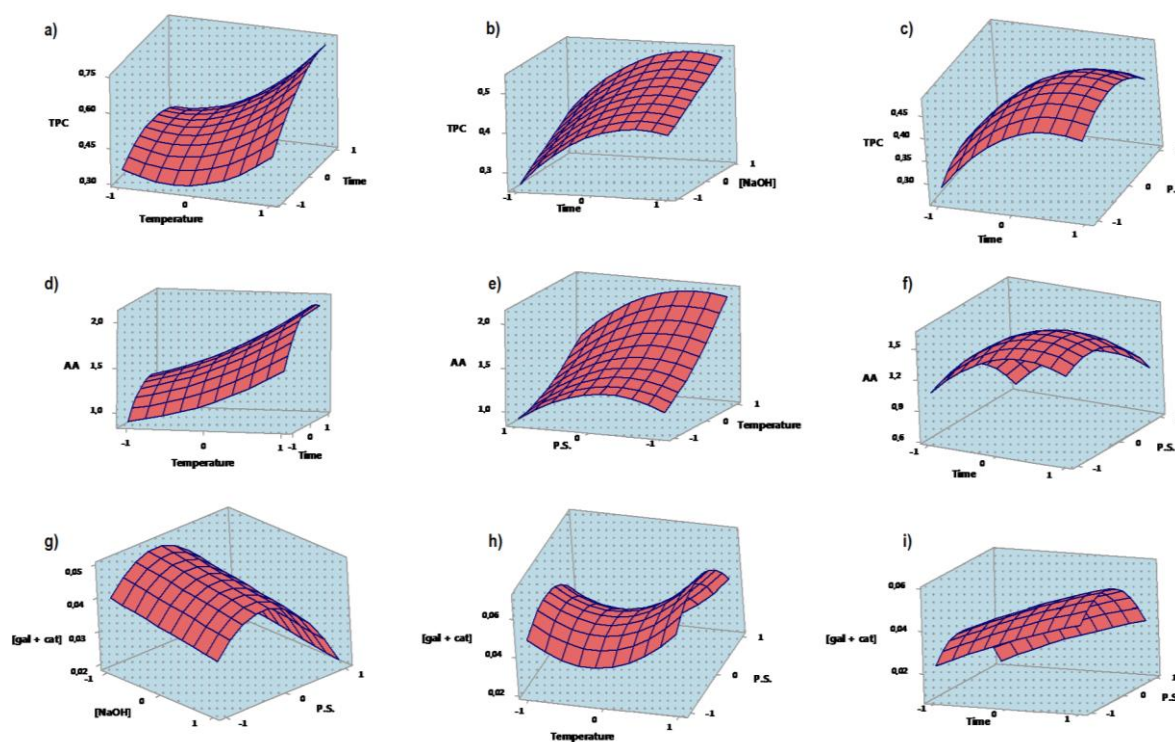


Figura 4.3: diagramas 3D de superficie de respuesta, a-c) modulación de fenólicos totales por distintos factores; d-e) actividad antioxidante; g-i) ác. gálico y (+)-catequina.

En cuanto a la influencia de los factores en el CFT de las muestras, al aumentar la temperatura CFT aumenta significativamente (Figura 4.3a).

El rango de temperatura elegido es relativamente bajo (temperatura máxima de 70 °C), limitado para evitar la degradación de los compuestos fenólicos [129]. Además, por la posible co-extracción de otros compuestos indeseables en el extracto se aconseja evitar las altas temperaturas de extracción, aunque la eficiencia sea un poco más baja [130]. En la Figura 4.3b se puede observar que el tiempo aumentó el rendimiento de fenólicos y en este caso se pudo detectar un máximo en la variable tiempo para el intervalo elegido. Con respecto al efecto de la concentración de NaOH, en la misma figura se ve que el contenido de CFT aumenta linealmente a medida que aumenta la concentración del álcali.

Por otro lado, la Figura 4.3c (CFT vs tiempo y TP) muestra cómo se pueden encontrar valores óptimo en un tamaño intermedio TP y un valor tiempo relativamente alto dentro de sus intervalos. Habitualmente, moler el material más pequeño permite una mejor extracción de antioxidantes [129], pero en nuestro caso, posiblemente porque la cascarilla de soja se aglomera más y la solución se vuelve más viscosa a medida baja el TP, la extracción no se favorece.

La actividad antioxidante se puede observar en la Figura 4.3d (AA vs temperatura y tiempo), donde se puede ver que ambos factores influyen considerablemente. En las Figuras 4.3e-f (AA vs TP, temperatura y tiempo respectivamente) muestran cómo el tamaño de partícula también encuentra un valor óptimo, mientras que la temperatura aumenta sin límite en el intervalo. En las tres gráficas puede verse algo similar a las de contenido fenólico. Más adelante, en el presente capítulo, se estudia la correlación entre AA y CFT.

Finalmente, en las Figuras 4.3g-i, se puede ver la influencia de los factores sobre los GCcc. Se observa, en coincidencia con las otras respuestas el valor óptimo de TP. Sin embargo, la concentración de NaOH prácticamente no tiene influencia y, curiosamente, la temperatura en los ensayos centrales, reduce la obtención de GCcc, en comparación con

valores bajos y altos del factor, dando un mínimo de la respuesta en la temperatura intermedia del intervalo estudiado. Pese a ese mínimo, a altas temperaturas se denota un fuerte crecimiento de la extracción de GCcc, y esto queda más claro al construir la función deseabilidad en la sección siguiente. El tiempo también favorece esta respuesta, la influencia de estos factores es comparable a la descrita por otros autores para la obtención de compuestos fenólicos a partir de té verde [130].

Para determinar qué relaciones existen entre las respuestas estudiadas, y saber, por ejemplo, si todas ellas crecen de forma conjunta como podría esperarse, los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon incluyendo datos experimentales de *screening* y optimización. Se observó una buena correlación entre AA y CFT ($R_2 = 0,761$, con pendiente = 3,80), Figura 4.5. El resultado no es inesperado, ya que se observaron correlaciones entre las composiciones fenólicas y las actividades antioxidantes, como en los extractos preparados a partir de 8 clases de leguminosas [124]. En ellos se relacionaron el CFT, contenido total de flavonoides y la AA. Dichas variables también se correlacionaron ($R^2 = 0,70$) en un trabajo sobre legumbres crudas, descortezadas, cocidas y remojadas [131]. En una extracción con solvente orgánico, los extractos preparados en acetona de lentejas, garbanzos y soja [132] CFT y AA también tuvieron buena correlación lineal.

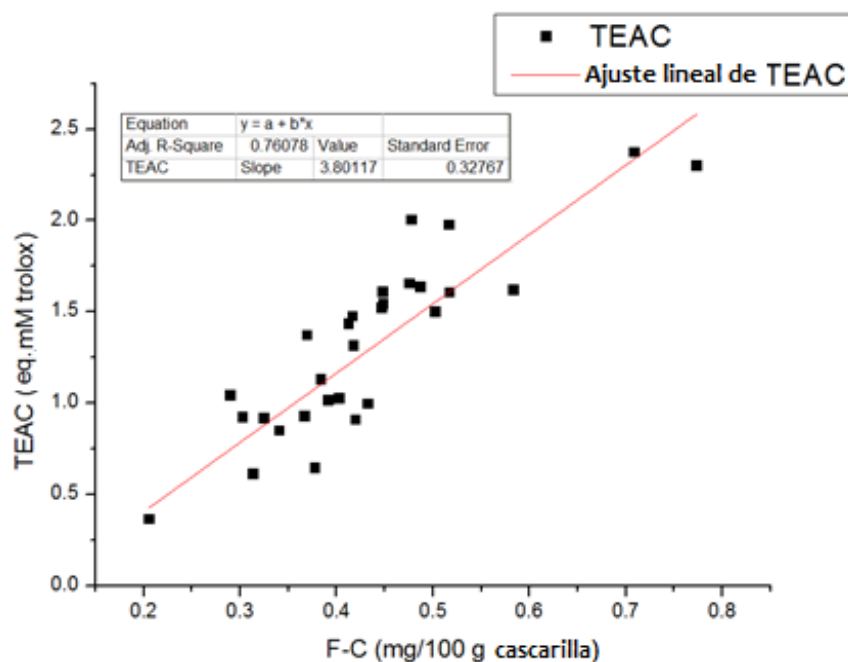


Figura 4.5: correlación entre las mediciones de AA y CFT.

Contrario a lo que pudiera esperarse, la correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la concentración GCcc no fue tan bien correlacionada ($R^2 = 0,444$). Además, la correlación entre GCcc y AA tuvo una correlación aún más pobre ($R^2 = 0,343$).

4.3.4. Uso de la función deseabilidad D para maximizar todas las respuestas

Como existe interés en aumentar los valores de las tres respuestas en estudio, se utilizó una función deseabilidad (D) para producir extractos que las pueden maximizar en simultáneo. Para tal fin, se debieron ajustar los parámetros que definen D, de acuerdo a las posibilidades ofrecidas por el *software*, considerando la importancia, el peso y el rango para cada respuesta. La AA fue considerada la respuesta más importante, asignándosele un peso de 1, siendo el de GCcc y CFT de 0,1. En cuanto a los rangos utilizados para los factores para buscar los valores más

“deseables”, los mismos son aquellos utilizados hasta aquí en *screening* y optimización, exceptuando el caso de TP, en el que se fija el valor central (más favorable para todas las respuestas). Esto obedece a la imposibilidad de usar un rango continuo para este factor y construir un nuevo TP de tamaño exacto, a medida.

Mediante los criterios elegidos, el modelo sugiere una temperatura de 70 °C y un tiempo de 151 min, con una concentración de NaOH 2M, para obtener los valores de 78,9 mg de GCcc por cada 100 g cascarilla, 0,804 g EAG/100 g CS de CFT y una actividad antioxidante de 2,37 mmol ET/100 g CS, con una deseabilidad general de 0,987. Todas las condiciones elegidas se hallan en la Tabla IV.IV, y los perfiles para cada respuesta obtenidas para la función D se muestran en la Figura 4.4.

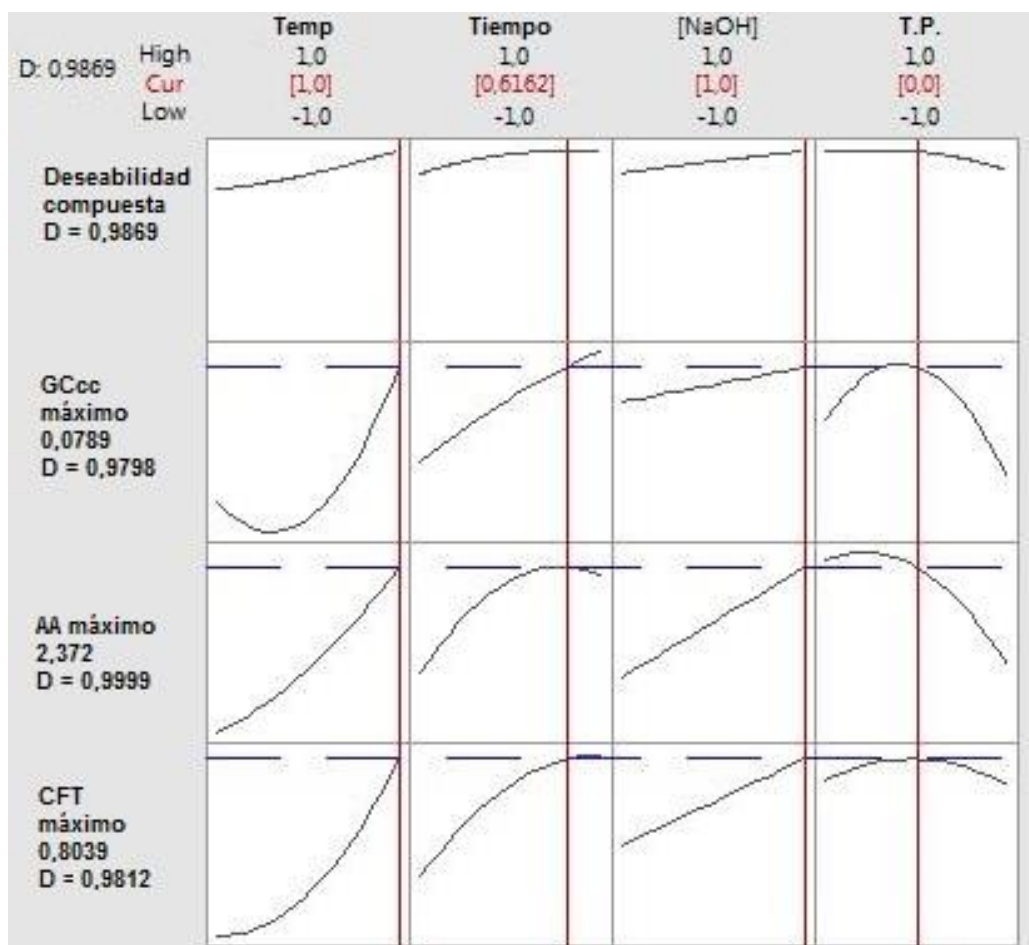


Figura 4.4: valores de deseabilidad y las tres respuestas en función de los 4 factores.

a) Parámetros de la función D					
Respuesta	Objetivo	Bajo	Alto	Peso	Importancia
GCcc	maxim.	0	0,0968	0,1	1
AA	maxim.	0,362	2,372	1	1
CFT	maxim.	0,206	0,929	0,1	1

b) Rango de factores	
Factor	Valores
Temperatura	(-1; 1)
Tiempo	(-1; 1)
[NaOH]	(-1; 1)
TP	0

c) Solución		Factor				Respuesta			
	Temp.	t	[NaOH]	T.P.	GCcc	AA	CFT	D	
Valor	1	0,616	1	0	0,0789	2,37	0,804	0,987	

Tabla IV.IV: a) parámetros usados para las respuestas, b) rangos para los factores analizados (se fija el TP) c) solución propuesta por deseabilidad.

La concordancia entre los resultados del modelo y los resultados de valores experimentales fue confirmada realizando cuatro réplicas en dichas condiciones. Se obtuvieron valores con una concentración de $71,0 \pm 15,8$ mg de GCcc por cada 100 g cascarilla, $0,718 \pm 0,048$ g EAG/100 g CS de CFT y una actividad antioxidante de $2.167 \pm 0,320$ mmol ET/100 g

CS, en los tres casos. Curiosamente los valores obtenidos fueron aproximadamente 10% más bajos que los predichos pero de una concordancia aceptable.

4.3.5. Identificación de fenólicos por CL-EM

Para indagar acerca de la estructura de los FNE responsables de la actividad antioxidante demostrada por los extractos de CS, utilizamos CL-EM. Debido a las características de los compuestos y a la poca disponibilidad de compuestos de referencia, la detección por espectrometría de masas demostró ser una herramienta indispensable para la asignación inequívoca de los picos. La identidad del ión primario detectado se confirmó por fragmentación en iones hijos, ya que los fragmentos de las moléculas más recurrentes pueden ser encontrados en la literatura [133], [134]. El extracto preparado en condiciones optimizadas se neutralizó, centrifugó y filtró a través de filtro de jeringa de 0,45 μm para prepararlo para el análisis CL y la identificación del contenido fenólico utilizando un espectrómetro de masas.

Para la separación de polifenoles, se utilizó una columna de fase reversa C18, y luego los analitos se ionizaron para ingresar en el EM. Se incluyen las relaciones masa-carga de los fragmentos obtenidos por disociación inducida por colisión en el experimento EM². Se observa el espectro de daidzeína detectado por EM², se puede ver como los iones padre (Figura 4.6a) e hijo (Figura 4.6b) están presentes, en aproximadamente el mismo tiempo de retención.

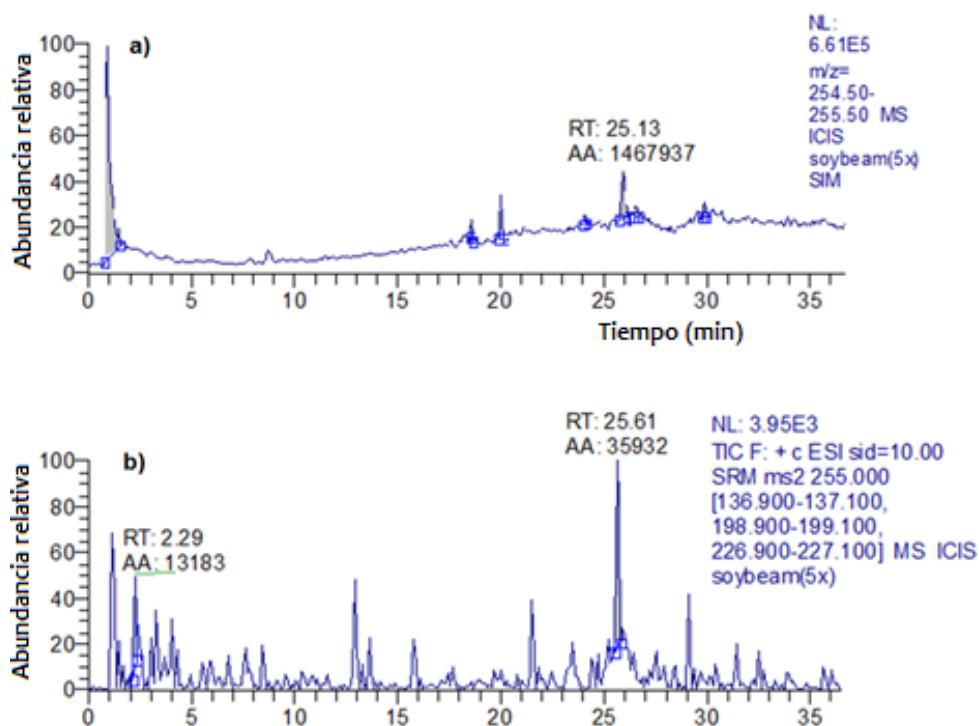


Figura 4.6: identificación de daidzeína por CL-EM2: a) ion molecular de la daidzeína observado por EM1 b) EM2 de fragmentos hijos originados a partir del ion molecular padre de daidzeína.

La totalidad de compuestos que fueron encontrados de esta forma se encuentran en la Tabla IV.V, dentro de tres grupos, ácidos fenólicos, antocianinas y estilbenos, e isoflavonas.

La hidrólisis alcalina también escinde el enlace éster entre el ácido fenólico y el glucósido flavonoide, lo que impide determinar glucósidos de flavonoides acilados [135]. Además, debido a que los glucósidos de ácido fenólico están unidos mediante un enlace éster, que también se degrada en condiciones alcalinas, la presencia de ácidos fenólicos en forma de glucósidos no se detecta. Los ácidos fenólicos, como gálico, siríngico, ferúlico, que poseen actividad antioxidante, también se han encontrado en soja [136], además de isoflavonas, encontradas en extractos acuosos o metanólicos de soja entera [137]. Las isoflavonas genisteína, daidzeína y

gliciteína, son las que se presentan en mayor proporción en soja. Dichas isoflavonas pueden estar presentes en forma de glucósidos, en un 64% genisteína, 23% daidzeína y 13% gliciteína-7-O- β -glucósido [138]. Otra vez, se pudieron detectar isoflavonas, pero en forma libre.

Nro.	Compuesto	t.r.	[M+H] ⁺	MS ²
<i>Ácidos fenólicos</i>				
1	ácido gálico	1.2	171	127
2	ácido sirínico	9.4	199	155 / 184
3	ácido ferúlico	13.1	195	136 / 145
<i>Antocianina y estilbenos</i>				
4	(+)-catequina	11.8	291	247
5	(-)-epicatequina	17.8	291	247
6	quercetina	25.3	303	151 / 179
<i>Isoflavonas</i>				
7	daidzeina	25.6	255	137 / 227 / 199
8	genisteina	25.7	271	153 / 243 / 215

Tabla IV.V: polifenoles que pueden ser identificados en el extracto optimizado por CL-EM2.

4.4. Conclusiones

Se llevó a cabo un análisis inédito para la preparación de extractos con AA de cascarilla de soja, a través de hidrólisis alcalina y liberación de FNEs. Cinco factores y tres respuestas fueron estudiadas por diseño de experimentos. El análisis simultáneo de las condiciones en todos los factores de extracción se llevó a cabo gracias por deseabilidad. Se encontró un compromiso en la búsqueda de valores máximos de tres respuestas relacionadas con el contenido de fenólicos no extraíbles, priorizando la AA.

El presente es uno de los primeros trabajos realizados sobre los PFs antioxidantes de la cascarilla de soja, ya que otros trabajos permitieron obtener datos relativos a otras partes del grano, y sólo a algunos compuestos o grupos [131, 134, 139]. Dado que la biodisponibilidad de los PFs en distintas partes de la planta es muy variada, estos datos pueden contribuir a la selección de materiales vegetales adecuados para la obtención de fitoquímicos como ingredientes de alimentos funcionales o farmacéuticos [114].

Capítulo 5: Extracción de polifenoles de cascarilla de soja mediante tratamientos fúngicos y enzimáticos

El que ha llegado tan lejos que ya no se confunde, ha dejado también de trabajar.

– Max Planck

5.1. Introducción

A diferencia de las fermentaciones tradicionales en medio líquido, en la fermentación en estado sólido (FES) se emplea un soporte sólido donde se desarrolla un microorganismo frecuentemente un hongo filamentoso, con bajo contenido de agua (<20-30%). Si dicho soporte es un residuo orgánico, cumple además la función de nutriente disminuyendo notablemente los costos del proceso de fermentación [52]. Los hongos filamentosos se alimentan por absorción de sustancias simples como aminoácidos, mono o disacáridos, etc. Para obtener dichas moléculas secretan al medio una alta cantidad de enzimas hidrolíticas capaces de degradar macromoléculas biológicas complejas como almidón, xilano, celulosa, etc. [140]. Esta capacidad de producir de enzimas extracelulares convierte a los hongos en grandes productores de enzimas eucariotas, las cuales pueden colectarse en un medio con alta concentración debido a la baja actividad de agua que la FES posee. Los compuestos bioactivos sintetizados por las plantas tienen muchas aplicaciones potenciales como agentes promotores de la salud, y una porción sustancial de los mismos permanece atrapada por la compleja matriz de la pared celular de la planta, disminuyendo su disponibilidad [53]. La FES ofrece la posibilidad de procesar residuos agroindustriales que se pueden utilizar como sustratos para la producción de enzimas, y, si el residuo contiene polifenoles unidos, co-eluir los mismos por medio de su liberación gracias a dichas enzimas (especialmente hidrolasas). Los métodos de extracción asistida por enzimas se han aplicado para a la recuperación de polifenoles logrando altos rendimientos de extracción [141]. Al final del proceso se obtiene un residuo degradado y de menor volumen, que baja el impacto que los desechos orgánicos provocan en el medioambiente [142].

Un método más específico que la hidrólisis alcalina y que el uso de hongos para liberar compuestos fenólicos unidos puede ser la hidrólisis enzimática. La adición de las enzimas puras (obtenidas a partir de hongos) sobre un residuo también pueden facilitar la liberación de estos

compuestos fenólicos [53]. El tratamiento enzimático también representa una estrategia más ecológica para la recuperación de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales que la extracción con solvente y merece ser evaluada. Kammerer y colaboradores probaron el empleo de enzimas con actividades pectinasas y celulasas sobre el orujo de uva durante la extracción con agua, obteniendo un aumento en el rendimiento de la extracción de alrededor del 30%, respecto a un control sin enzima [54]. Las celulasas, por su parte, actúan en la despolimerización de la celulosa a azúcares fermentables. Estas enzimas desempeñan un papel en la desintegración de la matriz de la pared celular de la planta y, en consecuencia, facilitan la extracción de polifenoles, además son GRAS (generalmente considerado como seguro), permitidas para distintas aplicaciones.

Algunos trabajos han demostrado la viabilidad de la aplicación de pectinasas, celulasas y tanasa para la extracción fenólica a partir otro residuo, orujo de uva, en medios acuosos [54], [55]. En el caso de los taninos condensados, su biodisponibilidad depende del grado de polimerización y de su unión a ácido gálico [143]. Chamorro y colaboradores demostraron que el empleo de enzimas con actividades pectinasa y tanasa mejora la actividad antioxidante del producto obtenido, debido a la liberación de ácido gálico a partir de su forma unida a la catequina [55]. Recientemente, Fernández y colaboradores probaron el empleo de enzimas con observando liberación de los taninos condensados de residuos de uva, así como aumento de la actividad antioxidante del producto obtenido debido a liberación de polifenoles no extraíbles (FNE) [144].

En el presente capítulo nos centramos en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cascarilla de soja (CS), que es un subproducto de la industria aceitera. Este residuo representa un problema sustancial de gestión de residuos en regiones de producción intensa. Estudiamos la liberación de PFs por medio del hongo filamentoso *A. Oryzae*, y mediante

el uso de enzimas hidrolasas puras. También analizamos la influencia de estos factores en la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos partir de CS. Destacamos que tanto la extracción biológica empleando hongos filamentosos como la extracción enzimáticas aplicadas a CS, no reportan antecedentes en la bibliografía.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Solución de elementos traza para FES

La solución de trazas se preparó colocando 3 g de KH_2PO_4 , 3 g de NaNO_3 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0075 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,003g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,002 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se llevó a un volumen final de 1 L con agua destilada. La elección del contenido de esta solución se ajustó a la información publicada. Esta solución diluida es un requisito nutricional para el óptimo desarrollo de la cepa de *Aspergillus oryzae* [145].

5.2.2. Preparación de un cultivo en estado sólido de *A. oryzae*

Se evaluó la extracción biológica de PF empleando fermentación en estado sólido (FES) del hongo filamentoso *Aspergillus oryzae* para distintos días de cultivo. Para tal fin, se realizaron fermentaciones en estado sólido colocando en un recipiente de aluminio con tapa 1,00 g de CS (sustrato sólido), previamente molida y tamizada en un tamiz de ensayo MACOTEST mesh 20 y con una abertura de 840μ , y 10 mL de solución de trazas. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 120°C , y luego se sembró un inóculo de conidios de *Aspergillus oryzae* de $4,75 \times 10^7$ conidios ($0,495 \mu\text{L}$ de la suspensión de conidios de la cepa almacenada en glicerol a -70°C), y se incubó en estufa a 30°C por 2, 5 y 7 días. Luego de la incubación se procedió a obtener un extracto líquido de la FES. Se prepararon por triplicado de cada uno de los sistemas por cada tiempo de incubación. Una vez recolectados los extractos fueron filtrados con tela y centrifugadas por 5 min a 125 RPM (Figura 5.1), y se determinó el contenido de AA y CFT.

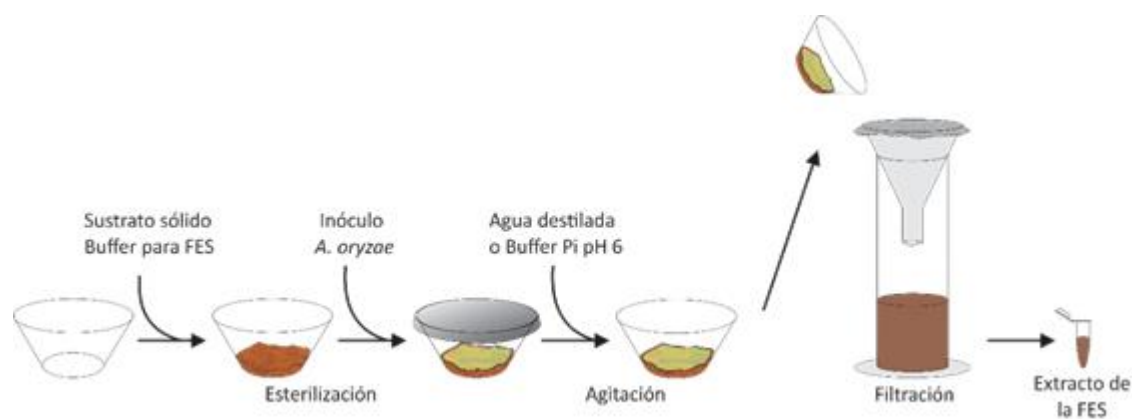


Figura 5.1 Esquema de trabajo del cultivo en estado sólido

Se empleó como control un recipiente de 1g de cascarilla preparado y tratado en idénticas condiciones pero sin inóculo del *A. oryzae*.

5.2.3. Tratamiento enzimático de la cascarilla de soja

Se ensayaron tratamientos enzimáticos sobre CS con enzimas comerciales y en diferentes concentraciones. También se ensayó una mezcla artificial de las mismas. De acuerdo a la composición de la cascarilla, las enzimas seleccionadas para el tratamiento enzimático fueron: α -amilasa (0,5 - 1,5mg/mL) de *A. oryzae*, celulasa (0,26 - 0,78mg/mL) y pectinasa (0,31 - 0,93mg/mL) de *A. niger*, todas adquiridas en Sigma-Aldrich Chem. Co., USA. Las mismas se prepararon en soluciones buffer Pi, pH 7,00, 50mM. Se empleó agua destilada como solución control. La cascarilla fue incubada con las soluciones de enzimas entre 60-100 minutos en agitación de 100 rpm a 30°C.

5.2.4. Determinación de contenido fenólico total y de actividad antioxidante

De acuerdo con la sección materiales y métodos del capítulo 4.

5.3. Resultados

5.3.1. Tratamiento de la cascarilla de soja con el hongo *A. oryzae*

La CS con solución de trazas fue inoculada con *A. oryzae* durante 7 días a 30°C, temperatura óptima de crecimiento del hongo. Se pudo observar que el desarrollo del hongo (H+) generó la secreción de enzimas hidrolasas inducidas por la presencia de este sustrato como única fuente de carbono. Las enzimas producidas por el hongo fueron capaces de degradar CS, tal como se muestra en la Figura 5.2.



Figura 5.2: fotografía del quinto día de un cultivo de fermentación sólida de A. oryzae sobre CS como única fuente de carbono.

Los resultados obtenidos se compararon con un sistema en ausencia del hongo (H-) utilizado como control negativo. La figura 5.3 muestra un incremento apreciable en la concentración de PFs en presencia del hongo que se hace máximo al quinto día de desarrollo del cultivo. En el control negativo, se pudo verificar que no hay modificación de CFT en ausencia del hongo.

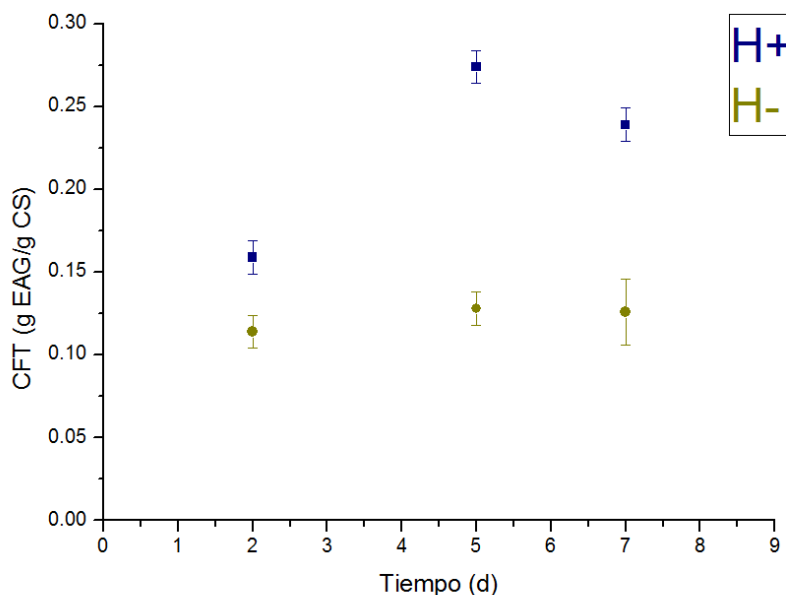


Figura 5.3: Determinación de CFT en presencia y ausencia de *A. oryzae* para los extractos obtenidos en los días 2, 5 y 7 de cultivo.

En la Figura 5.3 se puede ver que los valores de CFT obtenidos en los extractos fúngicos, la acción enzimática sobre la fibra de CS favorece la extracción de CFT siendo máxima en el día cinco de cultivo donde se obtiene un aumento de 107% respecto a la CS en agua sin tratamiento biológico. La secreción de enzimas es máxima al quinto día, principalmente en el caso de la enzima α -amilasa y esto justifica los valores más altos, luego, la posible presencia de proteasas secretadas podría explicar la disminución de la actividad hidrolasa observada al sexto día. Sin embargo, las proteasas podrían también justificar una alta AA, como se menciona en párrafos posteriores.

La extracción de CFT por medio del cultivo fúngico, 0,274 g EAG/100 g CS, fue del 40% respecto del rendimiento de la extracción alcalina optimizada, CFT = 0,718 g/100 g CS. Cuando se analizó la AA de los extractos fúngicos, estos crecieron o decrecieron en la medida en que lo hacía el CFT, esto es lógico debido la habitual correlación encontrada

entre contenido fenólico y actividad antioxidante. La correlación entre dichas variables para tratamientos biológicos es analizada más adelante en este capítulo.

En cuanto a la AA de los extractos de CS obtenidos, el análisis de los mismos por el método de TEAC se muestra en la Figura 5.4. El tratamiento biológico resultó muy efectivo, principalmente en el quinto día de cultivo donde se extraen casi cuatro veces más respecto al control acuoso.

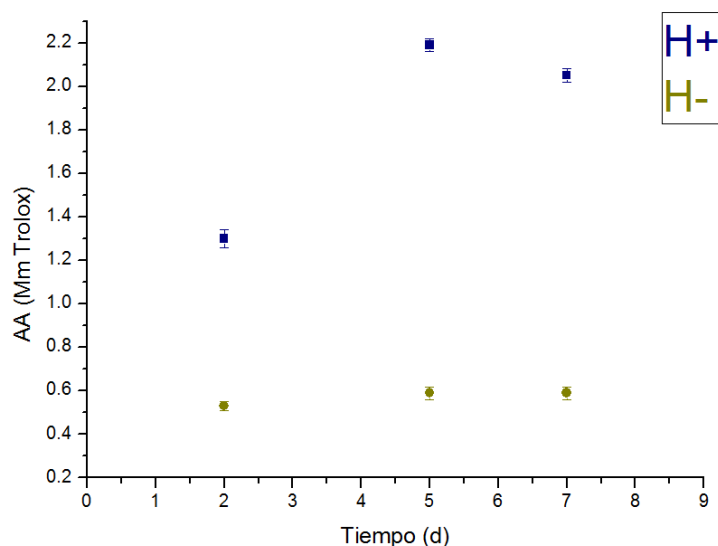


Figura 5.4: Determinación de AA en presencia y ausencia de *A. oryzae* para los extractos obtenidos en los días 2, 5 y 7 de cultivo.

En comparación con los extractos obtenidos de CS por hidrólisis alcalina, 2,17 mM Trolox, y fúngica, 2,19 mM Trolox, resultaron equivalentes. Aún sin haber optimizado, los resultados para el cultivo de 5 días con *A. Oryzae* resultaron sorprendentemente altos en AA. Debido a que el contenido fenólico de esas muestras es, como mencionamos, inferior al del tratamiento alcalino. Esto podría sugerir que, o bien los PFs presentes en extractos de hongo tienen mayor AA, o bien hay antioxidantes no fenólicos

dentro de los extractos biológicos. En ese sentido, el valor alto de AA, podría ser producto de la acción de proteasas que pudieran comenzar a manifestarse a los 5d, ya que en la bibliografía estas enzimas son responsables de la formación de péptidos antioxidantes en *A.Oryzae* [146].

Para determinar los factores más importantes que afectan a la actividad antioxidante, los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon utilizando los datos experimentales. La figura 5.5 muestra la correlación entre AA y CFT la cual sigue el mismo patrón ya observado para los métodos de extracción ensayados en esta tesis que emplearon tanto CS como orujo de uva. Es decir, se observó una muy buena correlación entre ambas variables ($R^2 = 0,952$, pendiente = 8,02). En relación con el párrafo anterior, y la mayor AA de estos extractos, la pendiente de la gráfica AA vs CFT duplica aquella del tratamiento alcalino (8 vs 4).

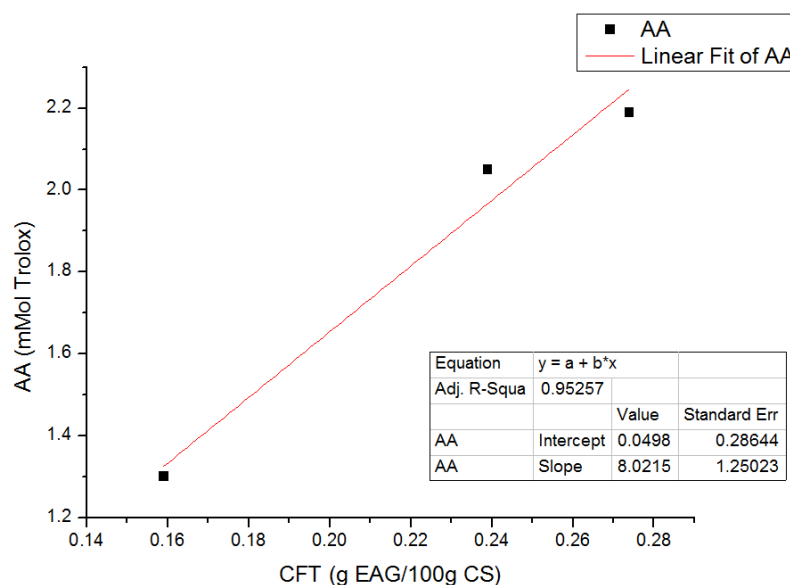


Figura 5.5: correlación entre AA y CFT obtenidos por tratamiento biológico sobre CS para los extractos obtenidos en los días 2, 5 y 7 de cultivo.

5.3.2. Tratamiento enzimático de la cascarilla de soja

La CS se trató con soluciones de enzimas comerciales con actividad hidrolasa, es decir, capaces de hidrolizar enlaces químicos: α -amilasa,

celulasa y pectinasa. Se evaluaron dos concentraciones para cada enzima, como se explicó en materiales y métodos, y la extracción de polifenoles mejoró al aumentar la concentración, se muestra la liberación de polifenoles a mayor concentración de enzima. Los mejores resultados fueron obtenidos mediante α -amilasa 1,5mg/mL, seguida de celulasa 0,78 mg/mL. La Tabla V.I resume los datos obtenidos para CFT y AA luego del tratamiento y en comparación de la cascarilla no tratada, control de extracción con agua.

Se puede observar que la enzima α -amilasa es la única que produce una extracción 48% superior al control. Las demás no justifican ser usadas, incluso la enzima pectinasa la perjudica, lo cual puede ser indicio de interferir en la actividad antioxidante de los extractos, o quizás en el método de determinación del mismo. Además, se realizó una mezcla de aquellas que demostraron mayor capacidad de extracción de CFT y AA frente al agua. La mezcla de ambas enzimas no mejoró la extracción respecto a la α -amilasa sola. El tratamiento enzimático es una alternativa mucho más rápida al hongo pero los rendimientos en las respuestas estudiadas no son tan buenos. Con estos sistemas más puros y limpios no se puede obtener el CFT y la AA que tuvimos con *A. Oryzae*.

Enzima	CFT	% ↑	AA	% ↑
α -Amilasa	1,55	44,8	0,52	48,6
Celulasa	1,12	4,6	0,36	0,03
Pectinasa	0,8	-25,2	0,02	-94,3
Control H ₂ O	1,07	-	0,35	-

Tabla V.I: Determinación de CFT (g EAG/ 100 g CS) y AA (mmol T/ 100 g CS) en los extractos obtenidos por tratamiento enzimático de CS empleando la concentración de enzima más alta.

5.4. Conclusión

Del análisis de las extracciones por medio del hongo filamentoso *A. oryzae* y el tratamiento enzimático se puede concluir que ambos representan una buena opción para la recuperación de polifenoles de cascarilla de soja de manera amigable con el medio ambiente. Es relevante destacar que la metodología requiere bajo consumo de energía, recicla un material recalcitrante de la región y no requiere de aditivos ni procedimientos químicos posteriores. Por otro lado, *A. oryzae* es un hongo considerado GRAS, lo que implica que los extractos obtenidos en este trabajo pueden ser empleados por la industria alimenticia sin objeciones.

Conclusiones finales

Este trabajo de tesis tuvo comienzo gracias al inicio de una red internacional de investigadores en la que participamos junto con otros cinco grupos de investigación de Latinoamérica y Europa llamada “Biotecnologías para valorizar la biodiversidad de alimentos regional”, *BiValBi*, de Marie Curie Actions. En dicha red nos convocó la problemática del aprovechamiento de desechos para obtener productos de valor agregado. Esta tesis se inició en la Universidad de Reading, Reino Unido, para trabajar sobre la problemática de otorgar valor al lactosuero. Una vez en Argentina y en el marco de una beca doctoral de CONICET, continuó en nuestro laboratorio del IPROBYQ, UNR, con el empleo de orujo de uva y la cascarilla de soja para producir extractos ricos en polifenoles con actividad antioxidante.

En un balance de este trabajo, podemos concluir que la betalactoglobulina demostró una alta capacidad en la reducción de la astringencia en las etapas de elaboración del vino tinto, comparables a las proteínas de referencia empleadas habitualmente, y no se detecta su presencia en el producto final. Por esta razón, la BLG presenta una alta potencialidad en el uso industrial para la reducción de astringencia en el sector vitivinícola, como una alternativa natural y ecológica en el proceso de elaboración de vino tinto.

Por el lado del orujo de uva, se obtuvieron una variedad de extractos polifenólicos a partir de orujo de uva, bajo la directriz de un diseño de experimentos. Los mismos fueron producto de diversas estrategias de extracción por métodos *químicos* de extracción sólido líquido. Se diseñaron protocolos alternativos que evitaron el uso de solventes orgánicos, permitiendo la obtención de fenólicos *extraíbles* y *no extraíbles*. Cada estrategia mostró un perfil fenólico particular que podría tomar relevancia de acuerdo al producto industrial al cual se pretende destinar.

Para la cascarilla de soja, se profundizó en nuestro conocimiento sobre diseño de experimentos, incrementando el número de variables en estudio

y la relevancia de las mismas para la extracción química. Se trabajó en la obtención de fenólicos no extraíbles por hidrólisis alcalina y, además, se diseñaron métodos *biológicos* que involucran enzimas comerciales y un hongo filamentoso.

Finalmente, este trabajo fue pionero en nuestro instituto respecto del uso del orujo de uva y del suero de leche para generar valor agregado, también en cuanto a la obtención de antioxidantes a partir de la cascarilla de soja. Esto ha permitido el desarrollo de nuevas líneas de investigación, convenios con Empresas y la adquisición de nuevos subsidios de investigación. La necesidad de reutilización de los desechos nos incumbe como miembros de un instituto dedicado a los procesos y, sin duda, quedan pendientes a futuro nuevos estudios que permitan profundizar el conocimiento de respecto de la obtención, cuantificación e identificación de antioxidantes con miras a una inserción de los mismos como ingredientes cosméticos, o en alimentos funcionales, u otros usos potenciales.

Resumen

Los residuos del sector agroalimentario

La industria agroalimentaria combina el proceso productivo agrícola con el industrial para generar alimentos o materias primas semi-elaboradas destinadas al mercado. La tendencia mundial es el notable crecimiento en la generación de residuos por esta industria derivada del incremento en la generación de productos comercializables y el procesamiento de nuevos alimentos. Estos desechos no son de fácil disposición, ya que poseen elevada carga orgánica y requieren un costo adicional para su tratamiento. Sin embargo, podrían ser susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social.

Para lograr el aprovechamiento de sus residuos, necesitamos desarrollar una clara conciencia ambiental, así como aumentar nuestro conocimiento y capacidad tecnológica para darles un destino final. En nuestro análisis para el aprovechamiento de los desechos locales, utilizamos los siguientes criterios: que puedan tener un mercado demandante o ser utilizados dentro de la cadena de otro proceso productivo; que estén disponibles localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación del producto de interés. Han sido objeto de nuestro estudio en la presente tesis el suero de leche, el orujo de uva y la cascarilla de soja.

Utilización de proteínas de suero de leche para la reducción de la astringencia de vino tinto

El suero de leche contiene aproximadamente el 50% de los sólidos totales de leche, incluyendo aproximadamente el 20% de la proteína total. Por eso el mismo representa una alternativa para la obtención de proteínas con potenciales aplicaciones industriales. Un proceso en el que pueden encontrar aplicación es el de clarificación o reducción de astringencia de

bebidas fermentadas. Al terminar la vinificación en la producción del vino, el exceso de taninos puede causar algunas propiedades indeseables, como la astringencia. Esta sensación áspera está asociada con las interacciones taninos-proteínas de la saliva. El tratamiento del vino con proteínas puede mejorar la claridad, las características sensoriales y la capacidad de envejecimiento de los vinos. La betalactoglobulina (BLG), la proteína de suero de leche más ubicua, tiene algunas ventajas tecnológicas para su aplicación como agente clarificante; es un material económico, alimenticio, no tóxico, capaz de solubilizar y proteger moléculas hidrófobas biológicamente activas en medios acuosos.

En nuestro estudio, se aplicó a la reducción de la astringencia del vino tinto. Realizamos una comparación entre la efectividad de la gelatina, de conformación desplegada, y la BLG, globular, como agentes clarificantes. Las dos proteínas mostraron una selectividad similar para distintos tipos de polifenoles del vino tinto. Además, la BLG se demostró que la BLG fue eliminada del vino tratado, después de su utilidad, descartando la potencial alergenicidad del tratamiento. Finalmente, se obtuvo una mejor comprensión de las interacciones proteína-tanino mediante calorimetría de titulación isotérmica. En general, este estudio demuestra que las proteínas de suero de leche tienen el potencial de reducir la astringencia en el vino tinto y pueden encontrar un nicho para su uso en enología.

Recuperación de fenólicos extraíbles y no extraíbles del orujo de uva por optimización de su extracción sólido-líquido

Se ha estudiado y propuesto una amplia gama de polifenoles de plantas, antioxidantes naturales por excelencia. Una potencial fuente de estos compuestos es el orujo de uva. Se preparó extractos mediante extracción sólido-líquido de orujo de uva Syrah, mediante un diseño experimental, incluyendo los factores temperatura, tiempo y solvente; midiendo las respuestas de fenólicos totales y actividad antioxidante. Un solvente

“tradicional”, una mezcla hidroalcohólica, fue idónea para recuperar los “fenólicos extraíbles”. Cuando se utilizó EtOH:H₂O (1:1) como solvente, el contenido fenólico total fue de entre 2,2 y 4,4 g de equivalentes de ácido gálico/100 g de orujo en las distintas condiciones planteadas.

Los compuestos no recuperados en dicho solvente, son aquellos que presentan baja afinidad por el mismo, así como los “fenólicos unidos o no extraíbles”, que obtuvimos mediante NaOH 2M. Estos fenólicos, descritos como la "cara oculta" de los fenólicos alimentarios tienen escasos estudios en comparación con los extraíbles. Se obtuvieron contenidos de equivalentes de ácido gálico entre 4,4 y 10,3 g/100 g de orujo. Tanto en unos como en otros extractos, las actividades antioxidantes fueron proporcionales al contenido fenólico detectado.

Finalmente, se preparó una función deseabilidad para encontrar óptimos ponderando varios criterios que combinan minimizar tiempo y temperatura, maximizando el contenido de fenólicos con actividad antioxidante. Dichos extractos fueron caracterizados utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia, combinando detección por arreglo de diodos, y espectrometría de masas. Se encontró que los extractos alcalinos contienen una concentración mucho más alta de ácido gálico y (+)-catequina. Además, entre se detectaron en ambos distintos ácidos fenólicos, antocianinas y estilbenos, e isoflavonas, asociados con su alta actividad antioxidante.

Optimización de la extracción de polifenoles con actividad antioxidante de cascarilla de soja mediante hidrólisis alcalina

Las cáscaras de los vegetales contienen compuestos con actividad antioxidante. Las capas externas suelen contener una mayor cantidad de compuestos fenólicos, como se espera de su función protectora en las plantas. Los polifenoles de la soja son bien conocidos por su efecto

protector de la salud hacia los consumidores, sin embargo, el nuestro es el primer estudio sobre polifenoles asociados específicamente a la cascarilla de esta planta.

Estudiamos el efecto de la concentración de NaOH acuoso, y otros factores de importancia como tiempo, temperatura, asistencia de ultrasonido y tamaño, sobre la extracción de polifenoles de dicho residuo. Dicho solvente puede reaccionar con fenólicos poliméricos, hidrolizar taninos y fragmentos de polisacáridos. De esa forma, se liberaron fenólicos, con un contenido total entre 0,206 y 0,929 g de equivalentes de ácido gálico/100 g de cascarilla, medidos por Folin-Ciocalteu, y la actividad antioxidante de los extractos, medida por equivalentes de Trolox (ET), osciló entre 0,362 y 2,372 mmoles/100 g de cascarilla. El perfil fenólico de extractos extraíbles y no extraíbles optimizados se caracterizó por cromatografía líquida con arreglo de diodos, detectando ácido gálico y (+)-catequina, que se utilizaron como respuesta en el diseño de experimentos. Además, para poder determinar la presencia de otros polifenoles, se analizó dichos extractos por CL-EM, detectándose ocho compuestos, entre ácidos fenólicos, antocianinas, estilbenos e isoflavonas.

Extracción de polifenoles de cascarilla de soja mediante tratamientos fúngicos y enzimáticos

Se prepararon cultivos de *A. oryzae* utilizando cascarilla de soja como sustrato, adicionando solamente las mínimas sales necesarias. Se tomaron muestras en distintos tiempos y, a los cinco días, la actividad antioxidante de los extractos preparados fue muy alta. El tratamiento fúngico permitió obtener 2,19 mmol Trolox/100 g, resultó equivalente. Sin embargo, dado que el contenido fenólico fue relativamente mucho menor, el origen de la actividad antioxidante podría, en parte, no deberse a compuestos fenólicos.

De los tratamientos enzimáticos, la enzima α -amilasa es la única que produce una extracción 48% superior al control. Las demás no justifican su utilización. Además, una mezcla enzimática no mejoró la extracción respecto a la α -amilasa sola. El tratamiento enzimático es una alternativa mucho más rápida al hongo pero los rendimientos en las respuestas estudiadas son menores.

Ambos tratamientos, fúngicos y enzimáticos representan una opción para la recuperación de polifenoles de cascarilla de soja que evitan por completo el empleo de químicos. Se destaca que la metodología requiere bajo consumo de energía, recicla un material recalcitrante de la región y, más aún, *A. oryzae* es un hongo considerado generalmente seguro.

Referencias

- [1] L. M. R. da Silva *et al.*, «Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil», *Food Chem.*, vol. 143, pp. 398–404, 2014.
- [2] A. Baiano, «Recovery of biomolecules from food wastes—a review», *Molecules*, vol. 19, n.º 9, pp. 14821–14842, 2014.
- [3] F. Segovia Gómez y others, «Aprovechamiento de residuos agro-industriales: preparación de extractos, caracterización y uso en alimentos», 2015.
- [4] D. R. Kammerer, J. Kammerer, R. Valet, y R. Carle, «Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients», *Food Res. Int.*, vol. 65, pp. 2–12, 2014.
- [5] M. R. Kosseva, «Processing of food wastes», *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 58, pp. 57–136, 2009.
- [6] A. Cuellas y J. Wagner, «Elaboración de bebida energizante a partir de suero de quesería», *Rev. Lab. Tecnológico Urug. INNOTEC*, vol. 5, p. 54, 2010.
- [7] R. Cardin y M. E. Iturregui, «Informes de cadenas de valor - Industria láctea», 2016. [En línea]. Disponible en: https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_Lacteo.pdf. [Accedido: 20-dic-2017].
- [8] S. Ostojić *et al.*, «Processing of whey from dairy industry waste», *Environ. Chem. Lett.*, vol. 3, n.º 1, pp. 29–32, 2005.
- [9] Y. Motta-Correa y W. J. Mosquera, «AVANCES EN EL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO COMO MATERIA PRIMA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA», *Limentech Cienc. Tecnol. Aliment.*, vol. 13, n.º 1, 2015.
- [10] J. P. Conti, M. C. Ceriani, M. A. Juliarena, y E. N. Esteban, «Perfil Proteico y Peptídico de una base Fluida para Bebidas Funcionales obtenida por Fermentación de Lactosuero», *Inf. Tecnológica*, vol. 23, n.º 2, pp. 61-70, 2012.
- [11] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, y A. Lonvaud, *Handbook of enology, the microbiology of wine and vinifications*, vol. 1. John Wiley & Sons, 2006.
- [12] C. Maury, P. Sarni-Manchado, S. Lefebvre, V. Cheynier, y M. Moutounet, «Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 54, n.º 2, pp. 105–111, 2003.
- [13] R. F. Guerrero, P. Smith, y K. A. Bindon, «Application of Insoluble Fibers in the Fining of Wine Phenolics», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n.º 18, pp. 4424–4432, may 2013.
- [14] M. F. Horno, «Galletitas enriquecidas con harina con residuos de soja okara», 2011.
- [15] F. Salvagiotti, «Manejo de soja de alta producción», *Para Mejor. Prod.*, vol. 42, pp. 57–62, 2009.
- [16] J. Yang, A. Xiao, y C. Wang, «Novel development and characterisation of dietary fibre from yellow soybean hulls», *Food Chem.*, vol. 161, pp. 367-375, oct. 2014.
- [17] A. Alemdar y M. Sain, «Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues - Wheat straw and soy hulls», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n.º 6, pp. 1664-1671, abr. 2008.
- [18] M. Hussain, S. Cholette, y R. M. Castaldi, «An analysis of globalization forces in the wine industry: implications and recommendations for wineries», *J. Glob. Mark.*, vol. 21, n.º 1, pp. 33–47, 2008.

-
- [19] R. Devesa-Rey, X. Vecino, J. L. Varela-Alende, M. T. Barral, J. M. Cruz, y A. B. Moldes, «Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling», *Waste Manag.*, vol. 31, n.º 11, pp. 2327–2335, 2011.
- [20] S. de Renaud y M. de Lorgeril, «Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease», *The Lancet*, vol. 339, n.º 8808, pp. 1523–1526, 1992.
- [21] M. R. González-Centeno, C. Rosselló, S. Simal, M. C. Garau, F. López, y A. Femenia, «Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems», *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 43, n.º 10, pp. 1580-1586, dic. 2010.
- [22] K. L. Christ y R. L. Burritt, «Critical environmental concerns in wine production: an integrative review», *J. Clean. Prod.*, vol. 53, n.º Supplement C, pp. 232-242, ago. 2013.
- [23] C. Beres *et al.*, «Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review», *Waste Manag.*, vol. 68, n.º Supplement C, pp. 581-594, oct. 2017.
- [24] I. Ignat, I. Volf, y V. I. Popa, «A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables», *Food Chem.*, vol. 126, n.º 4, pp. 1821–1835, 2011.
- [25] E. Middleton, C. Kandaswami, y T. C. Theoharides, «The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer», *Pharmacol. Rev.*, vol. 52, n.º 4, pp. 673-751, dic. 2000.
- [26] I. Ky, B. Lorrain, N. Kolbas, A. Crozier, y P.-L. Teissedre, «Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties», *Molecules*, vol. 19, n.º 1, pp. 482–506, 2014.
- [27] D. Kammerer, A. Claus, R. Carle, y A. Schieber, «Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n.º 14, pp. 4360–4367, 2004.
- [28] J. Yu y M. Ahmedna, «Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications», *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, n.º 2, pp. 221–237, 2013.
- [29] A. V. Sirotkin y A. H. Harrath, «Phytoestrogens and their effects», *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 741, pp. 230–236, 2014.
- [30] A. Zaiter, L. Becker, M.-C. Karam, y A. Dicko, «Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders», *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, n.º 4, pp. 2025-2032, abr. 2016.
- [31] S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, y C. García-Viguera, «Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, n.º 4, pp. 1679–1703, 2010.
- [32] P. C.-T. Tang, Y.-F. Ng, S. Ho, M. Gyda, y S.-W. Chan, «Resveratrol and cardiovascular health—promising therapeutic or hopeless illusion?», *Pharmacol. Res.*, vol. 90, pp. 88–115, 2014.
- [33] J. M. McRae, R. J. Falconer, y J. A. Kennedy, «Thermodynamics of Grape and Wine Tannin Interaction with Polyproline: Implications for Red Wine Astringency», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, n.º 23, pp. 12510-12518, dic. 2010.
- [34] M. Pinelo, M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, y M. J. Núñez, «Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 6, pp. 2111–2117, 2005.

- [35] F. Gironi y V. Piemonte, «Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood», *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 89, n.º 7, pp. 857–862, 2011.
- [36] G. Spigno, L. Tramelli, y D. M. De Faveri, «Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics», *J. Food Eng.*, vol. 81, n.º 1, pp. 200–208, jul. 2007.
- [37] C. Drosou, K. Kyriakopoulou, A. Bimpilas, D. Tsimogiannis, y M. Krokida, «A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts», *Ind. Crops Prod.*, vol. 75, pp. 141–149, 2015.
- [38] A. H. Goli, M. Barzegar, y M. A. Sahari, «Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts», *Food Chem.*, vol. 92, n.º 3, pp. 521–525, 2005.
- [39] E. Roselló-Soto *et al.*, «Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 42, n.º 2, pp. 134–149, 2015.
- [40] M. R. González-Centeno, F. Comas-Serra, A. Femenia, C. Rosselló, y S. Simal, «Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling», *Ultrason. Sonochem.*, vol. 22, pp. 506–514, 2015.
- [41] N. M. Anson, R. van den Berg, R. Havenaar, A. Bast, y G. R. Haenen, «Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility», *J. Cereal Sci.*, vol. 49, n.º 2, pp. 296–300, 2009.
- [42] F. Saura-Calixto, «Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: the missing dietary polyphenols», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, n.º 45, pp. 11195–11200, 2012.
- [43] B. A. Acosta-Estrada, J. A. Gutiérrez-Urbe, y S. O. Serna-Saldívar, «Bound phenolics in foods, a review», *Food Chem.*, vol. 152, n.º Supplement C, pp. 46–55, jun. 2014.
- [44] R. H. Liu, «Whole grain phytochemicals and health», *J. Cereal Sci.*, vol. 46, n.º 3, pp. 207–219, 2007.
- [45] K. K. Adom y R. H. Liu, «Antioxidant activity of grains», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n.º 21, pp. 6182–6187, 2002.
- [46] Y.-P. Neo, A. Ariffin, C.-P. Tan, y Y.-A. Tan, «Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts», *Food Chem.*, vol. 122, n.º 1, pp. 353–359, 2010.
- [47] D. Peričin, V. Krimer, S. Trivić, y L. Radulović, «The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull», *Food Chem.*, vol. 113, n.º 2, pp. 450–456, 2009.
- [48] C. D. Stalikas, «Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids», *J. Sep. Sci.*, vol. 30, n.º 18, pp. 3268–3295, 2007.
- [49] B. Verma, P. Hucl, y R. N. Chibbar, «Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions», *Food Chem.*, vol. 116, n.º 4, pp. 947–954, 2009.
- [50] K.-H. Kim, R. Tsao, R. Yang, y S. W. Cui, «Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions», *Food Chem.*, vol. 95, n.º 3, pp. 466–473, 2006.
- [51] B. L. White, L. R. Howard, y R. L. Prior, «Release of Bound Procyanidins from Cranberry Pomace by Alkaline Hydrolysis», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, n.º 13, pp. 7572–7579, jul. 2010.

- [52] R. R. Singhanian, A. K. Patel, C. R. Soccol, y A. Pandey, «Recent advances in solid-state fermentation», *Biochem. Eng. J.*, vol. 44, n.º 1, pp. 13-18, abr. 2009.
- [53] M. Puri, D. Sharma, y C. J. Barrow, «Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants», *Trends Biotechnol.*, vol. 30, n.º 1, pp. 37-44, 2012.
- [54] D. Kammerer, A. Claus, A. Schieber, y R. Carle, «A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace», *J. Food Sci.*, vol. 70, n.º 2, 2005.
- [55] S. Chamorro, A. Viveros, I. Alvarez, E. Vega, y A. Brenes, «Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment», *Food Chem.*, vol. 133, n.º 2, pp. 308-314, 2012.
- [56] V. L. Singleton, R. Orthofer, y R. M. Lamuela-Raventós, «[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent», *Methods Enzymol.*, vol. 299, pp. 152-178, 1999.
- [57] J. R. Cornelio Bello y Y. P. Azaña Sulca, «Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas», 2007.
- [58] P. L. Pisano, M. F. Silva, y A. C. Olivieri, «Anthocyanins as markers for the classification of Argentinean wines according to botanical and geographical origin. Chemometric modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data», *Food Chem.*, vol. 175, n.º Supplement C, pp. 174-180, may 2015.
- [59] D. A. C. L. Castellano, «DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS DE USO VETERINARIO EN DIVERSAS MATRICES BIOLÓGICAS».
- [60] N. P. Seeram, R. Lee, H. S. Scheuller, y D. Heber, «Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy», *Food Chem.*, vol. 97, n.º 1, pp. 1-11, jul. 2006.
- [61] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, y C. Rice-Evans, «Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, n.º 9, pp. 1231-1237, 1999.
- [62] Y.-Y. Soong y P. J. Barlow, «Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds», *Food Chem.*, vol. 88, n.º 3, pp. 411-417, 2004.
- [63] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, y N. Vidal, «Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds», *Food Chem.*, vol. 97, n.º 4, pp. 654-660, 2006.
- [64] D. C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons, 2017.
- [65] K. M. Sharif *et al.*, «Experimental design of supercritical fluid extraction-A review», *J. Food Eng.*, vol. 124, pp. 105-116, 2014.
- [66] M. Kennedy y D. Krouse, «Strategies for improving fermentation medium performance: a review», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, n.º 6, pp. 456-475, 1999.
- [67] B. Dejaegher y Y. Vander Heyden, «Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 56, n.º 2, pp. 141-158, sep. 2011.
- [68] S. Tanaydin, *Robust design and analysis for quality engineering*. Taylor & Francis Group, 1998.

- [69] P. G. Mathews, *Design of Experiments with MINITAB*. ASQ Quality Press, 2005.
- [70] T. Swain y E. C. Bate-Smith, «Flavonoid compounds», en *Comparative Biochemistry, Volume 3*, Elsevier, 1962, pp. 755–809.
- [71] M. S. Guerrero, J. S. Torres, y M. J. Nuñez, «Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: optimization and modelling», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n.º 5, pp. 1311–1318, 2008.
- [72] C. D. Kanakis, I. Hasni, P. Bourassa, P. A. Tarantilis, M. G. Polissiou, y H.-A. Tajmir-Riahi, «Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols», *Food Chem.*, vol. 127, n.º 3, pp. 1046-1055, ago. 2011.
- [73] M. von Staszewski, F. L. Jara, A. L. T. G. Ruiz, R. J. Jagus, J. E. Carvalho, y A. M. R. Pilosof, «Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropéptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity», *J. Funct. Foods*, vol. 4, n.º 4, pp. 800-809, oct. 2012.
- [74] A. J. Charlton *et al.*, «Polyphenol/peptide binding and precipitation», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n.º 6, pp. 1593–1601, 2002.
- [75] S. Soares, E. Brandão, N. Mateus, y V. de Freitas, «Interaction between red wine procyanidins and salivary proteins: effect of stomach digestion on the resulting complexes», *RSC Adv.*, vol. 5, n.º 17, pp. 12664-12670, ene. 2015.
- [76] T. Ozdal, E. Capanoglu, y F. Altay, «A review on protein–phenolic interactions and associated changes», *Food Res. Int.*, vol. 51, n.º 2, pp. 954-970, may 2013.
- [77] F. T. Welderufael, T. Gibson, y P. Jauregi, «Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from β -lactoglobulin- and casein-derived peptides: An integrative approach», *Biotechnol. Prog.*, vol. 28, n.º 3, pp. 746-755, may 2012.
- [78] C. Thomä, I. Krause, y U. Kulozik, «Precipitation behaviour of caseinomacropéptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC», *Int. Dairy J.*, vol. 16, n.º 4, pp. 285–293, 2006.
- [79] M. C. Llaudy, R. Canals, J.-M. Canals, N. Rozés, L. Arola, y F. Zamora, «New Method for Evaluating Astringency in Red Wine», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, n.º 4, pp. 742-746, feb. 2004.
- [80] W. Kim, Y. Yamasaki, y K. Kataoka, «Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands», *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, n.º 22, pp. 10919–10925, 2006.
- [81] K. J. Siebert, N. V. Troukhanova, y P. Y. Lynn, «Nature of Polyphenol–Protein Interactions», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44, n.º 1, pp. 80-85, ene. 1996.
- [82] A. Bennick, «Interaction of plant polyphenols with salivary proteins», *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 13, n.º 2, pp. 184–196, 2002.
- [83] J. M. Ricardo-da-Silva, V. Cheynier, J.-M. Souquet, M. Moutounet, J.-C. Cabanis, y M. Bourzeix, «Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 57, n.º 1, pp. 111-125, ene. 1991.
- [84] M. Deckwart *et al.*, «Impact of wine manufacturing practice on the occurrence of fining agents with allergenic potential», *Food Addit. Contam. Part A*, vol. 31, n.º 11, pp. 1805–1817, 2014.
- [85] E. R. Deaville, R. J. Green, I. Mueller-Harvey, I. Willoughby, y R. A. Frazier, «Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n.º 11, pp. 4554–4561, 2007.

- [86] Z. Yuksel, E. Avci, y Y. K. Erdem, «Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins», *Food Chem.*, vol. 121, n.º 2, pp. 450-456, jul. 2010.
- [87] L. Liang, H. A. Tajmir-Riahi, y M. Subirade, «Interaction of β -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications», *Biomacromolecules*, vol. 9, n.º 1, pp. 50-56, ene. 2008.
- [88] A. E. Quirós-Sauceda *et al.*, «Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion», *Food Funct.*, vol. 5, n.º 6, pp. 1063-1072, 2014.
- [89] S. Kallithraka, C. Garcia-Viguera, P. Bridle, y J. Bakker, «Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics», *Phytochem. Anal.*, vol. 6, n.º 5, pp. 265-267, 1995.
- [90] G. K. Jayaprakasha, R. P. Singh, y K. K. Sakariah, «Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro», *Food Chem.*, vol. 73, n.º 3, pp. 285-290, 2001.
- [91] Y. Yilmaz y R. T. Toledo, «Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols», *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, n.º 1, pp. 41-48, 2006.
- [92] T. Albishi, J. A. John, A. S. Al-Khalifa, y F. Shahidi, «Phenolic content and antioxidant activities of selected potato varieties and their processing by-products», *J. Funct. Foods*, vol. 5, n.º 2, pp. 590-600, 2013.
- [93] G. B. Gonzales, G. Smagghe, K. Raes, y J. Van Camp, «Combined alkaline hydrolysis and ultrasound-assisted extraction for the release of nonextractable phenolics from cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) waste», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, n.º 15, pp. 3371-3376, 2014.
- [94] A. R. Fontana, A. Antonioli, y R. Bottini, «Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n.º 38, pp. 8987-9003, sep. 2013.
- [95] J. A. Larrauri, P. Rupérez, y F. Saura-Calixto, «Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, n.º 4, pp. 1390-1393, 1997.
- [96] V. L. Singleton y J. A. Rossi, «Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents», *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, n.º 3, pp. 144-158, ene. 1965.
- [97] N. Paixão, R. Perestrelo, J. C. Marques, y J. S. Câmara, «Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines», *Food Chem.*, vol. 105, n.º 1, pp. 204-214, 2007.
- [98] S. Sellappan, C. C. Akoh, y G. Krewer, «Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n.º 8, pp. 2432-2438, 2002.
- [99] T.-I. Lafka, V. Sinanoglou, y E. S. Lazos, «On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes», *Food Chem.*, vol. 104, n.º 3, pp. 1206-1214, 2007.
- [100] C. Mané *et al.*, «Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n.º 18, pp. 7224-7233, 2007.
- [101] M. S. Dopico-García, P. Valentão, L. Guerra, P. B. Andrade, y R. M. Seabra, «Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes», *Anal. Chim. Acta*, vol. 583, n.º 1, pp. 15-22, 2007.

- [102] F. Marini, *Chemometrics in food chemistry*, vol. 28. Newnes, 2013.
- [103] N. I. Hong, V. A. Yaylayan, G. S. Vijaya Raghavan, J. J. Paré, y J. M. Bélanger, «Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed», *Nat. Prod. Lett.*, vol. 15, n.º 3, pp. 197–204, 2001.
- [104] N. Babbar, H. S. Oberoi, D. S. Uppal, y R. T. Patil, «Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues», *Food Res. Int.*, vol. 44, n.º 1, pp. 391–396, 2011.
- [105] M. J. Jara-Palacios, D. Hernanz, M. L. Escudero-Gilete, y F. J. Heredia, «Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods», *Food Res. Int.*, vol. 66, pp. 150–157, 2014.
- [106] C. Beres *et al.*, «Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace», *Food Chem.*, vol. 201, pp. 145–152, 2016.
- [107] F. Karadeniz, R. W. Durst, y R. E. Wrolstad, «Polyphenolic composition of raisins», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, n.º 11, pp. 5343–5350, 2000.
- [108] M. Al-Farsi, C. Alasalvar, A. Morris, M. Baron, y F. Shahidi, «Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, n.º 19, pp. 7592–7599, 2005.
- [109] R. H. Myers, D. C. Montgomery, G. G. Vining, C. M. Borrer, y S. M. Kowalski, «Response surface methodology: a retrospective and literature survey», *J. Qual. Technol.*, vol. 36, n.º 1, p. 53, 2004.
- [110] P. M. Jeganathan, S. Venkatachalam, T. Karichappan, y S. Ramasamy, «Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using Box–Behnken design», *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 44, n.º 1, pp. 56–67, 2014.
- [111] G. DERRINGER, «Simultaneous Optimization of Several Response Variables», *J. Qual. Technol.*, vol. 12, n.º 4, pp. 214–219, 1980.
- [112] E. Cantos, J. C. Espín, y F. A. Tomás-Barberán, «Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC–DAD–MS–MS», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, n.º 20, pp. 5691–5696, sep. 2002.
- [113] J. Oliveira, M. Alhinho da Silva, N. Teixeira, V. De Freitas, y E. Salas, «Screening of Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wine Grape Pomace Using LC-DAD/MS and MALDI-TOF Techniques», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, n.º 35, pp. 7636–7644, sep. 2015.
- [114] C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, S. Godbout, y J. R. Valéro, «Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends», *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 31, n.º 3, pp. 227–249, sep. 2011.
- [115] «USDA | OCE | 2016 Agricultural Outlook Forum | Commodity Outlooks». [En línea]. Disponible en: <https://www.usda.gov/oce/forum/commodity.html>. [Accedido: 19-jun-2017].
- [116] R. Gnanasambandam y A. Proctor, «Preparation of soy hull pectin», *Food Chem.*, vol. 65, n.º 4, pp. 461–467, 1999.
- [117] Á. C. Schirmer-Michel, S. H. Flôres, P. F. Hertz, G. S. Matos, y M. A. Z. Ayub, «Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n.º 8, pp. 2898–2904, 2008.
- [118] J. Isanga y G.-N. Zhang, «Soybean bioactive components and their implications to health—a review», *Food Rev. Int.*, vol. 24, n.º 2, pp. 252–276, 2008.

- [119] C. R. Sirtori, «Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis», *Drug Saf.*, vol. 24, n.º 9, pp. 665–682, 2001.
- [120] M. J. Messina, V. Persky, K. D. Setchell, y S. Barnes, «Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data», *Nutr. Cancer*, vol. 21, n.º 2, pp. 113–131, 1994.
- [121] S. R. Georgetti, R. Casagrande, C. R. F. Souza, W. P. Oliveira, y M. J. V. Fonseca, «Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity», *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 41, n.º 8, pp. 1521–1527, 2008.
- [122] S. Jokić *et al.*, «Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans», *Czech J. Food Sci.*, vol. 28, n.º 3, pp. 206–212, 2010.
- [123] D. Malenčić, Z. Maksimović, M. Popović, y J. Miladinović, «Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n.º 14, pp. 6688–6691, 2008.
- [124] B. j. Xu y S. k. c. Chang, «A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents», *J. Food Sci.*, vol. 72, n.º 2, pp. S159-S166, mar. 2007.
- [125] J. Dai y R. J. Mumper, «Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties», *Molecules*, vol. 15, n.º 10, pp. 7313–7352, oct. 2010.
- [126] G. Pan, G. Yu, C. Zhu, y J. Qiao, «Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS)», *Ultrason. Sonochem.*, vol. 19, n.º 3, pp. 486–490, 2012.
- [127] K. Ghafoor, Y. H. Choi, J. Y. Jeon, y I. H. Jo, «Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, n.º 11, pp. 4988–4994, 2009.
- [128] Y. Li, G. K. Skouroumounis, G. M. Elsey, y D. K. Taylor, «Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols», *Food Chem.*, vol. 129, n.º 2, pp. 570–576, 2011.
- [129] L. Wang y C. L. Weller, «Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 17, n.º 6, pp. 300–312, jun. 2006.
- [130] L.-S. Lee *et al.*, «Optimization of ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from green tea using response surface methodology», *Molecules*, vol. 18, n.º 11, pp. 13530–13545, 2013.
- [131] H. Han y B.-K. Baik, «Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing», *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 43, n.º 11, pp. 1971–1978, nov. 2008.
- [132] L.-H. Chang y C.-M. J. Chang, «Continuous hot pressurized fluids extraction of isoflavones and soyasaponins from defatted soybean flakes», *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, vol. 38, n.º 3, pp. 313–319, 2007.
- [133] C. R. Correa *et al.*, «Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*)», *Food Chem.*, vol. 123, n.º 4, pp. 1176–1184, dic. 2010.
- [134] D. E. Roopchand *et al.*, «Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods», *Food Chem.*, vol. 131, n.º 4, pp. 1193–1200, abr. 2012.
- [135] R. Llorach, A. Gil-Izquierdo, F. Ferreres, y F. A. Tomás-Barberán, «HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated

- flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. v ar. botrytis) agroindustrial byproducts», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n.º 13, pp. 3895–3899, 2003.
- [136] F. Shahidi y P. Ambigaipalan, «Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review», *J. Funct. Foods*, vol. 18, pp. 820–897, 2015.
- [137] D. E. Pratt y P. M. Birac, «Source of antioxidant activity of soybeans and soy products», *J. Food Sci.*, vol. 44, n.º 6, pp. 1720–1722, 1979.
- [138] M. H. Alu'datt *et al.*, «A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds», *Food Chem.*, vol. 218, n.º Supplement C, pp. 99–106, mar. 2017.
- [139] S. Barnes, J. K. Prasain, C.-C. Wang, y D. R. Moore, «Applications of LC-MS in the study of the uptake, distribution, metabolism and excretion of bioactive polyphenols from dietary supplements», *Life Sci.*, vol. 78, n.º 18, pp. 2054–2059, 2006.
- [140] J. Caballero-Mellado, «Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas», *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 48, n.º 2, pp. 154–161, 2006.
- [141] G. Zhang, M. Hu, L. He, P. Fu, L. Wang, y J. Zhou, «Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro», *Food Bioprod. Process.*, vol. 91, n.º 2, pp. 158–168, 2013.
- [142] D. L. Hawksworth, B. E. Kirsop, y S. C. Jong, *Filamentous fungi*. Cambridge University Press, 1988.
- [143] M. Monagas *et al.*, «Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites», *Food Funct.*, vol. 1, n.º 3, pp. 233–253, 2010.
- [144] K. Fernández, M. Vega, y E. Aspé, «An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins», *Food Chem.*, vol. 168, pp. 7–13, 2015.
- [145] R. Kammoun, B. Naili, y S. Bejar, «Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product)», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n.º 13, pp. 5602–5609, 2008.
- [146] R. J. S. de Castro y H. H. Sato, «Protease from *Aspergillus oryzae*: biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolysates with antioxidant activities», *J. Food Process.*, vol. 2014, 2014.