

Marianne Lizárraga Chaidez

Optimización en el proceso de extracción verde de
un antioxidante a partir del subproducto
agroindustrial de la industria vitivinícola

2024



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Optimización en el proceso de extracción verde de
un antioxidante a partir del subproducto
agroindustrial de la industria vitivinícola

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
grado de

Maestro en Ingeniería de Calidad y Productividad

Presenta

Ing. Marianne Lizárraga Chaidez

Dirigido por:

Dra. Magdalena Mendoza Sánchez

Querétaro, Qro, a 01 de enero del 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



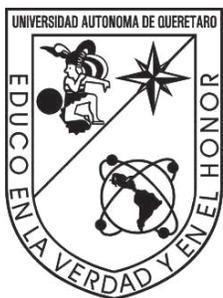
Optimización en el proceso de extracción verde de un
antioxidante a partir del subproducto agroindustrial
de la industria vitivinícola

por

Marianne Lizárraga Chaidez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: IGMAN-309220



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de ingeniería

Maestría en Ingeniería de Calidad y Productividad

Optimización en el proceso de extracción verde de un antioxidante a partir del subproducto agroindustrial de la industria vitivinícola

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ingeniería de Calidad y Productividad

Presenta

Ing. Marianne Lizárraga Chaidez

Dirigido por:

Dra. Magdalena Mendoza Sánchez

Dra. Magdalena Mendoza Sánchez
Presidenta

MI. Javier García Pérez
Secretario

Dra. Claudia Gutiérrez Antonio
Vocal

Dra. Lucía Abadía García
Suplente

MAP. José Agustín Ramírez Rodríguez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero 2024
México

Dedicatorias

A Dios, mi fuente inagotable de fortaleza y guía.

A mis padres, cuyo amor y sacrificio han iluminado mi camino.

A Uriel, por su paciencia y apoyo constante.

A mis hermanos, a Scarlett y Napoleón.

A mis compañeros de laboratorio y programa de estudio, gracias por su amistad y aprendizaje.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro, la Facultad de Ingeniería y al programa de estudios MICyP.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su apoyo financiero en la obtención del grado de estudio a través del CVU 1181399.

ÍNDICE GENERAL

<i>Dedicatorias</i>	iii
<i>Agradecimientos</i>	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
SIGLAS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
2 ANTECEDENTES	5
2.2 Producción y consumo de la industria vitivinícola en México.	5
2.3 Producción de residuos agroindustriales de la industria vitivinícola.	6
2.4 Efectos adversos al medio ambiente	6
2.4 Revalorización de subproductos agroindustriales y de la industria vitivinícola	7
2.4.1 Compuestos	7
2.4.2 Aplicaciones	8
2.4.2.1 Aprovechamiento del subproducto de la uva en la industria de alimentos.	10
2.5 Bebidas adicionadas con subproducto de la industria vitivinícola.	11
2.6 Aplicaciones para la extracción de compuestos de subproductos agroindustriales.	11
2.6.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	12
2.6.2 Extracción asistida por microondas (EAM)	12
2.7 Optimización de procesos	13
3 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	14
3.1 Extracción por ultrasonido	14

3.2	Extracción asistida por microondas (EAM).	15
3.3	Influencia de los parámetros fisicoquímicos en la extracción por EAU.	16
3.3.1	Temperatura	16
3.3.2	Influencia del pH	16
3.4	Capacidad antioxidante por captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y ABTS	16
3.5	Contenido de fenoles totales (CFT) utilizando la técnica Folin- Ciocalteu.	17
3.6	Contenido de antocianinas por CAbdel-CAI- and Hucl	18
3.7	Diseño experimental	18
3.8	Optimización por metodología de superficie de respuesta (MSR's)	19
4	HIPÓTESIS	21
5	OBJETIVOS	21
6	METODOLOGÍA	22
6.1	Obtención del producto agroindustrial.	23
6.2	Preparación de la muestra	23
6.3	Condiciones de extracción	23
6.3.1	Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	23
6.3.2	Extracción Asistida por Microondas (EAM)	24
6.4	Diseño experimental	24
6.5	Análisis del modelo de primer orden	24
6.5.1	Optimización por modelo de segundo orden	24
6.6	Cuantificación de contenido fenólico total (CFT)	25
6.7	Capacidad antioxidante por ABTS y DPPH	25
6.8	Contenido total de antocianinas	26
6.9	Desarrollo de jugo de zanahoria, manzana y suero de leche.	26
6.10	Determinaciones fisicoquímicas	27
6.10.1	pH	27
6.11	Capacidad antioxidante en jugos de zanahoria, manzana y suero de leche con extracto de subproducto de uva.	27
6.12	Análisis estadístico.	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES	29

7.1.1	EAU contenido de antocianinas (CAT) en el subproducto de la uva.	33
7.1.2	Influencia de la EAU en la capacidad antioxidante.	34
7.2	Compuestos fenólicos totales de subproducto de uva EAM	36
7.2.1	Contenido de antocianinas en el subproducto de la uva EAM	39
7.2.2	Efecto de la EAM sobre la capacidad antioxidante.	40
7.3	Optimización de CFT del subproducto de la uva mediante EAU	42
7.3.1	Efecto de EAU sobre el contenido de antocianinas	44
7.3.2	Efecto de EAU sobre la capacidad antioxidante.	46
7.4	Capacidad antioxidante de extractos de subproducto de uva en bebidas.	49
7.4.1	pH y color perceptible en bebidas adicionadas con subproducto de uva.	50
8	CONCLUSIONES	53
9	REFERENCIAS	54
	ANEXOS	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Aplicaciones del subproducto de uva	9
Cuadro 2.1 Matriz experimental del diseño factorial fraccionado para ultrasonido y microondas y diseño box-Behnken para ultrasonido.	29
Cuadro 2.2 Diseño factorial fraccionado y resultados de variables dependientes en EAU	33
Cuadro 2.3. Diseño factorial fraccionado y resultados de variables dependientes en EAM.	38
Cuadro 2.4. Diseño Box-Behnken y resultados de variables dependientes en EAU.....	45
Cuadro 2.5. Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS y pH de jugos de zanahoria, manzana y suero de leche con extracto de subproducto de uva, y ácido ascórbico.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Partes de la uva	6
Figura 2.1. Colapso de microburbujas por el principio de la cavitación (modificada de Medina-Torres et al., 2017)	14
Figura 2.2. Sistema de ultrasonido (a) sonda ultrasónica, (B) ultrasonido con baño de agua y termostato (Modificada de Strieder et al., 2019).....	15
Figura 2.3. Reacción del compuesto DPPH y el antioxidante dando lugar a su forma reducida que vira del color púrpura al amarillo.	17
Figura 2.4. Diseño experimental Box-Behnken (Modificado de Bezerra et al., 2008).....	20
Figura 3.1 Diagrama de la metodología seguida	22
Figura 4.2. (a) Diagrama de Pareto del diseño factorial fraccionado de extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido fenólico total (CFT) del subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de tiempo-temperatura de extracción de CFT del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de amplitud-tiempo de extracción de CFT del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de temperatura-amplitud de extracción en CFT a partir del subproducto de uva	30
Figura 4.3. (a) Diagrama de Pareto del diseño factorial fraccionado de extracción asistida por ultrasonido sobre la capacidad antioxidante del subproducto de uva. Ensayo ABTS del subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de tiempo-temperatura de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de amplitud-tiempo de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de temperatura-amplitud de extracción en CFT a partir del subproducto de uva en el ensayo ABTS del subproducto de uva	35

Figura 4.4. (a) Diagrama de Pareto del diseño factorial fraccional de extracción asistida por ultrasonido sobre la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH de subproducto de uva; (b) Gráfica de superficie de respuesta del diseño factorial fraccionado de tiempo-temperatura; (c) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccional de amplitud-tiempo de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH del subproducto de la uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccional de temperatura-amplitud de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH del subproducto de la uva36

Figura 4.5. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción asistida por ultrasonido del contenido fenólico total (CFT) del subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de tiempo-temperatura de la extracción de CFT del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta de optimización tiempo-amplitud de la extracción de CFT del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de temperatura-amplitud de la extracción de CFT del subproducto de uva.....44

Figura 4.6. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción del contenido total de antocianinas (CAT) asistida por ultrasonido a partir de subproductos de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de tiempo-temperatura de la extracción de CAT del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta de optimización tiempo-amplitud de la extracción de CAT del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de temperatura-amplitud de la extracción de CAT del subproducto de uva46

Figura 4.7. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción asistida por ultrasonido sobre la actividad antioxidante del ensayo ABTS de subproducto de uva a partir de subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del tiempo-temperatura de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta del tiempo-amplitud de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de temperatura-amplitud de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva 47

Figura 4.8. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción asistida por ultrasonido sobre la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH de subproducto de uva a partir de subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del tiempo-temperatura de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH del subproducto de la uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta de amplitud-tiempo de la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH

de subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de temperatura-amplitud de la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH de subproducto de uva48

Figura 4.9. Color perceptible al ojo humano durante su almacenamiento en los días 0, 1, 2, 3 y 4 del; (a) Jugo de zanahoria con extracto de subproducto de uva (JZE), Jugo de zanahoria con ácido ascórbico (JZA) y jugo de zanahoria control (JZC); (b) Jugo de manzana con extracto de subproducto de uva (JME), Jugo de manzana con ácido ascórbico (JMA) y jugo de manzana control (JMC); (c) suero de leche con extracto de subproducto de uva (SLE), suero de leche con ácido ascórbico (SLA) y suero de leche control (SLC).52

SIGLAS Y ABREVIATURAS

EAU	Extracción Asistida por Ultrasonido
EAM	Extracción Asistida por Microondas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
CA	Capacidad Antioxidante
CFT	Compuestos fenólicos Totales
CAT	Contenido de Antocianinas Totales
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
DBB	Diseño Box-Behnken
DFE	Diseño Factorial Fraccionado
ECG	Cianidina 3-glucósido
GAE	Equivalentes de ácido gálico
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
PS	Peso seco
JZE	Jugo de zanahoria con extracto de subproducto de uva
JZA	Jugo de zanahoria con ácido ascórbico
JZC	Jugo de zanahoria control
JME	Jugo de manzana con extracto de subproducto de uva
JMA	Jugo de manzana con ácido ascórbico
JMC	Jugo de manzana control
SLE	Suero de leche con extracto de subproducto de uva
SLA	Suero de leche con ácido ascórbico
SLC	Suero de leche control
ET	Tiempo de Extracción
CCD	Diseño Central Compuesto
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
ANOVA	Análisis de Varianza
TS	Tiempo de Sonicación
TU	Temperatura de ultrasonido
AU	Amplitud de ultrasonido
TEM	Tiempo de Extracción de Microondas
TM	Temperatura de Microondas
PM	Potencia de Microondas
<i>Cntrl</i>	Control

RESUMEN

En este estudio se investigaron las técnicas verdes de extracción asistida por ultrasonidos (EAU) y extracción asistida por microondas (EAM) para recuperar compuestos valiosos del subproducto de la uva, también conocido como orujo, que la industria vitivinícola genera en grandes cantidades. Se implementó un diseño experimental factorial fraccionado para determinar las condiciones óptimas de extracción, y se utilizó la metodología de superficie de respuesta de Box- Behnken para la optimización, con agua como disolvente. Se comprobó que las condiciones de extracción más eficaces eran un tiempo de 15 minutos, una temperatura de 85°C y una amplitud del 80%. Estas condiciones produjeron altas concentraciones de los compuestos recuperados por el ensayo ABTS y DPPH. Además, el extracto obtenido demostró una capacidad antioxidante superior en jugos de zanahoria, manzana y suero de leche en comparación con aditivos químicos comerciales. Este estudio resalta la viabilidad de las tecnologías de extracción asistida por ultrasonido y microondas para aprovechar eficazmente los compuestos beneficiosos encontrados en el subproducto de uva, ofreciendo una opción prometedora y amigable con el medio ambiente para la industria alimentaria.

Palabras claves: Subproducto de uva, extracción asistida por microondas (EAM), extracción asistida por ultrasonido (EAU), metodología de superficie de respuesta (MSR), capacidad antioxidante.

ABSTRACT

In this study, green techniques of ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) were investigated to recover valuable compounds from grape byproduct, also known as pomace, which the wine industry generates in large quantities. A fractional factorial experimental design was implemented to determine the optimal extraction conditions, and Box-Behnken response surface methodology was used for optimization, with water as the solvent. It was found that the most effective extraction conditions were a time of 15 minutes, a temperature of 85°C, and an amplitude of 80 %. These conditions yielded high concentrations of the compounds recovered by the ABTS and DPPH assays. Furthermore, the obtained extract demonstrated superior antioxidant capacity in carrot, apple, and whey juices compared to commercial chemical additives. This study highlights the feasibility of ultrasound and microwave-assisted extraction technologies to effectively harness beneficial compounds found in grape byproduct, offering a promising and environmentally friendly option for the food industry.

Keywords: Grape by-product, Microwave Assisted Extraction (MAE), Ultrasound Assisted Extraction (UAE), Response Surface Methodology (RSM), antioxidant capacity.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el crecimiento demográfico ha tenido un impacto significativo en la generación de residuos alimenticios. Con la población mundial en constante crecimiento y la expansión de la globalización, la producción de alimentos también se ha incrementado para satisfacer la demanda de los consumidores. Asimismo, las tendencias hacia un consumo más saludable han experimentado un cambio alrededor del mundo, motivando a la industria alimentaria a impulsar una búsqueda constante de nuevos ingredientes innovadores para satisfacer esta creciente demanda de productos saludables (Lima et al., 2016; Teixeira et al., 2018; Vodnar et al., 2019; Galanakis, 2021; Baroi et al., 2023). En este sentido, los investigadores han centrado sus esfuerzos en la producción sustentable de alimentos bajo un enfoque de sostenibilidad que ha llevado a la revalorización de materiales que solían considerarse como desechos de la agroindustria; éstos están emergiendo como una valiosa oportunidad para el desarrollo de nuevas formulaciones (Ferri et al., 2020).

La Organización Internacional de la viña y el vino (OIV) reportó la viticultura y la producción vinícola como actividades productivas relevantes a nivel mundial; dichas actividades alcanzaron en el 2022, 7.3 millones de hectáreas de superficie, una producción de 78 millones de toneladas de uva fresca y 258 millones de hectolitros de vino producido (OIV, 2022; Coelho et al., 2023). Esto ha dado lugar a una mayor cantidad de desperdicios debido a que no todos los alimentos producidos son utilizados por completo; por ejemplo, se estima que para la vinificación el subproducto de la uva es aproximadamente 8.5 millones de toneladas anuales. Además, la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) destaca que la pérdida y el desperdicio de alimentos representa un problema de índole social y económica en todo el mundo (FAO, 2019; Mammadova et al., 2020; Maicas & Mateo, 2020; Mora-Garrido et al., 2022).

El residuo de la uva, conocido como orujo, está formado por la piel, la pulpa, las semillas y el tallo; este residuo representa aproximadamente entre el 20 y el 25 % del peso original de la uva antes de la fermentación, y contiene aproximadamente el 70 % de los compuestos fenólicos contenidos en la uva fresca. Es por ello que, las alternativas para su aprovechamiento se han centrado en la extracción de estos compuestos, siendo sus principales micronutrientes los compuestos fenólicos que contienen capacidad antioxidante, los flavonoides en donde se encuentran las antocianinas, entre otros. Los flavonoides han reportado tener propiedades antiinflamatorias, antioxidante, además de ser una buena fuente de fibra, colorantes y minerales (Spigno et al., 2017; Lucera et al., 2018; Bordiga, 2019; AntoniĆ et al., 2020; AntoniĆ et al., 2020; Ferri et al., 2020; BuciĆ-Kojić et al., 2020; Spinei & Oroian, 2021; Monteiro et al. 2021; Amaya-Chantaca et al., 2022; Caponio et al., 2022 Crescente et al. 2023).

La recuperación de compuestos bioactivos se puede lograr por medio de diversas técnicas de extracción, aunque algunas de las técnicas convencionales plantean desafíos, como el tiempo y la elección del solvente. Además, estas técnicas no suelen reconocerse como métodos ecológicamente sostenibles, mientras que, las tecnologías verdes como la EAM y la EAU son consideradas como valiosas alternativas para abordar estos problemas (Monteiro et al. 2021; Crescente et al. 2023). Además, los componentes extraídos se han utilizado en el desarrollo de productos alimenticios como bebidas debido a su alto contenido de antioxidantes, proteínas y otros compuestos beneficiosos. (Vodnar et al., 2019).

El presente documento evalúa dos tecnologías verdes para la extracción de compuestos: EAU y EAM. Esta investigación se lleva a cabo utilizando diseños experimentales y de optimización para localizar los niveles óptimos de cada variable para la extracción de estos compuestos. Asimismo, se realiza una evaluación de la competitividad de estos micronutrientes en comparación con los químicos tradicionalmente utilizados en el mercado a través de su incorporación en bebidas.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sector de la viticultura, uno de los más importantes en términos de producción y exportación en muchos países, enfrenta desafíos considerables en términos de impacto ambiental. Por un lado, la producción de vino genera cantidades importantes de residuos como el subproducto de la uva, cuya disposición final inadecuada tiene efectos graves al ambiente; No obstante, el aumento de la población global y la creciente necesidad de alimentos empeoran aún más el desperdicio de estos últimos. Este fenómeno que se manifiesta como la pérdida de alimentos y su desperdicio en la cadena de suministros, y que representa un tercio de los destinados al consumo, equivalente a 1,300 millones de toneladas al año, conlleva consecuencias medioambientales como acidificación del suelo, contaminación del agua reduciendo gravemente su calidad, emisiones de malos olores y proliferación de plagas como las ratas que contraen enfermedades importantes para los humanos. Además, estos residuos causan lixiviados que pueden filtrarse a aguas subterráneas e impactar de manera perjudicial en la vegetación y la fauna circundante (Abid et al., 2023; Rashwan et al., 2023; Mora-Garrido et al., 2022).

Este desafío ambiental está relacionado con la creciente sostenibilidad y economía circular, donde la búsqueda de soluciones viables para la gestión y reutilización de estos subproductos es más importante cada día. Como resultado, surge la necesidad de utilizar los desechos de la industria de vinos como fuente de estos biocompuestos para desarrollar nuevos productos alimenticios, así como, disminuir el impacto ambiental y beneficiar la soberanía alimentaria.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la uva, así como su producción son ampliamente desarrollados con cifras anuales de 70 millones de toneladas (OIV, 2018; Bordiga et al., 2019); la superficie mundial vitivinícola reportada por la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV, 2016) es de 7.5 millones de hectáreas. Durante el año 2017, esta producción mundial fue de 73.3 millones de toneladas, donde el 52 % se destinó a la industria vitivinícola (Leal et al., 2020).

La importancia de esta industria a escala internacional está relacionada con una producción y un consumo anual de 267 y 242 millones de hectolitros, respectivamente. En México, el consumo per cápita de vino es alrededor de 950 ml, satisfaciendo sólo una demanda interna del 30 % (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018), y cuenta con una superficie de viña de 32 mil hectáreas, una producción de 194 mil y un consumo de 895 mil hectolitros (OIV, 2016). Para el periodo 2016-2024, la SAGARPA (2017) estimó una producción potencial de 367.34 miles de toneladas y un crecimiento acumulado del 13.09 %.

La producción de vinos genera una gran cantidad de desperdicios a nivel mundial; estos subproductos son el orujo que está conformado por la piel, semillas y tallos de las uvas (de Souza de Azevedo et al., 2018). Aproximadamente, los residuos de la uva representan del 15 % al 30 % del peso de la uva en la fabricación de vinos (Kandylyis et al., 2021). Esta cifra impacta ambientalmente porque su disposición final es en vertederos a cielo abierto, y ocasiona contaminación hídrica, generación de lixiviados y otros compuestos que dañan el suelo y el subsuelo (Mammadova et al., 2020; Mora-Garrido et al., 2022).

Recientemente, la investigación del subproducto de la uva aplicada en la formulación de alimentos ha adquirido relevancia por sus altos compuestos bioactivos, como los ácidos fenólicos, que tienen una alta fibra y una fuerte capacidad antioxidante, protegen contra el cáncer, las enfermedades autodegenerativas y las afecciones cardiovasculares gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerígenas.

2 ANTECEDENTES

2.1 Producción y consumo de vinos en el mundo.

La manufactura de la industria vitivinícola es considerada mundialmente como una actividad económica relevante, en la cual, tan sólo la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) en el 2021 reportó una cifra de 7.3 millones de hectáreas; cifra menor a la reportada en el 2020. Por otro lado, la superficie total del cultivo de la uva se encuentra destinada para vino, jugos de uva, uvas de mesa y pasas. En este sentido, en todo el mundo se produjeron 33.9 millones de toneladas de vino., representando el 48.8 % de esta producción, y siendo Italia, Francia, España, Alemania y Portugal, los principales países productores. En el 2020, el consumo mundial, de acuerdo con la OIV, fue de 234 millones de hectolitros. Los países con mayor consumo mundial de estas bebidas fueron Estados Unidos, Alemania, Francia, Reino Unido e Italia. Mientras que, las cifras más recientes reportadas por la misma organización de producción en el 2022, fueron de 258 millones de toneladas; lo anterior representa un decremento del 1 % con respecto al 2021, de las cuales el 33.6 millones de toneladas fueron destinadas a vino y el resto a uvas de mesa y pasas (OIV, 2022). En este sentido, durante el mismo año, el país que registró un mayor consumo de vino en el mundo fue Portugal, con cifras de aproximadamente 58 litros por habitante (Statista, 2023).

2.2 Producción y consumo de la industria vitivinícola en México.

Por otro lado, en México, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y la OIV reportaron una producción de 452 mil toneladas de uva fresca en 2021, de las cuales el 74 % fue destinado a uvas de mesa, el 15 % a pasas y el 11 % a la vinificación; en este último sector se reportó una producción de vino de 400 millones de hectolitros. Cabe mencionar que el estado de Querétaro, produjo 3.5 millones de botellas de vino, mientras que, su consumo per cápita en el mismo año fue de 1.1 litros. A nivel nacional, los principales estados productores incluyen Baja California, Coahuila, Querétaro, Sonora y, Zacatecas. Asimismo, su consumo representó un incremento del 22 % en

los últimos 10 años, reportando al cierre del 2021 un consumo de 1 millón de hectolitros (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022).

2.3 Producción de residuos agroindustriales de la industria vitivinícola.

Derivado de la práctica de vinificación, el subproducto de la uva se encuentra dividido en aguas residuales y residuos sólidos. Las primeras tienen una elevada carga orgánica (Kosseva, 2017), y los residuos sólidos constituyen el raspón del tallo y el orujo. El hollejo (piel), la pulpa y las pepitas son los componentes principales del orujo, como se muestra en la Figura 1.1. En las cuales, su proporción puede variar de acuerdo con el tipo de uva cultivada, las técnicas de fermentación y el prensado (Baroi et al., 2023). Sin embargo, diversos autores han señalado que esta proporción es aproximadamente del 20 % y hasta el 60 % del peso original de la uva (Spigno et al., 2017; Bordiga, 2019; Amaya- Chantaca et al., 2022), siendo la piel el 50 % y los tallos 14 % de éstos (Jin et al., 2019). Es importante destacar que, por cada litro de vino que se produce en la industria vitivinícola se desechan alrededor de 35 kg de la uva, en forma de orujo (Prozil et al., 2014).

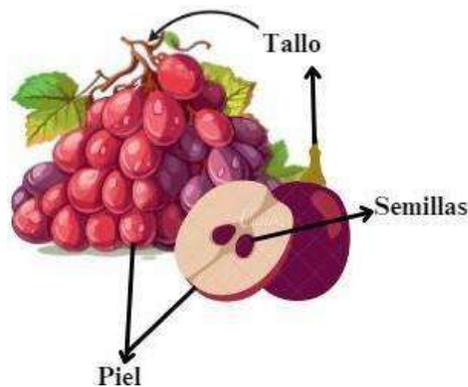


Figura 1.1 Partes de la uva

2.4 Efectos adversos al medio ambiente

La producción de vinos vinculada a la industria vitivinícola, presenta una dualidad de resultados: por un parte, el aumento de su demanda a nivel mundial, y por otro, la generación de subproducto

que plantea un gran desafío ambiental y de gestión de residuos que ya no puede ser pasada por alto. A medida que la industria de los vinos busca abastecer globalmente a sus clientes, nos enfrentamos al dilema de cómo gestionar los residuos que resultan de este proceso.

En el proceso de producción de vinos, una abundante cantidad de residuos es generada en un tiempo relativamente corto, originándose el desperdicio de aproximadamente el 30 % del peso inicial de la uva. En consecuencia, esto implica la disposición final de una cantidad significativa de residuos, especialmente cuando se considera que, gran parte de éstos son desechados a vertederos a cielo abierto. Dicha disposición final, trae como resultado la erosión de suelos ocasionada por el pH ácido, salinidad, materia orgánica que atrae fauna nociva e incluso la presencia de metales pesados que pueden provocar contaminación hídrica y comprometer la salud de animales y personas. Además la materia orgánica mal dispuesta, en particular a temperaturas elevadas, da lugar a la generación de lixiviados, lo cuales tienen el potencial de dañar el suelo y subsuelo, perjudicando la calidad del agua, así como el oxígeno disponible en el suelo (Baroi et al., 2022; Kandyliis et al., 2021).

2.4 Revalorización de subproductos agroindustriales y de la industria vitivinícola

El incremento en la demanda de la industria de vinos y la generación de subproductos derivados de esta producción, han planteado nuevas oportunidades y desafíos en términos de sostenibilidad y gestión ambiental al representar un impacto al medio ambiente. En este sentido, la creciente necesidad de mitigar el impacto ambiental originado por estos desechos brinda un valor adicional en los subproductos de la uva en una amplia variedad de aplicaciones industriales (Costa et al., 2022).

2.4.1 Compuestos

La uva tinta (*Vitis vinifera L.*) incluye en sus residuos azúcares residuales, proteínas, lípidos, fibras, celulosa y compuestos fenólicos (Jin et al., 2019; Leal et al., 2020). Dichos compuestos se clasifican en ácidos fenólicos, como el ácido benzoico e hidroxicinámico, en flavonoides simples como las catequinas, flavonoles y antocianinas (Nunes et. al., 2017). En el subproducto de la uva, el contenido de humedad

varía entre 50 % y 72 %, la lignina fluctúa entre el 17 % y el 24 %, los lípidos entre el 4.62 % y el 12.5 %, y la cantidad de proteína es superior al 4 %, acorde a su variedad (Nunes et. al. 2017; Jin et al. 2019).

Según la información proporcionada, el desecho de la uva contiene una variedad de compuestos de interés, por lo que se ha valorado la extracción de estos compuestos y su aplicación en diversas áreas productivas.

2.4.2 Aplicaciones

Los compuestos extraídos del subproducto de la uva y su relevancia en la actualidad, representan una importante oportunidad para realzar el valor y el impacto de estos residuos, ya que pueden realizar aportes significativos al enriquecer la creación de nuevos productos relacionados a diferentes áreas de aplicación (Zhu et al., 2015), desde la nutrición y salud hasta los cosméticos y productos farmacéuticos. Los compuestos bioactivos extraídos del subproducto de la uva han ido evolucionando hasta convertirse en una fuente de recursos valiosa; su potencial para mejorar la funcionalidad de alimentos, asimismo para promover la agricultura sostenible y producción de energías permiten una nueva visualización en su revalorización (Baroi et al., 2023; Ferreira & Santos, 2022; Zhou et al., 2022; Kandyliis et al., 2021; Leal et al., 2020; Jin et al., 2019; Prozil et al., 2014).

En la Cuadro 1.1 se presenta un listado de algunas investigaciones que han abordado las diferentes posibles aplicaciones del subproducto de la industria vitivinícola. Estos autores han investigado su utilidad en campos tan diversos como la industria farmacéutica, cosmética, energética, agrícola, entre otras. Por columna en la Cuadro se señalan los autores, el año en que se realizó el estudio, el área de aplicación en la que se enfocaron, así como los objetivos y resultados clave obtenidos en el estudio.

Cuadro 1.1 Aplicaciones del subproducto de uva

Autor (es)	Año	Área de aplicación
Zhue et al.	2014	Industria cosmética
		Farmacéutica
		Alimentos funcionales
Prozil et al.	2014	Industria papelera
Jin et al.	2019	Sector energético
		Biocompuestos
Leal et al.	2020	Industria cosmética
Kandyllis et al.	2021	Agricultura
Ferreira & Santos	2022	Industria de alimentos
Zhou et al.	2022	Medicina
		Industria farmacéutica
		Industria cosmética
		Industria de alimentos
Costa et al.	2022	Alimentos para animales
Baroi et al.	2023	Nanotecnología

En este Cuadro se presenta el esfuerzo en conjunto de los investigadores de diferentes ramas que han promovido la búsqueda de la comprensión y el aprovechamiento de las propiedades que contiene el subproducto de la industria de vinos en aras de la innovación y el desarrollo. En este sentido, el residuo de la uva ha destacado en la industria alimenticia debido a sus beneficios directos para la salud, por lo que, en combinación con otros ingredientes se usa para formular nuevos alimentos funcionales.

2.4.2.1 Aprovechamiento del subproducto de la uva en la industria de alimentos.

En la actualidad, a diferencia del enfoque anterior, que se centraba en proporcionar alimentos básicos para sobrevivir, ahora los consumidores buscan ingredientes que les proporcionen beneficios a la salud y una nutrición adecuada. Esta tendencia ha llevado a los fabricantes al desarrollo de nuevos alimentos funcionales, los cuales contienen compuestos bioactivos que pueden mejorar la salud. Esto ha impulsado a la industria alimentaria a investigar y comprender los compuestos bioactivos funcionales presentes en diferentes alimentos procesados y cómo puede mejorar la salud humana. En este último tema, se destacan las bebidas funcionales gracias a su facilidad de almacenamiento, su capacidad para incluir nutrientes y compuestos bioactivos en cantidades significativas, y su flexibilidad para satisfacer las preferencias de los consumidores en apariencia, tamaño y envasado del producto (Pérez- Marroquín et al., 2023; Anil et al., 2022).

Considerando esto, el orujo de la uva podría utilizarse para contribuir positivamente en la salud de las personas, porque contiene vitaminas, polifenoles, y ácidos grasos insaturados (Yu et al., 2013); por sus efectos antioxidantes y antimicrobianos, las semillas de las uvas son capaces de utilizarse como aditivos naturales en alimentos (Soukoulis et al., 2018; Andrade et al., 2019). El tallo de la uva tiene aplicación en la elaboración de bebidas dietéticas (Leal et al., 2020), ayudando a prevenir enfermedades crónico-degenerativas e inflamatorias (Da silva et al., 2015);

además, el raspón de la uva favorece la conservación de características sensoriales, como lo son el color y el sabor, impidiendo la eliminación de vitaminas y la oxidación en alimentos (de Souza de Azevedo et al., 2018).

2.5 Bebidas adicionadas con subproducto de la industria vitivinícola.

En el mercado existen muchas bebidas que contienen conservantes artificiales, en particular los jugos de frutas y verduras, lo que implica una pérdida de compuestos de interés presentes en los alimentos procesados. Para afrontar este problema, los investigadores han explorado la posibilidad de enriquecer las bebidas por medio de la adición de extractos de subproductos, en respuesta a los actuales hábitos alimenticios de las personas (Majerska, et al., 2019). Algunas investigaciones han propuesto la combinación del extracto de subproducto de uva con bebidas como el agua de coco (Costa et al., 2021), el té negro (Gerardi et al., 2020), la cerveza (Gasiński et al., 2022), y del tipo “listo para beber” como los licuados (Hoskin et al., 2022) en las cuales se registra un incremento en la concentración de polifenoles, antocianinas e incluso como inhibidor de la actividad microbiana.

Por otro lado, el suero de la leche puede combinarse para la formulación de bebidas funcionales, mejorando su fuente de fibra dietética y su aporte nutrimental, prolongando su vida en anaquel (Lucera et al. 2018; Shiby et al., 2012). Por lo tanto, nuevas oportunidades para el desarrollo de productos alimenticios más sanos pueden abrirse a través de la investigación continua en esta área.

2.6 Aplicaciones para la extracción de compuestos de subproductos agroindustriales.

Los componentes bioactivos que se encuentran en los subproductos de origen vegetal son liberados a través de diferentes métodos de tratamiento; algunos de ellos incluyen la extracción supercrítica, por microondas, por solventes (Kumar et al., 2021), por B-ciclodextrina, por extracción líquida presurizada, y por agua sobrecalentada (Babazadeh et al., 2017). Estos métodos de tratamiento convencionales, por su principio de calentamiento, consumen una gran cantidad de energía provocando la disminución de los compuestos de interés (Barba et al., 2016). Mientras que, la EAU y la EAM son tecnologías verdes para extraer y aprovechar los compuestos valiosos del orujo de uva debido al bajo consumo energético, versatilidad de solvente y la duración del proceso (Freitas et al., 2021).

2.6.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Frente a estos métodos, EAU aplicada en los alimentos tiene la ventaja de sustraer compuestos fenólicos, vitamínicos (Minjares-Fuentes et al. 2014), carotenoides, aromas, y polisacáridos de subproductos (Kumar et al, 2021) de los tejidos vegetales; esta técnica no requiere de grandes cantidades de solventes, ni demasiada energía de extracción (Minjares-Fuentes et al., 2014; Beres et al., 2017).

En la EAU para el subproducto de uva, se han reportado en algunas investigaciones el efecto de condiciones como la temperatura, el tiempo de sonicación, la amplitud y el tipo de solvente utilizado, como es el caso de Kaleem et al. (2019), quienes investigaron la extracción de compuestos bioactivos del subproducto de uva bajo las condiciones de temperatura (40 °C, 50 °C y, 60 °C), y tiempo (15 min, 20 min y, 25 min). Sus mejores condiciones fueron señaladas en el tiempo de 25 min y temperatura de 60 °C. Mientras que se registró, para la variedad de uva tempranillo, tiempo de 3 minutos y temperatura de 50 °C. Por otro lado, Benbougerra et al. (2020) indicó un tiempo de 5 minutos y Chimshirova et al. (2021) de 240 minutos.

Bruno Romanini et al. (2021) investigaron el efecto del solvente (agua), mientras que Poveda et al. (2018) estudiaron el impacto de la temperatura (25°C, 40 °C y 55 °C), la amplitud (20 %, 30 % y 40 %) y el tiempo de sonicación (2,5 min, 5 min, y 10 min) en ultrasonidos para extraer fenólicos de subproducto de uva. El estudio registró las mejores condiciones: una temperatura de 55 °C, una amplitud del 40 % y un tiempo de sonicación de 6 minutos.

2.6.2 Extracción asistida por microondas (EAM)

Así como en el ultrasonido, la EAM tiene como ventaja no requerir grandes cantidades de energía para la extracción, ni una cantidad elevada de solventes. Además de verse favorecido por la versatilidad de manejar diferentes tipos del este último (Minjares-Fuentes et al., 2014; Beres et al., 2017). Para la recuperación de elementos valiosos del subproducto de uva por medio de EAM, Da Rocha & Noreña (2020) estudiaron el efecto de la potencia (600 W, 800 W y, 1,000 W) y el tiempo (5 min, 7 min y, 10 min). Las mejores condiciones reportadas fueron en el tiempo de 15 min y la potencia de 450 W. Asimismo, Chimshirova et al. (2021) indicaron que realizaron una extracción de 60 minutos.

Por otro lado, Spinei & Oroian (2022) analizaron la potencia de microondas (280 W, 420 W y 560 W), el tiempo de extracción (60 s, 90 s, y 120 s), y tipo de disolvente (etanol y agua). Registraron condiciones óptimas de potencia, 560 W, tiempo de extracción, 120 s, y agua como disolvente. Además, Azaroual et al. (2021) estudiaron la EAM, tipo de solvente (metanol, etanol, acetona y agua), potencia (100-500 W) y tiempo de extracción (5 a 20 minutos). Las mejores condiciones reportadas fueron: solvente, 65% metanol en agua, potencia de 500 W, y un tiempo de extracción de 5 min. También es posible identificar fenoles estables durante estas condiciones de extracción.

2.7 Optimización de procesos

El diseño Box-Behnken y la metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizan con frecuencia para optimizar la extracción elementos valiosos en el subproducto de uva. En este sentido, autores como Li et al. (2019) establecieron algunas condiciones a través de la EAU tales como: temperatura (40-60 °C), tiempo de sonicación (10-20 min) y tipo de solvente (etanol y agua); de acuerdo con los autores, las mejores condiciones reportadas fueron: temperatura de 50.79 °C, tiempo de 14.82 min y etanol como solvente.

3 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1 Extracción por ultrasonido

En las últimas décadas, la recuperación de compuestos fenólicos en alimentos, y sus subproductos, se ha realizado mediante el tratamiento por ultrasonido (Goula et al. 2016). Esto ocurre como consecuencia de la elevada transferencia de masa en un medio semilíquido y el colapso de microburbujas producidas durante la cavitación, representado en la Figura 2.1; esto aumenta la reactividad química y provoca rupturas en el material sólido, que liberan sus componentes químicos (Barba et al., 2015).

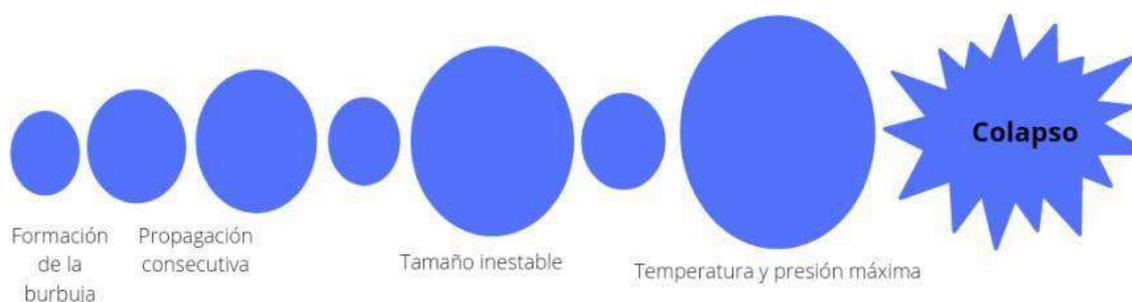


Figura 2.1. Colapso de microburbujas por cavitación (modificada de Medina-Torres et al., 2017)

El ultrasonido se clasifica en sonicación de baja intensidad con una potencia $<1 \text{ W/cm}^2$ y $>100 \text{ kHz}$, y de alta intensidad $>1 \text{ W/cm}^2$ y de 20 a 100 kHz. Ambos son usados para fines diferentes, La técnica de baja intensidad se utiliza para conservar la estructura y las propiedades fisicoquímicas de la materia de manera no destructiva. La técnica de alta intensidad se utiliza para extraer compuestos y procesarlos (Tiwari et al., 2015).

La cavitación acústica es un proceso en el que las ondas sonoras de alta frecuencia presionan y descomponen un líquido, produciendo burbujas de vapor. Este es el principio detrás del ultrasonido de alta intensidad. Luego, estas burbujas colapsan violentamente, lo que provoca altas temperaturas y presiones en el lugar. Durante el proceso, este fenómeno facilita la transferencia de masa y energía, lo que resulta en una extracción más eficiente de los fenoles en períodos de tiempo más cortos (Bhargava et al., 2021; Panda & Manickam, 2020).

La EAU se puede realizar por medio de un sistema de sonda, o por un baño con termostato. Los componentes que integran al sistema de sonda ultrasónica en la Figura 2.2 (a) contiene un generador de poder, un transductor, un amplificador, y una sonda. Para el ultrasonido con baño de agua y termostato en la Figura 2.2 (b) se cuenta con un generador de poder, el cual origina generalmente una frecuencia de 40 KHz; los transductores se encargan de disipar la energía acústica en el baño de agua en forma de ondas. La diferencia entre ambos métodos reside en ese último punto, ya que en el baño con termostato las muestras no reciben las ondas de forma directa como ocurre con el sistema de sondas (Martins Strieder et al., 2019).

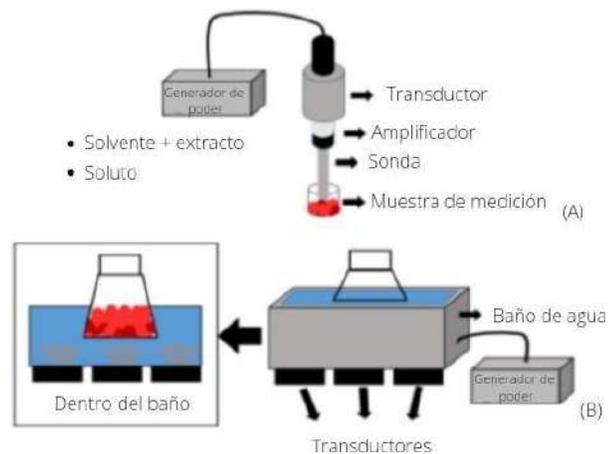


Figura 2.2. Sistema de ultrasonido (a) sonda ultrasónica, (B) ultrasonido con baño de agua y termostato (Modificada de Martins Strieder et al., 2019).

3.2 Extracción asistida por microondas (EAM).

Una forma sostenible de recuperar compuestos fenólicos es la extracción asistida por microondas. Se basa en la interacción de las microondas con los alimentos, lo que crea un campo electromagnético que polariza las moléculas de agua en la matriz alimentaria (Da Rocha & Noreña, 2020).

La eficiencia en la recuperación de los compuestos de interés aplicando la EAM, se ve influenciada por el campo eléctrico que interactúa con las moléculas dipolares y especies iónicas presentes en la mezcla de extracción. Al penetrar en los materiales sólidos, las microondas generan calor distribuido volumétricamente mediante fricción molecular, lo que mejora el coeficiente de transferencia de masa de los ingredientes objetivo. El impacto de las microondas transforma la energía de las microondas en energía térmica a través de la polarización dipolar y la conducción iónica. Esto hace que la muestra se caliente casi de inmediato para extraer los compuestos relevantes de la matriz del material hacia la solución (Mirzadeh et al. 2020).

3.3 Influencia de los parámetros fisicoquímicos en la extracción por EAU.

3.3.1 Temperatura

La temperatura en la extracción por ultrasonido es crítica debido a la sensibilidad de algunos de los compuestos como el contenido fenólico. Las temperaturas registradas en la extracción por ultrasonido oscilan de 20 a 80 °C, ya que, mediante el aumento de la temperatura se registran tensiones superficiales del solvente y viscosidad menores, lo que facilita la extracción. Por otro lado, compuestos como las antocianinas se degradan al incrementarse la temperatura a partir de los 50 °C (Ramón et al. 2021).

3.3.2 Influencia del pH

El efecto del pH en la extracción de los compuestos de interés no mantiene un registro amplio (Kumar et al., 2021). Rodrigues et al., 2015, Para extraer compuestos fenólicos de la cáscara de coco, evaluaron el pH entre 4,5 y 6,5. Por otro lado, la extracción de antocianinas disminuía cuando el valor del pH se incrementaba más de 6.5, por lo que los valores del pH registrados para obtener la mejor extracción oscilan entre 1 a 3.

3.4 Capacidad antioxidante por captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y ABTS

Las técnicas DPPH y ABTS son las más utilizadas por su estabilidad de extracción. La capacidad de eliminar los radicales libre, o DPPH, permite evaluar la capacidad antioxidante de una muestra mediante el análisis de las características de la luz y su frecuencia, para lograrlo, se utilizan herramientas especializadas como el espectrofotómetro (Musa et al., 2016).

El DPPH en la Figura 2.3 al contener un átomo desapareado de nitrógeno es capaz de reaccionar con compuestos dadores de hidrógeno, conocidos como compuestos antioxidantes; originando que el cromógeno púrpura se reduzca a la hidracina y de lugar a una coloración amarillo pálido (Kedare et al., 2011; Musa et al., 2016).

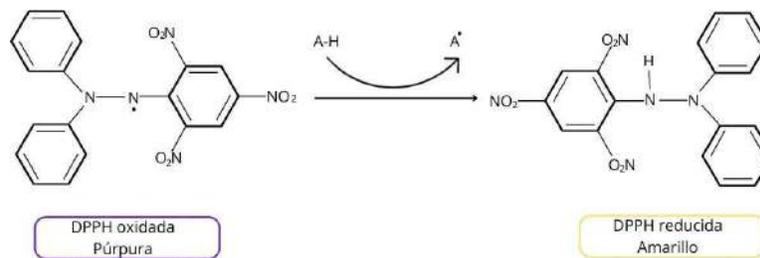


Figura 2.3. Reacción del compuesto DPPH y el antioxidante dando lugar a su forma reducida que vira del color púrpura al amarillo.

Este método es fácil, rápido, económico y tiene la vida útil de hasta seis meses, siendo muy utilizado en la valoración de la capacidad antioxidante en alimentos (Kedare et al., 2011; Luchian, et al., 2019). La técnica de ABTS es usado también para valorar la capacidad antioxidante a partir de la eliminación de radicales libres y donación de átomos de hidrógenos (Ren et al., 2018).

3.5 Contenido de fenoles totales (CFT) utilizando la técnica Folin- Ciocalteu.

Este método, aunque inicialmente se pensó para el análisis de proteínas, finalmente fue destinado a la evaluación de fenoles totales, siendo el más sencillo para la medición de los fenoles en productos (Agbor et al., 2014). La técnica es de fácil manejo, rápida y no requiere de equipos especializados. Este ensayo se inicia oxidando los compuestos fenólicos en una solución base, dando como resultado una sustancia teñida y medida a una absorbancia de 765 nm (Berker et al., 2013).

3.6 Contenido de antocianinas por CABdel-CAI- and Hucl

La extracción y cuantificación de antocianinas es generalmente realizada con solventes orgánicos como son el metanol o el etanol, adicionando una cantidad mínima de ácido (15 %, HCl 1N) con la finalidad de conseguir el catión flavilio, el cual es vuelve estable en un medio muy ácido. Actualmente se sabe que no existen diferencias importantes en las lecturas de la absorbancia al usar solventes como etanol y metanol (Abdel-CAI y Hucl, 1999); sin embargo, es recomendable usar etanol, ya que presenta menos toxicidad, particularmente en el área de alimentos.

Además del tipo de solvente, el tiempo de extracción (ET) también desempeña un rol importante en la recuperación de antocianinas. Se ha observado que un tiempo de extracción más prolongado facilita una mayor liberación y difusión de las antocianinas en la solución. Mientras que, la potencia utilizada durante la extracción por microondas tiene un efecto destacado en la eficiencia de recuperación de antocianinas, el aumento en la potencia puede calentar la muestra de manera más homogénea y acelerar su liberación. (Chimshirova et al., 2021; Coelho et al., 2020).

3.7 Diseño experimental

Un diseño factorial fraccionado completo 2^{k-1} permite una menor cifra de experimentaciones para su optimización; además este diseño permite encontrar y evaluar las variables más significativas y la influencia de sus interacciones (Myers et al., 2014). En este sentido, un diseño experimental del tipo factorial fraccionado es una estrategia avanzada que se basa en el principio de seleccionar un subconjunto estratégico de los niveles de los factores de interés dentro de un experimento. Este enfoque se desarrolló para abordar la complejidad de los diseños factoriales completos, evaluando todos los niveles de factores mezclados aleatoriamente; por lo que puede resultar en una cantidad significativa de experimentos, especialmente cuando se exploran múltiples factores con sus respectivas interacciones (Montgomery, 2004).

3.8 Optimización por metodología de superficie de respuesta (MSR's)

La metodología de superficie de respuesta, MSR's, es una herramienta estadística y matemática que permite mejorar u optimizar los procesos. La aplicación de este tipo de método se encuentra en mayor medida en el sector industrial, en donde una o más variables de entrada tienen influencia en el rendimiento o calidad del proceso (Casagrande et al., 2019). Esta metodología se utiliza con mayor frecuencia en los diseños central compuesto y Box-Behnken, por su eficiencia (Myers et al., 2014).

El diseño Box-Behnken (BBD) representado en la Figura 2.4, se emplea un diseño factorial de tres niveles, en donde cada uno de ellos se encuentra en un punto central equidistante; aunque no todos sus diseños son giratorios, como en el caso del diseño central compuesto (CCD), tiene una extensa aplicación para modelar los procesos bioquímicos frente a otros métodos en el sector alimenticio, al contar con beneficios como los bajos costos en diseño (Yolmeh et al., 2017; Myers et al., 2014; Swamy et al., 2014).

Esta metodología es crucial para maximizar la extracción de compuestos del orujo de uva mediante técnicas como el ultrasonido (Casagrande et al., 2019; CúcuZ et al., 2021). Para aplicar la MSR se debe establecer el diseño experimental adecuado que designe el tratamiento que se debe realizar en la región experimental de estudio; estos son el diseño central compuesto (CCD) y Box-Behnken (BBD) (Yolmeh et al., 2017). En los estudios de optimización empleando MSR, los investigadores precisan de diseños espaciados de manera uniforme, por lo cual, una alternativa del CCD es el BBD por su eficiencia (Myers et al., 2014).

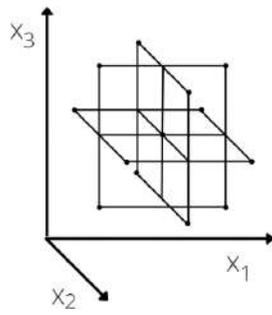


Figura 2.4. Diseño experimental Box-Behnken (Modificado de Bezerra et al., 2008).

4 HIPÓTESIS

La optimización por el diseño Box-Behnken aplicada en el tiempo, temperatura y amplitud/potencia, mediante el uso de ultrasonido y microondas como tecnologías emergentes, mejora la extracción de compuestos con mejor capacidad antioxidante en el extracto del subproducto de la industria vitivinícola.

5 OBJETIVOS

Establecer, mediante modelos estadísticos de superficie de respuesta, las condiciones ideales para extraer compuestos en el subproducto de la industria vitivinícola a partir de ultrasonido y microondas como tecnologías emergentes.

Objetivos específicos

- 1) Establecer las condiciones (tiempo, temperatura, amplitud y potencia) de la extracción de compuestos antioxidantes de subproducto de la industria vitivinícola utilizando ultrasonido y microondas.
- 2) Aplicar un diseño factorial fraccionado 2^{k-1} para determinar el efecto de los factores sobre las variables de extracción de compuestos de interés en el subproducto de la uva.
- 3) Aplicar un diseño Box-Behnken para la optimización de la extracción del subproducto de la industria vitivinícola.
- 4) Demostrar la capacidad antioxidante del extracto mediante su aplicación en tres bebidas comparando con un antioxidante comercial.

6 METODOLOGÍA

La Figura 3.1 muestra el procedimiento de investigación que comienza con la obtención de la muestra y su preparación. Después de eso, se utilizó un diseño factorial fraccionado $2k-1$ para EAU y EAM. Las combinaciones se establecieron para extraer los compuestos de interés del subproducto agroindustrial. Posteriormente, se determinaron los compuestos fenólicos totales (CFT), las antocianinas y la capacidad antioxidante (CA). Seguidamente, se seleccionó el mejor equipo de extracción y se aplicó MSR para su optimización a través de DBB. Se cuantificó CFT, CA y antocianinas para obtener las mejores condiciones de extracción; finalmente, se prepararon tres bebidas (jugo de zanahoria, jugo de manzana y suero de leche) adicionadas con el extracto del subproducto agroindustrial, a las cuales se les evaluó CA, pH y color visible al ojo humano.

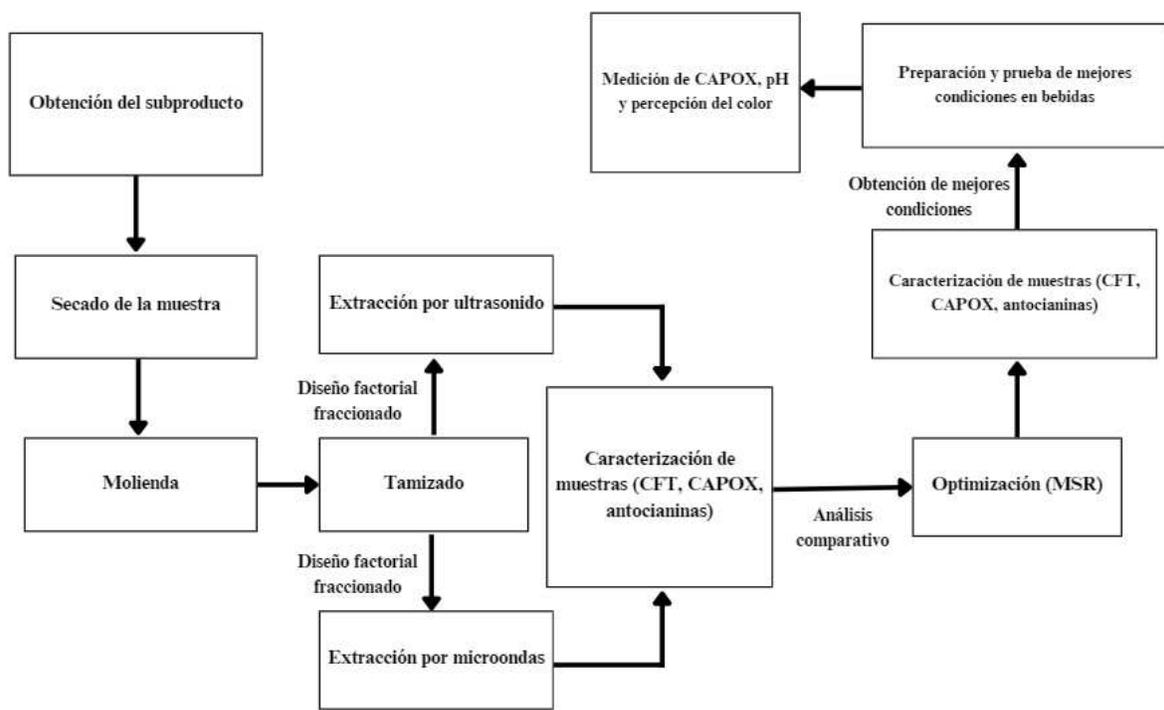


Figura 3.1 Diagrama de la metodología propuesta

6.1 Obtención del producto agroindustrial.

El subproducto de la uva de variedad roja procedente de la industria vitivinícola fue una donación de Viñedo Azteca, ubicado en carretera San Juan del Río Cadereyta, km 40.4, Los Pérez, 76686 Ezequiel Montes, Qro. Como resultado de su producción, ellos desechan el residuo de la uva a campo abierto, los cuales fueron recolectados en el lugar de su disposición final para su uso en la investigación. El traslado se realizó en un vehículo personal, en donde el producto se mantuvo en contenedores refrigerados (aproximadamente a 4 °C), hasta su llegada al laboratorio en la Universidad Autónoma de Querétaro. Dentro de sus instalaciones se almacenó en un congelador a una temperatura de -18 (±2) °C, hasta su posterior análisis.

6.2 Preparación de la muestra

Las muestras fueron secadas en un horno de convección a una temperatura de 60 °C, hasta obtener un peso constante en la balanza analítica (A&D Weighing, Orion HR-200 model). Posteriormente, las muestras se molieron utilizando un molino de café y se tamizaron a través de un tamiz estándar de malla 40 obteniendo un tamaño de partícula de 420 µm; el polvo obtenido fue colocado en recipientes cerrados y almacenados en la oscuridad a una temperatura -18 (±2) °C, asegurando su preservación durante el proyecto.

6.3 Condiciones de extracción

6.3.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La extracción de CFT se realizó mediante un ultrasonido (Cole Palmer, Instruments Company, EE. UU., modelo de 750 W y 20 kHz) con sonda (titanio de 13 mm de diámetro) de pulso continuo. En un recipiente se mezcló 1.5 ± 0.001 g de la muestra en polvo con 100 mL de agua purificada (w/v, g/mL) y se cubrió con aluminio como protección contra la luz. La temperatura se controló usando un termostato con termopar (HI 9063, Hanna Instruments Ltd. Texas, EE. UU.) y un baño de agua fría. Después de la extracción, los extractos se filtraron en papel filtro (0.20-0.25 µm, papel filtro Whatman N° 4), y se almacenaron en oscuridad a -18 (±2) °C. Todos los experimentos se realizaron en tres repeticiones.

6.3.2 Extracción Asistida por Microondas (EAM)

Los compuestos fenólicos del subproducto de la uva (tempranillo) se extrajeron mediante un reactor de microondas (ETHOS EASY Microwave Digestion Platform-Milestone Srl) funcionando a una frecuencia continua de 2.45 GHz. Para cada extracción, 0.750 ± 0.001 g de la muestra de polvo se mezcló con 50 mL de agua purificada (p/v, g/mL). Después de la extracción, se extrajo con papel filtro (0.20-0.25 μ m, papel filtro Whatman No. 4) y se almacenó en la oscuridad a $-18 (\pm 2)$ °C.

6.4 Diseño experimental

Para encontrar las mejores condiciones de CFT y CA se realizó un modelo de primer orden para EAU y EAM; para ello, se desarrolló un diseño factorial fraccionado de tres variables independientes, siendo éstas superiores a las reportadas por Romanini et al. (2020) y Spinei & Oroian (2022). Las condiciones de extracción para cada equipo fueron las siguientes: tiempo de sonicación (X1, TS): 5 min, 10 min y 15 min, Temperatura de ultrasonido (X2, TU): 35°C, 50°C y 65 °C y, amplitud de ultrasonido (X1, AU): 30 %, 50 % y 70 %, tiempo de extracción de microondas (Y1, TEM): 5 min, 10 min y 15 min, temperatura de microondas (Y2, TM): 45 °C, 72.5 °C y 100 °C, y potencia de microondas (Y3, PM): 100 W , 350 W y 600 W.

6.5 Análisis del modelo de primer orden

Se hizo un análisis comparativo por medio del software Minitab (Minitab versión 18) entre ambos métodos de extracción para encontrar el mejor. Por lo tanto, el modelo se evaluó en función de los resultados de R^2 y R^2 ajustada, la significancia de los coeficientes β , y el valor p.

6.5.1 Optimización por modelo de segundo orden

Se utilizó MSR para optimizar el equipo seleccionado para la extracción de CFT y CA realizó una optimización en el equipo seleccionado a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR) para obtener las mejores condiciones en la extracción de CFT y CA, desarrollando un modelo Box-Behnken de tres factores y tres repeticiones centrales. Los datos experimentales establecidos en los métodos anteriores fueron: tiempo de sonicación (Z1, TS): 15

min, 17:30 min, 20 min, temperatura (Z2, TU): 65°C, 75°C y 85°C y amplitud (Z3, AU): 70 %, 80 %, y 90 %. Todos los factores tuvieron tres niveles con valores reales y codificados (-1, 0, +1). Se ajustó la ecuación 1.1 de regresión polinómica de segundo orden para ilustrar la relación entre las variables independientes y las respuestas.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1.1)$$

6.6 Cuantificación de contenido fenólico total (CFT)

Se utilizó la técnica colorimétrica Folin-Ciocalteu, descrita por Garrido et al. (2019) con algunas modificaciones para valorar el CFT del orujo de uva. Se realizó una dilución de la muestra con agua purificada en una relación 1:10 para las cuantificaciones de DFF y 1:20 para el DBB. Después, 20 µL el extracto se mezcló con 100 µL del reactivo Folin- Ciocalteu diluido en una proporción 1:4 y 75 µL de solución de carbonato de sodio al 20 %. Las muestras se dejaron en oscuridad y a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 30 min, luego se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Multiskan GO Thermo Scientific). Se usó ácido gálico para crear una curva de calibración, por lo que, los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca.

6.7 Capacidad antioxidante por ABTS y DPPH

La capacidad antioxidante (CA) del orujo de uva se determinó usando el ensayo 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) mediante el método descrito por Brand Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Se realizó una dilución de las muestras 1:10 para las cuantificaciones del DFF y 1:20 para el DBB. Posteriormente, se mezcló 200 µL de la solución DPPH de 0.60 µM diluido en metanol, con 20 µL del extracto líquido de subproducto de la uva. Todas las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y en la oscuridad durante 6 minutos. Después, se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Multiskan GO Thermo Scientific).

El porcentaje de eliminación por el método DPPH se calculará a partir de la ecuación 1.2.

$$\% \text{ eliminación} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1.2)$$

En donde, A_0 representa el blanco y A_1 son los valores de absorbancia obtenidos de la muestra.

La CA de 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se determinó por el método de Re et al. (1999), con algunas modificaciones. El catión radical $ABTS^{\cdot+}$ se produjo a partir de la reacción de solución madre 7 mM de ABTS y persulfato de potasio 140 mM. Posteriormente, se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 12-16 h. La solución de ABTS se diluyó para obtener una absorbancia de 0.7-1 a 734 nm. Después, se mezcló 20 μ L de extracto con 200 μ L del reactivo preparado de ABTS. Antes de medir su absorbancia a 734 nm mediante un espectrofotómetro UV-Vis (Multiskan GO Thermo Scientific), todas las muestras fueron incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 6 minutos.

El porcentaje de captación se calculará por medio de la ecuación 1.3.

$$\% \text{ de captación de ABTS} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1.3)$$

En ambas determinaciones se utilizó el reactivo Trolox como curva de calibración, por lo que, los resultados se expresaron como mg de capacidad antioxidante equivalente de trolox por gramo de muestra seca.

6.8 Contenido total de antocianinas

El contenido total de antocianinas presentes en las muestras de subproducto de uva se determinó por el método de Abdel-CAI et al. (1999) con modificaciones de Salinas et al. (2005). Todas las muestras fueron previamente diluidas usando agua purificada en una relación 1:10 para DFF y 1:20 para DBB, midiéndose la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Multiskan GO Thermo Scientific). Finalmente, se elaboró una curva de cianidina 3-glucósido (Extrahintase, FR) para representar el contenido de antocianinas totales en mg equivalentes de cianidina 3-glucósido (ECG) por kg de muestra seca.

6.9 Desarrollo de jugo de zanahoria, manzana y suero de leche.

Los jugos se prepararon utilizando una concentración del 15% de zanahoria y manzana en 100 mL, generando tres tratamientos para cada bebida. El jugo de zanahoria se dividió en jugo de zanahoria adicionada con extracto del subproducto de la uva (JZE), jugo de zanahoria adicionada con ácido ascórbico (JZA) y jugo de zanahoria control (JZC). Similarmente, los tratamientos del

jugo de manzana se denominaron jugo de manzana con extracto (JME), jugo de manzana con ácido ascórbico (JMA) y jugo de manzana control (JMC). Por otro lado, la bebida de suero de leche se preparó con una concentración del 3.6% de suero en polvo en 100 mL, y se establecieron los tratamientos: suero de leche con extracto (SLE), suero de leche con ácido ascórbico (SLA) y suero de leche control (SLC). Todas las bebidas fueron almacenadas a 4 °C por 5 días. Ninguna de estas bebidas fue adicionada con saborizantes o endulzantes, y no se realizaron paneles sensoriales para su evaluación.

6.10 Determinaciones fisicoquímicas

6.10.1 pH

El pH en las muestras de las bebidas de jugo y suero de leche se determinó con un potenciómetro (HANNA HI 99163). Las mediciones se realizaron con 20 mL de muestra y a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

6.11 Capacidad antioxidante en jugos de zanahoria, manzana y suero de leche con extracto de subproducto de uva.

La capacidad antioxidante (CA) del jugo de zanahoria, manzana y suero de leche se determinó mediante el ensayo DPPH y ABTS. Todas las muestras fueron mezcladas con el reactivo DPPH y ABTS descrito en el punto 6.7, almacenándose en la oscuridad y a una temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 6 min. La absorbancia se midió a 517 nm y 734 nm para DPPH y ABTS respectivamente, en un espectrofotómetro UV-Vis (Multiskan GO Thermo Scientific.) El porcentaje de actividad eliminadora de radicales DPPH se calculó de acuerdo con la ecuación 1.4.

$$DPPH\% = \left(\frac{A_{t0} - A_{t180}}{A_{t0}} \right) \times 100 \quad (1.4)$$

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

6.12 Análisis estadístico.

El Análisis de Varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % y la prueba de TUKEY ($p = 0.05$) implementando el software Minitab versión 18, se utilizaron para analizar los resultados. Si el valor estimado del valor p fuera menor a la significancia (α) definida (0.05), se rechazaría la hipótesis nula, lo que indica que el efecto tiene influencia sobre la variable de respuesta. Cada análisis se completó en tres réplicas.

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Compuestos fenólicos totales de subproducto de la uva

La extracción asistida por ultrasonido de orujo de uva *tempranillo* se modeló mediante un diseño factorial fraccionado de tres variables descritos en la Cuadro 2.1 Para la técnica EAU las variables son: X_1 : 30-70 %, X_2 : 35-65 °C, X_3 : 5-15 para las evaluaciones de la extracción de CFT, CAmedia por el ensayo DPPH y ABTS y CAT.

Cuadro 2.1 Matriz experimental del diseño factorial fraccionado para ultrasonido y microondas y diseño box-Behnken para ultrasonido.

	Método	Variables independientes	Niveles de factores		
			-1	0	1
Diseño Factorial Fraccionado	EAU	Tiempo (min)	5	10	15
		Amplitud (%)	30	50	70
		Temperatura (°C)	35	50	65
Diseño Box-Behnken	EAU	Tiempo (min)	15	17.5	20
		Amplitud (%)	70	80	90
		Temperatura (°C)	65	75	85

Los valores de los CFT en la EAU se detallan en la Cuadro 2.2. Los valores obtenidos oscilaron entre 48.27 y 81.12 mg GAE/g peso seco, con condiciones de X1:15 min, X2: 35°C y X3: 30 % para los valores más bajos, y X1: 5 min, X2: 65 °C y X3: 30 % para los valores más altos. Estos hallazgos corroboran los hallazgos de investigaciones anteriores que han examinado la composición fenólica de varios subproductos de la uva, incluidas las semillas y la piel, que son abundantes en compuestos fenólicos. Por ejemplo, Benbouguerra et al. (2020) descubrieron que la concentración de CFT era de 63 mg GAE/g de peso seco. Por otro lado, Poveda et al. (2018) describieron una gama de concentraciones de CFT en el subproducto de la uva variedad tempranillo de 43.08 a 89.15 mg GAE/g.

Los análisis estadísticos revelaron que la variable más influyente en la concentración de contenido fenólico total fue el tiempo de extracción, seguido de la temperatura que se encuentra ilustrada en la Figura 4.2 en la gráfica de MSR.

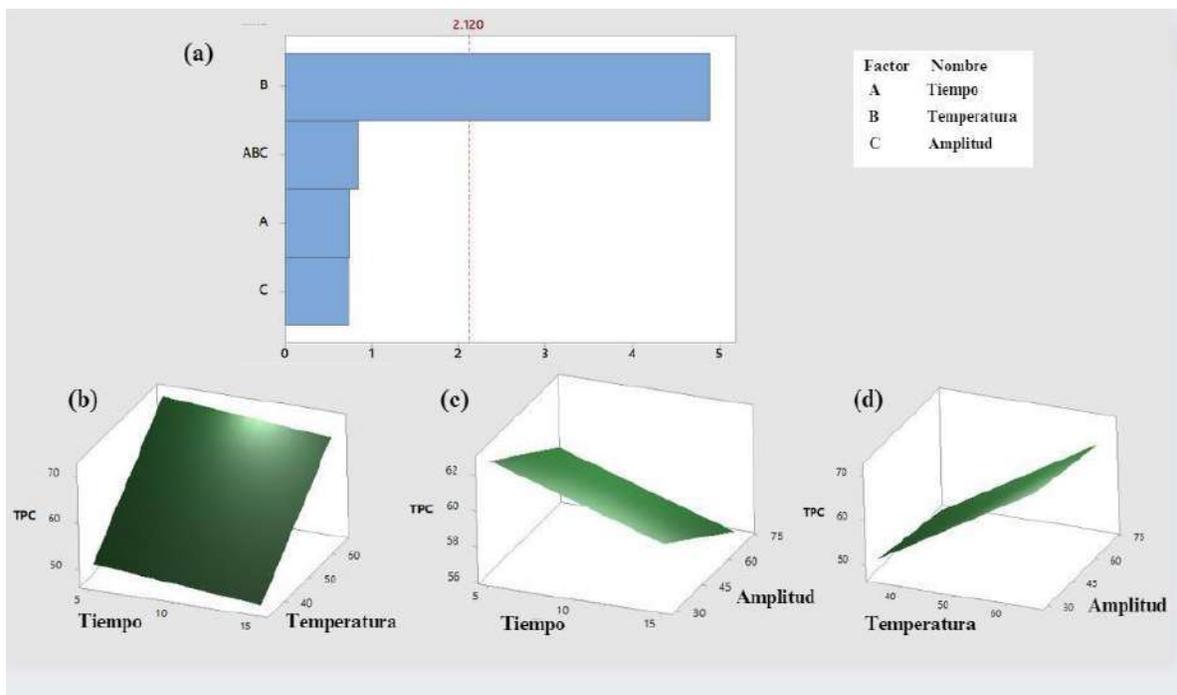


Figura 4.2. (a) Diagrama de Pareto del diseño factorial fraccional de EAU sobre el CFT del subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccional de tiempo- temperatura de extracción en CFT del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccional de amplitud-tiempo de extracción en CFT del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta del diseño factorial fraccional de temperatura-amplitud de extracción en CFT a partir de subproducto de uva.

La ecuación de regresión desarrollada se presenta a continuación.

$$TPC = 329.7 - 3.16 ST + 6.91 UT - 0.0520 UA - 27.3 Cntrl \quad (3.1)$$

La variabilidad en los valores de CFT entre diferentes estudios puede atribuirse a múltiples factores, como a la influencia en el tipo de solvente, las variaciones de temperatura, la amplitud utilizada, las disparidades en la composición de la uva, así como en los métodos de recuperación que son empleados, pueden tener un impacto importante en las concentraciones de CFT en los subproductos de la uva. Además, factores como el momento del cultivo y la cosecha, que tan madura está la fruta y el clima pueden ejercer una influencia en estas concentraciones (Tao et al., 2014; González- Centeno et al., 2015; Spinei & Oroian, 2022; Pérez-Porras et al., 2023). Por otro lado, la cavitación acústica en la EAU ha sido identificada como uno de los principales mecanismos que mejora la recuperación de los dichos compuestos. No obstante, algunos estudios han demostrado que la cavitación puede generar radicales libres y especies oxidantes, resultando en la descomposición de estos compuestos sensibles al calor. Además, se observó que una amplitud de ultrasonido demasiado alta puede inducir la formación de espumas y emulsiones, dificultando su extracción (Goula et al., 2016), por lo anterior, optimizar los procesos de extracción es de gran importancia.

La temperatura (TU) también influyó en el proceso; hay una correlación entre la temperatura y la transferencia de los CFT de la uva al solvente. Además, la temperatura aumentó la cinética de extracción al cambiar las interacciones dentro de la matriz vegetal y mejorar la movilidad de los CFT al reducir la viscosidad del medio y aumentar su permeabilidad celular. No obstante, es importante tener cuidado con las temperaturas demasiado elevadas porque pueden dañar algunos compuestos sensibles. (Media-Torres et al., 2017; Chemat, et al., 2019).

Por otro lado, se ha analizado que el tiempo de extracción ejerce una influencia significativa en los CFT recuperados usando ultrasonido, según lo informado por Medina-Torres et al. (2017). Según sus hallazgos, el proceso de extracción puede dividirse en dos etapas principales. La primera etapa, conocida como "lavado", en el cual, durante los primero 10 a 20 minutos de extracción se produce la pérdida de los componentes solubles presentes en las superficies de la matriz de las uvas. Es interesante destacar que en esta etapa se puede lograr una recuperación de hasta el 90% del CFT. Mientras tanto, la segunda etapa llamada “extracción lenta” ocurre después de los 60 y hasta los 100 minutos.

Cuadro 2.2 Diseño factorial fraccionado y resultados de variables dependientes en EAU.

Condiciones de extracción				Resultados analíticos			
Corrida	Tiempo	Temperatura	Amplitud	CFT	DPPH	ABTS	CAT
	(min)	(°C)	(%)	(mg GAE/g)	(mg TEAC/g)	(mg TEAC/g)	ECG
	[X1] [TS]	[X2] [TU]	[X3] [AU]				
1	15	65	70	68.25±0.91	48.15±0.37	58.85±1.40	63.26±1.40
2	10	50	50	61.81±9.35	47.41±1.74	73.97±1.43	62.13±1.43
3	5	35	70	52.16±1.05	50.27±1.97	55.51±0.88	55.73±0.88
4	10	50	50	63.69±9.35	46.91±1.74	58.46±1.43	62.13±1.43
5	15	35	30	55.11±2.80	45.55±0.41	55.67±1.45	56.86±1.45
6	10	50	50	71.74±9.35	46.38±1.74	57.2±1.43	62.89±1.43
7	5	65	30	73.62±3.80	46.71±0.97	57.43±0.77	67.03±0.77
8	15	35	30	48.27±2.80	45.76±0.41	55.44±1.45	60.25±1.45
9	5	65	30	72.61±3.80	48.82±0.97	56.79±0.77	68.16±0.77
10	5	35	70	50.55±1.05	45.91±1.97	59.33±0.88	57.61±0.88
11	10	50	50	50.49±9.35	45.93±1.74	57.43±1.43	64.02±1.43
12	10	50	50	77.24±9.35	47.82±1.74	57.73±1.43	61.0±1.43
13	10	50	50	53.7±9.35	46.63±1.74	57.43±1.43	61.0±1.43
14	15	65	70	70.4±0.91	49.06±0.37	59.83±1.40	64.39±1.40
15	15	65	70	69.86±0.91	48.67±0.37	60.2±1.40	66.65±1.40
16	10	50	50	50.82±9.35	51.04±1.74	57.77±1.43	60.25±1.43
17	15	35	30	52.3±2.807	46.52±0.41	56.7±1.45	57.61±1.45
18	5	65	30	81.13±3.80	46.78±0.97	57.54±0.77	68.91±0.77
19	10	50	50	57.26±9.35	46.55±1.74	57.13±1.43	64.02±1.43
20	5	35	70	53.1±1.052	46.28±1.97	56.74±0.88	57.61±0.88
21	10	50	50	49.21±9.35	44.08±1.74	56.83±1.43	59.87±1.43

15	15	65	70	69.86	48.67	60.20	66.65
16	10	50	50	50.82	51.04	57.77	60.25
17	15	35	30	52.30	46.52	56.70	57.61
18	5	65	30	81.13	46.78	57.54	68.91
19	10	50	50	57.26	46.55	57.13	64.02
20	5	35	70	53.10	46.28	56.74	57.61
21	10	50	50	49.21	44.08	56.83	59.87

*Los resultados se presentan como promedios de tres repeticiones. El contenido fenólico total es representado por CFT. La capacidad antioxidante es medida por el ensayo DPPH, y ABTS, y CAT es cantidad de antocianinas. GAE se utiliza para expresar los resultados de CFT como equivalentes de ácido gálico. PS es peso seco, TEAC expresa la capacidad antioxidante equivalente a Trolox y ECG se expresa como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido.

7.1.1 EAU contenido de antocianinas (CAT) en el subproducto de la uva.

El subproducto de la uva tempranillo tenía un CAT de 55.73 a 68.91 mg ECG/kg. Estos resultados son semejantes a los hallazgos de Poveda et al. (2018) en su investigación sobre el orujo de uva tempranillo. En este estudio, se describe que el uso de un tratamiento de ultrasonido a 50 °C reflejó un aumento importante en las antocianinas recuperadas siendo estos resultados de 33.07 a 187.57 mg (ECG).

Los análisis estadísticos revelaron que la variable que más influyó en la concentración de antocianinas fue la temperatura. Las variables TS, AU, TU se ajustaron mediante regresión lineal a la ecuación 3.2, con R^2 de 88.87.

$$ANT = 51.15 + 0.151 TS + 0.2176 TU - 0.00398 AU - 0.23 Cntrl \quad (3.2)$$

El valor más bajo de antocianinas en esta investigación, se encontró en la amplitud más alta (AU: 70 %), pero en la temperatura y tiempo más bajos (TU: 35 °C y TS: 5 min). Mientras que, el contenido de antocianinas más alto se obtuvo en las condiciones de temperatura más alta (TU: 65 °C), siendo la temperatura el efecto más influyente en la extracción de TAC. Castellanos-Gallo et al. (2022) reportó que un aumento moderado en la temperatura durante la extracción puede

favorecer la cinética de liberación de los compuestos bioactivos, incluyendo las antocianinas. Esto se debe a que la aplicación de ultrasonido produce ondas de alta frecuencia que generan un efecto mecánico sobre el material, aumentando la permeabilidad de las membranas celulares y favoreciendo la propagación de los compuestos bioactivos en el solvente. Esta técnica permite una extracción eficiente de los compuestos deseados sin comprometer su integridad y actividad biológica. Es importante destacar que, el uso de temperaturas muy altas comprometerá la calidad y cantidad de antocianinas así como su actividad biológica. Por otra parte, aunque una mayor amplitud de ultrasonido suele acrecentar la eficiencia de extracción debido a la mayor intensidad de las ondas ultrasónicas generadas y a la inducción de la fragmentación de las estructuras celulares, no es recomendable utilizar amplitudes excesivas debido a la degradación de compuestos sensibles.

De acuerdo con estudios previos, la degradación del TAC está relacionada con efectos de oxidación originadas por las interacciones de radicales libres que se han formado en la EAU. De Andrade et al. (2021) reportaron que el incremento a la temperatura se encuentra relacionada negativamente con el incremento de las antocianinas. Por otro lado, Tiwari et al. (2010) señalan cambios en las concentraciones de TAC bajo diferentes condiciones de TS, TU Y AU.

7.1.2 Influencia de la EAU en la capacidad antioxidante.

La actividad de eliminación de radicales del extracto del orujo de la uva, se valoró mediante el ensayo de ABTS y DPPH. La capacidad antioxidante por ABTS tuvo una variación en los valores de 55.44 a 59.83 mg TE/g peso seco como se indica en la Cuadro 2.2. Las condiciones en las cuales se encontró el mejor valor de ABTS fueron las más altas (TS= 15 min, TU=65 °C y AU= 70 %). Estos resultados indican la presencia de compuestos con capacidad para neutralizar los radicales libres generados por el radical ABTS.

En la Figura 4.3 se indica cómo la CA aumenta gradualmente en función al TS y la TU. Sin embargo, la influencia que tiene la temperatura puede llegar a ser dependiente a la clase de compuesto antioxidante y al tiempo de exposición (González et al., 2020).

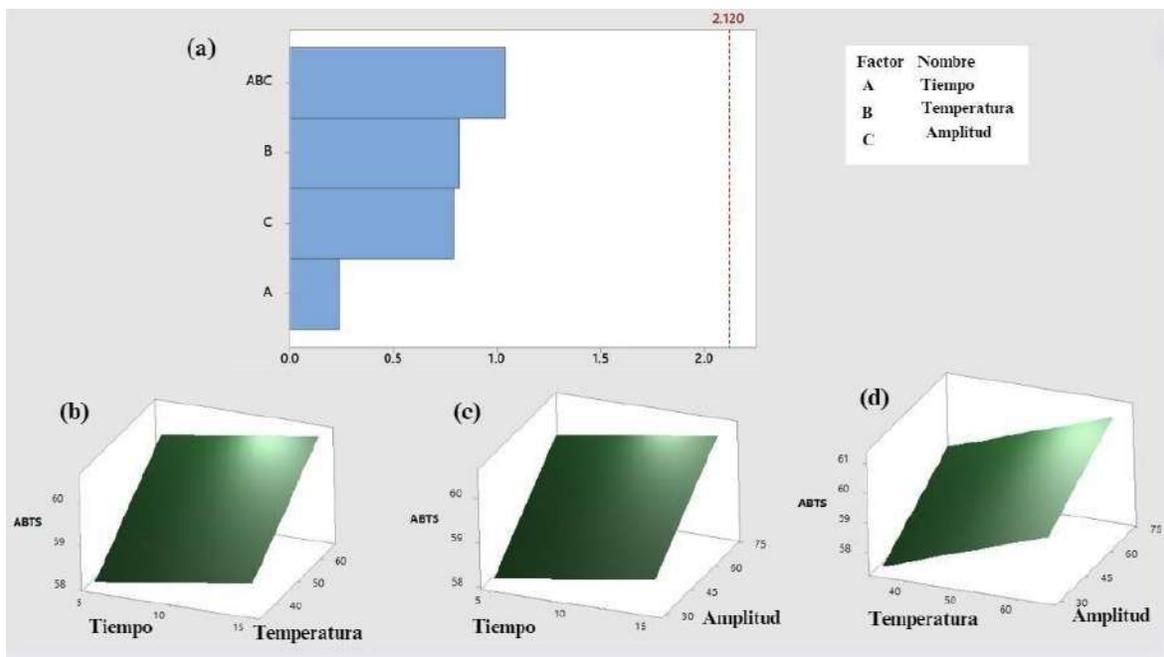


Figura 4.3. (a) Diagrama de Pareto del diseño factorial fraccional de extracción asistida por ultrasonido en la CA del subproducto de uva. Técnica por ABTS de subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie del diseño factorial fraccional de tiempo-temperatura de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie del diseño factorial fraccionado de amplitud-tiempo de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie del diseño factorial fraccional de temperatura-amplitud de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva.

La ecuación 3.3 se ajustó a los efectos de las variables ST, AU, TU, con R^2 de 89.50.

$$ABTS = 51.391 + 0.0717 TS + 0.07955 TU + 0.002846 AU + 0.205 Cntrl \quad (3.3)$$

Los valores registrados para DPPH se muestran en la Cuadro 2.2, con variación de 45.73 a 48.82 mg TE/g peso seco. La mayor extracción de antioxidantes por el ensayo DPPH se obtuvo bajo las condiciones más altas de temperatura (TU=65 °C), tiempo de sonicación (TS=15 min) y amplitud (AU=70 %).

Los resultados en la Figura 4.4. muestran que el TS, TU y AU son factores significativos que afectan la capacidad antioxidante del subproducto de la uva.

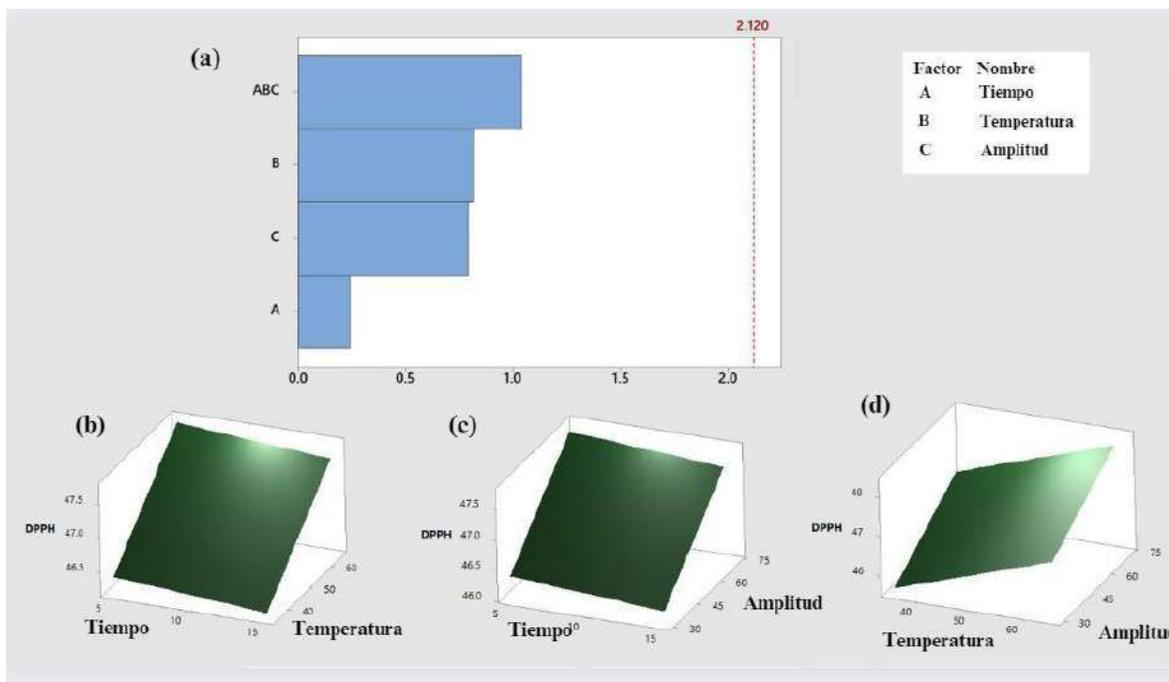


Figura 4.4. (a) Diagrama de Pareto del diseño factorial fraccional la EAU sobre la CA mediante ensayo DPPH de subproducto de uva; (b) Gráfica de superficie del diseño factorial fraccionado de tiempo-temperatura; (c) Gráfico de superficie del diseño factorial fraccional de amplitud-tiempo de CA mediante el ensayo DPPH del subproducto de la uva; (d) Gráfico de superficie del diseño factorial fraccional de temperatura-amplitud de la CA mediante el ensayo DPPH del subproducto de la uva.

La relación matemática entre las variables independientes (TS, TU y AU) con su punto central y la CA por el ensayo de DPPH se describe en la ecuación 3.4.

$$DPPH = 42.650 + 0.0516 TS + 0.0679 TU + 0.001189 AU - 0.274 Cntrl \quad (3.4)$$

El coeficiente positivo asociado al tiempo, temperatura y amplitud indican que un aumento en el tiempo de extracción se correlaciona con un incremento en la capacidad antioxidante medida por DPPH. Esto puede atribuirse a una mayor liberación de antioxidantes en los productos derivados en el subproducto acorde se extiende el tiempo, temperatura y amplitud de extracción (Ky et al., 2014).

7.2 Compuestos fenólicos totales de subproducto de uva EAM

Se modeló un diseño factorial fraccionado con tres variables para la EAM del subproducto de uva *tempranillo* como se muestra en la Cuadro 2.1, de las cuales EAM; Y_1 :5-15 min, Y_2 :45-100 °C, Y_3 : 100-600 W. Para la evaluación de tiempo de

extracción (ET), Temperatura (MT) y potencia (MP) en la relación de extracción del CFT, antocianinas y CA en DPPH y ABTS.

Los resultados de CFT en EAM que se muestran en la Cuadro 2.3, variaron entre 27.55 a 77.64 mg GAE/g peso seco, con Y₁:5 min, Y₂:100 °C Y₃: 100 W y Y₁: 10 min, Y₂:73 °C y Y₃: 350 W respectivamente. Estos resultados fueron ligeramente superiores a los de Chimshirova et al. (2021) en cuanto a la cantidad promedio de CFT de 62.14 mg GAE/g peso seco extraídos. Esto sugiere que las condiciones de extracción utilizadas en esta investigación podrían ser más efectivas en términos de recuperación de compuestos fenólicos en comparación con la extracción aplicada en el estudio anterior. Es relevante notar que, las disparidades en los procedimientos de recuperación de compuestos, como la TU, TE y la PM, así como a la variedad de las uvas utilizadas en ambos estudios, pueden ser responsables de las variaciones en los resultados.

Cuadro 2.3. Diseño factorial fraccionado y resultados de variables dependientes en EAM.

Corridas	Condiciones de extracción			Resultados analíticos			
	Tiempo	Temperatura	Potencia	CFT	DPPH	ABTS	CAT
	(min) [Y1] [TE]	(°C) [Y2] [MT]	(%) [Y3] [PM]	(mg GAE/g)	(mg TEAC/g)	(mg TEAC/g)	ECG
1	5	45	600	52.7±0.43	74.59±12.52	53.68±1.64	54.22±0.91
2	15	100	600	45.19±9.15	46.37±0.94	55.87±2.93	55.7±2.50
3	5	100	100	27.56±12.1	45.0±1.15	55.48±0.81	55.33±0.91
4	10	72.5	350	70.67±5.42	56.22±7.19	56.86±1.24	59.76±4.32
5	10	72.5	350	69.59±5.42	48.07±7.19	58.5±1.24	65.29±4.32
6	10	72.5	250	68.25±5.42	63.5±7.19	57.02±1.24	64.18±4.32
7	15	45	100	43.45±5.53	46.14±0.63	55.62±1.53	55.7±2.16
8	10	72.5	350	56.99±5.42	47.33±7.19	56.49±1.24	58.65±4.32
9	10	72.5	350	70±5.42	46.94±7.19	57.22±1.24	61.23±4.32
10	5	100	100	31.78±12.1	42.48±1.15	55.99±0.81	53.12±0.91
11	15	100	600	66.64±9.15	48.59±0.94	62.09±2.93	60.13±2.50
12	10	72.5	350	74.15±5.42	44.23±7.19	53.68±1.24	50.54±4.32
13	5	45	600	52.16±0.43	45.39±12.5	57.27±1.64	53.49±0.91
14	15	45	100	31.51±5.53	44.59±0.63	57.02±1.53	54.22±2.16
15	10	72.5	350	77.64±5.42	63.27±7.19	57.59±1.24	59.76±4.32

16	15	100	600	61.55±9.15	48.05±0.94	62.09±2.93	61.6±2.50
17	10	72.5	350	66.91±5.42	46.14±7.19	57.45±1.24	55.7±4.32
18	15	45	100	43.04±5.53	45.18±0.63	53.29±1.53	50.54±2.16
19	5	100	100	55.11±12.1	44.85±1.15	57.41±0.81	54.59±0.91
20	10	72.5	350	65.77±5.42	46.06±7.19	56.9±1.24	55.33±4.32
21	5	45	600	53.23±0.43	51.81±12.5	53.91±1.64	52.01±0.91

*Los resultados se presentan como promedios de tres repeticiones. El contenido fenólico total es representado por CFT. La capacidad antioxidante es medida por el ensayo DPPH, y ABTS, y CAT es cantidad de antocianinas. GAE se utiliza para expresar los resultados de CFT como equivalentes de ácido gálico. PS es peso seco, TEAC expresa la capacidad antioxidante equivalente a Trolox y ECG se expresa como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido.

Los análisis estadísticos demuestran que el tiempo de extracción tiene el mayor impacto en la concentración de CFT. A través de un análisis de regresión, se desarrolló la ecuación 3.5 que permite modelar esta relación.

$$CFT = 297.2 + 3.14 TE + 0.356 TM + 0.3301 PM + 218.9 Cntrl \quad (3.5)$$

El TE mostró un mayor impacto en los resultados obtenidos. Bajo las condiciones de Y1:10 min, Y2:73 °C y Y3: 350 W, se obtuvo un mayor contenido de CFT de 77.64 mg GAE/g peso seco. Esto sugiere que un tiempo de extracción más prolongado puede facilitar la liberación de los compuestos fenólicos (Chimshirova et al., 2021). Mientras que, la potencia utilizada durante la extracción también demostró tener un impacto en los resultados obtenidos. Se observó que una mayor potencia de 350 W condujo a un contenido más alto de CFT en comparación con una potencia de 100 W.

La potencia utilizada en la extracción por microondas tiene un impacto importante en la cantidad de CFT en la variedad de uva tempranillo que se utilizó en el estudio, ya que al aumentar la potencia, las ondas electromagnéticas tienen una capacidad más alta para transferir energía de manera más eficiente en la matriz alimentaria del subproducto de la uva.

Esto se traduce en un proceso de extracción más rápido, donde se reduce el tiempo necesario para extraer los CFT del subproducto. Además, el incremento de la potencia contribuye a elevar las temperaturas de manera más eficiente, lo que a su vez aumenta los coeficientes cinéticos de difusión. Esta combinación de un menor tiempo de extracción y una mayor temperatura facilita una mayor difusión del solvente a través del subproducto de la uva, permitiendo una extracción más eficiente y efectiva de los CFT (da Rocha & Noreña, 2020).

7.2.1 Contenido de antocianinas en el subproducto de la uva EAM

El subproducto de la uva tempranillo sometido a extracción asistida por microondas presentó un contenido de antocianinas totales (CAT) que varió entre 50.54 y 65.29 mg CGE/kg. Estos valores son mayores a los alcanzados por Chimshirova et al., (2021) quienes registraron que en una condición de TE= 20 min se obtuvo una extracción de 25.52 CGE/kg de semillas de uvas. Este déficit de CAT se debe a que el contenido de antocianinas es mayor en la pulpa y en el hollejo de la uva que en las semillas.

El análisis estadístico realizado reveló que las variables de temperatura (TM), tiempo (TE) y potencia (PM) tuvieron un efecto importante sobre el CAT en el subproducto de la uva. Para cuantificar su efecto, se ajustaron mediante regresión lineal, representada por la ecuación 3.6, que mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 92.47.

$$ANT = 46.49 + 0.252 TE + 0.0615 TM + 0.00455 PM + 3.88 Cntrl \quad (3.6)$$

Durante la EAM, que la temperatura suba se encuentra estrechamente relacionado con la potencia y el tiempo utilizados. Da Rocha & Noroña (2020) reportaron que el aumento de la temperatura beneficia a la mejora de los coeficientes de propagación del solvente a través de la matriz celular, lo cual conlleva a un mayor rendimiento en la extracción.

Por otra parte, estudios como el de Khan et al. (2018) han demostrado que al incrementar los tiempos de extracción y la potencia de la EAM se puede tener efectos negativos en el TAC

presentes en la muestra. Este aumento en la potencia y tiempo de irradiación puede generar un calentamiento excesivo, lo que podría llevar a la degradación de estos compuestos. Específicamente, se ha observado que los compuestos fenólicos unidos a glucósidos, como lo son los ácidos fenólicos esterificados y glucósidos, pueden ser susceptibles a la descomposición bajo las condiciones de EAM. En este sentido, a bajas potencias de extracción Coelho et al. (2020) reportaron que se encuentran mayores concentraciones de TAC.

7.2.2 Efecto de la EAM sobre la capacidad antioxidante.

En la Cuadro 2.3 se muestra como aplicando EAM, la CA del extracto de subproducto de la uva se cuantificó por medio el ensayo de ABTS y DPPH. Los efectos de la eliminación de radicales libres por ABTS variaron de 53.61 a 62.09 mg TE/g peso seco. Para los valores bajos y altos, las condiciones de extracción evaluadas fueron Y₁: 15 min, Y₂: 45 °C y Y₃: 100 W, y Y₁: 15 min, Y₂: 100 °C y Y₃: 600 W, respectivamente.

Se ajustó un modelo de regresión para analizar los efectos de TE, TM, y PM, en la CA, medida con ABTS.

$$ABTS = 45.885 + 0.3590 TE + 0.07488 TM + 0.004897 PM + 0.477 Cntrl \quad (3.7)$$

El coeficiente para el TE, TM y PM de la ecuación 3.7 indica que un aumento en el tiempo de extracción, temperatura y potencia está asociado con un incremento proporcional en la capacidad antioxidante medida por ABTS.

Los valores obtenidos para DPPH se muestran en la Cuadro 2.3, con variación de 42.48 a 48.59 mg TE/g peso seco y un valor promedio de extracción de 48.47 mg TE/g peso seco en las condiciones más altas en tiempo (TE=15 min) y potencia (PM=600 W), y un valor medio en la temperatura (TM=45 °C). Por otro lado, la menor extracción de capacidad antioxidante se midió en las condiciones más bajas de tiempo y potencia evaluadas en el diseño experimental (TE=5 min, PM=100 W) y el valor más alto en temperatura (TM=100 °C). Este hallazgo indica que, a diferencia del ensayo de ABTS, el tiempo y potencia son variables de mayor influencia para

extracción de la CA por DPPH, mientras que, la temperatura tiene menor influencia.

Estos datos son consistentes a lo registrados por Da Rocha & Noroña et al., (2020) quienes midieron la capacidad antioxidante por DPPH en orujo de uva con condiciones de extracción de TE= 10 min y PM=1000 W, lo cual resultó en una mayor capacidad antioxidante en comparación con tratamientos que emplearon condiciones de extracción más bajas. Este aumento en la capacidad antioxidante se puede atribuir a los efectos de la EAM, en la cual las ondas de microondas generan diferentes radicales libres, como hidroxilo y peroxilo, entre otras. Estas reacciones pueden liberar precursores relacionados con el estrés oxidativo que están vinculados a la ruptura de las estructuras poliméricas (da Rocha & Noroña et al., 2020).

De acuerdo con las condiciones analizadas por el ensayo de DPPH en la ecuación 3.8, los términos de tiempo y potencia fueron significativos ($p < 0.05$).

$$DPPH = 44.81 + 0.0224 ET - 0.0129 MT + 0.00653 MP + 0.457 Cntrl \quad (3.8)$$

Chimshirova et al., (2021) reportaron que el CFT está relacionado directamente con la capacidad antioxidante presente en la extracción del subproducto de la uva. De acuerdo con su investigación, a TE muy elevados se origina la destrucción de las paredes celulares. Coelho et al. (2020) señalan un patrón ascendente en la capacidad antioxidante equivalente de Trolox; sin embargo, cuando la potencia superó los 400 W, se observó una disminución gradual en este valor. También señala que otros estudios previos han informado sobre una mejora en la extracción de polifenoles con aumentos de potencia en el rango de 100 a 200 W, pero también una degradación de los mismos al combinar aumentos de temperatura y potencia de 200 W. Estos hallazgos podrían atribuirse a la aceleración del movimiento del solvente causado por la EAM. La ruptura de las células y una mejor difusión de los compuestos extraíbles hacia los disolventes son el resultado de esta técnica.

Los resultados de CFT, antocianinas y capacidad antioxidante por ABTS y DPPH mediante EAU y EAM que se muestran en las Cuadros 2.2 y 2.3, obteniendo cantidades similares que no fueron significativas al evaluarse mediante la prueba de TUKEY. Sin embargo, se aplicó la optimización

por medio de EAU de acuerdo con la fácil manipulación del equipo, los tiempos más cortos de extracción y menor energía utilizada. Estos valores son consistentes con los reportados por Medina- Torres et al., (2017) quienes también reportaron una mejor extracción por EAU en comparación con EAM.

7.3 Optimización de CFT del subproducto de la uva mediante EAU

En este estudio se usó la MSR para estimar y cuantifica los CFT, antocianinas y CA en DPPH y ABTS. Para la optimización del modelo, se aplicó el diseño Box- Behnken (BBD) de tres variables descritas en la Cuadro 2.1.

Los CFT fueron de 7.09 a 47.07 mg de GAE/g de peso seco. Con un TS de 17:30 minutos, una TU de 85 °C y una AU del 70 %, se observó una extracción de CFT más alta. Estos hallazgos superan los de Kaleem et al. (2019), que encontraron valores de CFT entre 12.77 y 34.39 mg GAE/g con tiempos de 25 minutos y temperatura de 60 °C.

El efecto del tiempo de extracción sobre el CFT está relacionado con el tiempo de unión entre el solvente y el material de extracción. Un mayor tiempo de extracción permite una mayor interacción entre los CFT en el material y el solvente, lo que mejora la difusión y aumenta la cantidad de compuestos extraídos. Por otro lado, el efecto de la temperatura puede ser significativo debido al fenómeno de cavitación en el medio líquido-sólido. Esto se refiere a la formación y disipación de microcavidades en líquidos por energía. El colapso de estas microcavidades puede producir ondas de choque locales y microcorrientes, lo que puede mejorar la energía entre el material sólido y el medio de extracción. La cavitación inducida por la temperatura durante la recuperación de CFT puede mejorar la desintegración de las estructuras celulares del material de extracción, lo que facilita la liberación y difusión de los CFT el solvente (Kaleem et al., 2019).

Los efectos de las variables sobre CFT y sus interacciones se describen en la ecuación polinomial de segundo orden 3.9.

$$CFT = -5320 + 88 TS + 86.5 TU + 40.0 AU - 1.79 TS^2 - 0.469 TU^2 + 0.077 AU^2 + 1.351 TS * TU - 1.527 TS * AU - 0.425 TU * AU \quad (3.9)$$

Las variables independientes, tiempo, temperatura y amplitud, tienen una influencia significativa en la cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT) extraídos del subproducto de la uva, como se muestran en las gráficas de superficie en la Figura 4.5. Sin embargo, es importante destacar que los efectos cuadráticos de estas variables y las interacciones tiempo-amplitud y temperatura-amplitud tienen un efecto negativo en la extracción de CFT. Esto implica que, aunque un aumento en el tiempo, la temperatura y la amplitud ultrasónica por separado pueden resultar en una mayor extracción de compuestos fenólicos, existe un punto óptimo en el cual estos efectos positivos se vuelven menos significativos. A partir de ese punto, un incremento adicional en estas variables no necesariamente conduce a un acrecentamiento proporcional en la extracción de compuestos fenólicos, e incluso puede ocasionar una degradación. Además, las interacciones tiempo-amplitud y temperatura-amplitud también tienen un efecto negativo en la recuperación de compuestos fenólicos. Esto sugiere que la combinación de ciertos niveles de tiempo, temperatura y amplitud ultrasónica puede afectar disminuyendo la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.

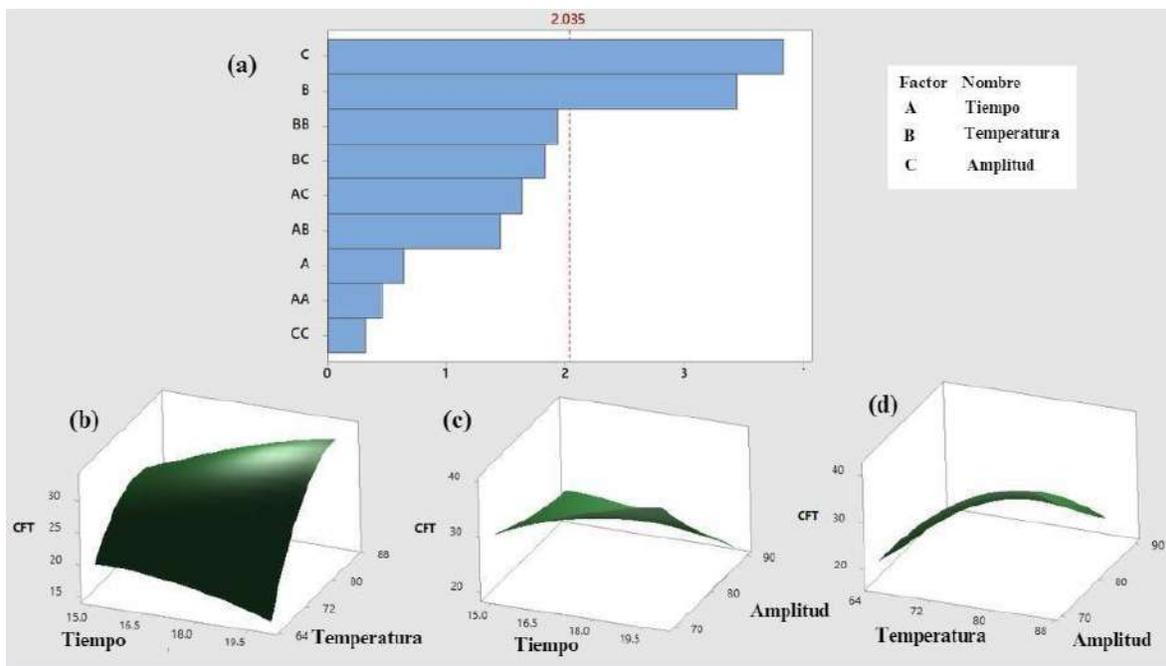


Figura 4.5. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción asistida por ultrasonido del contenido fenólico total (CFT) del subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de tiempo-temperatura de la extracción de CFT del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta de optimización tiempo-amplitud de la extracción de CFT del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de temperatura-amplitud de la extracción de CFT del subproducto de uva.

7.3.1 Efecto de EAU sobre el contenido de antocianinas

Los resultados de la extracción de antocianinas por la optimización de EAU variaron entre 56.48 a 76.44 mg CGE/kg como se observa en la Cuadro 2.4. Estos valores fueron obtenidos utilizando una combinación específica de condiciones de proceso, en donde, TS: 17.5 min, TU: 65 °C y AU: 90 % y TS: 15 min, TU: 85 °C y AU: 80 % para los valores bajo y alto respectivamente.

Cuadro 2.4. Diseño Box-Behnken y resultados de variables dependientes en EAU.

Condiciones de extracción				Resultados analíticos			
	Tiempo	Temperatura	Amplitud	CFT	DPPH	ABTS	CAT
	(min)	(°C)	(%)	(mg GAE/g)	(mg TEAC/g)	(mg TEAC/g)	ECG
Corrida	[Z1]	[Z2]	[Z3]				
	[TS]	[TU]	[AU]				

1	15	65	80	25.62±1.55	42.71±0.18	57.92±0.15	62.51±1.71
2	17.5	65	90	10.99±1.85	44.05±0.05	58.22±0.13	56.48±0.77
3	20	75	90	23.34±7.98	44.97±0.16	58.87±0.13	59.87±0.17
4	20	85	80	28.87±2.39	44.52±0.02	60.16±0.28	65.52±0.81
5	17.5	85	70	44.79±1.47	43.56±0.22	60.83±0.21	64.39±1.95
6	15	75	90	27.57±2.22	44.82±0.05	59.61±0.17	64.77±1.10
7	17.5	65	70	28.54±0.66	42.86±0.12	60±0.16	61.38±0.81
8	17.5	85	90	16.19±2.45	42.19±0.023	59.19±0.18	62.51±0.53
9	17.5	75	80	31.79±2.98	44.49±0.23	60.59±0.11	60.63±1.00
10	20	75	70	39.59±2.69	44.1±0.14	60.76±0.010	62.51±0.46
11	20	65	80	6.12±0.93	42.69±0.20	58.94±0.15	63.26±1.53
12	15	85	80	31.14±1.00	45.46±0.34	60.87±0.023	76.44±0.46
13	17.5	75	80	27.89±2.98	44.13±0.23	60.53±0.11	61.76±1.00
14	17.5	75	80	31.79±2.98	45.02±0.23	60.32±0.11	62.76±1.00
15	15	75	70	13.27±3.51	43.85±0.050	58.62±0.23	62.89±1.69

*Los resultados se presentan como promedios de tres repeticiones. CFT hace referencia al contenido de fenoles totales, DPPH se refiere a la capacidad antioxidante por ensayo DPPH, ABTS es la capacidad antioxidante evaluada por el ensayo ABTS y CAT es cantidad de antocianinas. GAE se utiliza para expresar los resultados de TPC como equivalentes de ácido gálico. PD es peso seco, TEAC expresa la capacidad antioxidante equivalente a Trolox y ECG se expresa como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido.

El análisis estadístico reveló que las variables de amplitud (AU), así como los efectos cuadráticos de tiempo (TS) y temperatura (TU) y la interacción temperatura y amplitud tuvieron un impacto significativo en la concentración de antocianinas en el subproducto de la uva, mostrado en la Figura 4.6.

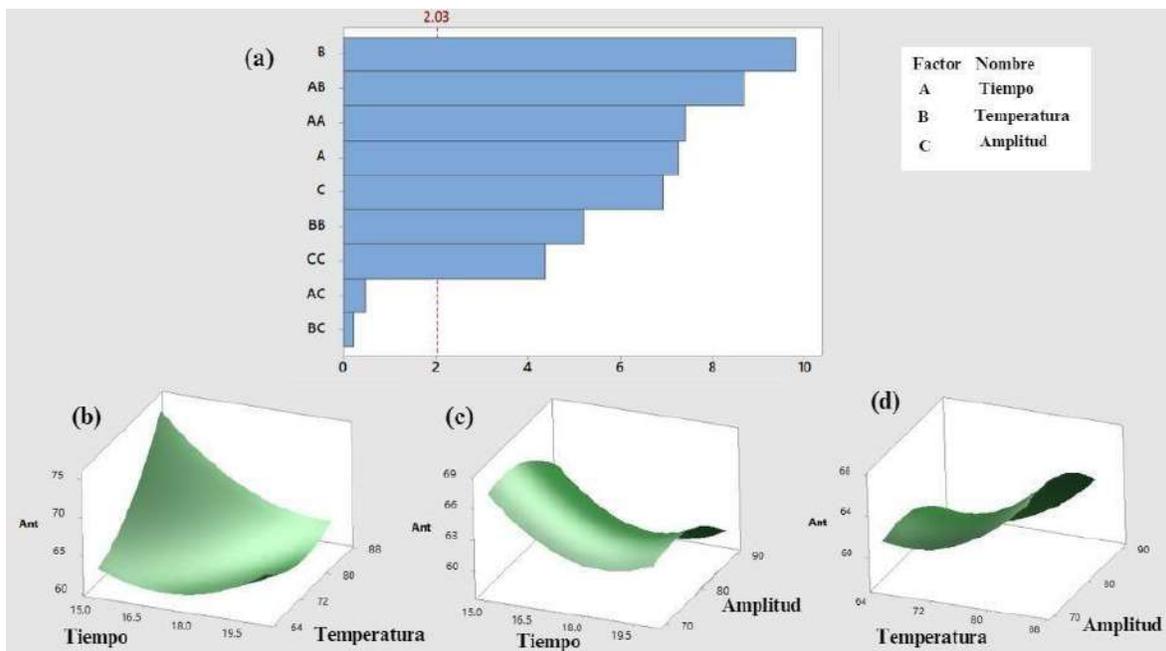


Figura 4.6. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción del contenido total de antocianinas (CAT) asistida por ultrasonido a partir de subproductos de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de tiempo-temperatura de la extracción de CAT del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta de optimización tiempo-amplitud de la extracción de CAT del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de optimización de temperatura-amplitud de la extracción de CAT del subproducto de uva.

Para cuantificar este efecto, se realizó un ajuste utilizando una ecuación polinomial de segundo orden, que se expresa a continuación. Esta ecuación mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 92.02.

$$ANT = 51.0 - 8.20 ST - 0.458 UT + 2.608 UA + 0.4871 ST^2 + 0.02134 UT^2 - 0.01789 UA^2 - 0.1368 ST * UT + 0.0075 ST * UA - 0.00094 UT * UA \quad (3.10)$$

7.3.2 Efecto de EAU sobre la capacidad antioxidante.

Se realizó la evaluación de la actividad de eliminación de radicales del extracto de orujo de uva utilizando los ensayos de ABTS y DPPH, tal como se describe en la Cuadro 2.4.

La capacidad antioxidante medida mediante el ensayo ABTS en el subproducto de la uva mostró una variación de 57.72 a 60.92 mg TE/g de peso seco. Estos valores fueron obtenidos utilizando una combinación específica de condiciones de proceso, en donde, TS: 15 min, Tu: 85 °C y AU: 80 %. Estos resultados son más altos en contraste con los reportados en el estudio de Li et al. (2019), donde la capacidad antioxidante máxima reportada fue de 44.59 mg TE/g DW. En ese

estudio, se sugirió que este descenso en la capacidad antioxidante podría estar relacionado con un aumento en la temperatura durante el proceso de extracción.

La ecuación 3.11 es polinomial de segundo orden, obtenida a partir de las variables independientes, incluyendo sus términos cuadráticos y las interacciones relevantes como muestra la Figura 4.7, basándose en los coeficientes estadísticamente significativos.

$$ABTS = -77.6 + 5.512 TS + 1.073 TU + 1.205 AU - 0.0659 TS^2 - 0.00489 TU^2 - 0.00493 AU^2 - 0.01398 TS * TU - 0.02587 TS * AU - 0.00025 TU * AU \quad (3.11)$$

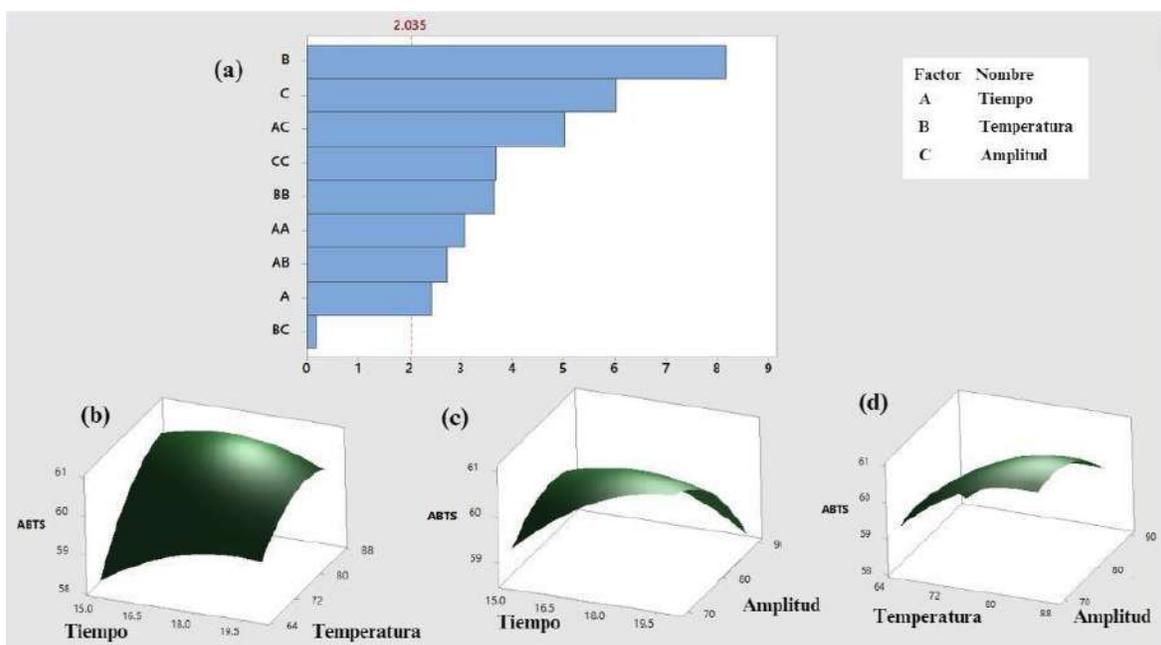


Figura 4.7. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción asistida por ultrasonido sobre la actividad antioxidante del ensayo ABTS de subproducto de uva a partir de subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del tiempo-temperatura de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta del tiempo-amplitud de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de temperatura-amplitud de extracción en el ensayo ABTS del subproducto de uva.

Los resultados obtenidos en el ensayo DPPH se presentan en la Cuadro 2.4, mostrando una variación en los valores de 42.24 a 45.46 mg TE/g de peso seco en las condiciones de tiempo y temperatura más altas (TS: 15 min y TU: 85 °C), con un valor intermedio para la amplitud (AU: 80 %). Estos valores son consistentes con los informados por Li et al. (2019), quienes también observaron una variación en los valores de DPPH que oscilaron entre 10.91 a 46.19 mg TE/g de peso seco. Esta variabilidad se atribuye a la degradación de la capacidad antioxidante, la cual

puede ser causada por el incremento de la temperatura en el proceso de extracción y también por el tipo de solvente utilizado en el estudio.

Se desarrolló la ecuación 3.12 para ajustar y modelar los efectos de las variables independientes, términos cuadráticos y sus interacciones en la capacidad antioxidante medida por el ensayo de DPPH.

$$DPPH = -79.2 - 0.42 TS + 2.177 TU + 1.090 UA + 0.0349 TS^2 - 0.01022 TU^2 - 0.00411 AU^2 - 0.01021 TS * TU - 0.00033 TS * AU - 0.00539 TU * AU \quad (3.12)$$

Los coeficientes asociados a cada término de la ecuación reflejan la magnitud y dirección de dichos efectos. Por ejemplo, en la Figura 4.8 se observa que un incremento en la TU y la AU resulta en un aumento positivo en la capacidad antioxidante, mientras que un incremento en el TS muestra un efecto negativo. Además, los términos cuadráticos y las interacciones entre las variables también influyen en la capacidad antioxidante.

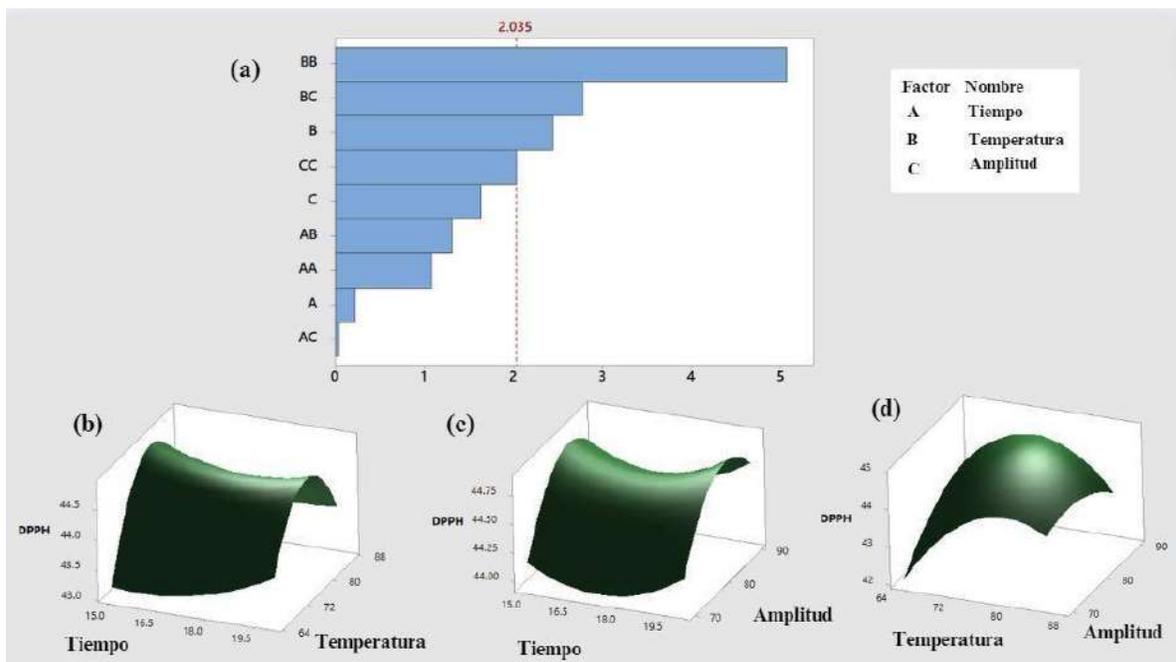


Figura 4.8. (a) Diagrama de Pareto del diseño Box-Behnken de extracción asistida por ultrasonido sobre la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH de subproducto de uva a partir de subproducto de uva; (b) Gráfico de superficie de respuesta del tiempo-temperatura de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH del subproducto de la uva; (c) Gráfico de superficie de respuesta de amplitud-tiempo de la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH de subproducto de uva; (d) Gráfico de superficie de respuesta de temperatura-amplitud de la actividad antioxidante mediante ensayo DPPH de subproducto de uva.

7.4 Capacidad antioxidante de extractos de subproducto de uva en bebidas.

La Cuadro 2.5 muestra los resultados de la influencia del extracto acuoso del subproducto de la uva en la capacidad antioxidante de tres tipos de bebidas: jugo de zanahoria, jugo de manzana y suero de la leche.

Las bebidas evaluadas con 400 mg/kg del extracto de subproducto de uva mostraron mayor capacidad antioxidante que las muestras tratadas con ácido ascórbico comercial y las bebidas de control; esto indica que el tiempo de almacenamiento influye en la degradación de la capacidad antioxidante medida por ABTS y DPPH y demostrando que en ambos ensayos hay diferencias estadísticas entre sus mediciones a través del tiempo. Estos resultados revelan que el extracto del subproducto de uva puede mejorar la capacidad antioxidante del jugo de zanahoria, manzana y el suero de leche, durante el día 1 hasta el día 5. Esto se debe a que la extracción por ultrasonido, al emplear ondas sonoras de alta frecuencia, podría haber facilitado la liberación y extracción eficiente de estos compuestos antioxidantes del subproducto de la uva (Nadeem et al., 2018). Por otro lado, las bebidas adicionadas con ácido ascórbico pudieron haber obtenido una capacidad antioxidante inferior a causa de la posible degradación de ácido ascórbico durante el almacenamiento; este efecto puede atribuirse principalmente a la oxidación causada por la exposición al oxígeno, así como a la influencia de la temperatura y otros compuestos reactivos presentes en la bebida (Castro-López et al., 2016).

Cuadro 2.5. Capacidad antioxidante por DPPH y ABTS y pH de jugos de zanahoria, manzana y suero de leche con extracto de subproducto de uva, y ácido ascórbico.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (Días)														
	0			1			2			3			4		
	DPPH	ABTS	pH	DPPH	ABTS	pH	DPPH	ABTS	pH	DPH	ABTS	pH	DH	ABTS	pH
JZE	52.8	57.6	6.45	47.8	56.5	6.35	40.1	51.5	6.02	20.	45.	5.7	19.	40.	5.5
	8	6		2	8		9	7		85	08	2	46	19	9
JZA	50.7	75.9	6.43	47.4	59.3	6.32	38.8	50.6	5.92	19.	43.	5.6	17.	38.	5.5

	9	6		3	7		5	8		01	89	8	38	38	6
JZC	50.5	63.0	6.65	45.9	53.0	6.6	45.9	48.9	6.41	3.5	41.	5.8	0.8	35.	5.7
	2	1		3	9		3	1		6	90	3	42	77	1
JME	83.5	84.7	3.99	81.6	84.4	4.05	71.2	84.4	4.06	54.	82.	4.0	49.	81.	4.0
	3	2		9	4		4	1		97	89	3	47	24	1
JMA	83.3	95.0	3.92	82.5	83.0	4.02	77.2	80.5	4.04	77.	80.	4	70.	79.	3.9
	8	3		4	7		1	4		05	08		28	50	7
JMC	74.8	81.9	4.01	73.5	76.8	4.1	60.8	76.2	4.11	39.	74.	4.0	23.	73.	4.0
	1	4		1	5		7	1		62	26	9	22	34	4
SLE	-	41.0	5.89	-	14.9	5.93	-	8.89	5.94	-	8.3	5.9	-	7.8	5.9
	112.	9		52.7	1		43.0			9.6	4	2	5.0	6	1
	55			8			0			5			02		
SLA	-	33.6	5.76	-	14.2	5.87	-	8.84	5.9	-	8.8	5.8	-	7.7	5.8
	62.7	6		46.1	1		32.0			14.	2	5	10.	1	
	5			7			1			85			89		
SLC	-	28.5	5.94	-	10.7	5.98	-	8.71	6.04	-	7.9	5.9	-	5.5	5.9
	118.	4		18.3	7		15.6	4		12.	9	7	11.	1	6
	65			0			6			55			04		

*Los tratamientos se realizaron por triplicado expresándose como medias. Los resultados de DPPH y ABTS se expresan en % de inhibición. El extracto adicionado del subproducto de uva fue: TS: 15 min, TU: 65 °C y AU: 70 %.

7.4.1 pH y color perceptible en bebidas adicionadas con subproducto de uva.

Los resultados de pH de los 3 tratamientos de bebidas adicionadas con extracto de subproducto de uva se muestran en la Cuadro 2.5.

El jugo de zanahoria registró un pH más ácido en el tratamiento con ácido ascórbico que la muestra adicionada con extracto de subproducto de uva, mientras que, el tratamiento de control obtuvo un pH mayor. Los valores de pH para los tres tratamientos en los cinco días de evaluación tuvieron una disminución gradual como consecuencia a la presencia de ácidos orgánicos naturales en las

zanahorias durante el almacenamiento (Naik et al., 2023). Por otro lado, el jugo de manzana y el suero de la leche mostraron un aumento en el pH durante el almacenamiento (día 1 y 2); Qian et al., 2023 lo atribuyó a la actividad microbiana y a la producción de compuestos alcalinos. Además, el pH puede influir en la estabilidad de los antioxidantes presentes en las bebidas, ya que algunos compuestos antioxidantes pueden ser más estables y efectivos en un rango de pH específico. Por lo tanto, nuestros resultados respaldan la importancia de controlar el pH durante la formulación y almacenamiento de estas bebidas para mantener la estabilidad de los componentes antioxidantes y garantizar su calidad y efectividad.

El color de los tres tratamientos de jugo de zanahoria, manzana y el suero de leche, durante el día 0 al 4 se muestra en la Figura 4.9. El análisis comparativo del color perceptible al ojo humano entre el suero de leche (Figura 4.9 c) y el jugo de zanahoria (Figura 4.9 a) reveló resultados similares, sin presentar diferencias significativas. Por otro lado, se observó que el jugo de manzana (Figura 4.9 b) con extracto de subproducto de uva exhibió una coloración más intensa en comparación con el jugo de manzana adicionado con ácido ascórbico. Estos hallazgos sugieren que la adición de extracto de subproducto de uva puede tener un efecto positivo en la intensidad del color del jugo de manzana, superando incluso la influencia del ácido ascórbico y el jugo natural.

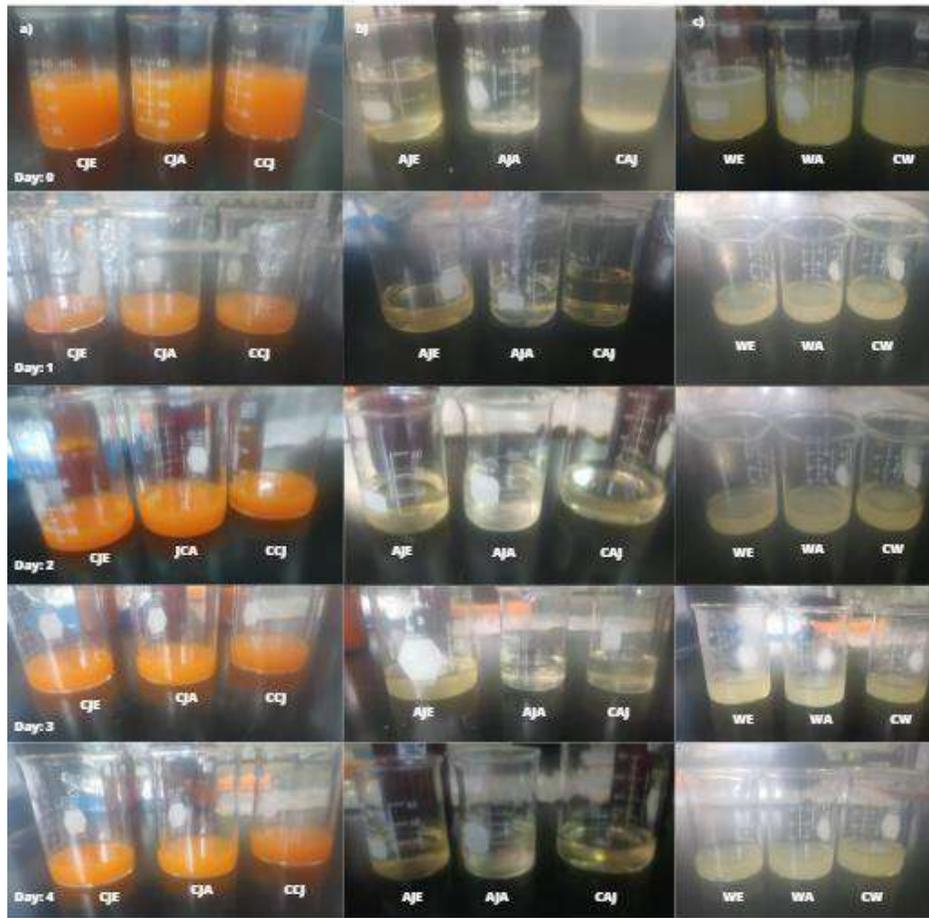


Figura 4.9. Color perceptible al ojo humano durante su almacenamiento en los días 0, 1, 2, 3 y 4 del; (a) Jugo de zanahoria con extracto de subproducto de uva (JZE), Jugo de zanahoria con ácido ascórbico (JZA) y jugo de zanahoria control (JZC); (b) Jugo de manzana con extracto de subproducto de uva (JME), Jugo de manzana con ácido ascórbico (JMA) y jugo de manzana control (JMC); (c) suero de leche con extracto de subproducto de uva (SLE), suero de leche con ácido ascórbico (SLA) y suero de leche control (SLC).

8 CONCLUSIONES

La investigación actual ha demostrado que la técnica EUA es efectiva para extraer CFT del subproducto de uva. Los resultados registrados a través del diseño factorial fraccionado y la optimización con el diseño Box-Behnken revelaron que las condiciones de extracción lograron el objetivo establecido.

En particular, se observó que los valores altos de temperatura (TU: 85 °C), tiempo de sonicación bajo (TS: 15 min) y amplitud media (AU: 80 %) eran las mejores condiciones para la extracción de CA. La temperatura más elevada mejoró la solubilidad de los compuestos, mientras que el tiempo de extracción (TS) afectó la cantidad extraída, por lo que, la temperatura, el tiempo y la amplitud fueron variables independientes que causaron un efecto importante en la extracción de estos micronutrientes.

Además, los extractos resultantes de esta investigación reportaron una buena capacidad antioxidante en comparación a los estudios reportados anteriormente. Este descubrimiento es relevante ya que, se sugiere que estos extractos podrían aprovecharse como ingredientes en la formulación de bebidas saludables. Específicamente se demostró que, al incorporar el extracto de subproducto de uva en bebidas como jugo de zanahoria, jugo de manzana y suero de leche, se mejoró la capacidad antioxidante durante el almacenamiento en comparación con los aditivos químicos tradicionales; por lo que, los extractos naturales derivados de la uva superaron en calidad y eficiencia.

La viabilidad del uso de subproducto de la uva a escala industrial se ve respaldada por la eficiencia del proceso de EAU en conjunto con la disponibilidad del residuo agroindustrial. Esto sugiere que, la producción a gran escala de extracto de subproducto de uva es factible y económicamente viable. Además, la demanda creciente de ingredientes naturales y saludables en la industria de alimentaria hace que estos extractos sean aún más atractivos como ingredientes funcionales.

9 REFERENCIAS

- Abdel-CAL, E.-S. M., and P. A. Hucl. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem*, 76: 350-354. Aoki, H., N. Kuze, and Y. Kato. 2002. Anthocyani Abd El Raoaf, M., Nasr, W. y Mostafa, K. (2014). WHEY CARROT BEVERAGE WITH SOME VEGETABLE OILS. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 5(12), 943– 958. <https://doi.org/10.21608/jfds.2014.53255>
- Abid, K., Boudagga, S., Abid, O., Najar, T., & Jaouani, A. (2023). Bioconversion of grape pomace waste into suitable alternative feed for ruminants with *Pleurotus cornucopiae* and *Ganoderma resinaceum* via solid-state fermentation bioprocess. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04771-z>
- Agbor, G., Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies, P.O. Box 6163, Yaoundé, Cameroon, Vinson, J. A., Donnelly, P. E., Department of Chemistry, Loyola Science Center, University of Scranton, 204 Monroe Avenue, Scranton, PA, 18510 USA, & Department of Chemistry, Loyola Science Center, University of Scranton, 204 Monroe Avenue, Scranton, PA, 18510 USA. (2014). Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. *International journal of food science, nutrition and dietetics*, 3:801, 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>
- Aizpurua-Olaizola, O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2014). Optimization of Supercritical Fluid Consecutive Extractions of Fatty Acids and Polyphenols from *Vitis Vinifera* Grape Wastes. *Journal of Food Science*, 80(1), E101–E107. doi:10.1111/1750-3841.12715
- Altuntas, S., & Hapoglu, H. (2019). Kefir-Type Drinks From Whey. *Non-Alcoholic Beverages*, 185–226. doi:10.1016/b978-0-12-815270-6.00007-4
- Amaya-Chantaca, D., Flores-Gallegos, A. C., Iliná, A., Aguilar, C. N., Sepúlveda-Torre, L., Ascacio-Vadlés, J. A., & Chávez-González, M. L. (2022). Comparative extraction study of 46 grape

pomace bioactive compounds by submerged and solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986), 97(6), 1494–1505. <https://doi.org/10.1002/jctb.6977>

Anil, P., Nitin, K., Kumar, S., Kumari, A., & Chhikara, N. (2022). Food function and health benefits of functional foods. En *Functional Foods* (pp. 419–441). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119776345.ch12>

Andrade, M. A., Lima, V., Sanches Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M. C., Khwaldia, K., & Ramos, F. (2019). Pomegranate and grape by-products and their active compounds: are they a valuable source for food applications? *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2019.02.010

Babazadeh, A., Taghvimi, A., Hamishehkar, H. y Tabibiazar, M. (2017). Development of new ultrasonic–solvent assisted method for determination of trans-resveratrol from red grapes: Optimization, characterization, and antioxidant activity (ORAC assay). *Food Bioscience*, 20, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.003>

Barukčić, I., Božanić, R. & Tratnik, L. (2008). Whey-based beverages-a new generation of diary products. *Mljekarstvo*. 58. 257-274. Barukčić, I., Lisak Jakopović, K., & Božanić, R. (2019). Valorisation of whey and buttermilk for production of functional beverages – an overview of current possibilities. *Food Technology and Biotechnology*, 57(4), 448–460. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6460>

Barba, F. J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N. y Vorobiev, E. (2015). Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), 1139– 1148. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1482-3>

Barba, F. J., Zhu, Z., KoubCA, M., Sant'Ana, A. S. y Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96– 109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006> 47

- Batista, M. A., Campos, N. C. A., & Silvestre, M. P. C. (2018). Whey and protein derivatives: Applications in food products development, technological properties and functional effects on child health. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1509687. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1509687>
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594. doi:10.1016/j.wasman.2017.07.017
- Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2013). Modified FolinCiocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4783–4791. <https://doi.org/10.1021/jf400249k>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. y Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bhargava, N., Mor, R. S., Kumar, K., & Sharanagat, V. S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70(105293), 105293. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>
- Baroi, A. M., Sieniawska, E., Świątek, Ł., & Fierascu, I. (2023). Grape waste materials—an attractive source for developing nanomaterials with versatile applications. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(5), 836. <https://doi.org/10.3390/nano13050836>
- Bordiga, M., Travaglia, F., & Locatelli, M. (2019). Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 933–942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)

Casagrande, M., Zanela, J., Pereira, D., de Lima, V. A., Oldoni, T. L. C., & Carpes, S. T. (2019). Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*. doi:10.1007/s11694-018-00027-x

Castro-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E. J., Niño-Medina, G., & Martínez-Ávila, G. C. (2016). Phenolic compounds recovery from grape fruit and by-products: An overview of extraction methods. *Grape and wine biotechnology*, 5, 104-123.

Chimshirova, R., Karsheva, M., Diankov, S., & Hinkov, I. (2021). CONVENTIONAL ULTRASOUND AND MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM MAVRUD GRAPE, POMACE AND SEEDS. *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*, 56(1).

Coelho, M. C., Ghalamara, S., Pereira, R., Rodrigues, A. S., Teixeira, J. A., & Pintado, M. E. (2023). Innovation and winemaking by-product valorization: An ohmic heating approach. *Processes* (Basel, Switzerland), 11(2), 495. <https://doi.org/10.3390/pr11020495>

Coelho, M. C., Pereira, R. N., Rodrigues, A. S., Teixeira, J. A., & Pintado, M. E. (2020). The use of emergent technologies to extract added value compounds from grape by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 182–197. Doi:10.1016/j.tifs.2020.09.028

Consejo Mexicano Vitivinícola A.C. (CMV) (2018).

Costa, M. M., Alfaia, C. M., Lopes, P. A., Pestana, J. M., & Prates, J. A. M. (2022). Grape by-products as feedstuff for pig and poultry production. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(17), 2239. <https://doi.org/10.3390/ani12172239>

Crescente, G., Cascone, G., Petruzzello, A., Bouymajane, A., Volpe, M. G., Russo, G. L., & Moccia, S. (2023). A comparative study between microwave hydrodiffusion and

gravity (MHG) and ultrasound-assisted extraction (UAE): Chemical and biological characterization of polyphenol- enriched extracts from aglianico grape pomace. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(14), 2678. <https://doi.org/10.3390/foods12142678>

Ćučuz, V., Cvejić, J., Torović, L., Gojković-Bukarica, L., Acevska, J., Dimitrovska, A., Aldawoud, T.

M. S. y Galanakis, C. M. (2021). Design of experiments (DoE) to model phenolic compounds recovery from grape pomace using ultrasounds. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05317-9>

de Andrade, R. B., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., Nascimento, R. Q., Corrêa, L. C., Leal, I. L., Tavares, P. P. L. G., Ferreira, E. de S., & Umsza-Guez, M. A. (2021). Syrah grape skin residues has potential as source of antioxidant and anti-microbial bioactive compounds. *Biology*, 10(12), 1262. <https://doi.org/10.3390/biology10121262>

Da Silva, D. F., Matumoto-Pintro, P. T., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M. (2015). Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1552-1562. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8796>

De Souza de Azevedo, P. O., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., LeBlanc, J. G., Perego, P. y de Souza Oliveira, R. P. (2018). Production of fermented skim milk supplemented with different grape pomace extracts: Effect on viability and acidification performance of probiotic cultures. *PharmaNutrition*, 6(2), 64– 68. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.03.001>

Ferreira, S. M., & Santos, L. (2022). A potential valorization strategy of wine industry by-products and their application in cosmetics—case study: Grape pomace and grapeseed. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(3), 969. <https://doi.org/10.3390/molecules27030969>

Gasiński, A., Kawa-Rygielska, J., Mikulski, D., Kłosowski, G., & Głowacki, A. (2022). Application of white grape pomace in the brewing technology and its impact on the

concentration of esters and alcohols, physicochemical parameters and antioxidative properties of the beer. *Food Chemistry*, 367(130646), 130646. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130646>

Gerardi, C., D'amico, L., Migoni, D., Santino, A., Salomone, A., Carluccio, M. A., & Giovinazzo, G. (2020). Strategies for reuse of skins separated from grape pomace as ingredient of functional beverages. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00645>

González, M., Barrios, S., Budelli, E., Pérez, N., Lema, P., & Heinzen, H. (2020). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds in fresh and freeze-dried *Vitis vinifera* cv Tannat grape pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 124, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.09.012>

González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176–2184. [doi:10.1016/j.ultsonch.2014.01.02](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.02)

Goula, A. M., Thymiatis, K., & Kaderides, K. (2016). Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. *Food and Bioprocess Technology*, 100, 132–144. [doi:10.1016/j.fbp.2016.06.016](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.016)

Hoskin, R. T., Plundrich, N., Vargochik, A., & Lila, M. A. (2022). Continuous flow microwave-assisted aqueous extraction of pomace phytoactives for production of protein-polyphenol particles and a protein-enriched ready-to-drink beverage. *Future Foods: A Dedicated Journal for Sustainability in Food Science*, 5(100137), 100137. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100137>

Jin, Q., O'Hair, J., Stewart, A. C., O'Keefe, S. F., Neilson, A. P., Kim, Y.-T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G. y Huang, H. (2019). Compositional Characterization of Different Industrial White and Red Grape Pomaces in Virginia and the Potential

Valorization of the Major Components. *Foods*, 8(12), 667.
<https://doi.org/10.3390/foods8120667>

Kaleem, M., Ahmad, A., Amir, R. M., & Kaukab Raja, G. (2019). Ultrasound-assisted phytochemical extraction condition optimization using response surface methodology from Perlette grapes (*Vitis vinifera*). *Processes* (Basel, Switzerland), 7(10), 749. Doi:10.3390/pr7100749

Kandyliis, P., Dimitrellou, D., & Moschakis, T. (2021). Recent applications of grapes and their derivatives in dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 696–711. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.029>

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

Khan, M. K., Ahmad, K., Hassan, S., Imran, M., Ahmad, N., & Xu, C. (2018). Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies: IFSET: The Official Scientific Journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 45, 361–381.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.006>

Kosseva, M., Joshi, V. K., & Panesar, P. S. (Eds.). (2016). *Science and technology of fruit wine production*. Academic Press. Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound Assisted Extraction (EAU) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing By- Products: A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70(105325), 105325.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

- Leal, C., Gouvinhas, I., Santos, R. A., Rosa, E., Silva, A. M., SCAvedra, M. J. y Barros, A. I. R. N. A. (2020). Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. *Industrial Crops and Products*, 154, 112675. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112675>
- Li, J., Zhang, S., Zhang, M., & Sun, B. (2019). Novel approach for extraction of grape skin antioxidants by accelerated solvent extraction: Box–Behnken design optimization. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4879–4890. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03958-5>
- Lima, A. V. S. C. de, Nicolau, E. S., Rezende, C. S. M. e., Torres, M. C. L., Novais, L. G., & Soares, N. R. (2016). Characterization and sensory preference of fermented dairy beverages prepared with different concentrations of whey and araticum pulp. *Semina. Ciências Agrárias*, 37(6), 4011. Doi:10.5433/1679-0359.2016v37n6p4011
- Lucera, A., Costa, C., Marinelli, V., Saccotelli, M., Del Nobile, M. y Conte, A. (2018). Fruit and Vegetable By-Products to Fortify Spreadable Cheese. *Antioxidants*, 7(5), 61. <https://doi.org/10.3390/antiox7050061>
- Luchian, C. E., Cotea, V. V., Vlase, L., Toiu, A. M., Colibaba, L. C., Răschip, I. E., Nadăș, G., Gheldiu, A. M., Tuchiluş, C., & Rotaru, L. (2019). Antioxidant and antimicrobial effects of grape pomace extracts. *BIO web of conferences*, 15, 04006. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191504006>
- Majerska, Joanna; Michalska, Anna; Figiel, Adam (2019). A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 88(), 207–219. doi:10.1016/j.tifs.2019.03.021
- Mammadova, S. M., Fataliyev, H. K., Gadimova, N. S., Aliyeva, G. R., Tagiyev, A. T., & Baloglanova, K. V. (2020). Production of functional products using grape processing residuals. *Food Science and Technology*, 40(suppl 2), 422–428. <https://doi.org/10.1590/fst.30419>
- Martins Strieder, M., Keven Silva, E. y Angela A. Meireles, M. (2019). Specific Energy: A New Approach to Ultrasound-assisted Extraction of Natural Colorants. *Food and*

Public Health, 9 (2), 45–52. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20190902.02>

Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A. y Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>

Mirzadeh, M., Arianejad, M. R., & Khedmat, L. (2020). Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate Polymers*, 229(115421), 115421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115421>

Monteiro, G. C., Minatel, I. O., Junior, A. P., Gomez-Gomez, H. A., de Camargo, J. P. C., Diamante, M. S., Pereira Basílio, L. S., Tecchio, M. A., & Pereira Lima, G. P. (2021). Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 135(110053), 110053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110053>

Mora-Garrido, A. B., Cejudo-Bastante, M. J., Heredia, F. J. y Escudero-Gilete, M. L. (2022). Revalorization of residues from the industrial exhaustion of grape by-products. *LWT*, 156, 113057. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113057>

Montgomery, D. C. *Diseño y análisis de experimentos/Douglas C. Montgomery; traductor Jaime Delgado Saldivar* (No. 001.434 M524d.).

Musa, K. H., Abdullah, A., & Al-Haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: application of artificial neural networks. *Food Chemistry*, 194, 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.038>

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2014). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. Wiley. Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Candelas-Cadillo, M. G., Simal, S., & Rosselló, C. (2016). Ultrasound-assisted extraction of hemicelluloses

from grape pomace using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 138, 180– 191. doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.045

Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T. M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034>

Nunes, M. A., Rodrigues, F., & Oliveira, M. B. P. P. (2017). 11 - grape processing by-products as active ingredients for cosmetic proposes. In C. M. Galanakis (Ed.), *Handbook of grape processing by- products* (pp. 267–292). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00011-9>. 54

OIV. (2023). ACTUALIDAD DE LA COYUNTURA DEL SECTOR VITIVINÍCOLA MUNDIAL EN 2022. https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Actualidad_de_la_coyuntura_del_sector_vitivinicola_mundial_en_2022_0.pdf

OIV. (2022). *Análisis anual del sector vitivinícola mundial en 2021*. https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Analisis_anual_del_sector_vitivinicola_mundial_en_2021.pdf

Oliveira, D. F. D., Granato, D. y Barana, A. C. (2017). Development and optimization of a mixed beverage made of whey and water-soluble soybean extract flavored with chocolate using a simplex-centroid design. *Food Science and Technology*, 38(3), 413– 420. <https://doi.org/10.1590/167-457x.07017>

Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) (2016).

Orús, A. (2023, junio 21). Ranking de los principales consumidores por persona de vino en todo el mundo en 2022. Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/503596/paises-del-mundo-con-mayor-consumo-per-capita-de-vino/>

- Panda, D., Saharan, V. K., & Manickam, S. (2020). Controlled hydrodynamic cavitation: A review of recent advances and perspectives for greener processing. *Processes (Basel, Switzerland)*, 8(2), 220. <https://doi.org/10.3390/pr8020220>
- Panghal, A., Kumar, V., Dhull, S., Gat, Y. y Chhikara, N. (2017). Utilization of Dairy Industry Waste- Whey in Formulation of Papaya RTS Beverage. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(2), 168–174. <https://doi.org/10.12944/crnfsj.5.2.14>
- Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y., & Sindhu, N. (2018). Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. *Nutrition & Food Science*, 48(3), 520–535. <https://doi.org/10.1108/nfs-01-2018-0017>
- Pérez-Marroquín, X. A., Estrada-Fernández, A. G., García-Ceja, A., Aguirre-Álvarez, G., & León- López, A. (2023). Agro-food waste as an ingredient in functional beverage processing: Sources, functionality, market and regulation. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/foods12081583>
- Poveda, J. M., Loarce, L., Alarcón, M., Díaz-Maroto, M. C., & Alañón, M. E. (2018). Revalorization of winery by-products as source of natural preservatives obtained by means of green extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 112, 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.063>
- Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., Silva, A. M. S., & Lopes, L. P. C. (2014). Structural characterization of lignin from grape stalks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5420–5428. <https://doi.org/10.1021/jf502267s>.
- Ramón, C., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Effect of the Operating Parameters of the Ultrasound Assisted Extraction on the Obtention of Grape Polyphenols: A Review. *Tecnológicas*, 24(51), e1822. <https://doi.org/10.22430/22565337.1822> 55
- Rashwan, A. K., Bai, H., Osman, A. I., Eltohamy, K. M., Chen, Z., Younis, H. A., Al-Fatesh, A., Rooney, D. W., & Yap, P.-S. (2023). Recycling food and agriculture

by-products to mitigate climate change: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(6), 3351–3375. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01639-6>

Ren, G., Xue, P., Sun, X., & Zhao, G. (2018). Determination of the volatile and polyphenol constituents and the antimicrobial, antioxidant, and tyrosinase inhibitory activities of the bioactive compounds from the by-product of *Rosa rugosa* Thunb. Var. plena Regal tea. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 307. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2374-7>

Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Industrial crops and products*, 69, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.059>

Salinas-Moreno, Y., G. Salas-Sánchez, D. Rubio-Hernández, and N. Ramos-Lobato. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *J. Chromat. Sci.* 43: 483-487.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2017).

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). Destaca Organización Internacional de la Viña y el Vino potencial de México en el mercado mundial para los siguientes años. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/destaca-organizacion-internacional-de-la-vina-y-el-vino-potencial-de-mexico-en-el-mercado-mundial-para-los-siguientes-años>

Shiby, V. K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2013). Development of whey-fruit-based energy drink mixes using D-optimal mixture design. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 742–748. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12022>

Soukoulis, C. y Tzia, C. (2018). Grape, raisin and sugarcane molasses as potential partial sucrose substitutes in chocolate ice cream: A feasibility study. *International Dairy Journal*, 76, 18– 29. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.08.004>

- Souza, F. P., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Silva, M. C. y Cruz, A. G. (2019). The addition of xylooligosaccharide in strawberry- flavored whey beverage. *LWT*, 109, 118– 122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.093> 56
- Spigno, G., Marinoni, L., & Garrido, G. D. (2017). State of the art in grape processing by-products. En C. M. Galanakis (Ed.), *Handbook of Grape Processing By-Products* (pp. 1–27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00001-6>
- Swamy, G. J., Sangamithra, A., & Chandrasekar, V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box–Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64–74. doi:10.1016/j.dyepig.2014.05.028
- Tiwari, Brijesh Kumar (2015). Ultrasound: a clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (), S016599361500148X–. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
- Yolmeh, M., & Jafari, S. M. (2017). Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 413– 433. doi:10.1007/s11947-016- 1855-2
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- Zandona, E., Blažić, M., & Režek Jambrak, A. (2021). Whey utilization: Sustainable uses and environmental approach. *Food Technology and Biotechnology*, 59(2), 147–161. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>
- Zhou, D.-D., Li, J., Xiong, R.-G., Saimaiti, A., Huang, S.-Y., Wu, S.-X., Yang, Z.-J., Shang, A., Zhao, C.-N., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2022). Bioactive compounds, health benefits and food applications of grape. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(18),

2755.

Zhu, F., Du, B., Zheng, L., & Li, J. (2015). Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.057>

ANEXOS

Cuadro 3.1. Análisis de varianza (ANOVA) de CFT, DPPH, ABTS DE extracción asistida por ultrasonido

	Respuesta			
	CFT	DPPH	ABTS	CAT
Principales Efectos				
TS	10.5*	0.031*	0.2209*	-2.024*
TU	56.6*	0.336*	0.7425*	2.73*
UA	-63.1*	0.224*	-0.5472*	-1.93*
Efectos cuadráticos				
TS ²	-11.2*	0.218*	-0.412*	3.044*
TU ²	-46.9*	-1.022*	-0.489**	2.134*
UA ²	7.7*	-0.411*	-0.493	-1.789*
Efectos Interacciones				
TS* ² TU	33.8	-0.255	-0.35	-3.421
TS*UA	-38.2	-0.008	-0.647	0.188
TU*UA	-42.5	-0.539	-0.025	-0.094
Análisis de varianza de modelo cuadrático				
R ²	54.46	60.04	84.04	92.02
R ² adj	39.28	46.72	78.72	89.35

*Significancia en $p < 0.05$.