

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“UTILIZACIÓN DE UN PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA
EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE ORUJOS DE
UVINA”**

Presentado por:

ESTEFANÍA CAROLINA MUÑOZ JIMENEZ

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima – Perú

2019

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente tesis (Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual de la UNALM)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“UTILIZACIÓN DE UN PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA
EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE ORUJOS DE UVINA”**

Presentado por:

ESTEFANÍA CAROLINA MUÑOZ JIMENEZ

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Dr. David Campos Gutiérrez

PRESIDENTE

Dra. Indira Betalleluz Pallardel

MIEMBRO

Dr. Milber Ureña Peralta

MIEMBRO

Mg. Sc. Beatriz Hatta Sakoda

ASESORA

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a mi familia, por acompañarme y apoyarme durante mi formación como profesional.

AGRADECIMIENTO

A mi madre, por su constante apoyo y amor a lo largo de mi vida.

A mi padre, por sus consejos, ideas y enseñanzas.

A mi hermano, por su cariño fraterno y comprensión.

A mi asesora, M. Sc. Beatriz Hatta, por su preocupación, paciencia, consejos e invaluable apoyo durante la realización del presente trabajo.

A mis jurados, la Dra. Betalleluz, el Dr. Ureña y el Dr. Campos, por el tiempo dedicado a la evaluación de presente trabajo y sus valiosos consejos.

A mis amigos de la universidad, por ser parte de esta maravillosa etapa y leales compañeros en los momentos difíciles; en especial a Nohely, Katherine y Miguel, por toda su colaboración en la elaboración de la presente tesis.

Al Ministerio de Educación, por el financiamiento parcial de la presente tesis, en el marco del Convenio MINDEU-UNALM Periodo 2016-2017; y al M. Sc. José Antonio Flores, de la Unidad de Investigación FIAL, por el constante apoyo con las gestiones correspondientes.

A todas las personas que de alguna manera han hecho posible la realización y culminación de la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY / ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	0
II. REVISIÓN DE LITERATURA	1
2.1. ANTOCIANINAS.....	2
2.2. COMPOSICIÓN DEL ORUJO	3
2.2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ORUJO.....	4
2.2.2 ANTOCIANINAS EN EL ORUJO.....	5
2.3. EXTRACCIÓN.....	7
2.3.1 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	8
2.3.2 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	11
2.4. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS.....	15
2.4.1 EFECTO DE LA RELACIÓN MATERIA PRIMA/SOLVENTE.....	16
2.4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	17
2.4.3 EFECTO DEL USO DE ENZIMAS.....	18
2.4.4 EFECTO DEL TIEMPO.....	19
2.5 POLIMERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	20
3.2. MATERIA PRIMA	20
3.3. INSUMOS	20
3.4. REACTIVOS.....	20
3.5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS	21
3.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS	21
3.7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	25
3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	28
4.1.1 COMPOSICIÓN DE LOS ORUJOS DE UVINA	28
4.1.2. COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ORUJOS DE UVINA	28
4.2. EVALUACIÓN DEL PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	30
4.3. DETERMINACIÓN DEL MEJOR SOLVENTE DE EXTRACCIÓN	41
4.4. COMPARACIÓN ENTRE LA EXTRACCIÓN CON PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL.....	43
4.5. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN	45
V.CONCLUSIONES	49
VI.RECOMENDACIONES.....	50
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
VIII.ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Niveles de los factores que intervienen en el pre tratamiento enzimático.....	27
Cuadro 2: Composición de los orujos de uvina.....	28
Cuadro 3: Composición fisicoquímica de los orujos de uvina	29
Cuadro 4: Comparación entre cantidad de antocianinas extraídas (mg Mvd-3,5-diglu/L) a partir de orujos de uvina durante el pre tratamiento enzimático y una extracción convencional.....	43
Cuadro 5: Comparativo de cantidad de antocianinas extraídas, rendimiento, enzima y solventes empleados en el pre tratamiento enzimático y una extracción convencional por 100 g de orujo de uvina	45
Cuadro 6: Ajuste de los modelos matemáticos a los datos experimentales de la cinética de extracción de antocianinas durante el pre tratamiento enzimático.....	45
Cuadro 7: Parámetros de la ecuación de cinética de pseudo primer orden ajustados a los valores de las antocianinas (mg Mvd-3,5-diglucósido/L) extraídas	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Grupo Flavilio.....	2
Figura 2: Representación esquemática de la localización de antocianos a nivel subcelular.....	6
Figura 3: Extracción sólido-líquido, (A) principales etapas y (B) típica curva de extracción durante la operación	9
Figura 4: Flujo experimental para la extracción de antocianinas.....	25
Figura 5: Color polimérico obtenido en el extracto a diferentes parámetros de concentración de enzimas, tiempo y temperatura en el pre tratamiento enzimático	31
Figura 6: Contenido de antocianinas del extracto (eje principal) y rendimiento de extracción de antocianinas (eje secundario) obtenidos a diferentes parámetros de concentración de enzimas, tiempo y temperatura en el pre tratamiento enzimático.....	33
Figura 7: Intensidad colorante obtenida en los extractos, a diferentes parámetros de concentración de enzimas, tiempo y temperatura en el pre tratamiento enzimático.....	36
Figura 8: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados ($\alpha = 0.05$) de contenido de antocianinas en los extractos	37
Figura 9: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados ($\alpha = 0.05$) de porcentaje de color polimérico en los extractos	38
Figura 10: Gráfica de interacción temperatura – concentración de enzimas sobre el contenido de antocianinas extraídas.....	39
Figura 11: Gráfica de interacción temperatura – concentración de enzimas sobre la intensidad colorante.....	40
Figura 12: Gráfica de interacción temperatura - tiempo sobre el porcentaje de color polimérico.....	40
Figura 13: Cantidad de antocianinas extraídas (mg Mvd 3,5-diglu mg/L) con diferentes solventes, posterior al pre tratamiento enzimático.....	41
Figura 14: Gráfica de barras de las medias obtenidas para contenido de antocianinas extraídas (eje principal) y rendimiento de extracción (eje secundario) con extracción convencional y el tratamiento enzimático.....	44
Figura 15: Gráfica de la cinética de extracción de antocianinas durante el pre tratamiento enzimático	46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS (ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO).....	61
ANEXO 2: RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	62
ANEXO 3: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CONTENIDO DE ANTOCIANINAS....	63
ANEXO 4: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA INTENSIDAD COLORANTE (IC).....	64
ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE COLOR POLIMÉRICO.....	65
ANEXO 6: DETERMINACIÓN DEL MEJOR SOLVENTE PARA LA EXTRACCIÓN A PARTIR DE ORUJOS PRE TRATADOS ENZIMÁTICAMENTE (DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR Y PRUEBA DE TUKEY).....	66
ANEXO 7: COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE EL RENDIMIENTO OBTENIDO CON PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL CON SOLVENTES	67
ANEXO 8: AJUSTE DE DATOS EXPERIMENTALES A MODELOS MATEMÁTICOS DE CINÉTICA DE EXTRACCIÓN.....	68
ANEXO 9: EVALUACIÓN DE TIEMPO ADECUADO DE PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON LA METODOLOGÍA DE VARIACIÓN NO SIGNIFICATIVA EN CINÉTICA (VNSC).....	71

RESUMEN

Los orujos de uva son residuos agroindustriales fuente potencial de antocianinas, conocidas por sus propiedades colorantes y su alta actividad antioxidante. El uso de enzimas en la extracción de antocianinas a partir de estos residuos representa una alternativa a los métodos convencionales, a fin de incrementar la eficiencia y como una respuesta a la necesidad de tecnologías de extracción más ecológicas. El objetivo principal del presente trabajo fue determinar el efecto de emplear un preparado enzimático (actividad poligalacturonasa, pectina-liasa, celulasa, hemicelulasa y proteasa) en el pre tratamiento para la extracción de antocianinas a partir de orujos de uvina (*Vitis aestivalis-cinerea x Vitis vinífera*). Se evaluó mediante un diseño factorial 2^3 los parámetros concentración de enzima (10 – 40 mg/L), temperatura (25 – 40 °C) y tiempo (1 – 2 h) durante el pre tratamiento enzimático. Se estudió la influencia de estos parámetros en la cantidad de antocianinas monoméricas extraídas, intensidad colorante y porcentaje de color polimérico. Se concluyó que las mejores condiciones de trabajo fueron 10 mg/L de enzimas, a 40 °C y durante 1 hora. Se evaluó la cinética de extracción y se definió que la ecuación pseudo primer orden describió el proceso adecuadamente ($r^2 = 0.97$), donde la concentración de equilibrio (C_{∞}) del extracto fue 88.21 mg Mvd/L y la velocidad de extracción constante (k) fue 0.034 min^{-1} . Además, se determinó que para una etapa de extracción posterior al pre tratamiento enzimático, el solvente hidroalcohólico con el que se obtuvo mayor cantidad de antocianinas fue una solución de etanol al 25 por ciento (v/v) en el tiempo de 1 hora, a comparación de la cantidad obtenida con agua y etanol al 50 por ciento. Finalmente, se verificó que, durante la primera hora, la cantidad de antocianinas obtenida en el pre tratamiento enzimático, empleando los parámetros definidos en el presente estudio, fue superior en un 12 por ciento a la cantidad con una extracción convencional con etanol; mientras que durante la segunda hora la cantidad obtenida con ambos métodos fue estadísticamente similar.

Palabras clave: Antocianinas, uvina, extracción, enzimas, etanol.

ABSTRACT

Grape pomace is an agro-industrial waste potential source of anthocyanins, known for their coloring properties and high antioxidant activity. The use of enzymes in the extraction of anthocyanins from these residues represents an alternative to conventional methods, in order to increase efficiency and as a response to the need for more ecological extraction technologies. The main objective of the present work was to determine the effect of using an enzyme preparation (polygalacturonase activity, pectin-lyase, cellulase, hemicellulase and protease) in the pre-treatment for the extraction of anthocyanins from grape pomace (*Vitis aestivalis-cinerea x Vitis vinifera*). The parameters enzyme concentration (10 - 40 mg/L), temperature (25 - 40 °C) and time (1 - 2 h) were evaluated during the enzymatic pre-treatment by means of a factorial design 2^3 . The influence of these parameters on the amount of extracted monomeric anthocyanins, colour intensity and percentage of polymeric color was studied. It was concluded that the best working conditions were 10 mg/L of enzymes, at 40 °C and for 1 hour. The kinetics of extraction were evaluated and it was defined that the pseudo first order equation described the process adequately ($r^2 = 0.97$), the equilibrium concentration (C_∞) of the extract was 88.21 mg Mvd/L and the constant extraction rate (k) was 0.034 min^{-1} . In addition, it was determined that for a stage of extraction after the enzymatic pre-treatment, the hydroalcoholic solvent with which the greatest quantity of anthocyanins was obtained was a 25 per cent (v/v) ethanol solution within 1 hour, compared to the amount obtained with water and 50 per cent ethanol. Finally, it was verified that, during the first hour, the amount of anthocyanins obtained in the pre-treatment enzymatic, using the parameters defined in the present study, was 12 per cent higher than the amount with a conventional extraction with 50 per cent ethanol; while during the second hour the amount obtained with both methods was statistically similar.

Keywords: Anthocyanins, uvina, extraction, enzymes, ethanol.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la producción de vinos y piscos, da como resultado la acumulación de grandes cantidades de subproductos tales como cáscaras y semillas. Las cáscaras tienen un alto valor añadido, ya que son una buena fuente de compuestos fenólicos y antocianinas (Medina-Meza y Barbosa-Cánovas, 2015). En el valle de Cañete, crece una variedad de uva tintórea denominada uvina (*Vitis aestivalis-cinerea x Vitis vinífera*). Esta uva tiene bayas pequeñas de tono azul - negro y sus racimos son grandes y muy abundantes. Es empleada para la elaboración de pisco, proceso durante el cual se desechan los orujos (cáscaras, semillas).

La extracción de antocianinas generalmente se realiza con solventes convencionales, que involucra consumo de tiempo, energía y mucho solvente, lo que representa una cuestión energética y ambiental grave (Medina-Meza y Barbosa-Cánovas, 2015). Actualmente, se estudian métodos que ayuden a incrementar la eficiencia del proceso. Entre algunos de estos se encuentran la extracción asistida con ultrasonido, con enzimas, con microondas, con pulsos eléctricos, con fluidos supercríticos y con líquidos presurizados (Azmir *et al.* 2013).

La utilización de enzimas a escala industrial se ha utilizado tradicionalmente en la industria de vinificación con el fin de incrementar rendimientos, incrementar el color, o para la clarificación. Sin embargo, hacen falta más estudios sobre la aplicación de enzimas para la extracción de antocianinas a partir de subproductos de la industria vitivinícola nacional y las condiciones adecuadas para incrementar el rendimiento de extracción.

El presente trabajo tuvo por objetivo principal determinar la influencia de los factores concentración de enzima, temperatura y tiempo de pre tratamiento enzimático, en la extracción de las antocianinas de los orujos de uvina (*Vitis aestivalis-cinerea x Vitis vinífera*); asimismo, determinar el solvente adecuado a emplear para la extracción de antocianinas a partir de cáscaras de uvina pre tratadas enzimáticamente y ajustar la obtención de antocianinas durante el pre tratamiento enzimático a un modelo cinético de extracción.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTOCIANINAS

Las antocianidinas son la estructura básica de las antocianinas. Las antocianidinas (o agliconas) consisten de un anillo aromático (A) unido a un anillo heterocíclico (C) que contiene oxígeno, el cual está también unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático (B). Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma glicósida (unidas a un radical azúcar) se conocen como antocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Los hidratos de carbono que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, la xilosa y la arabinosa y, ocasionalmente, la gentiobiosa, la rutinosa y la soforosa; todos ellos se unen a la antocianidina principalmente por medio del hidroxilo de la posición 3, y en segundo término, de la 5 o de la 7. Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, éstos se localizan en los hidroxilos 3 y 5, produciendo una estructura que generalmente es más estable que cuando sólo contienen un solo monosacárido (Badui, 1990).

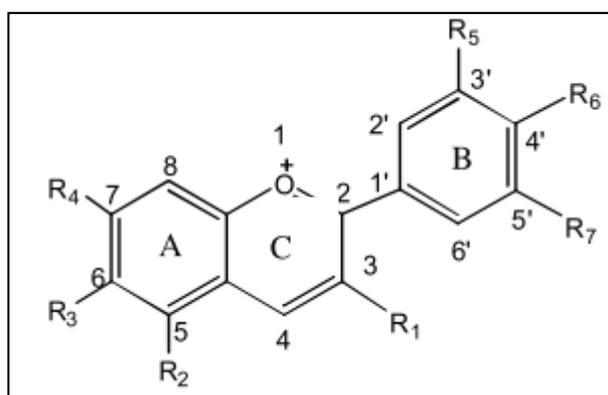


Figura 1: Grupo Flavilio.

FUENTE: Castañeda-Ovando *et al.* (2009).

Existe una amplia variedad de antocianinas en la naturaleza. Las principales diferencias entre ellas son el número de grupos hidroxilados, la naturaleza y número de azúcares ligados a su estructura, los carboxilos aromáticos o alifáticos unidos al azúcar en la molécula y posición de estos enlaces. A la actualidad se han reportado más de 500 diferentes antocianinas y 23

antocianidinas, de las cuales solo seis son las más comunes en plantas vasculares: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Las antocianinas aisladas son altamente inestables y muy susceptibles a degradación. Su estabilidad se ve afectada por muchos factores como el pH, la temperatura de almacenamiento, la estructura química, la concentración, la luz, el oxígeno, los solventes, la presencia de enzimas, flavonoides, proteínas y iones metálicos (Rein, 2005).

Las antocianinas y otros flavonoides se degradan como resultado del procesamiento, mientras que los taninos/procianidinas pueden cambiar en su grado relativo de polimerización. Tal vez lo más intrigante de todos los cambios sea la tendencia hacia la formación de pigmentos poliméricos (PP), también llamados polímeros de antocianina y tanino. Estos pigmentos pueden ser producidos por una reacción de condensación entre las antocianinas y los flavan-3oles o su contraparte polimérica, las procianidinas (Stebbins, 2017). Este autor indica que esto es una ventaja convincente para determinar el destino de las antocianinas, pero la dificultad surge en la medición de los pigmentos poliméricos. Actualmente, los pigmentos poliméricos se determinan como una relación con el contenido de antocianinas mediante un ensayo de porcentaje de color polimérico (Giusti y Wrolstad 2001).

2.2. COMPOSICIÓN DEL ORUJO

La composición de las uvas puede variar dependiendo de factores extrínsecos como las condiciones de clima y suelo, prácticas de viticultura; tanto como de factores intrínsecos como variedad, grado de madurez y condiciones sanitarias. De manera similar, el tipo de proceso y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la vinificación influyen notablemente en la composición de los orujos de vino. La variabilidad entre variedades de uva y los efectos de cada proceso de elaboración de vino explican las variaciones reportadas en la literatura sobre la composición del orujo de vino y sus componentes principales: pieles y semillas. Además es importante tener en cuenta que el orujo de vino tinto es un subproducto que se ha fermentado, mientras que los orujos blancos y rosados se eliminan antes de la fermentación alcohólica (García-Lomillo y González-San José, 2016).

La fibra dietaria es el principal componente de los orujos secos, con un contenido de entre 43 y 75 por ciento. La fibra dietaria está constituida principalmente por polisacáridos de la pared celular y lignina. Generalmente, las semillas son más ricas en fibra que las pieles. La fibra contiene considerables proporciones de taninos y proteínas (García-Lomillo y González-San José, 2016).

Ribeiro *et al.* (2015) estudiaron la composición fisicoquímica de las variedades de uva Cabernet Sauvignon, Merlot, Mix y Terci. La variedad Cabernet Sauvignon tuvo el valor más bajo de fibra dietaria (26.42%) entre éstas, posiblemente debido a que en la composición del orujo predominó la cantidad de pieles. Las otras variedades mostraron un contenido más alto de fibra dietaria (entre 56 y 59%), siendo estos resultados más altos debido al mayor contenido de semillas y escobajos, además de las pieles. Los resultados de otros análisis como humedad, cenizas, lípidos y proteínas mostraron diferencias significativas entre los orujos de uva entre estas variedades debido a algunos factores que influyen la composición química, tales como la composición del suelo, localización geográfica, grado de madurez, así como la diferencia entre las variedades de uva, *V. vinífera* y *V. labrusca*.

2.2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL ORUJO

La composición fenólica de los orujos ha sido descrita extensamente en la literatura, con ciertas diferencias cualitativas y cuantitativas. Estas diferencias se deben a la influencia de los factores que afectan la composición de las uvas en el perfil fenólico y al efecto de diferentes prácticas enológicas en la extracción de estos compuestos durante el proceso de elaboración del vino (García-Lomillo y González-San José, 2016).

Los compuestos fenólicos contenidos en las uvas y en el vino pueden clasificarse en tres grupos principales: (1) ácidos fenólicos (principalmente benzoicos e hidroxicinámicos), (2) flavonoides simples (catequinas, flavonoles y antocianinas) y (3) taninos y proantocianidinas. Muchos fenoles han sido identificados en los orujos de uva, siendo los más abundantes las antocianinas, ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, flavan-3-oles, flavonoles y estilbenos (Fontana *et al.*, 2013).

Los flavonoides son un grupo muy extenso de compuestos fenólicos que incluyen una amplia gama de diferentes familias o subgrupos, principalmente diferenciados por el grado de oxidación de su heterociclo oxigenado. Las antocianinas (en orujo de uvas tintas) y los flavanoles son los más abundantes en el orujo, dejando a todos los demás en una minoría.

De acuerdo con la composición normal de las variedades rojas de *Vitis vinifera*, la antocianina predominante es la malvidina-3-O-glucósido que generalmente es seguida por peonidina, petunidina o delfinidina-3-glucósido dependiendo de la variedad de uva (García-Lomillo y González-San José, 2016).

Aparte de la fracción de polifenoles que es fácilmente extraíble por métodos convencionales (solventes orgánicos-acuosos), los orujos presentan cantidades importantes de polifenoles no extraíbles, incluyendo polifenoles hidrolizables y proantocianidinas no extraíbles. Éstas últimas se encuentran asociadas con otros compuestos de los orujos, especialmente fibra. Los polifenoles hidrolizables son fenoles monoméricos ligados a proteínas, polisacáridos o paredes celulares mediante interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas, puentes hidrógeno o enlaces covalente. La baja solubilidad de estas fracciones es la causa de que no sean extraídas durante el procesamiento del vino y permanezcan en el orujo (García-Lomillo y González-San José, 2016).

2.2.2. ANTOCIANINAS EN EL ORUJO

En las pieles de uva, los compuestos fenólicos en general se pueden clasificar como (1) fenólicos de pared celular, los cuales están ligados a polisacáridos por interacciones hidrofóbicas, enlaces hidrógeno y covalentes, y (2) fenólicos no de la pared celular, que comprenden fenoles confinados en las vacuolas de las células vegetales y fenoles asociados con el núcleo de la célula (Pinelo *et al.* 2006).

Los antocianos están localizados generalmente en el hollejo del grano y se encuentran específicamente en las vacuolas de las tres o cuatro capas de células que forman la hipodermis, ubicada inmediatamente debajo de la cutícula (De Rosa, 1988). En las variedades tintóreas, como es el caso de la uvina, también se hallan en la pulpa (Romero, 2008).

A nivel subcelular, estas moléculas hidrosolubles se encuentran normalmente dentro de las vacuolas (Figura 2), donde se pueden acumular en unas vesículas esféricas denominadas “antocianoplastos” o “inclusiones antociánicas vacuolares”. En el transcurso de la maduración ocupan cada vez más espacio en detrimento del citoplasma (Romero, 2008).

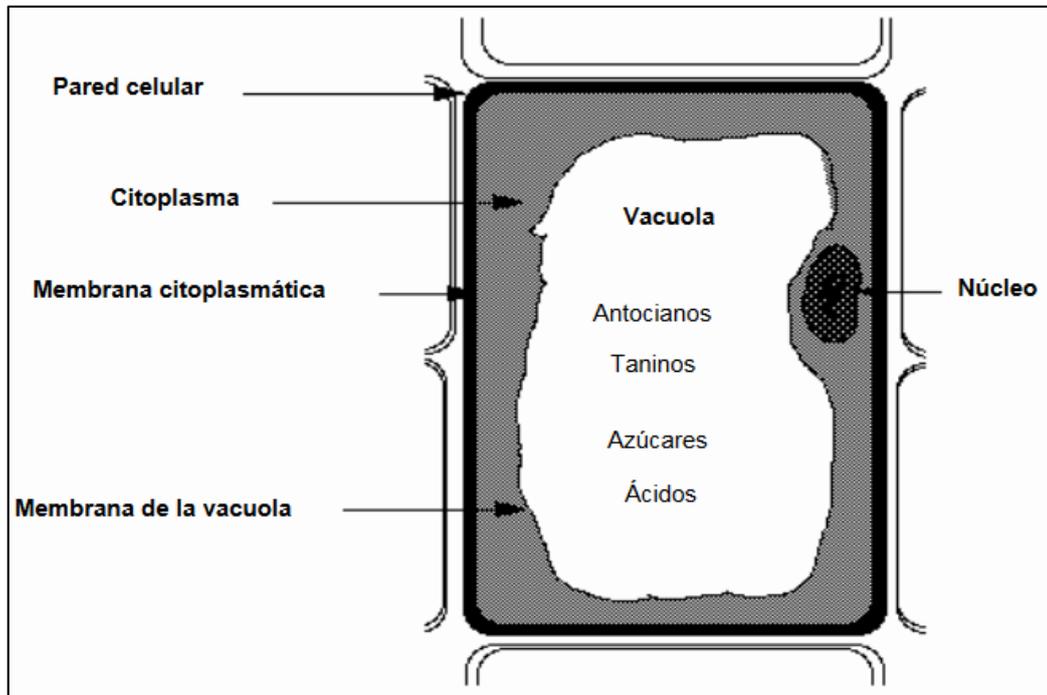


Figura 2: Representación esquemática de la localización de antocianos a nivel subcelular.

FUENTE: Romero (2008).

El patrón de glicosilación de las antocianinas de uva puede ser complejo. Para cultivares de *Vitis vinífera*, la glicosilación aparece exclusivamente en la posición 3-. Por el contrario, la glicosilación en *Vitis* salvajes y uvas híbridas ocurre en las posiciones 3- y 5- (Acevedo *et al.* 2012).

En lo reportado por Acevedo *et al.* (2012), en las variedades *V. vinífera*, las antocianinas son monoglucósidas, y los derivados de la malvidina son los componentes más abundantes, siendo el 57 por ciento del total del contenido de antocianinas. Los derivados de la delphinidina son los segundos componentes más abundantes, cerca del 17 por ciento, mientras que los derivados de la cianidina son los menos abundantes, cerca del 3 por ciento. Solo el 33 por ciento del total de antocianinas se encontraron combinados con ácidos orgánicos, y la forma dominante fueron los derivados acetil (23 por ciento del total de antocianinas). Esta composición es similares a lo reportado por otros de la literatura (Liang *et al.*, 2008). Se ha reportado que las antocianinas individuales en los extractos de piel de uva son principalmente malvidinas (1.40 – 7.09 mg/g de piel), en particular la malvidina-3-glucósido (Costa *et al.*, 2014).

2.3. EXTRACCIÓN

La extracción es la disolución de partículas sólidas en los líquidos. Es una de las operaciones básicas ampliamente empleadas en la tecnología química en la obtención de productos orgánicos y colorantes, abonos, minerales, etc. La disolución es premisa para acelerar diversas operaciones, puesto que en estado disuelto y disociado en grado considerable aumentan la movilidad y actividad química de las moléculas de la sustancia disuelta (Dueñas *et al.*, 2016).

La extracción es un proceso de separación que involucra dos fases. El disolvente es el material añadido para formar una fase diferente de la que en el que el material que se separó originalmente estaba presente. La separación se consigue cuando el compuesto que ha de separarse se disuelve en el disolvente mientras que el resto de los componentes permanecen donde estaban originalmente. Las dos fases pueden ser sólidos y líquidos, las fases líquidas inmiscibles, o sólido y gas. La extracción sólido-líquido también se denomina lixiviación (Toledo, 2007).

También se puede definir la extracción sólido-líquido como un fenómeno de transporte de masa en el cual el analito contenido en una matriz sólida migra dentro del solvente que está en contacto con la matriz. La eficiencia de extracción se puede mejorar mediante cambios en los gradientes de concentración, coeficientes de difusión o en las capas límite, todos estos se ven afectados por el método de extracción, tipo de solvente, tamaño de partícula, temperatura, y tiempo de extracción (Fontana *et al.*, 2013).

Las sustancias de origen biológico, por ejemplo los vegetales, tienen una estructura anisótropa, es decir que los solutos se transportan en estos cuerpos con iguales velocidades en todos los sentidos. De la estructura del sólido poroso depende la conductividad difusiva, la que ejerce determinante influencia sobre la velocidad de lixiviación o extracción sólido-líquido (Dueñas *et al.*, 2016).

En el caso de la lixiviación empleando materias vegetales, los materiales biológicos tienen estructura celular y los constituyentes solubles suelen estar dentro de las células. En ocasiones, la velocidad de lixiviación es bastante baja, debido a que las paredes celulares constituyen una resistencia adicional a la difusión. Para lixiviar a partir de hojas, tallos y raíces, el secado del material antes de la extracción ayuda a romper las paredes celulares. De esta manera, el disolvente ataca directamente al producto (Geankoplis, 1998).

En algunos casos, la disolución transcurre como resultado de la acción heterogénea en la interface, acompañada por la formación de productos sólidos insolubles o parcialmente solubles, o gases producto de la reacción. Esto puede crear una película, o sedimentar burbujas de gas sobre la superficie del sólido, por otra parte la fase sólida disuelta puede cristalizarse por sobresaturación y depositarse. Todos estos fenómenos disminuyen considerablemente la superficie de material accesible a la interacción de este con el disolvente, y reducen por tanto la transferencia de masa (Dueñas *et al.*, 2016).

El solvente de extracción es determinante para la eficiencia de extracción y recuperación de productos naturales. El criterio que define la máxima solubilidad y transferencia de masa son aspectos clave en la selección de un solvente para la extracción de compuestos bioactivos, e incluye aspectos como (1) afinidad molecular entre el solvente y el soluto definido por la solubilidad del compuesto objetivo, (2) recuperación del solvente en etapas posteriores, (3) tensión interfacial y viscosidad para humedecer el sólido y fluir a través de poros y capilares, (4) estabilidad e inercia química, no inflamabilidad, costo y (5) seguridad ambiental y baja toxicidad (Díaz *et al.*, 2017).

2.3.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante su desarrollo en respuesta a condiciones de estrés. Estos compuestos no se encuentran distribuidos uniformemente en las plantas en los tejidos, a niveles celulares y subcelulares. Los fenólicos insolubles son componentes de las paredes celulares, mientras que los solubles están compartimentalizados dentro de las vacuolas de las células vegetales. A nivel de tejido, las capas externas de las plantas contienen altos niveles más altos de compuestos fenólicos que aquellas localizadas en las partes internas (Naczk y Shahidi, 2004).

Las matrices de origen vegetal tienen una composición compleja y un intrincado arreglo micro estructural de células, espacios intercelulares, capilares y poros. Muchos solutos se encuentran dentro de las células y otros forman parte de las paredes celulares, usualmente en forma polimerizada. Ya que la pared celular es la mayor barrera que el solvente y los solutos deben atravesar, su degradación facilita la transferencia de masa. La Figura 3 (A) muestra la serie de etapas que ocurre durante la extracción sólido-líquido: (1) difusión del solvente dentro de la matriz sólida, (2) solubilización de los componentes objetivo en el solvente, (3) difusión del soluto fuera de la matriz hacia la superficie externa de la matriz

sólida, (4,5) transferencia de masa desde la superficie externa del sólido hacia la solución en masa (Díaz *et al.*, 2017).

La velocidad global del proceso depende de estas etapas, y es determinada por la velocidad más lenta. El transporte a través de la matriz sólida es usualmente la etapa que limita la velocidad. La transferencia externa de masa puede ser mejorada por un adecuado proceso de agitación, permitiendo una suspensión homogénea y transferencia de soluto; la transferencia de masa interna puede ser favorecida mediante la reducción de tamaño de partícula y degradación de la paredes celulares (Díaz *et al.*, 2017).

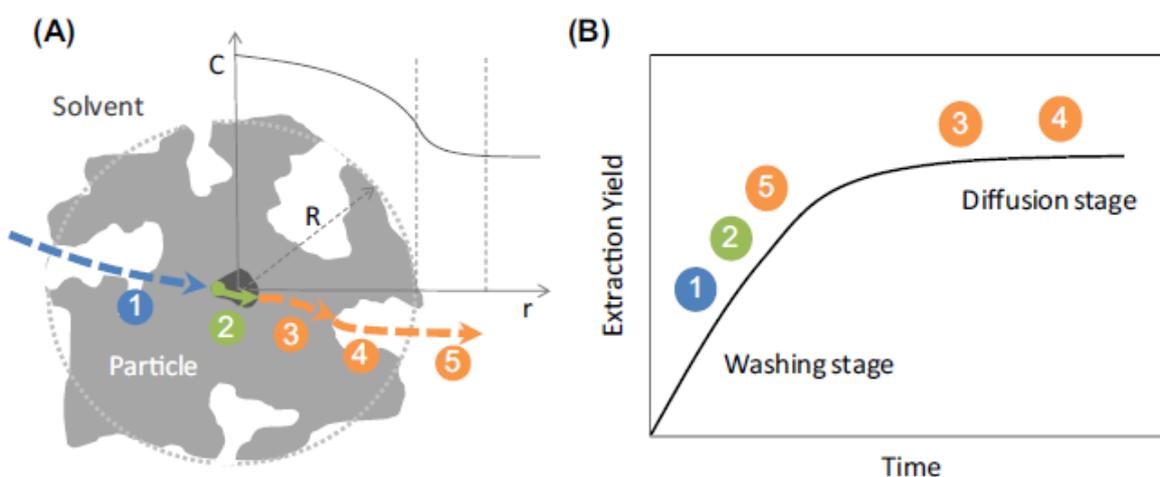


Figura 3: Extracción sólido-líquido, (A) principales etapas y (B) típica curva de extracción durante la operación.

FUENTE: Díaz *et al.* (2017).

En la Figura 3(B) muestra la típica curva de extracción. La pendiente inicial corresponde a la extracción de la fracción de los compuestos más accesible, principalmente de las células rotas. La etapa de lavado (“*Washing stage*” en el gráfico) se refiere a la cinética rápida de esta etapa, que requiere que la estructura celular esté rota para facilitar el acceso al soluto y al solvente. Durante la etapa de extracción lenta, los compuestos activos difunden desde el interior de la matriz vegetal y el rendimiento de extracción durante esta etapa es altamente dependiente de las células que permanecen intactas después de la etapa de lavado (Díaz *et al.*, 2017).

La extracción es un paso importante en la recuperación, aislamiento e identificación de compuestos antes del uso de extractos fenólicos. Las técnicas tradicionales como

extracciones sólido-líquido o *Soxhlet* han sido usadas por muchas décadas, pero requieren mucho tiempo y cantidades relativamente importantes de solvente. Además, debido a los pasos usados comúnmente en estas técnicas, tales como calentamiento, hervido, reflujo, ocurre pérdida de polifenoles debido a reacciones de ionización, hidrólisis y oxidación que ocurren durante el procedimiento. Factores como el solvente empleado y la proporción muestra/solvente son relevantes para lograr buenos rendimientos, considerando la naturaleza polar de los componentes (Fontana *et al.*, 2013).

Se ha desarrollado una amplia gama de productos a partir de los subproductos del vino en las últimas décadas. El enfoque más común es obtener extractos, distintos del aceite de semilla, utilizando solventes orgánicos o agua para la producción de extractos enriquecidos de alto interés en aplicaciones alimenticias. Sin embargo, también se han propuesto otros productos no extraídos para ser aplicados por la industria alimentaria. Los procesos extractivos pueden combinarse con pasos de purificación y concentración para obtener extractos concentrados de compuestos específicos (García-Lomillo y González-San José, 2016).

La extracción de compuestos fenólicos a partir de materiales vegetales se ve influenciada por su naturaleza química, el método de extracción empleado, el tamaño de partícula, tiempo de almacenamiento y condiciones, así como la presencia de sustancias interferentes. La naturaleza química de las plantas varía de sustancias simples a altamente polimerizadas que incluye proporciones variables de ácidos fenólicos, fenilpropanoides, antocianinas, taninos, entre otros. Éstos también pueden existir como complejos con carbohidratos, proteínas y otros compuestos de las plantas. Por lo tanto, los extractos fenólicos a partir de plantas siempre son una mezcla de diferentes clases de compuestos fenólicos que son solubles en el sistema solvente usado (Naczki y Shahidi, 2004).

El tipo de solvente es uno de los principales factores que afectan la eficiencia de extracción del proceso. Debido a la naturaleza polar de los polifenoles, son fácilmente solubilizados en medio polar prótico como las soluciones hidroalcohólicas. Las fracciones de compuestos fenólicos pueden ser obtenidas variando la concentración de alcohol en mezclas con aumento de la concentración de solventes de baja polaridad como etil acetato (Fontana *et al.*, 2013).

El metanol tiene alta capacidad de extraer fenoles. Cuando se utilizan alcoholes como solventes de extracción, se tiene una liberación progresiva de polifenoles a partir de los orujos de uva como una función del tiempo de extracción, mientras que el tiempo de contacto no es tan significativo cuando se usa agua. Muchos investigadores han usado mezclas de solventes orgánicos / alcohol / agua para la extracción de subproductos de la uva debido a que la presencia de agua incrementa la permeabilidad del tejido celular, permitiendo una mejor transferencia de masa por difusión molecular así como una recuperación de compuestos solubles en agua. En términos de extracción del contenido total de fenoles, las mezclas agua/etanol muestran resultados relativamente mejores comparados a las mezclas metanol/agua. Adicionalmente, el etanol es más barato y tiene status GRAS (Generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés), por lo que este solvente sería preferible en caso de utilización a futuro en alimentos (Fontana *et al.*, 2013).

Es necesario tener en cuenta que la extracción de polifenoles totales de orujos de uva también depende de la fracción de desechos, la variedad de uva, el tiempo de extracción, la temperatura, la acidificación de los solventes y las interacciones entre todas estas variables. También se ha encontrado que la relación creciente de disolvente a sólido funciona positivamente para mejorar los rendimientos. Sin embargo, es necesario encontrar un equilibrio entre los usos de altas y bajas relaciones de solvente a sólido, que implican un equilibrio entre el costo y el desperdicio de solvente y evitar los efectos de saturación, para situaciones específicas (Fontana *et al.*, 2013).

En cuanto a los taninos de las semillas de uva, de acuerdo a Zoecklein (2007), la extracción de taninos durante la inmersión en frío (“*cold soak*”) se ve limitada por la solubilidad. Esta etapa “*cold soak*” se refiere a la extracción acuosa, en una matriz no alcohólica, de las pieles, semillas y pulpa de las uvas a bajas temperaturas antes de la fermentación con el fin de mejorar características sensoriales del vino. La extracción de taninos de las semillas requiere etanol, por lo tanto, los taninos extraídos en esta etapa provienen de las semillas y tallos. La velocidad de extracción durante esta etapa es menor a la velocidad de extracción de antocianinas.

2.3.2. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El estudio de la cinética de extracción da una idea del comportamiento del proceso, la observación de la respuesta del sistema versus la temperatura, concentración de solvente y

tiempo, para relacionarla con las ecuaciones adecuadas. Ello nos permite obtener coeficientes que describen el fenómeno para fabricar el modelo matemático que se ajusta al proceso y más adelante optimizar el mismo. Además permiten determinar puntos de control en el proceso de extracción, ya que ofrece un panorama de las variables que afectan directamente el proceso (Segovia *et al.*, 2013).

La optimización de la extracción de antocianinas se basa en modelos matemáticos adecuados para garantizar un alto rendimiento y calidad del extracto. Por lo tanto, el conocimiento sobre la cinética de extracción de antocianinas es esencial para permitir su uso adecuado a escala industrial, minimizando así los errores de procesamiento y mejorando la precisión del procedimiento y la calidad final del producto (Sant'Anna *et al.*, 2013). Entre algunos de los modelos propuestos para la extracción de compuestos fenólicos, se tiene:

a. PELEG (1988)

El modelo de Peleg no exponencial de dos parámetros (Bucic-Kojic *et al.*, 2007), propuesto originalmente para predecir el contenido de humedad de una muestra después de una larga exposición (deshidratación / rehidratación) (Peleg, 1988). Este modelo ha sido empleado por diversos autores para describir la extracción sólido-líquido de compuestos fenólicos debido a la similitud entre las cinéticas de extracción y de sorción (Bucic-Kojic *et al.*, 2007; Amendola *et al.*, 2010; Segovia *et al.*, 2013). La ecuación propuesta por Peleg, aplicada para describir la cinética de extracción es:

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t}$$

Donde $C(t)$ es la concentración de fenólicos (mg GAE/L) en el tiempo t (min), C_0 es la concentración fenólica en el tiempo cero, K_1 es la tasa de Peleg constante (min. L/mg GAE) y constante de capacidad K_2 de Peleg (L/mg GAE). Como C_0 es cero para la primera etapa de lixiviación, esta ecuación se puede escribir como (Segovia *et al.*, 2013):

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t}$$

La constante de velocidad de Peleg K_1 se relaciona con la tasa de extracción (\dot{C}) al inicio de la misma ($t = t_0$) (Bucic-Kojic *et al.*, 2007)

$$B_0 = \frac{1}{K_1} (mg \text{ GAE} / g \text{ min})$$

Mientras que la constante de capacidad de Peleg K_2 se relaciona al máximo rendimiento de extracción; es decir, la concentración de equilibrio de los polifenoles totales extraídos (C_e). Cuando el $t \rightarrow \infty$, se tiene la relación entre la concentración de equilibrio y la constante K_2

$$C_e = \frac{1}{K_2} (mg \text{ GAE} / g)$$

b. CACACE Y MAZZA (2003)

Teniendo en cuenta que el proceso de lixiviación es una operación de transferencia de masa, los rendimientos de la misma se ven afectados por la velocidad de transferencia que define la Ley de Fick, por lo que varios parámetros influyen en el rendimiento de la extracción de metabolitos en general, el tiempo de extracción, la temperatura, la relación disolvente/sólido, el número de etapas de extracción, y fundamentalmente la naturaleza del disolvente. La mayoría de las técnicas comunes para extraer los compuestos fenólicos emplean disolventes, orgánicos o inorgánicos, la elección de los disolventes de extracción tales como agua, acetona, acetato de etilo, alcoholes (metanol, etanol y propanol) y sus mezclas influyen en los rendimientos de compuestos fenólicos extraídos (Dueñas *et al.*, 2016).

La ecuación planteada por Cacace y Mazza (2003) para la extracción de antocianinas con etanol es la siguiente:

$$C = A[1 - \exp(-Bt)] + C[1 - \exp(-Dt)]$$

En esta ecuación, se asume que la extracción de compuestos ocurre en dos periodos distintos, relacionado a compuestos accesibles e inaccesibles (compuestos fuera y dentro de las células de las plantas, respectivamente). Los parámetros B y D son las tasas de extracción de las dos diferentes clases de compuestos, y A y C son constantes (Sant'Anna *et al.*, 2013).

c. PSEUDO PRIMER ORDEN

La extracción sólido-líquido se puede considerar como la operación opuesta de la adsorción (transferencia de masa de soluto entre una fase sólida y un solvente). La cinética de la extracción parece ser similar a la de la adsorción, como se muestra en investigaciones anteriores (Harouna-Oumarou *et al.*, 2007). En sistemas de adsorción por lotes, se han

desarrollado varios modelos que describen la difusión de solutos en la superficie y en los poros del adsorbente para explicar la cinética de adsorción. Los modelos de pseudo primer orden y pseudo segundo orden se han utilizado ampliamente para describir la tasa de adsorción en las interacciones líquido-sólido. Las expresiones de esos dos modelos se obtienen al integrar la siguiente ecuación general (Moussout *et al.*, 2018):

$$\frac{dC}{dt} = k_n(C_\infty - C)^n$$

La expresión de reacción de pseudo primer orden para $n = 1$ es:

$$\frac{dC}{dt} = k_1(C_\infty - C)$$

La ecuación integrada es (Linares *et al.*, 2010):

$$\ln \frac{C_\infty}{(C_\infty - C)} = kt + a$$

El modelo de pseudo primer orden considera que la concentración de un compuesto en el extracto tiende a una “meseta” y a es una constante de integración del modelo. Se puede escribir la ecuación de la siguiente forma (Sant’Anna *et al.*, 2013; Linares *et al.*, 2010):

$$C = C_\infty - \frac{C_\infty}{\exp(kt + a)}$$

La información sobre los parámetros cinéticos del modelo de pseudo primer orden para la extracción de compuestos polifenólicos a partir de material vegetal es escasa. La mitad del tiempo de extracción ($t_{1/2}$) disminuye cuando se incrementa la temperatura. Esta relación es calculada según la siguiente ecuación (Linares *et al.*, 2010; Sant’Anna *et al.*, 2012):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2 - a)}{k}$$

Y, cuando la constante de integración (valor a) es un modelo de pseudo primer orden es igual a cero (el comportamiento ideal del fenómeno), los valores de k son llamados aparentes (k_{apar}), y se calculan mediante la siguiente ecuación (Linares *et al.*, 2010; Sant’Anna *et al.*, 2012):

$$k_{apar} = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

El incremento de los valores k está relacionado al incremento de la energía interna de las moléculas y a la reducción de la viscosidad dinámica del solvente, mejorando así el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos y disminuyendo el tiempo que se necesita para eliminarlo de la matriz. Sin embargo, la temperatura de proceso no se puede incrementar indefinidamente, debido a que los compuestos bioactivos son relativamente termolábiles, siendo susceptibles a la degradación a altas temperaturas (Sant'Anna *et al.*, 2012).

d. SEGUNDO ORDEN

La ley de segundo orden ha sido aplicada por diversos autores en la extracción de compuestos polifenólicos y otros antioxidantes (Hai *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2014). El modelo cinético general de segundo orden se puede escribir como:

$$\frac{dC_t}{dt} = k(C_e - C_t)^2$$

Donde k es la constante de velocidad de extracción de segundo orden (L/g min), C_e es la concentración de equilibrio de los compuestos fenólicos en el medio extractor (g/L), y C_t es la concentración total de compuestos fenólicos en el líquido extractor a un tiempo dado t (g/L). La ley integrada para una extracción de segundo orden bajo las condiciones de $t = 0$ para C_t y $C_t = 0$ para C_t , se puede escribir como:

$$C_t = \frac{C_e^2 kt}{1 + C_e kt}$$

Cuando t se aproxima a cero, la tasa inicial de extracción, h (g/L.min), se puede hallar con:

$$h = kC_e^2$$

2.4. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas y antocianidinas usualmente son extraídas de materiales vegetales con un solvente orgánico acidificado, muy comúnmente metanol. Este sistema solvente destruye las

membranas celulares, y simultáneamente disuelve las antocianinas y las estabiliza. (Naczki y Shahidi, 2004).

Cacace y Mazza (2002) reportaron que la extracción de antocianinas se incrementó con el incremento de la concentración de SO_2 , pero que el efecto no fue estadísticamente significativo. El mecanismo exacto mediante el cual el SO_2 mejora la extracción no es conocido, pero algunas posibles razones que se han mencionado es: interacciones que conducen a incrementar la difusión a través de la pared celular y el incremento de la solubilidad. Se señala que la extracción de antocianinas y polifenoles totales a partir de grosellas negras con agua a temperatura ambiente resultó en rendimientos similares a los obtenidos con los tratamientos con menor contenido de SO_2 (28 ppm). La composición del solvente cambia las propiedades físicas como la densidad y la viscosidad dinámica que pueden afectar la difusión y la velocidad de extracción.

Otra propiedad física del solvente que puede ser modificada con la composición de solvente es la constante dieléctrica. Esta propiedad mide la habilidad para reducir la interacción de partículas con cargas opuestas y también determina las características de solvatación de un solvente. La reducción de la constante dieléctrica de un solvente prótico (que contiene protones relativamente móviles), como el agua ($\epsilon \text{H}_2\text{O} = 78.5$) en el rango de solventes de comportamiento intermedio como metanol ($\epsilon \text{MeOH} = 32.6$) o etanol ($\epsilon \text{EtOH} = 24.3$) mediante la modificación de presión y temperatura incrementa la extracción de productos naturales. Una menor constante dieléctrica reduce la energía requerida para separar las moléculas de solvente y permite a las moléculas de soluto entrar entre ellas. Es a partir de los resultados de esa investigación que se sugiere que el mecanismo por el cual el SO_2 mejora la extracción es modificando el solvente, resultando así en el incremento de la solubilidad de las moléculas de polifenoles (Cacace y Mazza, 2002).

Landbo y Meyer (2001) compararon el rendimiento de extracción acuosa de compuestos fenólicos a partir de residuos de grosellas negras con y sin semillas (empleando una proporción de piel:semilla 51:49% wt), encontrando que el rendimiento se incrementa entre 1.1 y 1.6 veces al emplear restos sin semillas.

2.4.1. EFECTO DE LA RELACIÓN MATERIA PRIMA/SOLVENTE

Diversos autores han corroborado que un incremento de la relación Soluta/Solvente mejora la extracción de antocianinas y compuestos polifenólicos. En el estudio realizado por Lotfi

et al. (2015), se determinó el mejor ratio para mezcla de tépalos de azafrán (materia prima) y agua (solvente) probando concentraciones de materia prima en solvente de 4, 6.7 y 10 por ciento. La mayor concentración se obtuvo al 10 por ciento, y se mantuvo esta relación para la ejecución de las pruebas siguientes al verificar que permitió obtener resultados en el rango lineal de 0.1–2.0 para la medición de la absorbancia.

De forma similar, Qu *et al.* (2010) determinaron el efecto de las proporciones agua/muestra (agua desionizada) entre 50/1, 40/1, 30/1, 20/1 y 10/1 para la extracción de antioxidantes a partir de bagazo de granada. Dichos autores concluyeron que una mayor proporción de agua/muestra benefició el proceso de extracción, por tanto, para determinar otros efectos tales como la temperatura, emplearon la proporción 50/1; señalando que una mayor proporción es mejor para incrementar el rendimiento de antioxidantes, pero que esto puede significar un mayor uso de agua en la extracción y mayor consumo de energía para la concentración en una etapa posterior del proceso.

En la extracción usando enzimas, Xu *et al.* (2014) hallaron mayores rendimientos al extraer antocianinas de pieles y semillas de uva molidas usando una relación 1/8 (p/v) en una primera extracción con enzimas celulasa, pectinasa y β -glucosidasa, seguido por dos extracciones con agua o etanol al 50 por ciento usando una relación 1/20 (p/v). Maier *et al.* (2008) emplearon una relación constante de 1:3 materia prima:solvente para hollejos de uva, también molidos. Mientras que Muñoz *et al.* (2004) emplearon una relación materia prima:solvente de 1:5 para la extracción enzimática de pigmentos a partir de pieles y semillas sin una etapa de molienda.

2.4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Los autores concuerdan en que el hecho de incrementar la temperatura de trabajo favorece la extracción al incrementar la solubilidad del soluto y el coeficiente de difusión. Sin embargo, más allá de cierto valor los compuestos fenólicos se pueden desnaturalizar (Spigno y De Faveri, 2007; Pinelo *et al.*, 2005)

Lotfi *et al.* (2015) señala que la temperatura óptima para la extracción de compuestos fenólicos a partir de material vegetal es alrededor de 50 °C, y considera que para la extracción de antocianinas se debería trabajar con el máximo de 40 °C, con el fin de prevenir la degradación durante el proceso. Mientras que Spigno y De Faveri (2007) concluyeron que el rendimiento de compuestos fenólicos fue mayor a 60 °C que a 28 °C, pero se seleccionó

una temperatura intermedia de 45 °C para verificar si era posible obtener los mismos rendimientos que a 60 °C con reducción de costos de energía. Spigno *et al.* (2007) concluyeron al respecto que con el fin de obtener mayores rendimientos era mejor trabajar a 45 °C que a 60 °C por tiempos más prolongados.

Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de los 60 °C) se degradan según una cinética de primer orden. En general las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, 2008).

2.4.3. EFECTO DEL USO DE ENZIMAS

El pre tratamiento enzimático de material crudo normalmente resulta en una reducción en el tiempo de extracción, minimiza el uso de solventes e incrementa el rendimiento y calidad del producto. Un conocimiento previo de la composición de la pared celular de la materia prima ayuda en la selección de las enzimas útiles para el pre tratamiento. La disminución del uso del solvente durante la extracción es particularmente importante por razones regulatorias y medioambientales, dando una opción más “verde” que las extracciones tradicionales no enzimáticas (Puri *et al.*, 2012).

El mecanismo de la extracción asistida por enzimas es que las enzimas que degradan la pared celular (por ejemplo, glucanasas y pectinasas) debiliten o rompan esta pared, provocando que el material intracelular sea más accesible para la extracción (Li *et al.*, 2006).

Maier *et al.* (2008), reporta que una alta concentración de enzimas pectolíticas podría destruir los pigmentos celulares debido a la liberación de proteínas a partir de material vegetal y por tanto, disminuir el rendimiento en la extracción de antocianinas. En los ensayos realizados por estos autores, el aumento en el rendimiento de extracción fue proporcional al aumento de la concentración de los preparados enzimáticos empleados hasta cierto punto, tras el cual el aumento de esta concentración provocó una ligera disminución en el rendimiento. Similares resultados fueron obtenidos para la extracción de compuestos fenólicos por Landbo y Meyer (2001) y Li *et al.* (2006).

2.4.4. EFECTO DEL TIEMPO

Los datos disponibles sobre el tiempo de extracción es contradictoria: algunos autores sugieren tiempos de extracción bastante cortos, y otros, tiempos de extracción largos (Spigno *et al.*, 2007). Spigno y De Faveri (2007) reportaron que el tiempo fue una variable significativa a 45 °C para la extracción de compuestos fenólicos.

Spigno *et al.* (2007) reportaron un tiempo adecuado de 5 horas para la extracción con solventes. Sin embargo, otros autores consideraron establecer como suficientes tiempos cortos de extracción con solventes para los compuestos polifenólicos: 2 horas (Librán *et al.*, 2013) y 3 horas (Lafka *et al.*, 2007).

Para la extracción de antocianinas a partir de subproductos del vino mediante el uso de enzimas, Muñoz *et al.* (2004) reportaron un tiempo de 2 horas a 37 °C. Gómez-García *et al.* (2012) indican 12 horas a 40 °C para la extracción enzimática de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de dicha materia prima. Para efectos de estudiar otras variables en la extracción de pigmentos a partir de pieles de uva, Maier *et al.* (2008) considera suficiente un tiempo de 2 horas.

2.5. POLIMERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS

En uvas y vinos, los pigmentos de antocianinas pueden encontrarse como monómeros libres, es decir, no ligados; o asociados con otros fenoles para formar polímeros. La polimerización puede impactar la calidad sensorial de los pigmentos al incrementar la estabilidad de color y cambiando el espectro de color de rojo brillante a rojo ladrillo (Zoecklein, 2007).

En la vinificación, durante la extracción y el procesamiento, una proporción de las antocianinas monoméricas se condensan con otros flavonoides, para formar pigmentos poliméricos (Bridle y Timberlake, 1997). Los pigmentos de antocianinas poliméricos no muestran un cambio reversible pronunciado con el cambio de pH, como sí es característico de las antocianinas monoméricas (Wrolstad *et al.*, 2005).

El tiempo afecta el grado de polimerización, y este cambio también es dependiente de la concentración de antocianinas. En estudios de estabilidad de color, se observa que el porcentaje de color polimérico se incrementa durante un periodo de tiempo, tras lo cual, disminuye. Esto se explica por la precipitación del material polimerizado (Giusti, 1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones de la bodega vitivinícola “El Milagro” de Nuevo Imperial, Cañete y en los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis físico químico de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIA PRIMA

Se trabajó con orujo de uvina (*Vitis aestivalis-cinera x Vitis vinifera.*), subproducto del procesamiento de pisco en la bodega “El Milagro”, Nuevo Imperial, Cañete.

3.3. INSUMOS

Preparado enzimático Zimared Plus ® (actividad poligalacturonasa, pectina-liasa, celulasa, hemicelulasa y proteasa). Actividad 150.000 U/g (poligalacturonasa). Fabricante: VASON.

3.4. REACTIVOS

- Acetato de sodio hidratado ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- Agua destilada
- Cloruro de potasio (KCl)
- HCl concentrado
- Alcohol 96 °
- Reactivo de Folin – Ciocalteu
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Solución índigo carmín
- Permanganato de potasio (KMnO_4)
- Solución de gelatina
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

3.5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Alcoholímetro Alla France[®]
- Balanza analítica OHAUS Pionner[®]
- Balanza de precisión Soehnle[®]
- Baño María Memert[®]
- Campana de extracción
- Centrífuga Hettech[®]
- Espectrofotómetro UV-Visible Genesys[®] 6
- Estufa Termaks[®]
- Micropipeta Eppendorf Research[®] 50 ul – 200 ul
- Potenciómetro Hanna Instruments[®] modelo Checker
- Refrigeradora Frigidaire[®]
- Secador de bandejas
- Termómetro Hanna Instruments[®]
- Materiales diversos: los necesarios para la realización de los ensayos como beakers, pipetas, probetas, celdas espectrofotométricas, espátulas y fiolas.

3.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.6.1. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

a. Determinación de humedad. El contenido de humedad se determinó usando el método gravimétrico. Las muestras molidas fueron secadas en estufa a 105 °C por 24 horas y se determinó la humedad por diferencia de pesos (AOAC 930.04, 2016).

b. Determinación de compuestos fenólicos. Se determinó con el reactivo de Folin – Ciocalteu según la metodología propuesta por Singleton y Rossi (1965), citado por Ribeiro *et al.* (2015), con ácido gálico como estándar. A 10 g de muestra se añadió 500 mL de etanol al 60 por ciento (v/v) y esta mezcla se dejó en reposo por 24 h protegida de la luz. Se centrifugó a 4000 rpm por 25 minutos y se separó el sobrenadante. Se mezcló 30 µL del extracto, 1.5 mL de agua destilada y 0.15 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 3 minutos se agregó 0.45 mL de carbonato de sodio al 15 por ciento y 0.87 mL de agua destilada. La mezcla se dejó reposar en la oscuridad por 2 h. La absorbancia se midió a 765 nm y se expresó los resultados como mg de ácido gálico equivalentes (GAE / 100 g ms), utilizando una curva estándar de ácido gálico (Anexo 1).

c. Determinación de taninos. Se realizó según el método descrito en AOAC 955.35 (1980). El extracto se preparó con 10 g de muestra, a los que se añadió 500 mL de etanol al 60 por ciento (v/v) y esta mezcla se dejó en reposo por 24 h protegida de la luz. Se centrifugó a 4000 rpm por 25 minutos y se separó el sobrenadante (Ribeiro *et al.*, 2015). Se tomó una alícuota de 5 mL del extracto y se mezcló con 12.5 mL de solución índigo carmín y 375 mL de agua destilada. Esta mezcla se tituló con solución de KMnO_4 y se anotó el gasto (“Y” mL). Se tomó otra alícuota de 50 mL del extracto y se mezcló con 25 mL de solución de gelatina (25 g de gelatina en 1 L de solución saturada de NaCl), 50 mL de solución acidificada de NaCl (25 mL de H_2SO_4 añadido a 975 mL de solución saturada de NaCl) y 5 g de caolín en polvo. La mezcla se agitó por 15 minutos y se filtró con papel Whatman N°1. Se tomó 12.5 mL del filtrado y se mezcló con igual volumen de solución índigo carmín y 375 mL de agua destilada. Esta mezcla se tituló con solución de KMnO_4 y se anotó el gasto (“X” mL). El volumen utilizado para titular únicamente los taninos se calculó a partir de la diferencia de “Y” y “X”. La concentración de taninos se estimó usando la siguiente relación:

$$1 \text{ mL de solución de } \text{KMnO}_4 = 0.595 \text{ mL de ácido oxálico } 0.1\text{N}$$

$$1 \text{ mL de ácido oxálico } 0.1\text{N} = 0.0042 \text{ g de tanino}$$

d. Determinación de antocianinas. El contenido de antocianinas totales en el orujo se determinó a partir del extracto obtenido con el método descrito en Ranganna (1979). Se maceró 100 g de orujos con 100 mL de 95 por ciento ethanol-1.5N HCl (85:15) y se molió en licuadora. Se transfirió a beaker de 400 mL, usando 50 mL de solvente para lavar el vaso. El beaker se cubrió con film y se guardó una noche a 4 °C. Se filtró la muestra con papel Whatman N°1 y usando un embudo Buchner No.2. Los residuos en el beaker y papel filtro se lavaron con solvente y se transfirió al envase receptor hasta completar 500 mL. A partir de este extracto se realizó la determinación de antocianinas según la metodología del pH diferencial, descrita por Giusti y Wrolstad (2001).

Se determinó el contenido de antocianinas en los extractos con el método del pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Se preparó dos diluciones de la muestras en fiolas, una con buffer cloruro de potasio, pH 1.0, y otra con buffer acetato de sodio, pH 4.5, diluyendo cada una con el factor de dilución previamente determinado para que la absorbancia esté en el rango lineal del espectrofotómetro. Se esperó a que las diluciones se equilibren por 15 minutos y se midió la absorbancia de cada dilución a 520 y a 700 nm, contra un blanco de agua

destilada. Se calculó la concentración de pigmento antocianina, expresado como malvidina-3,5-diglucósido equivalente, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (e \times l)$$

Donde:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{MW} = 655.4 \text{ g/mol (Peso molecular para malvidina-3,5-glucósido)}$$

DF = Factor de dilución

l = Espesor de la celda de espectrofotómetro (1 cm)

e = 37700 (Coeficiente de extinción molar en $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para malvidina-3,5-glucósido).

1000 = Conversión de g a mg.

Los resultados se expresaron como antocianinas en mg/L de malvidina-3,5-diglucósido equivalente.

e. Determinación de intensidad colorante. Se realizó según lo descrito por Zamora (2003). En una cubeta de 1mm de camino óptico se miden las absorbancias del extracto a 420, 520 y 620 nm. El resultado se multiplicó por 10 para referirlo a la cubeta estándar de 10 mm de camino óptico. La intensidad colorante está dada por:

$$\text{IC} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

f. Determinación de índice de color polimérico. Según el método propuesto por Giusti y Wrolstad (2001). Primero se determinó el factor de dilución apropiado diluyendo la muestra con 0.025 M buffer cloruro de potasio, pH 1.0, hasta que la absorbancia de la muestra en la longitud de onda λ_{520} (máxima absorbancia) se encontró dentro del rango lineal de espectrofotómetro. Luego, se diluyó la muestra con agua utilizando el factor de dilución previamente determinado. Se transfirió 2.8 mL de esta muestra diluida a dos cubetas. En una de ellas se añadió 0.2 mL de solución de bisulfito y en la otra 0.2 mL de agua destilada. Se mantuvo en reposo por 15 minutos para equilibrar y se midió la absorbancia de ambas cubetas a 420 nm, 520 nm y 700 nm, contra un blanco de agua destilada. Se calculó el porcentaje de color polimérico de la siguiente manera:

Se calculó la densidad de color con la muestra tratada con agua empleando:

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})] \times \text{DF}$$

Donde DF es el factor de dilución determinado anteriormente.

Se calculó el color polimérico de la muestra blanqueada con bisulfito de la siguiente forma:

$$\text{Color polimérico} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})] \times \text{DF}$$

Finalmente, se calculó el porcentaje de color polimérico usando la fórmula:

$$\text{Porcentaje de color polimérico} = (\text{color polimérico} / \text{densidad de color}) \times 100$$

Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.6.2. OTROS ANÁLISIS

g. Determinación de la proporción cáscara/semilla: Se determinó tomando 10 muestras de 20 g cada una, empleando el método del cuarteo (Amponsah, 2009). El total de orujos se colocó en una superficie plana y se dividió en 4 partes iguales. De estas partes, se descartó dos de los cuartos opuestos y se mezclaron las dos partes restantes hasta homogenizar la muestra y se extendió nuevamente sobre la superficie. Esta operación se repitió hasta conseguir los pesos adecuados para las muestras. Se separó manualmente las cáscaras de las semillas para pesarlas por separado y establecer así la proporción de cada una, el resultado reportado fue el promedio obtenido.

3.6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

a. PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Para el análisis de los principales factores que influyen en el pre tratamiento enzimático, se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2^3 ($n = 3$). Los factores que se analizaron fueron: temperatura de trabajo, tiempo de tratamiento y concentración de enzima a emplear. El análisis estadístico se realizó con la versión 16 del *software* Minitab (Minitab Inc.).

El ajuste a un modelo cinético de extracción se realizó mediante una regresión no lineal de los datos experimentales ($n = 3$), empleando el *software* Origin Pro 2017. Se determinó el tiempo adecuado de esta etapa utilizando el método de Variación No Significativa en Cinética (VNSC) propuesto por Herrera (2005). Este método consistió en realizar un Análisis de Varianza (ANVA) usando el Diseño Completamente al Azar sobre las medias de los resultados obtenidos con cada uno de los tiempos evaluados. Luego, como el ANVA indicó la existencia de diferencias significativas entre las medias de los resultados, se realizó

una prueba de comparación de muestras LSD (mínima diferencia significativa de Fisher). Como tiempo óptimo de extracción, se tomó aquel en que la cantidad de antocianinas fue mayor y que en la prueba de comparación de medias LSD no tuvo diferencias significativas con la cantidad de pigmento extraído en aquel tiempo subsiguiente mayor, pero sí con aquel anterior.

b. SOLVENTE ADECUADO DE EXTRACCIÓN

Para el análisis del mejor solvente de extracción, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) ($n = 5$) y mediante el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey, a un nivel de significancia de 0.05, se determinó el mejor tratamiento. El análisis estadístico se realizó con la versión 16 del *software* Minitab (Minitab Inc.).

3.7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se siguió el flujo de operaciones indicado en la Figura 4, el cual se describe a continuación.

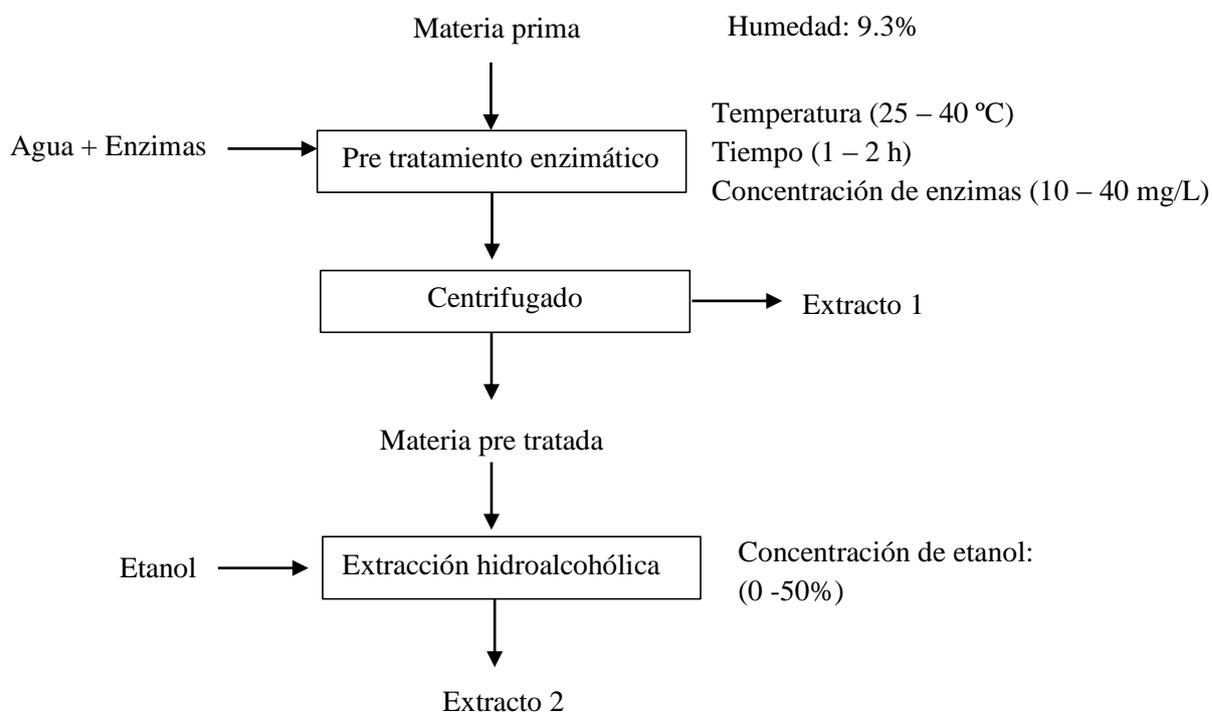


Figura 4: Flujo experimental para la extracción de antocianinas.

a. Materia prima: Se obtuvo como subproducto del estrujado de la uva durante la producción de pisco. Este subproducto estuvo compuesto principalmente por cáscaras y

semillas (orujo). Esta materia se deshidrató en un secador de bandejas por 24 h a 55 °C. Tras ello, se realizó los siguientes análisis al orujo deshidratado con el fin de caracterizar la materia prima:

- Determinación de la proporción cáscara/semilla: Según lo indicado en 3.6.2 (g)
- Humedad: Según lo indicado en 3.6.1 (a)
- Contenido de compuestos polifenólicos: Según lo indicado en 3.6.1 (b)
- Contenido de taninos: Según lo indicado en 3.6.1 (c)
- Contenido de antocianinas: Según lo indicado en 3.6.1 (d)

b. Pre tratamiento enzimático: A los orujos deshidratados se les adicionó la cantidad requerida de preparado enzimático Zimared Plus ® según la corrida experimental a realizar. Para todos los tratamientos la relación sólido-líquido fue 1:20 (p/v). Se ajustó el pH a 3.6, valor óptimo del preparado enzimático de acuerdo a Vason Group, empresa fabricante de las enzimas, utilizando ácido cítrico. Los factores estudiados fueron la concentración de enzimas (10 y 40 mg/L), temperatura (25 y 40 °C) y tiempo de hidrólisis (1 y 2 h).

Al finalizar el pre tratamiento enzimático, se separó los orujos (materia pre tratada) del líquido (Extracto 1). Se tomaron muestras de este extracto para determinar el contenido de antocianinas, la intensidad colorante y el porcentaje de color polimérico. A partir de los resultados, se definió los parámetros adecuados para el pre tratamiento enzimático. Se consideró adecuado el tratamiento que maximizó el contenido de antocianinas extraído y la intensidad colorante; a la vez que minimizó el porcentaje de color polimérico.

c. Extracción con solvente a partir de materia pre tratada: Una vez definidos los mejores parámetros para llevar a cabo el pre tratamiento enzimático, se procedió a definir al mejor solvente para la materia pre tratada enzimáticamente. Los solventes utilizados fueron: agua, solución etanólica al 25 por ciento y solución etanólica al 50 por ciento. Se ajustó el pH del medio a 2.0 empleando ácido cítrico. La relación sólido-líquido fue de 1:20 (p/v), a temperatura de 40 °C y se llevó a cabo durante una hora, basado en lo realizado por Xu *et al.* (2014), con ciertas modificaciones. Transcurrido el tiempo de extracción, se separó los orujos agotados de la fase líquida (Extracto 2). El mejor solvente se definió en función al contenido de antocianinas obtenido en el Extracto 2.

3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

a. Pre tratamiento enzimático

Los factores evaluados en esta etapa presentaron variables continuas, por lo que fue posible emplear un experimento factorial 2^3 ($n=3$) con el fin de estudiar los efectos principales y la interacción entre éstos. Para determinar los factores a evaluar y sus niveles se tomó como referencia la ficha técnica del preparado enzimático (VASON) e investigaciones similares realizadas por Xu *et al.* (2014) y Lotfi *et al.* (2015).

Cuadro 1: Niveles de los factores que intervienen en el pre tratamiento enzimático

FACTOR	MÍNIMO (-1)	MÁXIMO (+1)
Concentración de enzima	10 mg/L	40 mg/L
Temperatura	25 °C	40 °C
Tiempo	1 hora	2 horas

Se realizó el ajuste de la cinética de extracción a los modelos propuestos por Peleg (1988), Cacace y Mazza (2003), cinética de pseudo primer orden (Linares *et al.*, 2010) y de segundo orden (Hai *et al.*, 2016) mediante regresión no lineal (método de mínimos cuadrados), usando el programa Origin Pro 2017. Y se determinó el tiempo óptimo de esta etapa con el método de Variación No Significativa en Cinética (VNSC).

b. Extracción con solvente

Para determinar el mejor solvente de extracción se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 5 repeticiones, tomando como respuesta la cantidad de antocianinas extraídas (mg Mvd 3,5-diglucósido/L) y se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

4.1.1 COMPOSICIÓN DE LOS ORUJOS DE UVINA

En el Cuadro 2 se presenta la composición promedio de los orujos de uva deshidratados. Se observó que el orujo está compuesto principalmente por las pieles de uva (aproximadamente 60%); mientras que las semillas comprenden cerca del 40 por ciento del peso total de los orujos. Este contenido de semillas difiere ligeramente de los reportados por Muñoz *et al.* (2004): 21, 17 y 65 por ciento; sin embargo, estos valores revisados en literatura corresponden a otras variedades de uva y a orujos con alto contenido de humedad (entre 50 y 70%), lo que podría dar lugar a un mayor peso de las pieles en relación a las semillas. Por otra parte, esta proporción también podría verse influenciada por otros factores como la variedad de uva y el tipo de proceso al que se haya sometido la uva para extraer el jugo.

Se evitó la molienda de los orujos para no afectar la integridad de las semillas, debido a que Pekic *et al.* (1998) indicaron que la molienda de las semillas de uva causó un incremento significativo en la extracción de compuestos indeseables. Se prefirió el uso de semillas enteras de uva.

Cuadro 2: Composición de los orujos de uva

Pieles (%p/p)	60.2 ± 1.5
Semillas (%p/p)	39.8 ± 1.5
Proporción piel/semilla (p/p)	1.5 ± 0.1

4.1.2. COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ORUJOS DE UVINA

La composición fisicoquímica de los orujos de uva expresado en base seca se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Composición fisicoquímica de los orujos de uva

COMPONENTES	CONTENIDO
Humedad (%)	9.3 (b.h)
Taninos (g/100 g)	1.3 (b.s)
Polifenoles (mg AGE/ 100 g)	990.5 (b.s)
Antocianinas (mg/100 g)	253.7 (b.s)

El contenido de antocianinas totales fue similar al reportado en la literatura para otros orujos de uva. Así, Ribeiro *et al.* (2015) hallaron valores comprendidos entre 75.64 y 414.95 mg/100g para orujos secos de las cepas *Vitis vinífera* y *Vitis labrusca*. Por otra parte, Huaroto (2005) reportó valores hasta siete veces superiores en la extracción de antocianinas a partir de cáscaras frescas de uva (*Vitis aestivalis-cinerea x Vitis vinífera*). El menor contenido de antocianinas de la materia prima empleada en el presente trabajo puede deberse a que durante el proceso de maceración migra gran parte de las antocianinas al mosto; y a esto se suma que en la etapa de secado se produce pérdida de antocianinas.

Se consideró que la antocianina predominante en esta variedad de uva es la malvidina 3,5-diglucósido, ya que, según los resultados reportados por Liang *et al.* (2008), en las variedades diferentes a *Vitis vinífera* o híbridas de ésta especie, se identificó la presencia de malvidina 3,5-O-diglucósida en mayor cantidad que la antocianina monoglucósida. Otros estudios muestran también que la mayoría de variedades de uvas híbridas son muy ricas en antocianinas de monoglucósido y diglucósido (De Rosso *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2012). Asimismo, se tiene como antecedente que ha sido empleada como unidad de cuantificación en otras investigaciones realizadas con *Vitis aestivalis-cinerea x Vitis vinífera* (Spagna *et al.*, 2002; Panico *et al.*, 2006), variedad empleada en el presente trabajo.

Los principales componentes bioactivos del orujo de uva son los polifenoles. El contenido de polifenoles del orujo analizado fue menor a otros valores reportados en literatura, tal como Ribeiro *et al.* (2015), quienes reportan valores entre 2500 y 4124 mg/100 g para los orujos de *Vitis vinífera* y *Vitis labrusca*. Según estos autores, las diferencias entre los resultados de este tipo se deben a las diferentes concentraciones de compuestos fenólicos en la uva según la variedad, clima, suelo, cosecha, técnicas de viticultura, etc. Kammerer *et al.* (2005) también señalan que el contenido de polifenoles de los orujos de uva en las distintas investigaciones ha mostrado diferencias significativas debido al tipo de cultivar, el grado de maduración en la cosecha y la tecnología de vinificación. En cuanto a la relación antocianina-polifenoles, en *Vitis vinífera* frescas, las antocianinas son en promedio el 67 por

ciento de los polifenoles totales, y en otras variedades de *Vitis*, se tiene un promedio de hasta 87.5 por ciento (Liang *et al.*, 2012); mientras que en los orujos de uva (*Vitis vinifera* y *Vitis labrusca*) se ha reportado que las antocianinas son entre el 10 y 17 por ciento de los polifenoles totales (Rockenbach *et al.*, 2011; Ky y Teissedre, 2015). Las antocianinas contenidas en el orujo empleado en el presente trabajo representan el 25.6 por ciento de los polifenoles totales, valor superior a los mencionados anteriormente para orujos. Esto se explica con lo señalado por Valls *et al.* (2017), quienes indican que el contenido inicial y el tiempo de maceración juegan un rol importante en el contenido residual de antocianinas. En el orujo de uvina analizado, esta mayor proporción de antocianinas con respecto a lo revisado en literatura pudo deberse a que, al ser empleado en elaboración de pisco y no en vino, el tiempo de maceración fue corto, por lo que se retuvo mayor cantidad de antocianinas en el orujo.

El contenido de taninos fue menor al reportado por Ky y Teissedre (2015), quienes determinaron valores entre 8 y 22 g/100g bs para pieles de uva procedentes de los orujos de *Vitis vinifera* empleando HPLC. Esta diferencia puede deberse, además de la influencia propia de la variedad de uva y factores agrícolas, a que la mayor parte de los taninos contenidos en pieles y semillas se extrae al mosto durante el periodo de maceración (Zoecklein, 2007), etapa llevada a cabo en la elaboración del pisco. Asimismo, el contenido de taninos reportado para la materia prima se puede considerar adecuado para una posterior extracción de antocianinas, ya que no supera el contenido de taninos determinado en extractos comerciales de antocianina (Prodanov *et al.*, 2005): los extractos a partir de pieles de uva se encontraron en un rango de 6 a 14 g/100g, mientras que el extracto a partir de orujos de uva fue el que presentó mayor contenido de taninos (15.91 g/100g).

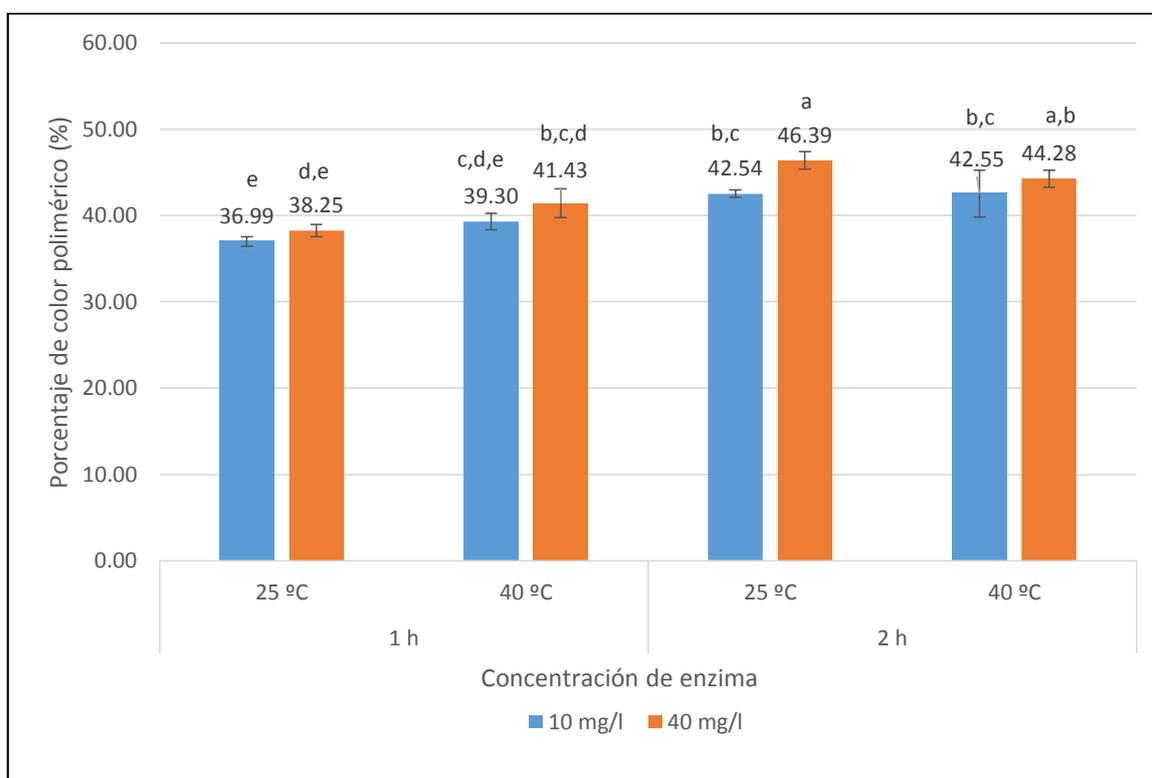
4.2. EVALUACIÓN DEL PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

En el Anexo 2 se muestran los resultados de las corridas experimentales del pre tratamiento enzimático, donde se evaluaron los siguientes factores: concentración de enzima, temperatura y tiempo de tratamiento.

a. CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

Este factor tuvo efecto significativo en todas las variables respuesta (Anexo 5). Según se muestra en la Figura 5, una mayor concentración de enzimas influyó significativamente (p -valor = 0.001 < 0.05) en el incremento del porcentaje de color polimérico. Esto indica que

una mayor concentración de enzimas puede conducir a la polimerización de las antocianinas. Ello concuerda con Parley *et al.* (2001), quienes señalan que las enzimas de maceración aceleran la polimerización de antocianinas en vinos, y que esto ha sido reportado previamente para pectinasas y para preparados de pectinasas con actividad enzimática secundaria. Estos autores señalan que el desarrollo de pigmentos poliméricos en vinos puede ser causado por una modificación de las enzimas con actividad hemicelulasa y proteasa sobre los coloides del vino. Estos coloides incluyen proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, y pueden interactuar con los fenoles mediante asociaciones hidrofóbicas y enlaces hidrógeno. Al modificar las enzimas la naturaleza de estas interacciones se reduce el efecto protector de estos coloides y complejos que de otra manera hubiesen inhibido la polimerización antocianina-polifenol. De acuerdo a su ficha técnica, el preparado enzimático Zimared Plus® tiene actividad hemicelulósica y proteasa, por lo cual, de acuerdo a lo expuesto por Parley *et al.* (2001), una mayor concentración de este preparado incrementó el porcentaje de color polimérico.



*Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 5: Color polimérico obtenido en el extracto a diferentes parámetros de concentración de enzimas, tiempo y temperatura en el pre tratamiento enzimático.

El rango de valores de porcentaje de color polimérico varió entre 36.9 y 46.4 por ciento, los cuales fueron mayores al 22 por ciento reportado por Reyes y Cisneros (2007) para un extracto comercial de antocianinas de uva (proveedor: Warner Jenkinson). Estos autores reportaron también un valor de 16 por ciento de color polimérico para un extracto comercial de zanahoria morada y valores de 27 y 16 por ciento para extractos de antocianina a partir de papas (morada y roja), usando una solución de HCl como solvente. Sin embargo, los valores de color polimérico presentados en la Figura 5 se encuentran en el rango de los valores reportados por Lee y Wrolstad (2004), quienes realizaron determinaciones de porcentaje de color polimérico en extractos obtenidos con enzimas (pectinasas, celulasas y/o hemicelulasas) a partir de blueberries enteros y de pieles de blueberries, encontrando valores entre 40.9 y 73.4 por ciento para los extractos a partir de berries enteros, mientras que para los extractos obtenidos de solo cáscara los valores estuvieron comprendidos entre 28.5 y 36.3 por ciento. Los autores señalaron que la diferencia se debió a la presencia de pulpa en la materia prima entera, ya que la pulpa es fuente de enzimas endógenas y ácido clorogénico.

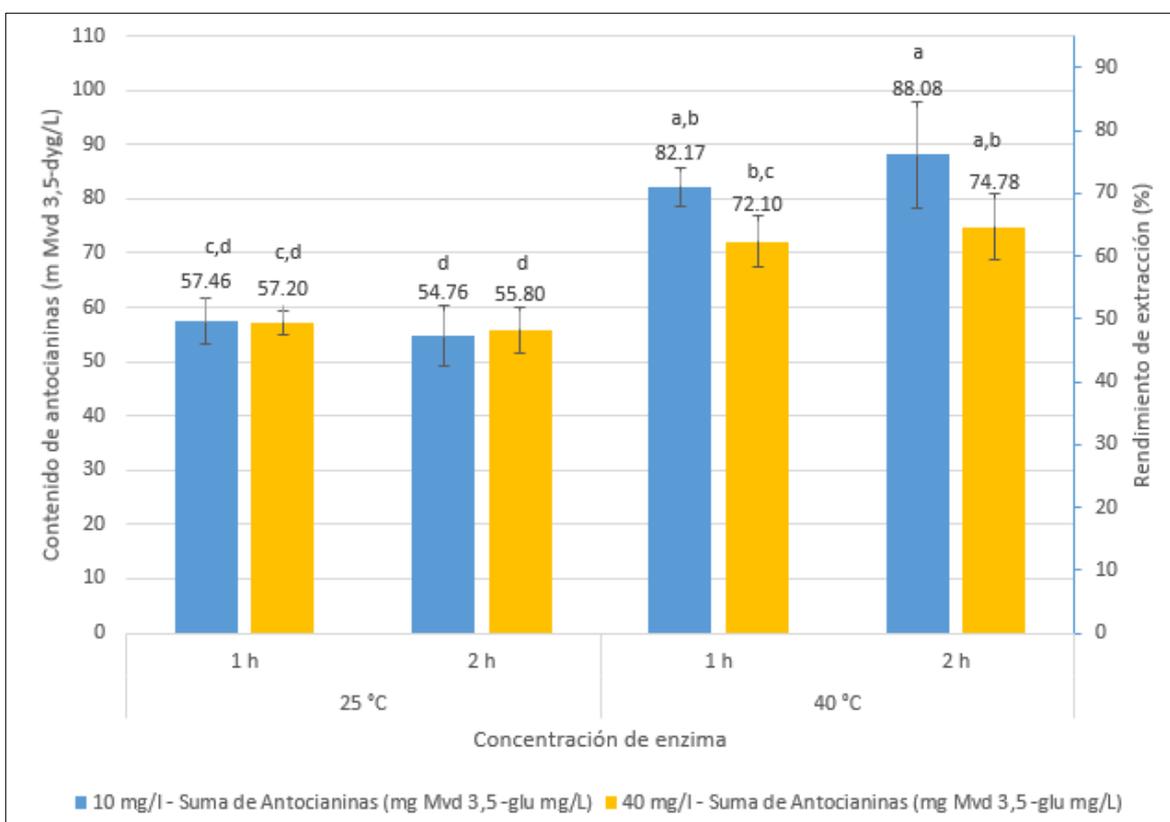
Asimismo, la composición y procesamiento del orujo pudo influir en los valores de porcentaje de color polimérico de los extractos obtenidos a partir de éstos. Según lo revisado en literatura, los orujos tienen cierta proporción de antocianinas polimerizadas; así, He *et al.* (2012) indican que aproximadamente el 25 por ciento de las antocianinas son polimerizadas por la unión con compuestos flavonoides al final de la fermentación en el proceso de elaboración del vino. Mientras que Brownmiller *et al.* (2008) evaluaron la proporción de color polimérico en diferentes etapas de obtención de jugo de blueberries y determinaron que, tras 1 hora de despectinización enzimática (actividad pectin liasa) a 40 °C, la torta de prensado (compuesta por pulpa, pieles y semillas) tuvo 30.1 por ciento de color polimérico, valor cercano a los reportados para los extractos en el presente trabajo. Estos autores indican que posiblemente las antocianinas monoméricas son polimerizadas durante la etapa de despectinización debido a la acción de enzimas endógenas de los blueberries, que no fueron totalmente inactivadas en una etapa anterior de escaldado (95 °C por 3 min.).

Los orujos no fueron sometidos a un proceso de inactivación de enzimas endógenas, por lo que estas enzimas posiblemente estuvieron presentes en la materia prima y pudieron influir en el incremento de la cantidad de antocianinas poliméricas, ya que, tal como señalan Muche *et al.* (2018), las reacciones de polimerización pueden deberse a la actividad de enzimas endógenas, que incluyen actividad residual peroxidasa y polifenol oxidasa. Estos autores

también indican que altas temperaturas de almacenamiento pueden provocar estas reacciones de polimerización, mientras que bajas temperaturas disminuyen la actividad enzimática. Además, Vámos y Haard (2009) afirman que la actividad enzimática de la polifenol oxidasa es mayor en las pieles de uva que en la pulpa o el jugo.

Asimismo, el secado del orujo por aire caliente pudo favorecer la polimerización de antocianinas, ya que, como afirman Vashisth *et al.* (2011), estos compuestos polifenólicos son sensibles a tratamientos térmicos prolongados, los que pueden causar cambios químicos irreversibles como la formación de formas poliméricas de los flavonoides.

Por otra parte, el incremento de la concentración de enzimas disminuyó significativamente ($p\text{-valor} = 0.005 < 0.05$) los valores de Antocianinas monoméricas (Anexo 3). Los resultados obtenidos a una concentración de enzimas 10 mg/L fueron mayores a los obtenidos con 40 mg/L, como se ve en los datos de la Figura 6.



*Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 6: Contenido de antocianinas del extracto (eje principal) y rendimiento de extracción de antocianinas (eje secundario) obtenidos a diferentes parámetros de concentración de enzimas, tiempo y temperatura en el pre tratamiento enzimático.

Esta relación entre concentración de enzimas y cantidad de antocianinas extraídas guarda similitud con lo reportado por Gong *et al.* (2014), quienes hallaron que el rendimiento de extracción de antocianinas, a partir de blackberry, disminuyó ligeramente cuando se tuvo una concentración enzimática (pectinasa) mayor al 0.2 por ciento, y solo se incrementó al emplear una concentración de preparado enzimático de 0.1 a 0.2 por ciento. De forma análoga, Tomaz *et al.* (2015), al evaluar concentraciones de preparado enzimático (actividad poligalacturonasa, pectin liasa y pectin metilesterasa) de 0 a 50 mg/g en cáscaras de uva, determinaron que los mayores rendimientos de antocianina se obtuvieron en el rango de 10-20 mg/g. Mientras que Maier *et al.* (2008) indicaron que la extracción de antocianinas a partir de orujos de uva se incrementó empleando concentraciones de enzimas con actividad pectolítica y celulósica hasta 4500 mg/kg y a mayores concentraciones se presentó una disminución de la cantidad extraída.

Asimismo, Lotfi *et al.* (2015) reportaron que se tuvo incrementos en el rendimiento de antocianinas sólo hasta una concentración de solución enzimática (preparado de pectinasa, celulasa, hemicelulasa, pectinesterasa, proteasa, fructosiltransferasa y β -galactosidasa) al 5 por ciento. Estos autores señalaron que una mayor concentración pudo destruir los pigmentos celulares debido a la liberación de proteínas del material vegetal y por ello, causar una disminución en el rendimiento. Ozdal *et al.* (2013) indican que los polifenoles forman complejos con las proteínas, lo que lleva a cambios en la estructura y la funcionalidad de ambos compuestos. Estas proteínas pueden precipitar con los compuestos fenólicos, entre los que se incluyen las antocianinas, a través de interacciones principalmente no-covalentes hidrofóbicas, las cuales pueden ser posteriormente estabilizadas por enlaces hidrógeno (Jakobek, 2015).

Una mayor liberación de proteínas pudo conducir a una disminución en las antocianinas monoméricas en la solución, ya que, de acuerdo a Ozdal *et al.* (2013), la cantidad de proteínas en solución afectan las interacciones entre proteínas y compuestos fenólicos; y, como indican Labuckas *et al.* (2008), una consecuencia de la interacción resultante entre proteínas y compuestos fenólicos puede llevar a una disminución de la concentración de fenoles libres y su eficacia antioxidante.

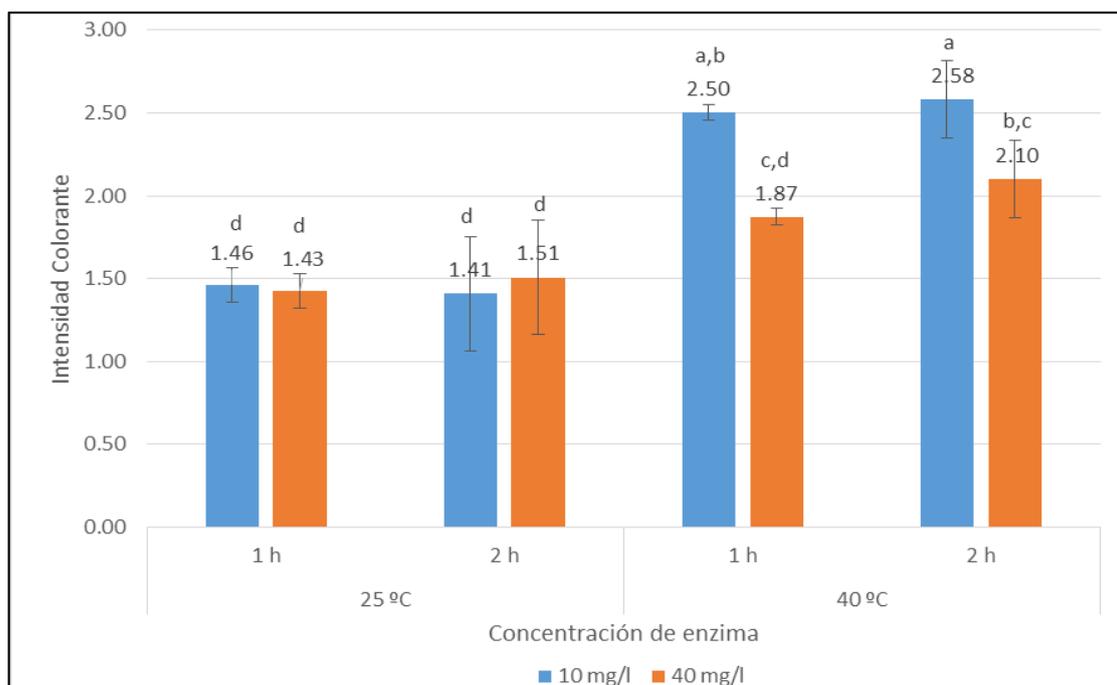
Por otra parte, la acción de las enzimas sobre la pared celular pudo afectar la extracción de antocianinas ya que, tal como señala Zietsman (2015), en las cáscaras de uva, la pérdida de pared celular y degradación de pectina conduce a la formación de poros, y la elevada

porosidad implica un incremento en los sitios de unión entre los polímeros de la pared celular y los polifenoles, tales como taninos condensados y antocianinas. Y debido a la retención de estos polifenoles por las partículas de la pared celular, se tenga una menor concentración en el vino. Es posible que una elevada actividad enzimática, logrado con la mayor concentración de enzimas (40 mg/L) incrementara excesivamente la porosidad de la pared celular, favoreciendo la retención de las antocianinas a la pared celular, de manera que se tuvo menor cantidad de antocianinas extraídas con esta concentración de preparado enzimático.

La cantidad de antocianinas obtenida con los parámetros adecuados (1.81 mg/g bs) fue cercano a lo reportado por Maier *et al.* (2008) empleando, de forma similar, un tratamiento enzimático en pieles de uva ‘Lemberger’ (*Vitis vinífera*) molidas, a 40 °C con una relación MP: solvente de 1:3 p/p en agua desionizada a pH 3, durante dos horas, usando una concentración de enzimas (actividades celulolítica y pectinolítica) de 4500 mg/kg cáscara. Mientras que la cantidad de antocianinas obtenida es aproximadamente el 10 por ciento de lo reportado por Xu *et al.* (2014), quienes obtuvieron 16.79 mg/g bs a partir de pieles de uva Muscadine (*Vitis rotundifolia*) con una extracción enzimática (actividades celulasa 100 U/g bs, pectinasa 7 U/g bs y β -glucosidasa 25 U/g bs) relación MP: solvente de 1/8 (p/v) a pH 4.8 y 50 °C durante una hora. La variabilidad obtenida en los resultados de distintos autores se atribuye a diferencias en las variedades de uva empleadas, contenido inicial en la materia prima a extraer y la diferente naturaleza y actividad de las enzimas usadas.

En cuanto al rendimiento de extracción, es decir, el porcentaje de antocianinas extraídas en relación al contenido total de antocianinas de la materia prima, los mayores valores fueron superiores al 70 por ciento según se observa en el eje derecho (secundario) de la Figura 6 y en el Anexo 2c. Con una concentración de enzimas de 10 mg/L y a 40 °C durante una hora se obtuvo un rendimiento de 71.42 por ciento, mientras que a dos horas se tuvo un rendimiento de 76.56 por ciento.

En la Figura 7, se muestra el efecto significativo (p -valor = 0.002 < 0.05) de la concentración de enzimas sobre la variable Intensidad Colorante. Se obtuvo los valores más altos con la concentración de enzimas de 10 mg/L, tal como se observó al evaluar el contenido de antocianinas, debido a que una mayor concentración de antocianinas es proporcional a la intensidad de color, luminosidad y croma (Lotfi *et al.*, 2015).



*Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 7: Intensidad colorante obtenida en los extractos, a diferentes parámetros de concentración de enzimas, tiempo y temperatura en el pre tratamiento enzimático.

b. TEMPERATURA

La variable temperatura tuvo efectos significativos sobre la cantidad extraída de antocianinas monoméricas e intensidad colorante (Anexos 2 y 3). En los extractos obtenidos a la temperatura de 40 °C, se observó los mayores valores de antocianinas e intensidad colorante, tal como se muestra en las Figuras 5 y 6.

La temperatura fue el principal factor influyente ($p\text{-valor} = 0.000 < 0.05$) en el contenido de antocianinas que se obtuvo tras el pre tratamiento enzimático, tal como se observa en el diagrama de Pareto en la Figura 8. Esto se explica debido a que el aumento de la temperatura incrementa la solubilidad de los pigmentos y el coeficiente de difusión (Cacace y Maza, 2003), por lo que a mayor temperatura se obtuvo mayor cantidad de antocianinas en la extracción. De acuerdo a Pinelo *et al.* (2006), la temperatura es una de las variables más críticas que afectan la liberación de fenoles a partir de cáscaras de uva, observando que a valores más altos de temperatura se tiene un incremento en la cantidad de fenoles extraídos, principalmente de los fenoles unidos débilmente a la estructura de la pared celular y aquellos contenidos en las vacuolas. En las cáscaras de uva, las antocianinas se encuentran

normalmente dentro de las vacuolas (Romero, 2008), lo que facilita su extracción al incrementarse la temperatura.

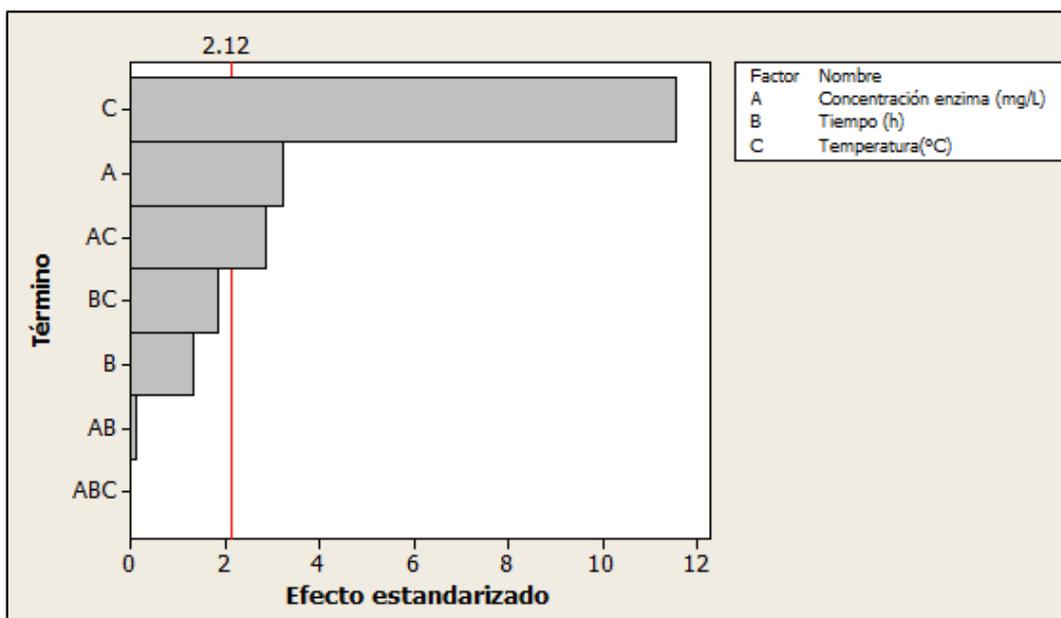


Figura 8: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados ($\alpha = 0.05$) de contenido de antocianinas en los extractos.

A pesar de los efectos positivos de las altas temperaturas sobre el contenido de antocianinas extraídas, la temperatura no puede incrementarse indefinidamente, porque la inestabilidad de los compuestos fenólicos y la desnaturalización de las membranas tienen lugar a temperaturas superiores a 55 °C (Cacace y Maza, 2003).

c. TIEMPO

La variable Tiempo tuvo efecto significativo ($p\text{-valor} = 0.000 < 0.05$) sobre el contenido de color polimérico obtenido tras el pre tratamiento enzimático (Anexo 5), pero no tuvo significancia sobre la cantidad de antocianinas extraídas, ni la intensidad colorante. Se observó que a mayor tiempo de pre tratamiento enzimático, se incrementó el porcentaje de color polimérico (Figura 5). El tiempo fue la variable de mayor influencia en el porcentaje de color polimérico de los extractos, según se ilustra en el diagrama de Pareto para el porcentaje de color polimérico (Figura 9).

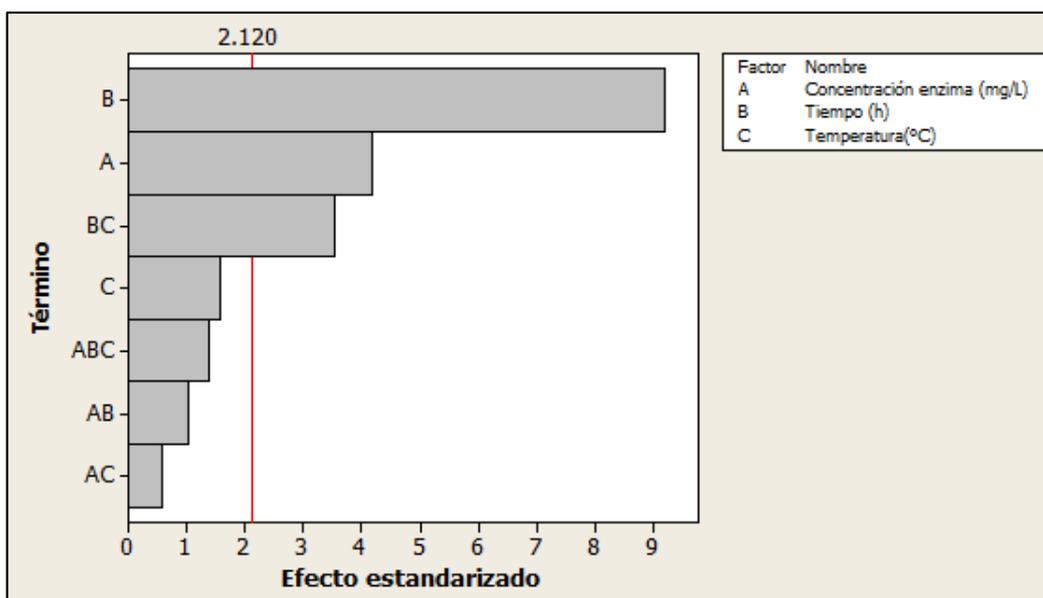


Figura 9: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados ($\alpha = 0.05$) de porcentaje de color polimérico en los extractos.

En la literatura se han reportado efectos similares del tiempo sobre el color polimérico; así, Xu *et al.* (2014) mencionan que el uso de pectinasa en pieles y semillas de uva contribuyó al incremento en la extracción de polifenoles durante la primera hora, pero que luego el rendimiento de compuestos fenólicos disminuyó a mayores tiempos de incubación. Los autores señalan que es posible que la pectinasa ayude a romper la estructura de polisacáridos de la pared celular muy rápido, acelerando así la liberación de fenoles; sin embargo, luego los fenoles libres están expuestos a condiciones adversas (temperatura, enzimas celulares, etc.) durante el largo tiempo de incubación y empiezan a degradarse. Estos compuestos fenólicos libres podrían reaccionar con las antocianinas monoméricas para formar los pigmentos polimerizados y, debido a ello, el tiempo de pre tratamiento enzimático tiene un efecto positivo en la cantidad de antocianinas polimerizadas.

Por otra parte, el tiempo evaluado no fue una variable significativa en la extracción de las antocianinas monoméricas. Es decir, que a una o dos horas de tratamiento, se obtuvieron cantidades similares de antocianinas monoméricas extraídas, lo que concuerda con diversos estudios que han reportado como adecuados tiempos de extracción con enzimas los que varían de una a dos horas. Gong *et al.* (2014) indicaron que el rendimiento de antocianinas se incrementó a durante la primera hora de extracción con enzimas a partir de bagazo de blackberry, y se mantuvo similar cuando se extendió el tiempo de extracción de una a dos horas; para luego disminuir al emplear mayores tiempos de extracción. Muñoz *et al.* (2004),

por su parte, señalan que los mejores resultados de extracción de antocianinas con enzimas a partir de cáscaras de uva se obtienen con dos horas de tratamiento.

Se consideró, entonces, que el tiempo de extracción adecuado es el menor tiempo empleado (una hora), ya que al emplear dos horas no se tuvo un incremento significativo en la cantidad de antocianinas y, tal como señalan Spigno *et al.* (2007), la optimización del tiempo implica la reducción de costos del proceso.

d. INTERACCIÓN TEMPERATURA – CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

La interacción temperatura – concentración de enzima tuvo efectos significativos en la cantidad de antocianinas extraídas ($p\text{-valor} = 0.011 < 0.05$) y en la intensidad colorante ($p\text{-valor} = 0.001 < 0.05$). A temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), los promedios obtenidos de antocianinas con ambas concentraciones de enzima son similares. Sin embargo, al incrementar la temperatura de trabajo a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvo mayor cantidad de antocianinas con la menor concentración de enzimas empleada (10 mg/L). El efecto de la interacción temperatura-concentración de enzima en la respuesta de contenido de antocianinas (Mvd 3,5-diglu mg/L) se grafica en la Figura 10. En el gráfico, las líneas se cruzan, lo cual indica la existencia de una interacción.

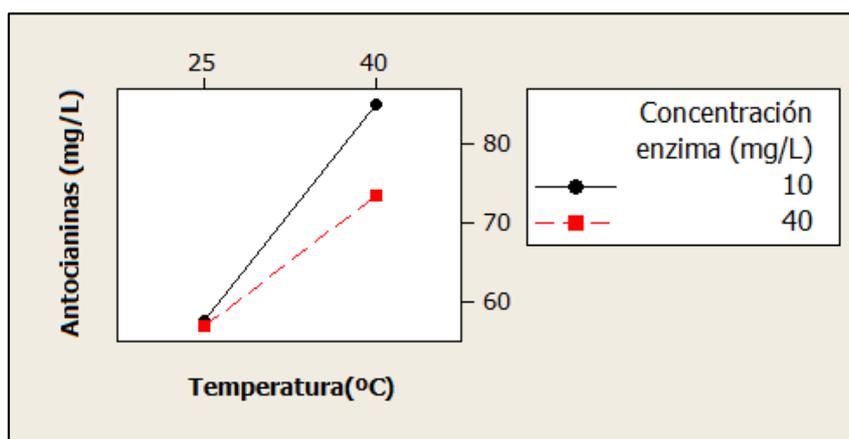


Figura 10: Gráfica de interacción temperatura – concentración de enzimas sobre el contenido de antocianinas extraídas.

Estas observaciones en la interacción temperatura-concentración de enzima son similares a lo reportado por Gong *et al.* (2014), quienes indicaron que cuando la concentración enzimática se incrementó a 0.2 por ciento, la temperatura se convirtió en un factor crítico para elevar el valor de antocianinas extraídas. Los autores reportaron que al trabajar con una

temperatura óptima de 50 °C, el mayor rendimiento de antocianinas se logró con 0.2 por ciento y este rendimiento disminuyó ligeramente cuando la concentración de enzimas se incrementó por sobre el 0.2 por ciento. Landbo y Meyer (2001) también reportaron la influencia positiva de la interacción temperatura-enzimas en la extracción de compuestos fenólicos. De forma similar, en la Figura 11 se muestra la interacción temperatura – concentración para la intensidad colorante (p-valor = 0.001 < 0.05). Ésta es similar a la observada para el contenido de antocianinas.

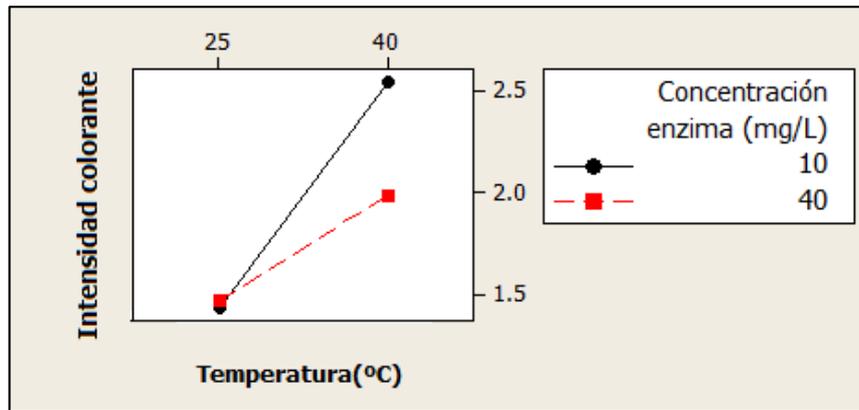


Figura 11: Gráfica de interacción temperatura – concentración de enzimas sobre la intensidad colorante.

e. INTERACCIÓN TEMPERATURA – TIEMPO

En la Figura 12, se presenta el efecto significativo (p-valor = 0.003 < 0.05) de la interacción tiempo-temperatura sobre el porcentaje de color polimérico.

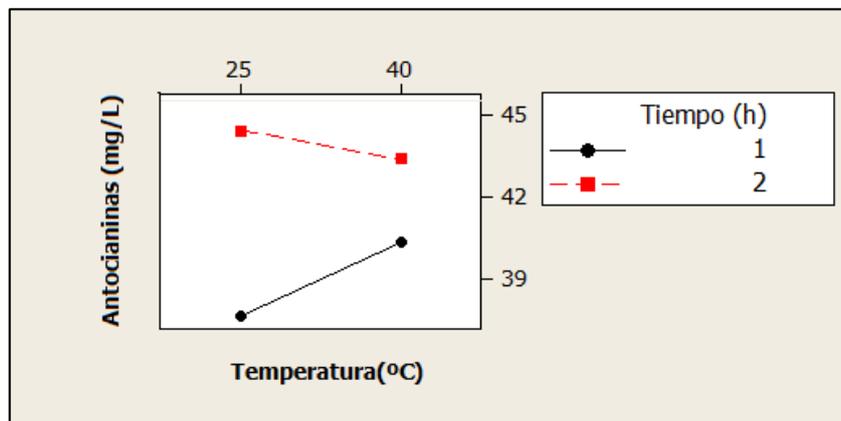


Figura 12: Gráfica de interacción temperatura - tiempo sobre el porcentaje de color polimérico.

En los datos obtenidos, se observó que a una hora de pre tratamiento enzimático, las muestras tratadas a 25 °C tuvieron menor proporción de color polimérico que las muestras a 40 °C. Mientras que tras dos horas de pre tratamiento enzimático, se tuvo un porcentaje de color polimérico similar en las dos temperaturas trabajadas.

La mayor proporción de compuestos poliméricos a 40 °C durante la primera hora de pre tratamiento enzimático pudo deberse a lo señalado por Kunsági-Máté *et al.* (2011), quienes indican que elevadas temperaturas conducen a la descomposición de los complejos de copigmentación y a la polimerización de las estructuras de malvidina. Estos autores recomiendan que los vinos rojos no se almacenen a temperaturas superiores a los 20 °C.

Después de dos horas de pre tratamiento enzimático, la temperatura tuvo un efecto menos pronunciado; y esto posiblemente se debe a que el tiempo es el factor principal que afecta el grado de polimerización (Giusti, 1995).

4.3. DETERMINACIÓN DEL MEJOR SOLVENTE DE EXTRACCIÓN

En la Figura 13 y Anexo 6 se presentan los resultados obtenidos durante la determinación del mejor solvente para los orujos pre tratados enzimáticamente.

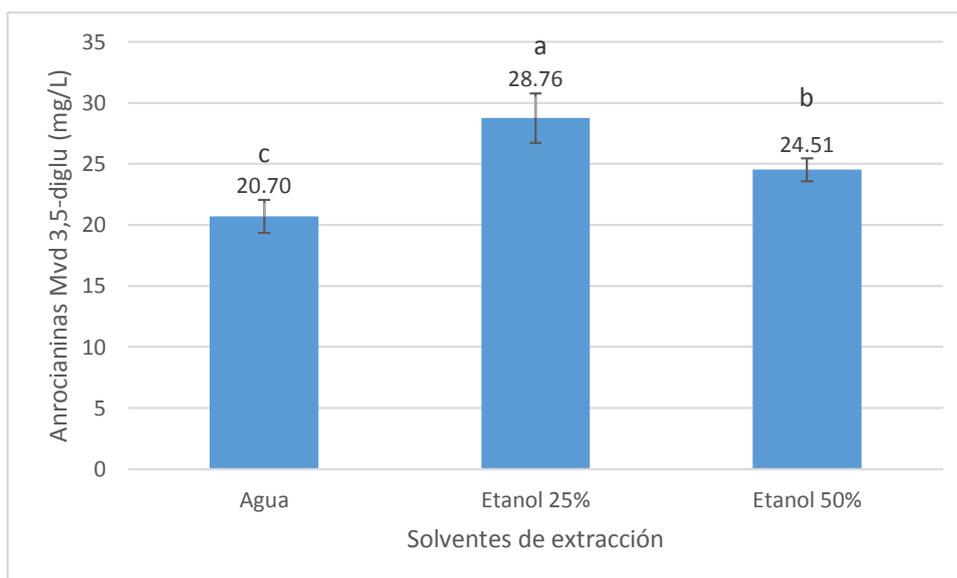


Figura 13: Cantidad de antocianinas extraídas (mg Mvd 3,5-diglu mg/L) con diferentes solventes, posterior al pre tratamiento enzimático.

Se observó que la influencia de los tratamientos sobre la cantidad de antocianinas extraídas es significativa ($p\text{-valor} = 0.002 < 0.05$). De acuerdo a la prueba de Tukey, se concluyó que se obtuvo el mayor valor de antocianinas en las extracciones realizadas con solución de etanol al 25 por ciento.

En una extracción convencional con un solvente hidroalcohólico, diversos autores (Joshi *et al.*, 2013; Goula *et al.*, 2016) señalan que la mayor eficiencia de extracción de antocianinas se logra con una concentración de etanol del 50 por ciento. Sin embargo, en el presente estudio se determinó como mejor concentración una solución etanólica al 25 por ciento. Esto puede deberse a la alta solubilidad de las antocianinas en soluciones acuosas (Alcázar *et al.*, 2017) y a que el uso de etanol permite obtener valores más altos de antocianinas debido a que es un solvente menos polar que el agua y por tanto, más eficiente en la degradación de paredes celulares, las cuales tienen carácter apolar, lo que causa que las antocianinas y otros polifenoles sean liberados de las células (Lapornik *et al.*, 2005). Debido a que el pretratamiento enzimático tiene la capacidad de degradar la pared celular a fin de liberar las antocianinas, es posible que una menor proporción de etanol fuese suficiente para incrementar el contenido de antocianinas extraídas en una solución agua-etanol.

Por otra parte, el tipo de antocianina presente en el orujo pudo influir también en el solvente más adecuado para su extracción posterior al tratamiento enzimático, ya que Khoo *et al.* (2017) señalan que la malvidina es altamente soluble en agua en comparación con el metanol y el etanol debido a que el momento dipolar estático de la malvidina en el agua es mayor que en el metanol y el etanol.

De forma similar, se han reportado otras extracciones de antocianina en las que se han obtenido los mayores rendimientos empleando soluciones agua-etanol con menos del 50 por ciento de etanol. Así, Fonseca *et al.* (2008) determinaron rendimientos de extracción de antocianinas en una columna de extracción a partir de col roja con etanol al 30, 40 y 70 por ciento (v/v) y entre éstos, los mayores valores se obtuvieron con etanol al 30 y 40 por ciento (estadísticamente similares). Estos autores señalaron que el coeficiente de difusión probablemente disminuyó a altas concentraciones de etanol debido a la menor solubilidad de las antocianinas en alcohol que en agua. De forma similar, Chaudhary y Mukhopadhyay (2012) determinaron el mejor rendimiento de extracción de antocianinas a partir de polvo de pieles de pesjua (*Syzygium cumini* L.), un fruto similar a una baya con alto contenido de antocianinas, evaluando solventes con contenidos de etanol entre 20 y 80 por ciento; y

concluyeron que se tuvo el mayor rendimiento con etanol al 20 por ciento y 1 por ciento de ácido acético.

4.4. COMPARACIÓN ENTRE LA EXTRACCIÓN CON PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL

En el Cuadro 4 se presenta el valor de antocianinas obtenido en la extracción con pre tratamiento enzimático, según las mejores condiciones determinadas en la etapa anterior, comparada con una extracción convencional (con etanol al 50 por ciento). Se realizó un análisis de varianza (Anexo 7a), mediante el cual se determinó que el tiempo de tratamiento, el tipo de tratamiento y la interacción entre éstos fueron factores significativos.

Cuadro 4: Comparación entre cantidad de antocianinas extraídas (mg Mvd-3,5-diglu/L) a partir de orujos de uvina entre el pre tratamiento enzimático y una extracción convencional

TIEMPO (h)	TIPO DE TRATAMIENTO	
	EXTRACCIÓN CON PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	EXTRACCIÓN CONVENCIONAL
1	82.61 ± 1.82 ^a	73.32 ± 1.38 ^b
2	87.03 ± 4.75 ^a	85.08 ± 1.89 ^a

*Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Al realizar la comparación de medias con la prueba de Tukey, se concluyó que existe diferencia significativa ($p\text{-valor} = 0.000 < 0.05$) entre las medias de los resultados obtenidos (Anexo 7b). Se observó que a 1 h se obtuvo mayor cantidad de antocianinas con el pre tratamiento enzimático a comparación de la extracción convencional. Mientras que a las 2 h, es estadísticamente similar la cantidad obtenida con pre tratamiento enzimático y con extracción convencional, tal como se observa en la Figura 14.

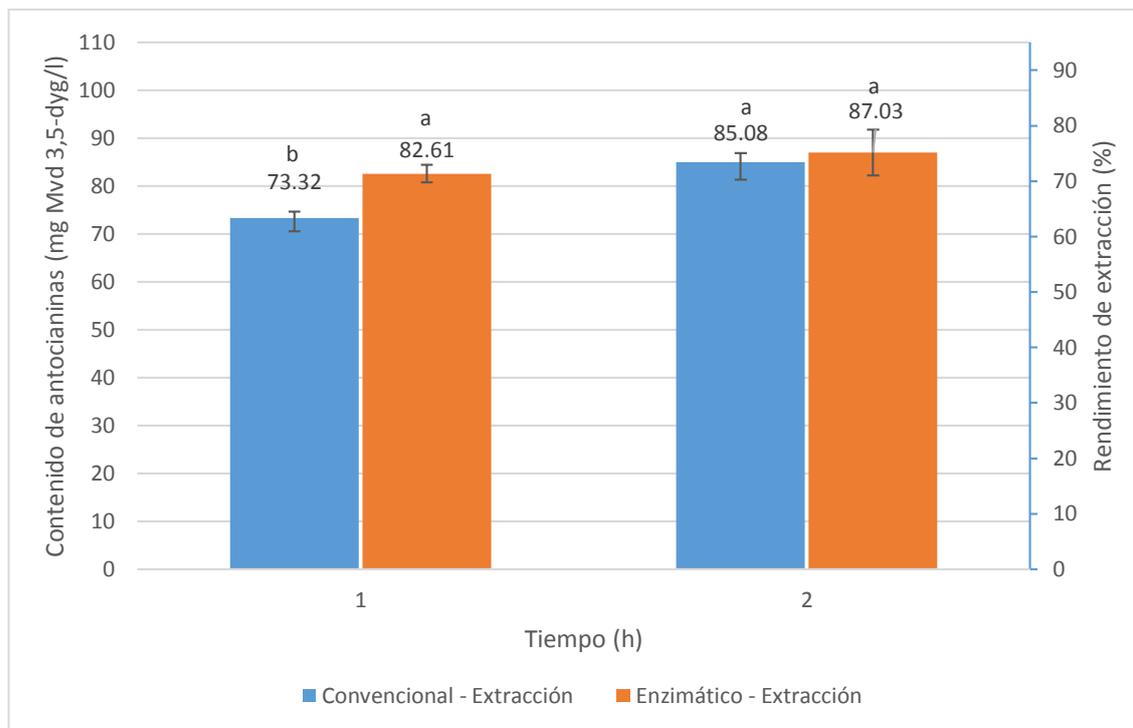


Figura 14: Gráfica de barras de las medias obtenidas para contenido de antocianinas extraídas (eje principal) y rendimiento de extracción (eje secundario) con extracción convencional y el pre tratamiento enzimático.

A una hora, se tiene que al emplear el pre tratamiento enzimático se tiene un incremento del 12 por ciento aproximadamente con respecto a la cantidad de antocianinas obtenida de una extracción convencional con etanol. El mayor valor de antocianinas obtenido con el uso de enzimas con respecto a una extracción con etanol es similar a lo reportado por otros autores. Así, Xu *et al.* (2014) reportaron que la extracción de antocianinas, a partir de pieles de uva, utilizando una mezcla de enzimas pectinasas y celulasas durante una hora tuvo un rendimiento de antocianinas 10 por ciento mayor que el obtenido con una extracción con etanol al 50 por ciento. Por otra parte, Lotfi *et al.* (2015) determinaron que el valor obtenido de antocianinas empleando enzimas en la extracción fue aproximadamente el doble que con etanol acidificado (13.3 mg antocianinas/100g frente a 6 mg antocianinas/100 g).

En el Cuadro 5 se resumen los resultados obtenidos de la extracción de antocianinas usando un pre tratamiento enzimático y una extracción convencional por cada 100 g de orujo. Tal como se mencionó, el contenido de antocianinas extraídas es estadísticamente similar a las dos horas para ambos métodos de extracción; sin embargo, al emplear el preparado enzimático pectolítico Zimared Plus® se tiene la ventaja de que para alcanzar un rendimiento similar a la extracción convencional no se requiere el uso de etanol.

Cuadro 5: Comparativo de cantidad de antocianinas extraídas, rendimiento, enzima y solventes empleados en el pre tratamiento enzimático y una extracción convencional por 100 g de orujo de uva

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CONVENCIONAL
Cantidad extraída en la primera hora	165.2 ± 3.6 ^a mg	146.6 ± 2.8 ^b mg
Cantidad extraída en la segunda hora	174.0 ± 9.5 ^a mg	170.1 ± 3.8 ^a mg
Rendimiento total	75.6 ± 4.8%	73.9 ± 1.9%
Agua empleada	2 litros	0.96 litros
Etanol (96 °) empleado	-	1.04 litros
Enzima empleada	20 mg	-

*Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

4.5. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron adecuadamente al modelo de pseudo-primer orden, como ya fue determinado por otros autores para extracción de polifenoles y antocianinas a partir de orujos (Sant'Anna *et al.*, 2013; Sant'Anna *et al.*, 2012). Como se observa en el Cuadro 6, es el modelo que se correlaciona mejor con los datos experimentales, al tener mayor valor de R^2 ajustado y menor valor de chi cuadrado.

Cuadro 6: Ajuste de los modelos matemáticos a los datos experimentales de la cinética de extracción de antocianinas durante el pre tratamiento enzimático

MODELO	ADJ. R^2	χ^2
Peleg (1988)	0.964	1.83
Cacace y Mazza (2003)	0.979	1.09
Pseudo- primer orden	0.985	0.73
Segundo orden	0.964	1.81

La ecuación de pseudo-primer orden, que describe mejor la cinética de extracción, es la siguiente:

$$C = C_{\infty} - \frac{C_{\infty}}{\exp(kt + a)}$$

Donde C es la cantidad de antocianinas extraídas al tiempo t , C_{∞} es la concentración de equilibrio, k es la velocidad de extracción constante y a es una constante de integración (Sant'Anna *et al.*, 2013). En la Figura 15 se observa la cinética de extracción a partir de los orujos de uva durante el pre tratamiento enzimático, explicada por el modelo mencionado.

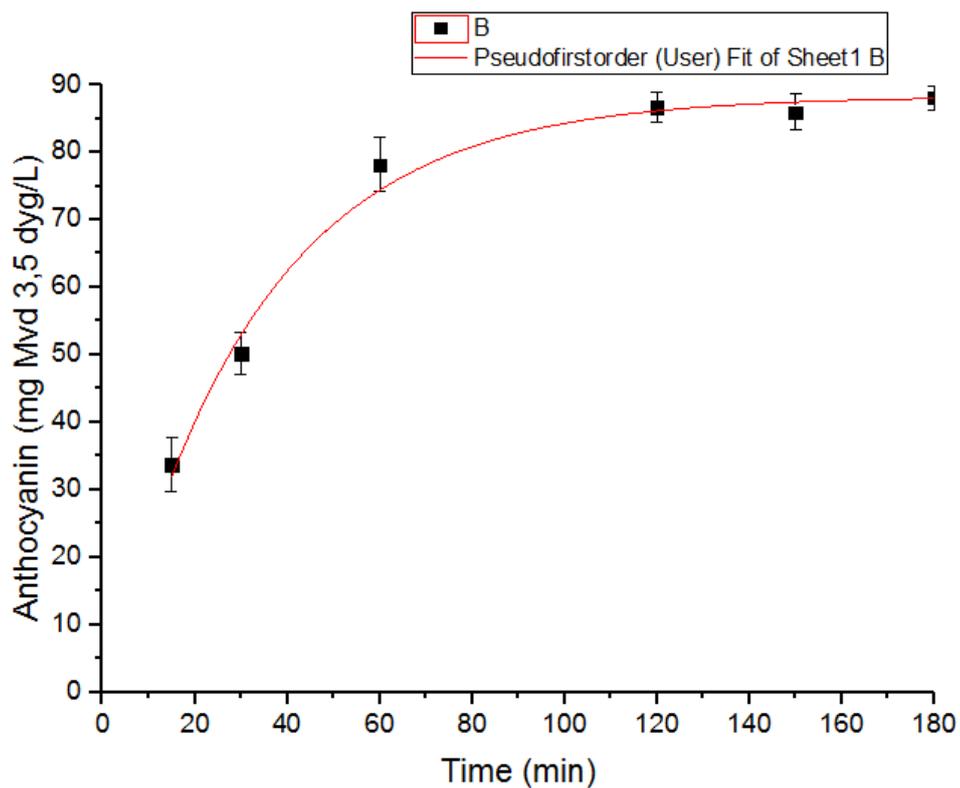


Figura 15: Gráfica de la cinética de extracción de antocianinas durante el pre tratamiento enzimático.

Los resultados experimentales son explicados adecuadamente por el modelo cinético de pseudo primer orden (Anexo 8). Se observa en la gráfica que durante los primeros minutos, la cantidad de antocianinas extraídas se incrementó rápidamente, mientras que después de los 60 minutos, esta velocidad de extracción disminuyó y se aproximó a la concentración de equilibrio.

El comportamiento de la cinética de extracción es acorde a lo descrito por Díaz *et al.* (2017), pues la una pendiente inicial es más pronunciada, la cual corresponde a la extracción de la fracción de los compuestos más accesibles, según los autores. Y a medida que transcurre la extracción, se muestra una etapa de extracción lenta, en la que los compuestos activos difunden desde el interior de la matriz vegetal. En el Cuadro 7 se muestran los parámetros de la ecuación de pseudo-primer orden.

Cuadro 7: Parámetros de la ecuación de cinética de pseudo primer orden ajustados a los valores de las antocianinas (mg Mvd-3,5-diglucósido/L) extraídas

C_{∞} (mg Mvd/L)	88.30 ± 1.32
k (1/min)	0.031 ± 0.005
a	-0.019 ± 0.112
$t_{1/2}$ (min)	22.66
k_{apar} (1/min)	0.0306
X^2 reducido	0.73
R^2 (Cod.)	0.99
R^2 ajustado	0.98

Los valores k (velocidad de extracción) y k_{apar} (velocidad aparente de extracción) fueron menores al reportado por Sant'Anna *et al.* (2013) para extracción de antocianinas con un solvente a la misma temperatura, es decir, se obtuvo una menor velocidad de extracción. Ello pudo deberse a diferencias en el tamaño de partícula, composición del orujo, solvente empleado y otras condiciones de extracción. De forma análoga, el valor $t_{1/2}$ (mitad del tiempo de extracción) es mayor que lo reportado por dichos autores, debido a que la velocidad de extracción es menor.

Se observó que el valor de a es bastante cercano a cero y similar a los reportados para la cinética de extracción de polifenoles a partir de bagazo de uva (Sant'Anna *et al.*, 2012). De acuerdo a Sant'Anna *et al.* (2013), este valor representa el intercepto de la curva al eje de las ordenadas (es decir, cuando $t = 0$). Se puede decir que este valor es bastante cercano al comportamiento ideal del fenómeno de extracción descrito por el modelo.

Al aplicar el método VNSC propuesto por Herrera (2005), el análisis de varianza realizado indica que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de los resultados obtenidos en los tiempos de extracción evaluados (Anexo 9). En la comparación de medias realizada se observó que los mayores valores se obtuvieron a los 120, 150 y 180 minutos y que no existió diferencia significativa entre estos tratamientos, por lo que se afirma que, para las condiciones ensayadas, el tiempo óptimo de pre tratamiento enzimático es de 120 minutos.

V. CONCLUSIONES

- Los factores “Temperatura” y “Concentración de enzima” tuvieron influencia significativa sobre la Cantidad de antocianinas extraídas e Intensidad colorante, mientras que los factores “Tiempo” y “Concentración de enzima” tuvieron influencia significativa sobre el Color polimérico, con un nivel de confianza del 95 por ciento.
- Los parámetros adecuados para el pre tratamiento enzimático del orujo determinados con el diseño factorial fueron: concentración de preparado enzimático Zimared Plus ® de 10 mg/L, a 40 °C, durante 1 hora.
- La cantidad antocianinas extraídas con las condiciones adecuadas de pre tratamiento enzimático estuvo en el rango de 78.42 a 97.74 mg de Mvd 3,5 diglucósido/litro.
- La intensidad colorante obtenida con las condiciones adecuadas de pre tratamiento enzimático fue de 2.16 a 2.85 unidades de absorbancia ($A_{420} + A_{520} + A_{620}$).
- El porcentaje de color polimérico obtenido con las condiciones adecuadas de pre tratamiento fue de 38.37 a 40.24 por ciento.
- La concentración adecuada de etanol en el solvente de extracción utilizado posterior al pre tratamiento enzimático fue 25 por ciento (v/v).
- A las condiciones estudiadas, con un tiempo de 2 horas, no se tuvo diferencia significativa en la cantidad de antocianinas extraídas al emplear un pre tratamiento enzimático a comparación de una extracción convencional con etanol (87.03 y 85.08 mg de Mvd 3,5 diglucósido/L, respectivamente); sin embargo, con el pre tratamiento enzimático se tuvo la ventaja de no requerir el uso de etanol.
- El modelo cinético de pseudo primer orden explica adecuadamente ($r^2 = 0.97$) la extracción de antocianinas durante el pre tratamiento enzimático a partir de orujos. La concentración de equilibrio del extracto (C_{∞}) fue 88.21 mg Mvd/L, mientras que la constante cinética de pseudo primer orden (k) fue de 0.034 min^{-1} .
- Aplicándose el método de Variación No Significativa en Cinética (VNSC) se determinó que el proceso de pre tratamiento enzimático no presentó diferencias significativas en cuanto a la cantidad de antocianinas extraídas a partir de los 120 minutos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios similares empleando otras mezclas de enzimas pectolíticas, celulasas y hemicelulasas.
- Se recomienda que la deshidratación de la materia prima se realice a bajas temperaturas, empleando métodos como la liofilización, con el fin de lograr una mejor conservación de antocianinas en la materia prima.
- Se recomienda determinar los tipos de antocianinas y compuestos fenólicos presentes en la uva y en los orujos obtenidos a partir de ésta.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, A; Hilbert, G; Rivièrre, C; Mengin, V; Ollat, N; Bodernave, L; Decroocq, S; Delaunay, J.C; Delrot, S; Mérillon, J.M; Monti, J.P; Gomès, E; Richard, T. 2012. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp.accessions by using LC-MS and LC-NMR. *Analytica Chimica Acta* 732:145-152.
- Alcázar, S; Cardenas, F; Osorio, J; Barbero, G; Meireles, MA. 2017. Obtaining anthocyanin-rich extracts from frozen açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp using pressurized liquid extraction. *Food Sci. Technol, Campinas* 37(1):48-54.
- Amendola, D; De Faveri, DM; Spigno, G. 2010. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering* 97:384 – 392.
- Amponsah, G. 2009. Recogida, manipulación y preparación de las muestras. Presentado en: Curso para graduados del África occidental sobre composición de alimentos y biodiversidad. Ghana. Disponible en http://www.fao.org/fileadmin/templates/food_composition/documents/upload/spanish/RECOGIDA_MANIPULACION_Y_PREPARACION_DE_LAS_MUESTRAS_george.pdf
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1980. Official methods of analysis of AOAC International. 13 ed. Washington DC, Estados Unidos. AOAC International. 1037 p.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20 ed. Washington DC, Estados Unidos. AOAC International. 3100 p.
- Azmir, J; Zaidul, ISM; Rahman, MM; Sharif, KM; Mohamed, A; Sahena, F; Jahurul, MHA; Ghafoor, K; Norulaini, NAN; Omar, AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117:426-436.

- Badui, S. 1990. Química de los alimentos. 2 ed. Mexico D.F, México, Alhambra Mexicana. 648 p.
- Bridle, P; Timberlake, CF. 1997. Anthocyanins as natural foods colours-selected aspects. Food Chemistry 58(2):103-109.
- Brownmiller, C; Howard, LR; Prior, RL. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. Journal of Food Science 73(5):72-79.
- Bucic-Kojic, A; Planinic, M; Tomas, S; Bilic, M; Velic, D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. Journal of Food Engineering 81:236-242.
- Cacace, JE; Mazza, G. 2002. Extraction of anthocyanin and other phenolics from black currants with sulfured water. J. Agric. Food. Chem. 50:5939 – 5946.
- Cacace, JE; Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering 59:379-389.
- Castañeda-Ovando, A; Pacheco-Hernández, ML; Páez-Hernández, ME; Rodríguez, JA; Galán-Vidal, CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. Food. Chem. 113:859-871.
- Chaudhary, B; Mukhopadhyay, K. 2012. Solvent optimization for anthocyanin extraction from *Syzygium cumini* L. Skeels using response surface methodology. International Journal of Food Sciences and Nutrition. Early Online:1-9.
- Costa, E; Cosme, F; Jordao, A; Mendes-Faia, A. 2014. Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two portuguese wine regions. J. Int. Sci. Vigne Vin. 48(1):51-62.
- De Rosa, T. 1988. Tecnología del vino tinto. 1 ed. Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa. 246 p.
- De Rosso, N; Tonidandel, L, Larcher, R; Nicolini, G; Vedova, A; De Marchi, F; Gardiman, M; Giust, M; Flamini, R. 2014. Identification of new flavonols in hybrid grapes by

combined liquid chromatography-mass spectrometry approaches. *Food Chemistry* 163:244-251.

Díaz, B; González, MJ; Domínguez, H. 2017. *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*. 1 ed. Elsevier Inc. 466 p.

Dueñas, A; Alcívar, U; Sacon, E; Bravo, L; Villanueva, G. 2016. Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Chuquiraga Jussieuiff Gmel* usando la lixiviación de muestras sólidas. *Tecnología Química* 36(2):166-175.

Fonseca, M; Lopes, TJ; Novy, MG; Bastos, M. 2008. Extraction of red cabbage anthocyanins: optimization of the operation conditions of the column process. *Brazilian archives of Biology and Technology* 51(1):143-152.

Fontana, A; Antonioli, A; Bottini, R. 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J. of Agricultural and Food Chem.* 61(38):8987-9003.

García-Lomillo, J; González-San José, ML. 2016. Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 00:1 – 20.

Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colombia.* 13(3):27–36.

Geankoplis, C.J. 1998. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3 ed. México, Continental. 1024 p.

Giusti, M. 1995. *Radish Anthocyanin Extract as a Natural Red Colorant for Maraschino Cherries*. Tesis Mg. Sc. Oregon, United States of America, Oregon State University. 113 p.

Giusti, M; Wrolstad, R. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Unit F1.2:1-13

Gómez-García, R; Martínez-Ávila, G; Aguilar, C. 2012. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *Biotech* 2(3):297-300.

- Gong, H; Li, Q; Yang, Z. 2014. Optimization of enzyme-assisted extraction of anthocyanin from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juice using response surface methodology. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 8(34):841-848.
- Goula, A; Thymiatis, K; Kaderides, K. 2016. Valorization of grape pomace: drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. Food and Bioproducts Processing 100:132-144
- Hai, TC; Nam, ND; Hong Anh, LT; Vu, TA; Man, PV. 2016. Enzyme assisted extraction of polyphenols from the old tea leaves. J Nutr Health Sci 3(4):404-410.
- Harouna-Oumarou, H; Fauduet, H; Porte, C; Ho, Y. 2007. Comparison of kinetic models for the aqueous solid-liquid extraction of tilia sapwood in a continuous stirred tank reactor. Chemical Engineering Communications 194(4):537-552
- He, F; Liang, N; Mu, L; Pan, Q; Wang, J; Reeves, MJ; Duan, CQ. 2012. Anthocyanins and their variation in red wines ii. anthocyanin derived pigments and their color evolution. Journal Molecules 17:1483-1519.
- Herrera, JC. 2005. Ahorro energético en la extracción por lixiviación del pigmento del maíz morado (*Zea mays* L.). Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Huaroto, R. 2005. Obtención de un extracto concentrado de antocianinas a partir de la cáscara de uvina. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. 112 p.
- Joshi, VK; Preema, M. 2013. Optimization of extraction treatment and concentration of extract on yield and quality of anthocyanins from plum var. 'Santa Rosa'. Indian Journal of Natural Products and Resources 5(2):171-175
- Kammerer, D; Claus, A; Schieber, A; Carle, R. 2005. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. J of Food Science. 70(2):157-163.
- Khoo, H; Azlan, A; Teng, S; Meng, S. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food & Nutrition Research 61(1):1361779.
- Kunsági-Máté, S; May, B; Tschiersch, C; Fetzer, D; Horváth, I; Kollár, L; Pour, M. 2011. Transformation of stacked π - π -stabilized malvidin-3-O-glucoside –Catechin

complexes towards polymeric structures followed by anisotropy decay study. *Food Research International* 44:23-27.

Ky, I; Teissedre, P. 2015. Characterisation of mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity. *Journal Molecules* 20:2190 – 2207.

Labuckas, D; Maestri, D; Perelló, M; Martínez, M; Lamarque, A. 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry* 107:607-612.

Lafka, TI; Sinanoglou, V; Lazos, ES. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* 104:1206-1214

Landbo, A; Meyer, A. 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J. Agric. Food Chem.* 49:3169 – 3177.

Lapornik, B; Prosek, M; Golc, A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71:214-222.

Lee, J; Wrolstad, RE. 2004. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science* 69(7):564-573.

Li, BB; Smith, B; Hossain, MM. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. *J. of Separation and Purification Technology* 48:189-196.

Li, Y; Han, L; Ma, R; Xu, X; Zhao, C; Wang, Z; Chen, F; Hu, X. 2012. Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-assisted extraction process. *Journal of Food Engineering* 109:274-280.

Liang, Z; Wu, B; Fan, P; Yang, C; Duan, W; Zheng, X; Liu, C; Li, S. 2008. Anthocyanin composition and content in grape Berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry* 111:837-844.

Liang, Z; Yang, Y; Cheng, L; Zhong, G. 2012. Polyphenolic composition and content in the ripe berries of wild *Vitis* species. *Food chemistry* 132:730-738.

- Librán, CM; Mayor, L; García-Castello, E; Vidal-Brotons, D. 2013. Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. *Agricultural Sciences* 4(9):56-65
- Linares, A; Hase, S; Vergara, ML; Resnik, S. 2010. Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: influence of temperatura. *Journal of Food Engineering* 97:471–477.
- Lotfi, L; Kalbasi-Ashtari, A; Hamed, M; Ghorbani, F. 2015. Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability. *Journal of Food and drug analysis* 23:210 – 218.
- Maier, T; Göppert, A; Kammerer, D; Schieber, A; Carle, R. 2008. Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Eur Food Res Technol.* 227:267-275.
- Medina-Meza, I; Barbosa-Cánovas, G. 2015. Assisted extraction of bioactive compounds from plum and grape peels by ultrasonics and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 166:268-275.
- Monagas, M; Gómez-Cordovés, Bartolomé, B; Laureano, O; Da Silva, R. 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from vitis vinífera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem* 51:6475-6481.
- Moncayo, L. 2013. Caracterización de los piscos del Perú a través de su composición aromática. Tesis Ph.D. Zaragoza, España, Universidad De Zaragoza. 247 p.
- Moussout, H; Ahlafi, H; Aazza, M; Maghat, H. 2018. Critical of linear and nonlinear equations of pseudo-first order and pseudo-second order kinetic models. *Karbala International Journal of Modern Science* 4:244-254.
- Muche, B; Speers, RA; Vasantha, HP. 2018. Storage temperature impacts on anthocyanins degradation, color changes and haze development in juice of “merlot” and “ruby” grapes (*Vitis vinifera*). *Front. Nutr.* 5:100.
- Muñoz, O; Sepúlveda, M; Schwartz, M. 2004. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine. *Food Chemistry* 87:487-490.

- Nacz, M; Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography* 1054:95–111.
- Nguyen, T; Phan, L; Le, V. 2014. Enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of phenolics from mulberry (*Morus alba*) fruit: comparison o kinetic parameters and antioxidant level. *International Food Research Journal* 21(5):1937-1940.
- Ozdal, T; Capanoglu, E; Altay, F. 2013. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51:954-970.
- Panico, AM; Cardile, V; Avondo, S; Garufi, F; Gentile, B; Puglia, C; Bonina, F; Santagati, NA; Ronsisvalle, G. 2006. The in vitro effect o a lyophilized extract of wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes. *Journal Phytomedicine* 13:522-526.
- Parley, A; Vanhanen, L; Heatherbell, D. 2001. Effects of pre fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in Pinot Noir wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7:146-152.
- Pekic, B; Kovac, V; Alonso, E; Revilla, E. 1998. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *J. Food Chemistry*. 61(1):201-206.
- Peleg, M. (1988). An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, 53(4):1216–1219.
- Pinelo, M; Arnous, A; Meyer, A. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*. 17:579-590.
- Pinelo, M; Rubilar, M; Sineiro, J; Nuñez, MJ. 2005. A termal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur Food Res Technol* 221:284-290.
- Puri, M; Sharma, D; Barrow, CJ. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol*. 30(1):37-44.
- Prodanov, M.P; Domínguez, J.A; Blázquez, I.; Salinas, M.R; Alonso, G.L. 2005. Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts. *Food Chemistry* 90:585-596.

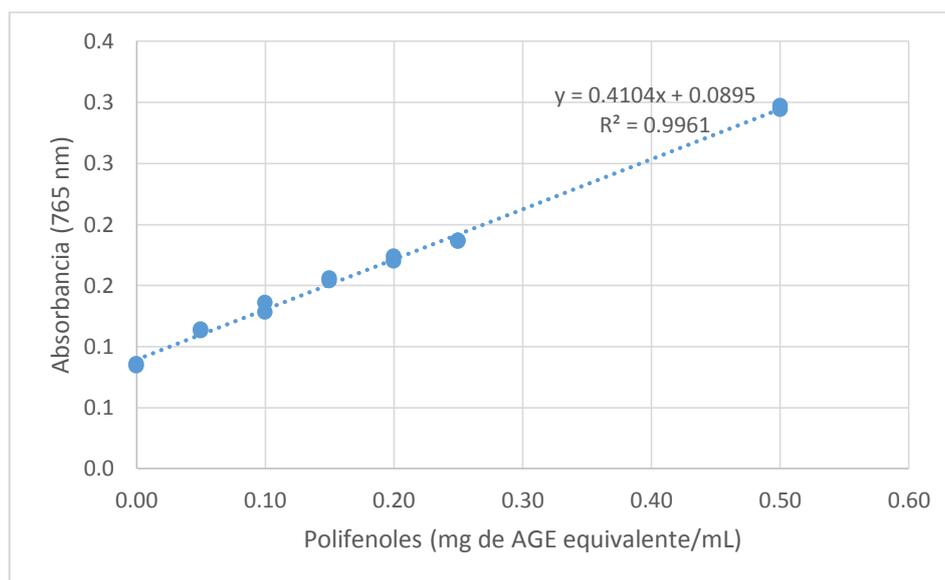
- Qu, W; Pan, Z; Ma, H. 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering* 99:16-23
- Rein, MJ. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Academic dissertation EKT series (1331, 2005, Helsinki, Finland). University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 88 p.
- Reyes, F; Cisneros, L. 2007. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry* 100:885-894.
- Ribeiro, LF; Ribani, RH; Francisco, TMG; Soares, AA; Pontarolo, R; Hamininuk, CWI. 2015. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *J. of Chromatography B* 1007:72-80.
- Rockenbach, I; Rodrigues, E; Valdemiro, L; Caliari, V; Genovese, M. I; Schmidt, A; Fett, R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry* 127:173–179.
- Romero, I. 2008. Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración. Tesis Dr. Murcia, España, Universidad de Murcia. 273 p.
- Sant'Anna, V; Brandelli, A; Ferreira, L; Tessaro, IC. 2012. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology* 100:82-87.
- Sant'Anna, V; Ferreira, L; Tessaro, I. 2013. Kinetic modeling of Anthocyanin Extraction from Grape Marc. *Food Bioprocess Technology* 6(12):3473-3480.
- Segovia, F; Corral, JJ; Almajano, MP. 2013. Estudio cinético de la extracción sólido-líquido de los compuestos polifenólicos del residuo del aguacate. *Jornades de Recerca Euetib*:131-138.

- Spagna, G; Tomaino, A; Cimino, F; Barbagallo, R; Ventura, D; Bonina, F; Saija, A. 2002. Chemical analysis and photoprotective effect of an extract of wine from Jacquez grapes. *Journal of Science of Food and Agriculture* 82:1867-1874.
- Spigno, G; De Faveri, DM. 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78:793-801.
- Spigno, G; Tramelli, L; De Faveri, DM. 2007. Effects of extraction time, temperatura and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81:200-208.
- Stebbins, N. 2017. Characterization and mechanisms of anthocyanin degradation and stabilization. Theses and Dissertations. Arkansas, United States of America, University of Arkansas. 220 p.
- Swain, T; Hillis, WE. 1959. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*. I.—The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10:63-68.
- Toledo, R. 2007. *Fundamentals of Food Process Engineering*. 3 ed. Georgia, Estados Unidos, Springer Science Business Media. 575 p.
- Tomaz, I; Maslov, L; Stupic, D; Preiner, D; Asperger, D; Karoglan, J. 2015. Recovery of flavonoids from grape skins by enzyme-assisted extraction. *Separation Science and Technology* 51(2):255-268.
- Vámos, L; Haard, N. 2009. Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15(1):49-127.
- Vashisth, T; Singh, R; Pegg, R. 2011. Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT Food Science and Technology* 44:1649-1657.
- Wrolstad, R; Durst, R; Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology* 16:423-428.

- Xu, C; Yagiz, Y; Borejsza-Wysocki, W; Lu, J; Gu, L; Ramírez-Rodrigues, M; Marshall, M. 2014. Enzyme release of phenolics from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) skins and seeds. *Food Chemistry* 157:20-29.
- Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tino: Aspectos científicos y prácticos*. 1 ed. Madrid, España, Mundi Prensa.
- Zietsman, J. 2015. *Investigating grape berry cell wall deconstruction by hydrolytic enzymes*. Dissertations (Stellenbosch, South Africa) Stellenbosch University. 167 p.
- Zoecklein, B. 2007. Grape and wine color and tannins. *Vineyard & Winery Management*. 33(1):62-88.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS (ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO)



CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES (MG DE AGE EQUIVALENTE/ML)	ABSORBANCIA	
	REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2
0.00	0.086	0.084
0.05	0.113	0.114
0.10	0.128	0.136
0.15	0.154	0.156
0.20	0.174	0.170
0.25	0.187	0.186
0.50	0.297	0.294

ANEXO 2: RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

a. Resultados obtenidos en cada corrida experimental

OrdenEst	OrdenCorrida	Concentración enzima (mg/L)	Tiempo (h)	Temperatura(°C)	IC	Antocianinas	Color polimérico (%)
17	1	40	1	25	1.41	58.24	37.46
3	2	10	2	40	2.47	77.54	45.57
6	3	40	2	40	2.23	80.75	43.56
21	4	40	1	40	1.76	69.67	43.33
10	5	10	1	25	1.55	58.85	36.98
15	6	40	2	40	2.05	75.10	45.39
18	7	10	1	40	2.79	83.80	39.19
12	8	40	1	40	1.97	76.80	40.28
20	9	40	1	25	1.48	58.59	38.58
1	10	10	2	40	2.85	96.49	40.41
23	11	10	1	25	1.50	60.67	37.53
13	12	10	1	25	1.35	52.85	36.47
5	13	10	2	25	1.37	50.76	42.25
7	14	10	1	40	2.60	86.65	38.43
2	15	10	2	40	2.42	90.23	41.66
4	16	40	2	25	1.46	51.46	45.64
16	17	10	2	25	1.39	56.33	43.03
24	18	40	2	25	1.41	55.11	47.58
14	19	40	2	25	1.65	60.83	45.96
11	20	10	2	25	1.46	57.20	42.33
22	21	40	1	25	1.39	54.76	38.71
9	22	10	1	40	2.12	76.06	40.29
8	23	40	1	40	1.89	69.84	40.67
19	24	40	2	40	2.01	68.50	43.88

a) Cuadro resumen de los resultados obtenidos en el experimento factorial

Concentración enzima (mg/L)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Antocianinas (mg Mvd 3,5 -glu mg/L)	Intensidad Colorante	Color polimérico (%)
10	1	25	57.46 ^{c,d} ± 4.09	1.46 ^d ± 0.10	36.99 ^e ± 0.53
10	1	40	82.17 ^{a,b} ± 5.48	2.50 ^{a,b} ± 0.35	39.31 ^{c,d,e} ± 0.93
10	2	25	54.76 ^d ± 3.49	1.41 ^d ± 0.05	42.54 ^{b,c} ± 0.43
10	2	40	88.08 ^a ± 9.66	2.58 ^a ± 0.23	42.55 ^{b,c} ± 2.70
40	1	25	57.20 ^{c,d} ± 2.12	1.43 ^d ± 0.05	38.25 ^{d,e} ± 0.69
40	1	40	72.10 ^{b,c} ± 4.09	1.87 ^{c,d} ± 0.11	41.43 ^{b,c,d} ± 1.66
40	2	25	55.80 ^d ± 4.72	1.51 ^d ± 0.13	46.39 ^a ± 1.04
40	2	40	74.78 ^{a,b} ± 6.13	2.10 ^{b,c} ± 0.12	44.28 ^{a,b} ± 0.98

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Tukey (p < 0.05)

b) Rendimiento de extracción de los puntos factoriales

Concentración enzima (mg/L)	Tiempo (h)	Temperatura(°C)	Antocianinas (mg Mvd 3,5 -glu mg/L)	Rendimiento de extracción de antocianinas (%)
10	1	25	57.46 ± 4.09	49.94 ± 3.56
10	1	40	82.17 ± 5.48	71.42 ± 4.76
10	2	25	54.76 ± 3.49	47.60 ± 3.03
10	2	40	88.08 ± 9.66	76.56 ± 8.39
40	1	25	57.20 ± 2.12	49.71 ± 1.84
40	1	40	72.10 ± 4.09	62.67 ± 3.54
40	2	25	55.80 ± 4.72	48.50 ± 4.11
40	2	40	74.78 ± 6.13	65.00 ± 5.33

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar.

ANEXO 3: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CONTENIDO DE ANTOCIANINAS

Efectos y coeficientes estimados para Acys mg/L (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef	SE Coef	T	P
Constante		69.060	1.627	42.45	0.000
Concentración enzima (mg/L)	-8.347	-4.173	1.627	-2.57	0.021
Tiempo (h)	0.954	0.477	1.627	0.29	0.773
Temperatura (°C)	25.123	12.561	1.627	7.72	0.000
Concentración enzima (mg/L) * Tiempo (h)	0.520	0.260	1.627	0.16	0.875
Concentración enzima (mg/L) * Temperatura (°C)	-8.343	-4.172	1.627	-2.56	0.021
Tiempo (h) * Temperatura (°C)	3.392	1.696	1.627	1.04	0.313
Concentración enzima (mg/L) * Tiempo (h) * Temperatura (°C)	-0.520	-0.260	1.627	-0.16	0.875

S = 7.96956 PRESS = 2286.50
R-cuad. = 82.22% R-cuad. (pred.) = 60.00% R-cuad. (ajustado) = 74.45%

Análisis de varianza para Acys mg/L (unidades codificadas)

Fuente GL SC Sec.

Efectos principales	3	4.39930
Concentración enzima (mg/L)	1	0.41134
Tiempo (h)	1	0.04002
Temperatura(°C)	1	3.94795
2-Interacciones de (No.) factores	3	0.57975
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)	1	0.03025
Concentración enzima (mg/L)*Temperatura(°C)	1	0.52038
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	1	0.02912
3-Interacciones de (No.) factores	1	0.00007
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)*Temperatura(°C)	1	0.00007
Error residual	16	0.46071
Error puro	16	0.46071
Total	23	5.43983

Fuente	SC Ajust.	CM Ajust.
Efectos principales	4.39930	1.46643
Concentración enzima (mg/L)	0.41134	0.41134
Tiempo (h)	0.04002	0.04002
Temperatura(°C)	3.94795	3.94795
2-Interacciones de (No.) factores	0.57975	0.19325
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)	0.03025	0.03025
Concentración enzima (mg/L)*Temperatura(°C)	0.52038	0.52038
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	0.02912	0.02912
3-Interacciones de (No.) factores	0.00007	0.00007
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)*Temperatura(°C)	0.00007	0.00007
Error residual	0.46071	0.02879
Error puro	0.46071	0.02879
Total		

Fuente	F	P
Efectos principales	50.93	0.000
Concentración enzima (mg/L)	14.29	0.002
Tiempo (h)	1.39	0.256
Temperatura(°C)	137.11	0.000
2-Interacciones de (No.) factores	6.71	0.004
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)	1.05	0.321
Concentración enzima (mg/L)*Temperatura(°C)	18.07	0.001
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	1.01	0.330
3-Interacciones de (No.) factores	0.00	0.962
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)*Temperatura(°C)	0.00	0.962
Error residual		
Error puro		
Total		

ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE COLOR POLIMÉRICO

Efectos y coeficientes estimados para Porcentaje % color polimérico (unidades codificadas)

Término	Efecto	Coef	SE Coef	T	P
Constante		41.4653	0.2684	154.49	0.000
Concentración enzima (mg/L)	2.2418	1.1209	0.2684	4.18	0.001
Tiempo (h)	4.9457	2.4728	0.2684	9.21	0.000
Temperatura(°C)	0.8473	0.4237	0.2684	1.58	0.134
Concentración enzima (mg/L)* Tiempo (h)	0.5532	0.2766	0.2684	1.03	0.318
Concentración enzima (mg/L)* Temperatura(°C)	-0.3148	-0.1574	0.2684	-0.59	0.566
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	-1.8980	-0.9490	0.2684	-3.54	0.003
Concentración enzima (mg/L)* Tiempo (h)*Temperatura(°C)	-0.7478	-0.3739	0.2684	-1.39	0.183

S = 1.31493 PRESS = 62.2454
R-cuad. = 88.29% R-cuad. (pred.) = 73.66% R-cuad. (ajustado) = 83.17%

Análisis de varianza para Porcentaje % color polimérico (unidades codificadas)

Fuente	GL	SC	Sec.
Efectos principales	3	181.220	
Concentración enzima (mg/L)	1	30.155	
Tiempo (h)	1	146.758	
Temperatura(°C)	1	4.308	
2-Interacciones de (No.) factores	3	24.045	
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)	1	1.836	
Concentración enzima (mg/L)*Temperatura(°C)	1	0.595	
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	1	21.614	
3-Interacciones de (No.) factores	1	3.356	
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)*Temperatura(°C)	1	3.356	
Error residual	16	27.665	
Error puro	16	27.665	
Total	23	236.286	

Fuente	SC	Ajust.	CM	Ajust.
Efectos principales	181.220		60.407	
Concentración enzima (mg/L)	30.155		30.155	
Tiempo (h)	146.758		146.758	
Temperatura(°C)	4.308		4.308	
2-Interacciones de (No.) factores	24.045		8.015	
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)	1.836		1.836	
Concentración enzima (mg/L)*Temperatura(°C)	0.595		0.595	
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	21.614		21.614	
3-Interacciones de (No.) factores	3.356		3.356	
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)*Temperatura(°C)	3.356		3.356	
Error residual	27.665		1.729	
Error puro	27.665		1.729	
Total				

Fuente	F	P
Efectos principales	34.94	0.000
Concentración enzima (mg/L)	17.44	0.001
Tiempo (h)	84.88	0.000
Temperatura(°C)	2.49	0.134
2-Interacciones de (No.) factores	4.64	0.016
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)	1.06	0.318
Concentración enzima (mg/L)*Temperatura(°C)	0.34	0.566
Tiempo (h)*Temperatura(°C)	12.50	0.003
3-Interacciones de (No.) factores	1.94	0.183
Concentración enzima (mg/L)*Tiempo (h)*Temperatura(°C)	1.94	0.183
Error residual		
Error puro		
Total		

ANEXO 6: DETERMINACIÓN DEL MEJOR SOLVENTE PARA LA EXTRACCIÓN A PARTIR DE ORUJOS PRE TRATADOS ENZIMÁTICAMENTE (DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR Y PRUEBA DE TUKEY)

a) Contenido de antocianinas (mg Mvd-3,5-diglu / L) obtenidas durante la extracción con solventes, posterior al pre tratamiento enzimático.

Tratamiento	1	2	3	4	5	Promedio	Desv. estándar
Agua	21.21	19.16	19.35	22.06	21.73	20.70	1.36

b) Cacace y Mazza (2003)

$$C = A[1 - \exp(-Bt)] + C[1 - \exp(-Dt)]$$

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	A	-1.67267	12.3428	-0.13552	0.90461	0.99176
	B	1.15902E6	--	--	--	--
	C	89.97391	11.73644	7.6662	0.01659	0.98901
	D	0.03113	0.00613	5.07966	0.03664	0.86481

Reduced Chi-sqr = 1.088173553

COD(R*2) = 0.9914675428851

Iterations Performed = 18

Total Iterations in Session = 25

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

Statistics

	B
Number of Points	6
Degrees of Freedom	2
Reduced Chi-Sqr	1.08817
Residual Sum of Squares	2.17635
R-Square(COD)	0.99147
Adj. R-Square	0.97867
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Regression	4	5590.05353	1397.51338	1284.27435	7.78145E-4
	Residual	2	2.17635	1.08817		
	Uncorrected Total	6	5592.22987			
	Corrected Total	5	255.06687			

c) Pseudo-primer orden

$$C = C_{\infty} - \frac{C_{\infty}}{\exp(kt + a)}$$

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	Cinf	88.3012	1.31858	66.96665	7.33747E-6	0.41802
	k	0.03113	0.005	6.22132	0.00837	0.86481
	a	-0.01877	0.11213	-0.1674	0.8777	0.82885

Reduced Chi-sqr = 0.725448980173

COD(R*2) = 0.99146754353388

Iterations Performed = 4

Total Iterations in Session = 4

Fit converged - Chi-sqr no longer changed.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

Statistics

B	
Number of Points	6
Degrees of Freedom	3
Reduced Chi-Sqr	0.72545
Residual Sum of Squares	2.17635
R-Square(COD)	0.99147
Adj. R-Square	0.98578
Fit Status	Succeeded(101)

Fit Status Code :
101 : Fit converged - Chi-sqr no longer changed.

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Regression	3	5590.05353	1863.35118	2568.54889	1.41002E-5
	Residual	3	2.17635	0.72545		
	Uncorrected Total	6	5592.22987			
	Corrected Total	5	255.06687			

d) Segundo orden

$$C_t = \frac{C_e^2 kt}{1 + C_e kt}$$

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	Ce	103.70744	4.01493	25.83043	1.33444E-5	0.84643
	k	3.39939E-4	7.37023E-5	4.61233	0.00994	0.84643

Reduced Chi-sqr = 1.83117703283
COD(R²) = 0.97128318463974
Iterations Performed = 7
Total Iterations in Session = 8
Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.
Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

Statistics

B	
Number of Points	6
Degrees of Freedom	4
Reduced Chi-Sqr	1.83118
Residual Sum of Squares	7.32471
R-Square(COD)	0.97128
Adj. R-Square	0.9641
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :
100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

ANOVA

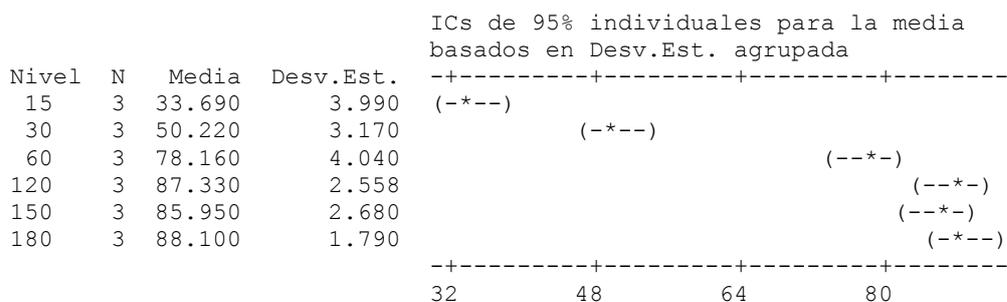
		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Regression	2	5584.90517	2792.45258	1524.94954	2.56888E-6
	Residual	4	7.32471	1.83118		
	Uncorrected Total	6	5592.22987			
	Corrected Total	5	255.06687			

ANEXO 9: EVALUACIÓN DE TIEMPO ADECUADO DE PRE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO CON LA METODOLOGÍA DE VARIACIÓN NO SIGNIFICATIVA EN CINÉTICA (VNSC)

ANOVA unidireccional: Antocianinas (mg/L) vs. Tiempo (min)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tiempo (min)	5	7969.82	1593.96	161.49	0.000
Error	12	118.44	9.87		
Total	17	8088.27			

S = 3.142 R-cuad. = 98.54% R-cuad. (ajustado) = 97.93%



Desv.Est. agrupada = 3.142

Agrupar información utilizando el método de Fisher

Tiempo (min)	N	Media	Agrupación
180	3	88.100	A
120	3	87.330	A
150	3	85.950	A
60	3	78.160	B
30	3	50.220	C
15	3	33.690	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza individuales de Fisher del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tiempo (min)