

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para
optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

**Evaluación de la extracción etanólica asistida por ultrasonido de los polifenoles de un
subproducto del procesamiento de la mora**

Elaborado por:

Mariana Wilson Hidalgo

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2020

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por:

M. Sc Ana Lucía Mayorga Gross
Presidente del Tribunal

Ing. Eduardo Enrique Thompson Vicente
Director del Proyecto

Lic. Ana María Quirós Blanco
Asesora del Proyecto

Lic. Johan Gerardo Jiménez Arias
Asesor del Proyecto

M. Sc. Carolina Cortés Herrera
Profesora designada

DEDICATORIA

A mi madre, ejemplo a seguir; personificación de lo moralmente correcto, el apoyo incondicional y la perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Tecnología de Alimentos, el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, sus docentes e investigadores y a la Universidad de Costa Rica por el apoyo durante mi proceso de formación y el invaluable asesoramiento brindado para la realización de este trabajo de investigación. A mi familia y amigos por el apoyo incondicional durante todo el proceso.

Índice General

TRIBUNAL EXAMINADOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
Índice General	vi
Índice de Cuadros	ix
Índice de Figuras	xi
Nomenclatura	xiii
Resumen	xiv
1. Justificación	1
2. Objetivos	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. Marco Teórico	9
3.1. Generalidades de la mora	9
3.1.1. Cultivo y producción de mora en Costa Rica	9
3.1.2. Los subproductos del procesamiento de mora.....	10
3.2. Compuestos fenólicos	11
3.2.1. Compuestos fenólicos en plantas y subproductos agroindustriales	18
3.2.2. Compuestos fenólicos en la mora	18
3.2.2.1. Antocianinas	19
3.2.2.2. Elagitaninos.....	20
3.2.3. Compuestos fenólicos en la variedad <i>Rubus adenotrichos</i> en Costa Rica.....	20
3.3. Actividad biológica de los compuestos fenólicos en la mora.....	20
3.4. Extracción de biomoléculas a partir de fuentes vegetales	22
3.4.1. La extracción sólido-líquido	22
3.4.2. Parámetros que influyen la extracción sólido-líquido.....	23
3.4.2.1. Preparación previa del sustrato	23
3.4.2.2. Naturaleza del disolvente de extracción	23
3.4.2.3. Temperatura y tiempo de extracción.....	24
3.4.2.4. Agitación del medio de extracción	25

3.4.2.5. Relación sólido-líquido.....	25
3.5. Métodos de extracción sólido-líquido	26
3.5.1. Extracciones convencionales	26
3.5.1.1. Maceración.....	26
3.5.1.2. Infusión.....	26
3.5.1.3. Extracción Soxhlet.....	27
3.5.2. Extracciones alternativas.....	27
3.5.2.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	28
3.5.2.2. Variables que afectan la EAU	30
4. Materiales y métodos	31
4.1. Localización	31
4.2. Materia prima.....	31
4.3. Extracción de polifenoles	31
4.3.1. Equipo de extracción.....	31
4.3.2. Sistemas de extracción	32
4.3.2.1. Extracción asistida por ultrasonido.....	32
4.3.2.2. Extracción convencional	32
4.3.3. Evaluación del efecto de la preparación del subproducto de la mora	32
4.3.3.1. Análisis de datos	36
4.3.4. Evaluación de los parámetros de extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	37
4.3.4.1. Verificación de los modelos	40
4.3.4.2. Análisis de datos	40
4.3.5. Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles	41
4.3.5.1. Análisis de datos	42
4.3.6. Caracterización del extracto de polifenoles	43
4.3.6.1. Análisis de datos	43
4.4. Análisis fisicoquímicos	44
4.4.1. Contenido de polifenoles totales.....	44
4.4.2. Contenido de antocianinas y elagitaninos	44
4.4.3. Capacidad antioxidante	45

4.4.4. Humedad	45
4.4.5. Cenizas totales	46
4.4.6. Acidez total.....	46
4.4.7. Contenido de etanol.....	46
4.4.8. Contenido de azúcares simples.....	47
5. Resultados y Discusión.....	48
5.1. Evaluación del efecto de la preparación del subproducto de la mora	48
5.1.1. Polifenoles Totales	48
5.1.2. Antocianinas	50
5.1.3. Elagitaninos.....	53
5.1.4. Comportamiento general de las cinéticas.....	55
5.2 Evaluación de las condiciones de extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	57
5.2.1. Aplicación del diseño central compuesto rotable	58
5.2.1.1. Comportamiento de la extracción de polifenoles totales.....	63
5.2.1.2. Comportamiento de la extracción de antocianinas	66
5.2.1.3. Comportamiento de la extracción de elagitaninos	68
5.2.2. Zonas óptimas de extracción	69
5.2.3. Verificación de los modelos obtenidos en los puntos de mayor extracción	70
5.2.3. Función de Deseabilidad	71
5.3. Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles. 74	
5.3.1. Polifenoles Totales	74
5.3.2. Antocianinas	78
5.3.3. Elagitaninos.....	80
5.3.4. Generalidades del comportamiento de las cinéticas de extracción	81
5.4. Caracterización del extracto de polifenoles	83
6. Conclusiones	88
7. Recomendaciones	89
8. Bibliografía	91
9. Anexos	104
9.1. Análisis de Varianza de los Modelos de la Superficie de Respuesta	104
9.2. Probabilidad de los coeficientes de regresión de los modelos.....	104

Índice de Cuadros

Cuadro I. Clasificación de los compuestos fenólicos según Harborne y Simmonds (1964).	12
Cuadro II. Composición de compuestos fenólicos de la mora variedad <i>Rubus adenotrichos</i>	20
Cuadro III. Condiciones de extracción de polifenoles a partir del subproducto de mora.	33
Cuadro IV. Variables del diseño central compuesto y sus respectivos niveles codificados y sin codificar para analizar la EAU.	37
Cuadro V. Diseño Central Compuesto Rotable para la optimización de la EAU de polifenoles a partir del subproducto de mora.	39
Cuadro VI. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de polifenoles totales del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido.	49
Cuadro VII. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de polifenoles totales del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido	49
Cuadro VIII. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de antocianinas del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido.	51
Cuadro IX. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de antocianinas del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido	51
Cuadro X. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de ET de SMS y SMF.	53
Cuadro XI. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de elagitaninos del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido	54
Cuadro XII. Valores obtenidos de las variables respuesta analizadas en los extractos, en la optimización de extracción de polifenoles del subproducto de mora seco y molido.	57
Cuadro XIII. Parámetros de ajuste y bondad obtenidos para cada variable al aplicar la metodología de superficie de respuesta.	58
Cuadro XIV. Ámbitos de los factores donde se obtuvo la zona óptima de cada variable respuesta.	69
Cuadro XV. Valores de las variables respuesta, predichos según el modelo, y obtenidos por experimentación durante la verificación de dos puntos en la zona óptima de la superficie de respuesta	70

Cuadro XVI. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de polifenoles totales del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.	75
Cuadro XVII. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de polifenoles totales del del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido	75
Cuadro XVIII. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de antocianinas del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	78
Cuadro XIX. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de antocianinas del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.	79
Cuadro XX. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de elagitaninos del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	80
Cuadro XXI. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de elagitaninos del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	81
Cuadro XXII. Parámetros obtenidos para la caracterización del extracto bajo las condiciones óptimas de extracción.	83
Cuadro XXIII. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de diferentes productos y subproductos vegetales.....	84
Cuadro XXIV. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en 100 g de SMS.....	104
Cuadro XXV. Probabilidad de los coeficientes de regresión de los modelos generados en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en 100 g de SMS.....	104

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del fruto de la mora.....	9
Figura 2. Subproducto del procesamiento de la mora (cáscaras y semillas).	11
Figura 3. Estructura del fenol.	11
Figura 4. Estructura general de un flavonoide.....	13
Figura 5. Cation pirilio.	13
Figura 6. Estructura de antocianidinas comunes (Nollet y Toldrá, 2012).	14
Figura 7. Estructura general de una antocianina.	14
Figura 8. Estructuras del ácido gálico (a) y el ácido elágico (b).	15
Figura 9. Ejemplos de derivados simples del ácido gálico.....	16
Figura 10. Ejemplo de la estructura de un galotanino.	17
Figura 11. Estructura del ácido hexahidroxideifénico (a) y ejemplo de la estructura de un elagitanino (b).....	18
Figura 12. Cianidin-3-glucósido (a) y cianidin-3-rutinósido (b).....	19
Figura 13. Proceso de compresión (C) y rarefacción (R) del líquido durante el efecto de la cavitación.....	28
Figura 14. Etapas de la cavitación en un proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir de una matriz vegetal.	29
Figura 15. Esquema del equipo a ser utilizado en la Extracción Convencional (EC) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).....	32
Figura 16. Cinéticas de extracción de PT del SMS y SMF.	48
Figura 17. Cinéticas de extracción de AT del SMS y SMF	50
Figura 18. Cinéticas de extracción de ET del SMS y SMF.....	53
Figura 19. Valores predichos contra residuos para la variable Concentración de PT.....	59
Figura 20. Valores predichos contra residuos para la variable Concentración de AT	59
Figura 21. Valores predichos contra residuos para la variable Concentración de ET.....	59
Figura 22. Gráficas de contorno para la optimización de PT del SMS.	63
Figura 23. Gráficas de contorno para la optimización de AT del SMS.	66

Figura 24. Gráficas de contorno para la optimización de ET del SMS.....	68
Figura 25. Gráficas de la función de deseabilidad.	71
Figura 26. Cinéticas (a) y modelos (b) de extracción de polifenoles totales del SMS mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU).....	74
Figura 27. Cinéticas (a) y modelos (b) de extracción de antocianinas del SMS mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU).	78
Figura 28. Cinéticas (a) y modelos (b) de extracción de elagitaninos del SMS mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU).	80

Nomenclatura

AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro
AE	Ácido elágico
AG	Ácido gálico
AT	Antocianinas
BS	Base seca
BH	Base húmeda
C3G	Cianidin-3-O-glucósido
E	Rendimiento de extracción
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EC	Extracción convencional
ET	Elagitaninos
EtOH	Etanol
k	Constante de velocidad de extracción
ρ	Densidad
PT	Polifenoles totales
R²	Coefficiente de determinación
R²_{adj}	Coefficiente de determinación ajustado
SMF	Subproducto de mora fresco
SMS	Subproducto de mora seco y molido

Resumen

Wilson Hidalgo, Mariana

Evaluación de la extracción etanólica asistida por ultrasonido de los polifenoles de un subproducto del procesamiento de la mora

Tesis de Licenciatura de Ingeniería de Alimentos – San José, Costa Rica.

Wilson, M. 2020.

93 pp : 28 il. - 108 ref.

Los compuestos fenólicos de ciertos frutos presentan bioactividad, la cual genera demanda de extractos de dichos compuestos para consumo en busca de beneficios a la salud. Los cultivares de la mora *Rubus adenotrichos* de Costa Rica se destacan debido al contenido apreciable de compuestos fenólicos, principalmente de antocianinas y elagitaninos.

La mora se utiliza a nivel industrial y genera una mezcla de cáscaras y semillas como desecho que representa el 20 % del peso del fruto, el cual puede ser una fuente aprovechable de estos compuestos. Las tecnologías de procesamiento verdes son de interés para recuperar de forma efectiva y sostenible compuestos de alto valor agregado, como los ya mencionados, en reemplazo de métodos convencionales que consumen más energía.

Se destaca la extracción asistida por ultrasonido (EAU) como técnica que permite mejorar la eficiencia de obtención de polifenoles. La sostenibilidad de las extracciones se beneficia por el uso de disolventes, como el etanol, que son obtenidos por procesos biológicos y no derivados de combustibles fósiles. Por ende, se planteó evaluar las condiciones de extracción de polifenoles de un subproducto de la mora (*Rubus adenotrichos*), con etanol como disolvente, en condiciones convencionales y utilizando ultrasonido de manera directa con el fin de valorizar un residuo a través de la obtención de un extracto funcional utilizando una tecnología verde.

Se seleccionó el tratamiento de la semilla de mora que favorece la extracción de compuestos fenólicos realizando cinéticas de primer orden con la semilla de mora seca y molida (SMS) y la semilla de mora fresca (SMF). Mediante un diseño irrestricto aleatorio de

dos tratamientos (SMS y SMF) se comparó la constante de velocidad (k) y el rendimiento de extracción (E) para las variables de concentración de polifenoles totales (PT), antocianinas (AT) y elagitaninos (ET).

Se presentaron diferencias significativas entre los E y las k de la extracción de PT para SMF ($4,0 \pm 0,6$ % y $1,2 \pm 0,4$ min⁻¹) y SMS (35 ± 2 % y $2,0 \pm 0,3$ min⁻¹), al igual que la hay entre los E de la extracción de AT para SMF y SMS (4 ± 1 % y 29 ± 5 %, respectivamente), con una significancia de 5 %; siendo mayores los valores obtenidos para SMS. Por lo que el secado y la molienda son el pretratamiento seleccionado.

Seguidamente, se determinaron las condiciones óptimas de la EAU con la SMS, utilizando un diseño Central Compuesto Rotable con tres factores (concentración de etanol, amplitud del ultrasonido y temperatura) en cinco niveles con las mismas variables respuesta. El punto óptimo de extracción para la SMS de PT, AT y ET fue de 60 °C, 30 % (m/m) de etanol y 65 % de amplitud del ultrasonido para una deseabilidad de 0,94.

Finalmente, se evaluó el efecto del ultrasonido bajo las condiciones 25 °C, 30 % (m/m) de etanol y 65 % de amplitud del ultrasonido, seleccionadas de la RSM (exceptuando la temperatura), sobre la extracción; mediante un modelo irrestricto aleatorio de dos tratamientos se comparó la constante de velocidad (k) y el rendimiento (E) de la EAU y la extracción convencional (EC) utilizando las mismas variables respuesta.

No hay diferencia significativa entre los E y las k para las cinéticas de extracción de PT (77 ± 4 % y 73 ± 2 %; $1,8 \pm 0,9$ min⁻¹ y $1,6 \pm 0,2$ min⁻¹), AT (33 ± 5 % y 36 ± 7 %; $1,2 \pm 0,3$ min⁻¹ y 1 ± 2 min⁻¹) y ET (18 ± 6 % y 19 ± 6 %; 2 ± 1 min⁻¹ y $1,8 \pm 0,9$ min⁻¹) utilizando EC y EAU, respectivamente, con una significancia del 5 %. Por lo tanto, no se observa un efecto positivo para el uso del ultrasonido en la extracción de compuestos fenólicos del SMS en comparación con el uso de una EC.

El extracto obtenido bajo las condiciones de EAU óptimas presentó contenidos menores al 1 % de posibles interferentes como sólidos totales, azúcares, cenizas y ácidos libres, mientras que presenta un contenido considerable de PT, AT y ETs (6485 ± 83 mg AG/100 g BS, 205 ± 6 mg C3G/100 g BS y 482 ± 26 mg AE/100 g BS, respectivamente).

El uso del subproducto del procesamiento de la mora con un pretratamiento de secado y molienda y de un proceso de extracción utilizando como las condiciones óptimas de extracción encontradas (60 °C, 30 % (m/m) de etanol y 65 % de amplitud del ultrasonido) permitió la obtención de un extracto con un alto contenido de compuestos fenólicos que le aportan valor agregado.

Palabras clave: extracción asistida por ultrasonido, mora, optimización, antocianinas, elagitaninos.

Lic. Eduardo Thompson Vicente

Escuela de Tecnología de Alimentos

1. Justificación

Las ciencias de los alimentos y de la nutrición han dirigido su enfoque hacia el diseño de alimentos que promueven la salud y disminuyen el riesgo de enfermedades, ante la demanda de consumidores conscientes que buscan productos funcionales y nutracéuticos para mejorar sus condiciones de salud.

Siguiendo esta tendencia, en las últimas décadas ha aumentado el interés en la investigación de las frutas y particularmente las bayas, debido a que son una fuente considerable de compuestos bioactivos, los cuales se usan como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales. Las bayas han recibido especial atención en función de su alto contenido de fitoquímicos, en particular, de compuestos fenólicos como los flavonoides, que incluyen a las antocianinas y los elagitaninos (Zhao, 2007).

Un miembro importante de las bayas son las moras (*Rubus* sp.), que poseen un alto contenido de polifenoles totales en el rango de 114 - 1056 mg/100 g en base húmeda (Zhao, 2007), los cuales confieren a esta fruta su importante capacidad antioxidante. Se denominan compuestos bioactivos aquellos que pueden tener un efecto positivo sobre la salud humana (Biesalski *et al.*, 2009) y, en el caso de los polifenoles presentes en las moras, su consumo se relaciona específicamente con la disminución del riesgo de obesidad, enfermedad coronaria, condiciones degenerativas y diversos tipos de cáncer (Kaume, Howard y Devareddy, 2012).

Se ha encontrado que la biodisponibilidad “*in vitro*” de los polifenoles totales en diferentes bayas puede ser entre 33 % - 73 % y de las antocianinas entre 9,9 % - 31,7 %, lo cual se considera baja (Marhuenda *et al.*, 2016). Diversos autores mencionan que la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos es pobre ya que la cantidad de barreras que tienen que atravesar los compuestos para llegar al sitio activo es elevada, sin embargo, también se genera controversia con respecto a los resultados obtenidos por métodos “*in vitro*” e “*in vivo*” (Scheepens *et al.*, 2010; Marhuenda *et al.*, 2016; Teng y Chen, 2018).

Recientemente, el consenso radica en que la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos es incierta y que se requiere encontrar mayor correlación entre ambos tipos de estudios, al igual que se concluye que se necesitan realizar intervenciones “*in vivo*” mejor

ejecutadas y estudios mecanísticos “*in vitro*” para comprender completamente cómo interactúan las moléculas de interés con los procesos patológicos y fisiológicos del ser humano (Marhuenda *et al.*, 2016; Teng y Chen, 2018).

Aun así, debido a la bioactividad que presentan, han tomado importancia los extractos de los compuestos fenólicos, especialmente de las antocianinas para su comercialización y consumo como suplementos nutricionales o ingredientes de alimentos y otros productos. Tal es el caso de los extractos en polvo de mora “Live Superfoods Blackberry Powder” y el “Organic Blackberry Whole Food Powder” (Live Superfoods, 2017; Nubeleaf, 2017).

La investigación concerniente a los compuestos fenólicos de la mora se ha centrado principalmente en cultivos comerciales ubicados en zonas templadas, con menos atención a la mora cultivada en tierras altas tropicales como es el caso de la variedad *Rubus adenotrichos* (Acosta-Montoya *et al.*, 2010), la cual se encuentra en Costa Rica.

Los cultivares de *Rubus adenotrichos* se destacan debido a su alta actividad antioxidante, relacionada con el contenido apreciable de compuestos fenólicos, principalmente las antocianinas y los elagitaninos, en comparación con otros cultivos comerciales (Acosta-Montoya *et al.*, 2010). Debido al clima tropical, estas moras crecen en un ambiente más estresante que puede aumentar la producción de antioxidantes como mecanismo de defensa, por lo que explotar esta característica de las moras del país resulta de gran interés.

Según Banerjee *et al.* (2017), las empresas procesadoras de frutas son responsables por la generación de más de 0,5 billones de toneladas de residuos a nivel mundial. En este mismo nivel, la producción anual específica de la mora es de 154.578 toneladas al año (Kaume, Howard y Devareddy, 2012). En Costa Rica, en el Centro Nacional de Abastecimiento y Distribución de Alimentos (CENADA), se comercializaron 414.900 kg de mora nacional y se importaron 43.559 kg de mora durante el año 2016 (CNP, 2017).

En el país, esta fruta tiene múltiples usos en la industria alimentaria, como materia prima en la elaboración de diversos productos como jugos, pulpas, jaleas, mermeladas y toppings. El procesamiento de la mora para la obtención de estos productos alimenticios genera una mezcla de cáscaras y semillas, residuo que es desechado y que puede representar

aproximadamente un 20 % del peso de la mora (Soto, 2014; Zúñiga, 2017). Encontrar un mecanismo para aportar valor agregado a este subproducto puede ser beneficioso para el medio ambiente y la economía.

El contenido de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos de este tipo de subproducto ha sido analizado, debido a la evidencia de su contenido en el fruto. Quirós (2016) determinó que el subproducto de la mora, obtenido del prensado de la misma, para la elaboración de jugo, contiene en base húmeda 1728,5 mg AG (ácido gálico)/100 g de polifenoles totales, 152,4 mg C3G (cianidin-3-glucósido)/100 g de antocianinas y 417,7 mg AE (ácido elágico)/100 g de elagitaninos.

De manera similar, Soto (2014) encontró un contenido de polifenoles totales en base húmeda de 959 mg AG/100 g en el subproducto de la mora, en comparación con un contenido de polifenoles totales en base húmeda de 598 mg AG/100 g reportado en el fruto entero de la mora (*R. adenotrichos*) (Gancel *et al.*, 2011). Además, se determinó un contenido de 252 mg AE/100 g de elagitaninos y 55 mg C3G/100 g de antocianinas, ambos en base húmeda, en el mismo subproducto (Soto, 2014).

Kosmala *et al.* (2017) realizaron extracciones con mezclas de etanol/agua y acetona/agua a la torta del prensado de la mora y obtuvieron que el extracto liofilizado obtenido está compuesto de un 29,32 % de polifenoles totales, 24,8 % de elagitaninos totales y 2,71 % de antocianinas. Lo cual indica que el subproducto puede ser una fuente importante de estos compuestos fenólicos, no solo al comparar con la mora, pero también al considerar que es un desecho de la industria.

Los residuos de la industria alimentaria deben recibir un tratamiento que reduzca su carga contaminante y se cumpla con la normativa nacional sobre el manejo de este tipo de subproductos. La Ley de la Gestión Integral de Residuos N° 8839 (La Gaceta, 2010) y el Reglamento sobre el manejo de residuos sólidos ordinarios N° 36093-S (SCIJ, 2010) buscan principalmente salvaguardar la salud pública y el medio ambiente, pero también hacen hincapié en el uso eficiente de los recursos, de manera que se recomienda valorizar los subproductos industriales antes de que estos se conviertan en desechos.

No solo es importante el adecuado manejo de estos subproductos para cumplir con la legislación; al igual se puede realizar como una actividad para aquellas empresas que desean certificaciones con normas de gestión ambiental o que desean mejorar sus estándares mediante la adopción de procesos más sostenibles, con el fin de aumentar su competitividad.

Ante esta temática de protección del medio ambiente, sostenibilidad y valorización de los residuos industriales de la industria alimentaria, es relevante la introducción de las tecnologías de procesamiento verdes. Estas tecnologías emergentes tienen un creciente interés debido a su potencial para recuperar efectiva y sosteniblemente compuestos de alto valor agregado, con un menor consumo de energía, en reemplazo de métodos convencionales que se basan en el uso de altas temperaturas (Barba *et al.*, 2016).

La extracción asistida por ultrasonido es considerada una técnica verde ya que ha demostrado reducir el consumo de tiempo, energía y disolventes orgánicos costosos necesarios en la operación, debido a la cavitación generada que permite la remoción de material, aumentando el área superficial disponible para la transferencia de masa de los solutos durante la extracción (Ameer *et al.*, 2017).

Diferentes autores destacan a la extracción asistida por ultrasonido como una técnica simple, segura, rápida, versátil, amigable con el ambiente y económica, que es fácil de implementar a nivel industrial y que permite mejorar la eficiencia de obtención de polifenoles (Barba *et al.*, 2016; Ameer *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Para su aplicación, diversos estudios utilizan diseños experimentales basados en la metodología de superficie de respuesta ya que esta permite determinar las condiciones de la extracción asistida por ultrasonido que generan un extracto con las mayores cantidades de los compuestos de interés (Khan *et al.*, 2010; Pradal *et al.*, 2016; Quirós, 2016).

Asociado a los procesos de extracción, se ha generado una problemática ambiental y social por el uso de disolventes convencionales obtenidos de combustibles fósiles, lo cual ha llevado a la búsqueda de nuevos disolventes ambientalmente sostenibles producto de procesos biológicos (también conocidos como “*bio-based*”, en inglés). Estos procesos biológicos se basan en la conversión de la biomasa ya sea en combustibles, energía o

sustancias químicas como las que se utilizan en los procesos de extracción (Pena-Pereira y Tobiszewski, 2017).

Adicionalmente, la extracción de polifenoles a partir de residuos vegetales requiere el uso de disolventes que deben ser compatibles con el uso final de los compuestos biológicos como suplementos alimenticios, para evitar costos adicionales debido a la purificación requerida o la presencia de sustancias que pueden afectar la salud de los consumidores; en estos casos, uno de los disolventes más comúnmente usados es el etanol (Rodríguez-Cabo *et al.*, 2018). Este puede ser obtenido a través de procesos de fermentación de la biomasa, es considerado biodegradable de acuerdo con su tecnología de producción y su polaridad es adecuada para la extracción de fitoquímicos polares tales como los polifenoles, y por esto se selecciona como el disolvente de interés en procesos de extracción amigables con el ambiente (Panja, 2017).

En el área de la obtención de compuestos de valor biológico a partir de subproductos se han realizado diversos trabajos que utilizan el etanol y la extracción asistida por ultrasonido como factores de sistemas que buscan ser eficientes y amigables con el ambiente. Ivanovic *et al.* (2014) y Oancea *et al.* (2013) combinaron estos factores para obtener un extracto fenólico rico en antocianinas a partir de sustratos como moras y cerezas; Da Porto, Porretto y Decorti (2013) compararon una extracción con ultrasonido respecto a una convencional para obtener polifenoles a partir de semillas de uva; por otro lado, D'Alessandro *et al.* (2014) y Pradal *et al.* (2016) estudiaron las cinéticas de extracción de antocianinas utilizando etanol y ultrasonido a partir de residuos de *Aronia melanocarpa* y achicoria.

En Costa Rica, Quirós (2016) investigó la extracción de polifenoles de un subproducto de mora utilizando mezclas de etanol/agua con una concentración de etanol entre 50 y 85 % m/m, con el uso de un sistema indirecto de ultrasonido que, de acuerdo con sus resultados, no logró aumentar la velocidad de extracción (k) de los polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos del subproducto industrial de la mora debido a su forma indirecta de aplicación.

Cabe rescatar que la tecnología de sonicación puede ser aplicada de manera directa o indirecta. En la primera, la sonda que transmite la energía a la muestra se encuentra en contacto directo con la misma, mientras que en la alternativa indirecta la energía se transfiere de la sonda al agua y de esta a la muestra. La sonicación directa es el método más comúnmente utilizado para procesar muestras con este tipo de tecnología (QSONICA, 2012). Por esto, en el presente trabajo el interés es emplear la tecnología del ultrasonido de manera directa para evaluar su efecto en la extracción de los compuestos de interés.

Otro factor que puede influir en los resultados de la extracción es el tratamiento previo que se aplique al subproducto, el cual influye en aspectos económicos y de facilidad de manejo del procesamiento. La vida útil de la mora es relativamente corta, ya que puede mantener sus características de 2 a 3 días a una temperatura de 0 °C (Joo *et al.*, 2011) y lo mismo sucede con el subproducto, que no solo se compone de semilla, pero también de cáscara. Por lo tanto, es de interés evaluar preliminarmente dos tratamientos básicos de conservación, el secado y la congelación.

El subproducto del procesamiento de la mora puede ser almacenado en congelación a -20 °C hasta 7 meses, reteniendo los compuestos de interés (Veberic *et al.*, 2014). Sin embargo, la congelación implica un consumo energético sostenido durante el periodo de almacenamiento. Por otro lado, el secado puede extender la vida útil del subproducto en condiciones ambientales al reducir la actividad de agua y otras reacciones de degradación, aunque implique un consumo energético inicial (Lutz *et al.*, 2015).

Se ha encontrado que, al secar mediante aire caliente, el contenido de polifenoles totales en la mora podría aumentar, debido a la formación de nuevos compuestos, pasando de 22,1 mg AG/g a 126,3 mg AG/g (Lutz *et al.*, 2015) o podría verse reducido, debido a la degradación, como en el caso de las antocianinas, hasta en un 91 %, en comparación con una muestra fresca (Sadowska *et al.*, 2017).

Por último, la caracterización del extracto obtenido es de importancia ya que permite comparar los contenidos de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos, al igual que su capacidad antioxidante, con los de otros productos similares, para establecer la efectividad de la extracción y la viabilidad de aplicar el método a mayor escala.

Adicionalmente, permite la determinación de variables como la humedad, las cenizas, la acidez y el contenido de azúcares y etanol, que pueden jugar un papel en el tratamiento posterior de la muestra, de manera a facilitar su conservación y consumo, como lo es el secado para obtener un polvo, como los productos mencionados anteriormente.

El objetivo del estudio que se plantea a continuación, es evaluar las condiciones de un proceso de extracción de polifenoles, de un subproducto del procesamiento de la mora, incluyendo su método de preparación previo al ensayo, a través de mezclas de etanol-agua, tanto en condiciones convencionales, como con la utilización de ultrasonido de manera directa, para generar un procedimiento que permita valorizar este residuo y obtener un extracto funcional con una tecnología amigable con el ambiente.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar las condiciones del proceso de extracción de polifenoles de un subproducto del procesamiento de la mora con soluciones de etanol-agua, asistida por ultrasonido aplicado de manera directa, como alternativa al proceso de extracción convencional para obtener un extracto de polifenoles con composición adecuada para el procesamiento industrial.

2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la preparación del sustrato sobre la extracción asistida por ultrasonido (EAU) de los polifenoles de un subproducto del procesamiento de mora, para la determinación del método de preservación que potencia el desempeño de la tecnología.
2. Evaluar las condiciones de proceso (temperatura, composición del disolvente y potencia del ultrasonido), para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de los polifenoles del subproducto de mora, a escala de laboratorio, mediante un diseño central compuesto rotatable y evaluación por superficie de respuesta.
3. Evaluar el efecto del método de extracción, convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU), de polifenoles del subproducto de mora para la valoración de la tecnología como potencial alternativa de extracción de dichos compuestos.
4. Determinar la composición fisicoquímica y la capacidad antioxidante del extracto de los polifenoles del subproducto de mora, obtenido con las condiciones óptimas de la extracción asistida por ultrasonido (EAU).

3. Marco Teórico

3.1. Generalidades de la mora

La mora pertenece a un diverso grupo de especies e híbridos del género *Rubus*, subgénero *Rubus* (previamente conocido como *Eubatus*), con más de 700 especies descritas. Son un cultivo que puede ser encontrado en todos los continentes (con excepción de la Antártica) en zonas templadas (Hall y Funt, 2017).

Desde el punto de vista de la horticultura, cada fruto de la mora es una agregación de drupas; cada drupa se deriva de un ovario que produce una semilla dura, revestida por un mesocarpio carnoso contenido en un exocarpo (cáscara). Las drupas están unidas mediante un receptáculo y cuando el fruto alcanza la madurez, tanto las drupas como el receptáculo se separan del tallo (Hall y Funt, 2017).

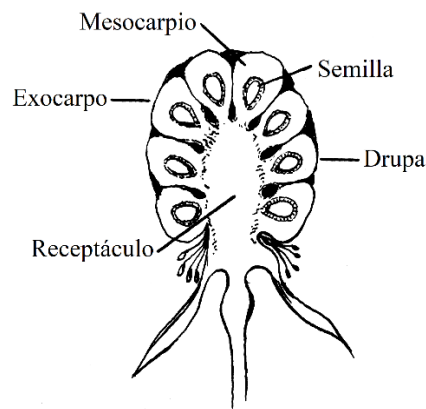


Figura 1. Estructura del fruto de la mora.

3.1.1. Cultivo y producción de mora en Costa Rica

En Costa Rica, la mora es cultivada en San Vito, cantón de Coto Brus, en la región de Los Santos en los cantones de Tarrazú, Dota y León Cortés, en la zona de Pérez Zeledón, en el cantón de El Guarco, provincia de Cartago (Madrigal *et al.*, 2017) y en Desamparados (CNP, 2017).

En el país, se pueden encontrar variedades de mora criolla e híbridos. Las moras criollas son aquellas que crecen de manera natural y se conocen como: Vino (*Rubus*

adenotrichos) con espinas (rojas o blancas) y sin espinas, Negrita (*Rubus miser lebm*), Ratón (*Rubus urticifolius*), Castilla (*Rubus glaucus*) y Caballo (*Rubus urticifolius*) (Orozco, 2011).

Por otro lado, las moras híbridas son originarias de América del Norte, específicamente de Carolina, Michigan y Texas, y sus variedades se denominan Brazos, Cherokee y Comanche (Castro y Cerdas, 2005). La variedad criolla Vino (*Rubus adenotrichos*) es la más explotada nacionalmente, debido a su mayor producción, calidad y aceptación (Flores *et al.*, 2003).

Según Mena (2017), el cantón de Pérez Zeledón es el que genera mayor producción con un 48 % del área sembrada, seguido por la zona de Dota con un 32 % y las zonas de El Guarco y Tarrazú con un 7 % y 6 %, respectivamente. En el año 2016 el CENADA recibió 414.900 kg de mora, donde el 92 % de este lo aportó la zona de Dota (CNP, 2017). Esto evidencia los grandes volúmenes de mora que se manejan en el país.

3.1.2. Los subproductos del procesamiento de mora

La mora puede ser consumida en diversas formas, ya sea fresca o después de haber recibido un proceso industrial (Castro y Cerdas, 2005). Sin embargo, según Leitón (2008), se estima que a nivel mundial solo un 10 % de la producción de mora se consume fresca, mientras que el otro 90 % de la mora se consume de forma procesada. Se puede encontrar en forma de pulpas, mermeladas, jaleas, refrescos, vinos y productos lácteos, como los helados y los batidos (Castro y Cerdas, 2005).

Uno de los principales desechos biológicos del procesamiento de las bayas es el subproducto primario de los procesos de elaboración de jugo y vino. Dichos procesos comúnmente involucran operaciones de ruptura de tejidos, como lo son el despulpado, el uso de enzimas en conjunto con calentamiento y el prensado para separar el jugo de la matriz sólida del fruto (Zhao, 2007; Struck *et al.*, 2016).

Los residuos originados en el procesamiento industrial de la mora (Figura 2) para obtención de jugo representan un 20 % del peso del fruto y se componen de cáscaras (exocarpo), semillas y algunas veces tallos (Santos *et al.* 2017), por lo que se genera un volumen importante de este subproducto.



Figura 2. Subproducto del procesamiento de la mora (cáscaras y semillas).

3.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son aquellos que estructuralmente poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo y otros posibles sustituyentes, basados en la estructura del fenol. Es un grupo muy diverso que posee desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados (Vermerris y Nicholson, 2008).

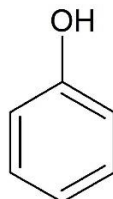


Figura 3. Estructura del fenol.

Estos compuestos pueden ser clasificados de diferentes formas. Harborne y Simmonds (1964) propusieron una clasificación basándose en el número de carbonos en la molécula (ver Cuadro I); aunque existen otras clasificaciones.

Cuadro I. Clasificación de los compuestos fenólicos según Harborne y Simmonds (1964).

Estructura	Clase
C ₆	Fenoles simples
C ₆ – C ₁	Fenoles ácidos y compuestos relacionados
C ₆ – C ₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C ₆ – C ₃	Ácidos cinámicos, aldehídos cinámicos, alcoholes cinámicos
C ₆ – C ₃	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C ₁₅	Chalconas, auronas y dihidrochalconas
C ₁₅	Flavanos
C ₁₅	Flavonas
C ₁₅	Flavanonas
C ₁₅	Flavanonoles
C ₁₅	Antocianidinas
C ₁₅	Antocianinas
C ₃₀	Biflavonilos
C ₆ – C ₁ – C ₆ , C ₆ – C ₂ – C ₆	Benxofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinonas
C ₁₈	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	Dímeros u oligómeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	Oligómeros o polímeros
Flobafenos	Polímeros

Los flavonoides son compuestos caracterizados por tener 15 carbonos en una estructura de tipo C₆ – C₃ – C₆, es decir dos anillos aromáticos se unen a través de un grupo de tres carbonos (un heterociclo), tal y como se observa en la Figura 4. El arreglo de la unión del grupo C₃ es el que determina la clasificación de los compuestos en tres subgrupos: las chalconas, las auronas y los flavonoides. El subgrupo de los flavonoides se caracteriza por tener anillos A, B y C (Vermerris y Nicholson, 2008).

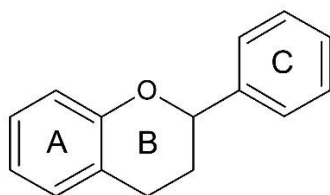


Figura 4. Estructura general de un flavonoide.

El anillo A de la mayoría de los compuestos de este grupo está meta-dihidroxiado o meta-trihidroxiado. El anillo B típicamente se encuentra mono-hidroxiado, orto-dihidroxiado o vic-hidroxiado, y puede tener esteres de metilo como sustituyentes (Vermerris y Nicholson, 2008).

Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran las flavanonas, isoflavonas, isoflavanonas, neoflavonas y las antocianidinas; estas últimas se caracterizan por el anillo B (heterociclo) que es un catión de pirilio, el cual tiene al oxígeno como heteroátomo; sin embargo, sus electrones libres no hacen parte del sistema aromático ya que este posee seis electrones π .

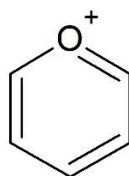


Figura 5. Cation pirilio.

Las antocianidinas pueden encontrarse como glucósidos (molécula que une mediante un enlace glicosídico un azúcar y otro grupo funcional) o algiconas (el grupo funcional libre del glucósido). Las algiconas más comunes, encontradas como compuestos coloreados, son la pelargonidina, la cianidina, la peonidina, la delfinidina, la petunidina y la mavidina. Estas

se diferencian principalmente por la sustitución de los grupos funcionales en el anillo C, de acuerdo con lo mostrado en la Figura 6 (Vermerris y Nicholson, 2008).

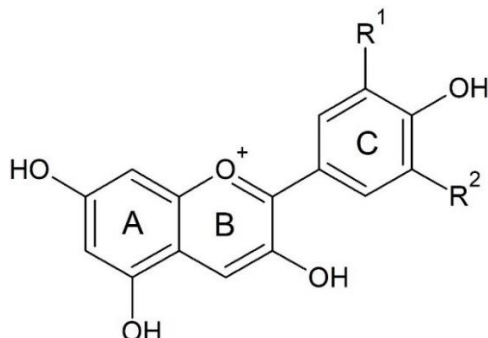


Figura 6. Estructura de antocianidinas comunes (pelargonidina: R₁=R₂=H; cianidina: R₁=OH, R₂=H; delphinidina: R₁=R₂=OH; peonidina: R₁=OCH₃, R₂=H; petunidina: R₁=OH, R₂=OCH₃; malvidina: R₁=R₂=OCH₃) (Nollet y Toldrá, 2012).

Las antocianinas, cuya estructura básica se muestra en la Figura 7, son glucósidos derivados de las antocianidinas. El más común es el cinidin-3-glucósido (C3G).

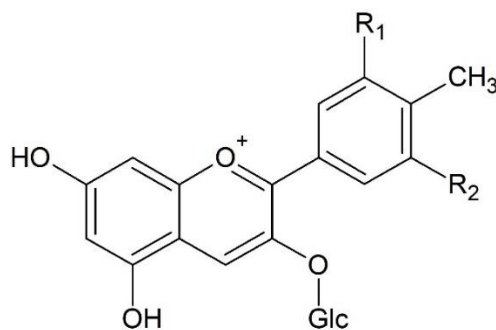


Figura 7. Estructura general de una antocianina.

Otro grupo importante de compuestos fenólicos son los taninos; un grupo heterogéneo de polifenoles solubles en agua con alto peso molecular, que pueden tener hasta 20 grupos hidroxilo en sus estructuras (Smeriglio *et al.*, 2017). Comprende compuestos con una gran diversidad en estructuras que pueden ser clasificados en tres grupos: los taninos

condensados, los taninos hidrolizables y los taninos complejos (Vermerris y Nicholson, 2008).

Los taninos hidrolizables, reciben su nombre por su naturaleza lábil en disoluciones, la cual los hace propensos a reacciones de hidrólisis y polimerización (Watson, Preedy y Zibadi, 2018). Se pueden clasificar en dos subgrupos específicos, denominados galotaninos y elagitaninos (Vermerris y Nicholson, 2008), aunque también se pueden incluir los derivados simples del ácido gálico (como tercer subgrupo) (Salminen y Karonen, 2011). Estos compuestos comparten en su estructura la presencia de ácido gálico y su derivado dimérico, el ácido elágico (mostrados en la Figura 8), los cuales pueden ser aislados a través de la hidrólisis de dichos taninos.



Figura 8. Estructuras del ácido gálico (a) y el ácido elágico (b).

Dentro de los taninos, se conocen a los derivados simples del ácido gálico como aquellas moléculas que contienen cinco o menos grupos galoil (del ácido gálico), los cuales se encuentran esterificados con la glucosa o con el ácido quínico (unión entre el grupo carboxílico del ácido gálico y el grupo -OH de las otras moléculas) (Salminen y Karonen, 2011).

En la Figura 9 se muestran ejemplos de los derivados simples del ácido gálico.

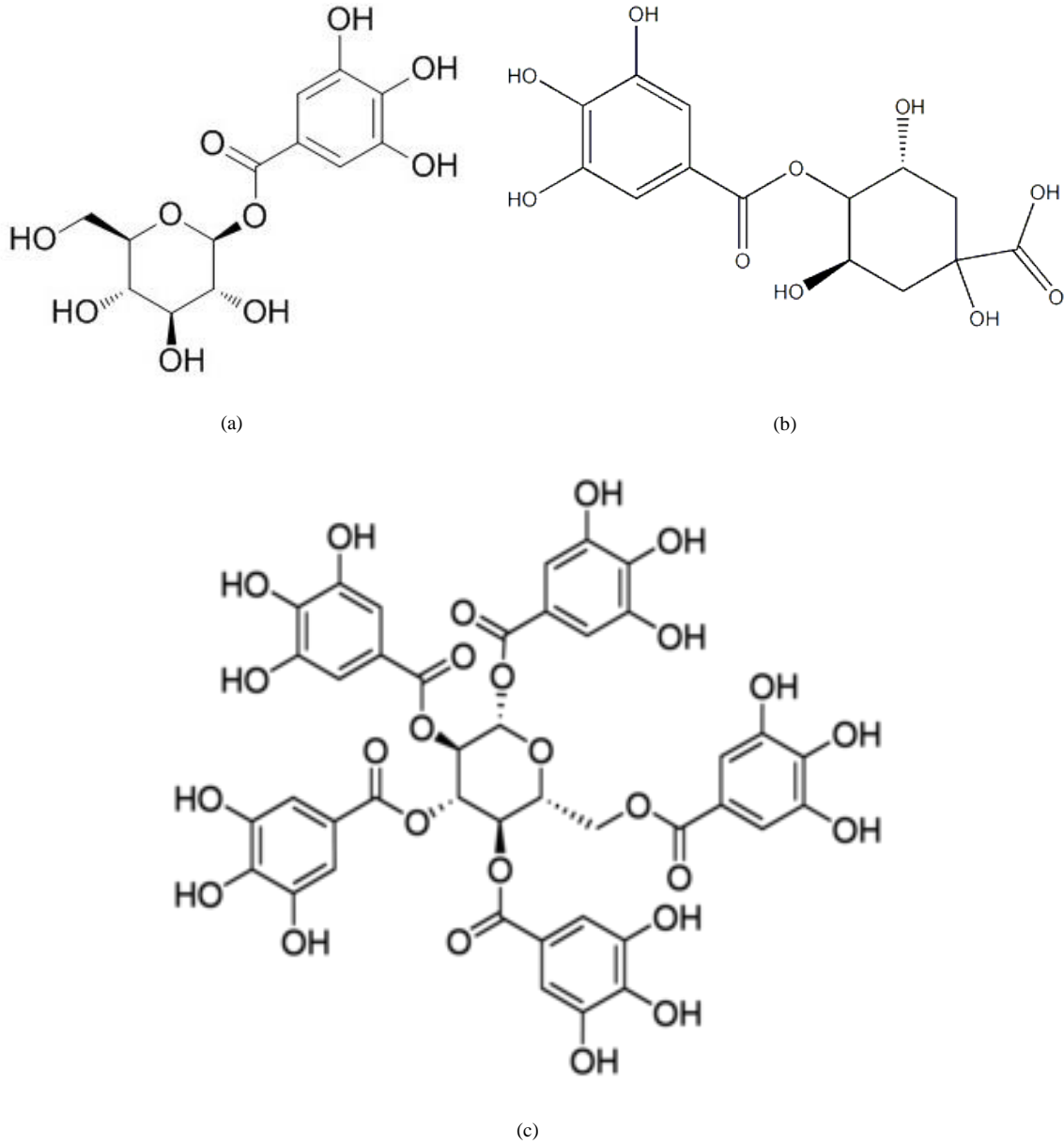


Figura 9. Ejemplos de derivados simples del ácido gálico: (a) ácido gálico esterificado con una molécula de glucosa; (b) ácido gálico esterificado con una molécula de ácido quínico; (c) es la pentagaloilglucosa).

Los galotaninos, son aquellos compuestos que poseen seis o más grupos galoil en su estructura (Salminen y Karonen, 2011). En la Figura 10 se muestra un ejemplo de un galotanino.

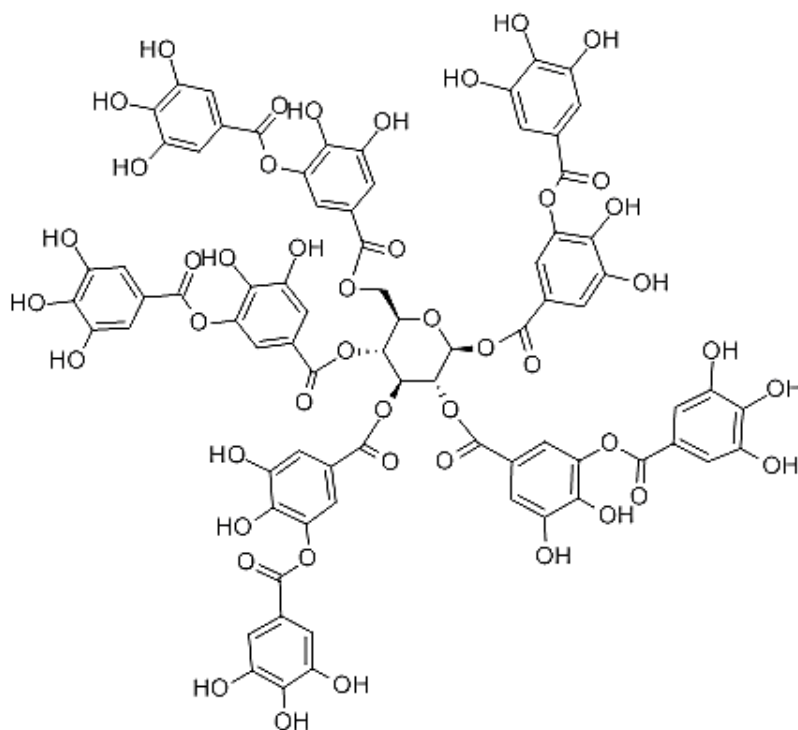


Figura 10. Ejemplo de la estructura de un galotanino.

Los elagitaninos se diferencian de los galotaninos debido a que contienen enlaces entre unidades adyacentes de galoil en la molécula de la pentagaloilglucosa (Vermerris y Nicholson, 2008). Se consideran como ésteres del ácido hexahidroxidifénico, cuya estructura se muestra en la Figura 11, en conjunto con un monosacárido, y son reconocidos como uno de los grupos más grandes de taninos, con más de 500 compuestos reportados. Al ser hidrolizados con ácido o base, su grupo hexahidroxidifenoil (HHDP) se reacomoda para formar el ácido elágico (Watson, Preedy y Zibadi, 2018). En la Figura 11 también se muestra un ejemplo de la estructura de un elagitanino.

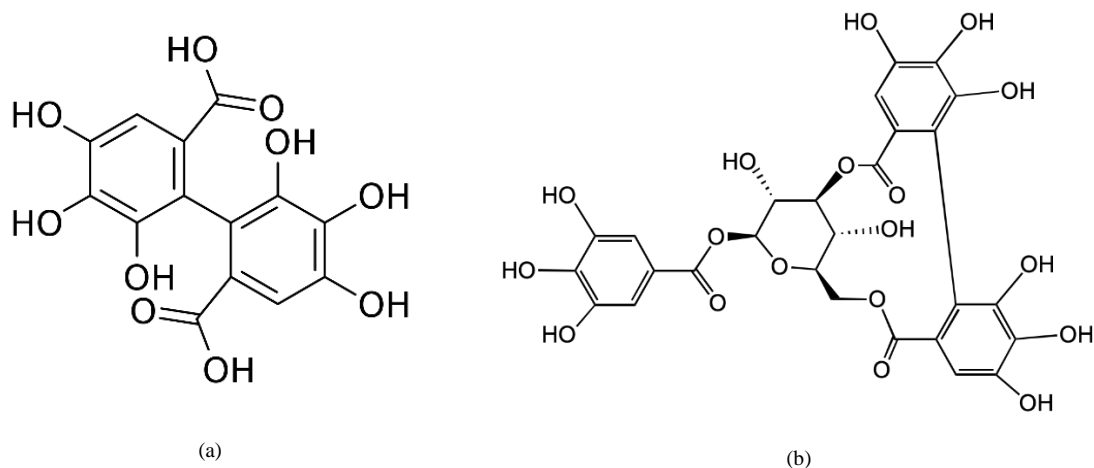


Figura 11. Estructura del ácido hexahidroxideifénico (a) y ejemplo de la estructura de un elagitanino (b).

3.2.1. Compuestos fenólicos en plantas y subproductos agroindustriales

En las plantas, los compuestos fenólicos son moléculas orgánicas que se encuentran como metabolitos secundarios derivados de diferentes vías metabólicas en estos organismos. Estos metabolitos toman parte en la regulación de la germinación de semillas y del crecimiento de las plantas, pero principalmente actúan en las respuestas de defensa ante la acción de patógenos, depredadores y condiciones ambientales adversas (Kulbat, 2016). Así mismo, son los responsables del color y ciertas características sensoriales de las frutas y vegetales (Balasundram, Sundram y Samman, 2006).

3.2.2. Compuestos fenólicos en la mora

La mora es una fruta que ha sido estudiada debido al interés en su composición de compuestos fenólicos. En ella se ha reportado la presencia de compuestos dentro de los grupos de antocianinas, elagitaninos, flavonoles, flavanoles, procianidinas, ácidos fenólicos e inclusive lignanos, aunque en niveles bajos (Kaume, Howard y Devareddy, 2012).

Se debe mencionar que los perfiles de composición de polifenoles en las variedades de mora son cualitativamente similares, pero pueden llegar a ser cuantitativamente muy diferentes, debido a diferentes factores reportados por varios autores como el cultivar, la localización del cultivo, las condiciones de cultivo (como la maduración), el procesamiento

que se le da al fruto y las condiciones de almacenamiento (como el tiempo y la temperatura) (Skrovankova *et al.*, 2015).

3.2.2.1. Antocianinas

Las antocianinas encontradas en la mora son principalmente derivados de la cianidina, donde esta antocianidina forma glucósidos con glucosa, rutinosa, xilosa o arabinosa. Algunas de las antocianinas identificadas son: cianidin-3-glucósido, cianidin-3-galactosido, cianidin-3-xilósido, cianidin-3-dioxalil-glucósido, cianidin-3-rutinósido, cianidin-3-soforosido, cianidin-3-glucosilrutinosido, cianidin-3-arabinósido, malvidin-3-arabinósido, pelargonidina-3-glucósido, cianidin-3-(3-malonil)glucósido y la cianidin-3-(6-malonil)glucósido (Kaume, Howard y Devareddy, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

De estas la cianidin-3-glucósido puede representar del 44 al 95 % y la cianidin-3-rutinósido desde cantidades traza hasta un 53 % del total de antocianinas (Fan-Chiang y Wrolstad, 2005; Ștefănuț *et al.*, 2011). Sus estructuras se muestran en la Figura 12.

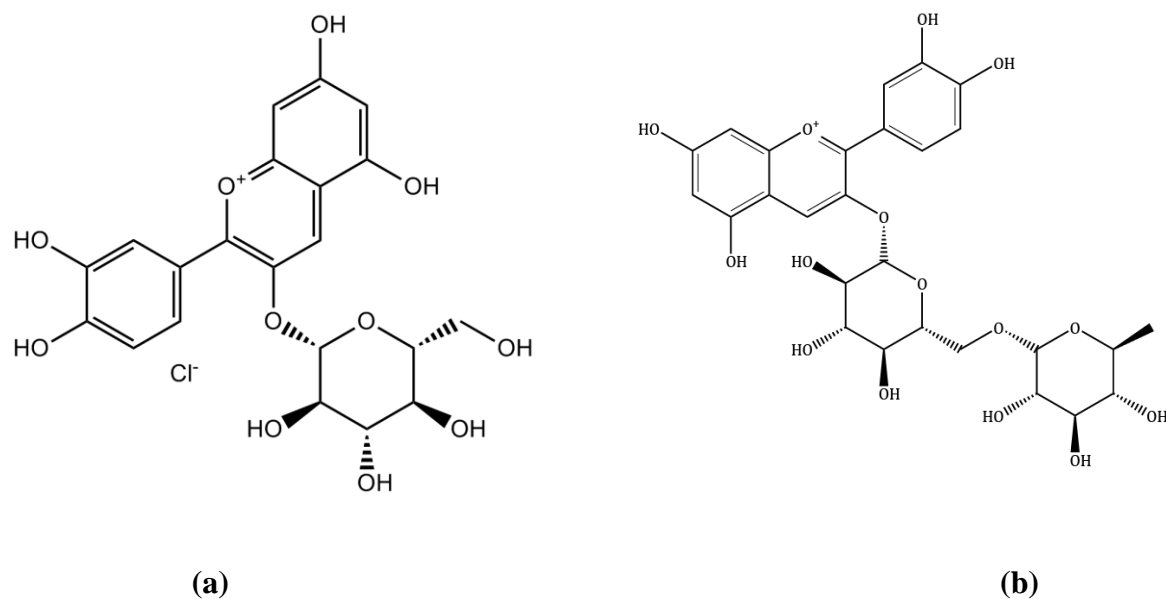


Figura 12. Cianidin-3-glucósido (a) y cianidin-3-rutinósido (b).

3.2.2.2. Elagitaninos

Los elagitaninos en la mora han sido identificados a través de cromatografía líquida principalmente como pedunculagina, casuarictina/potentilina, castalagina/vescalagina, lambertianina A/sanguína H-6, lambertianina C y lambertianina D. Estos compuestos están presentes en todas las partes del fruto (semillas, receptáculo y pulpa), pero se ha encontrado que el mayor número de elagitaninos se localiza en las semillas, reportándose una pérdida del 50 % de los elagitaninos hidrolizados en la fruta sin las semillas en comparación con la fruta que aun las mantiene (Hager *et al.*, 2008).

3.2.3. Compuestos fenólicos en la variedad *Rubus adenotrichos* en Costa Rica

Mertz *et al.* (2007) analizaron la composición de compuestos fenólicos presentes en la mora de variedad *Rubus adenotrichos*, cosechada en Costa Rica (Santa María de Dota), utilizando el fruto entero molido, y encontraron la distribución mostrada en el Cuadro II.

Según su análisis, en concordancia con otros estudios, los elagitaninos son el tipo de polifenoles presente en mayor cantidad en el género *Rubus*, determinados tanto en su forma soluble como en la forma de productos de conversión posterior a la hidrólisis ácida.

La segunda clase con mayor presencia son las antocianinas, donde la cianidin glucósido es la antocianina que más se encuentra en la variedad *R. adenotrichos* (95 %). Por último, se encuentran los flavonoles, como clase fenólica presente en menor proporción.

3.3. Actividad biológica de los compuestos fenólicos en la mora

La dieta humana contiene no solo macro y micronutrientes, pero también un conjunto de compuestos no nutrientes que presentan bioactividad, los cuales pueden tener un efecto positivo sobre la salud. Estos compuestos son de origen vegetal y también son conocidos como fitoquímicos (Mayor-Oxilia, 2010).

Cuadro II. Composición de compuestos fenólicos de la mora variedad *Rubus adenotrichos* (Mertz *et al.*, 2007).

Compuestos Fenólicos	Contenido (mg/ 100 g de mora BS)
Formas simples y conjugadas del ácido gálico	
Ácido gálico	0,46 ± 0,02
Ésteres de ácido gálico	4,9 ± 0,4
Formas conjugadas de los ácidos hidroxicinámicos	
Ácido cafeico	1,0 ± 0,1
Ácido p-cumárico	4,2 ± 0,3
Ésteres de feruloil	1,54 ± 0,02
Flavan-3-oles	
Epicatequina	5,1 ± 0,3
Formas libres y conjugadas del ácido elágico	
Pentósidos del ácido elágico	13,5 ± 0,2
Pentósido del ácido metilelágico	7,5 ± 0,2
Hexósido del ácido elágico	8,4 ± 0,3
Ácido elágico	2,0 ± 0,1
Flavonoles	
Quercetina glucurónido glucósido	57 ± 2
Quercetina glucósido-malonato	6,0 ± 0,3
Derivado de quercetina	1,3 ± 0,1
Glucósido de kaempferol	7,3 ± 0,2
Glucurónido de kaempferol	5,6 ± 0,4
Kaempferol glucósido-malonato	1,9 ± 0,1
Derivado de kaempferol	2,1 ± 0,1
Antocianinas	
Cianidin-3-glucósido	680 ± 20
Cianidin-3-malonil glucósido	40 ± 3
Elagitaninos	
Lambertianina C	598 ± 20
Sanguína H-6	420 ± 17

Dentro del grupo de estos fitoquímicos se encuentran los compuestos fenólicos, caracterizados por su capacidad antioxidante. La función antioxidante radica en la capacidad de prevenir el daño oxidativo de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos

ppoliinsaturados y azúcares a través de reacciones mediadas por radicales libres (Heleno *et al.*, 2015).

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno son moléculas que presentan en su estructura un electrón desapareado. En el cuerpo, los radicales libres se forman debido a las reacciones de oxidación que son esenciales en los procesos metabólicos celulares (Mayor-Oxilia, 2010). Existen dos mecanismos de acción antioxidante, por inactivación de radicales y por transferencia de electrones. En el primer caso, el radical libre puede remover un átomo de hidrógeno del antioxidante, el cual a su vez se vuelve un radical. En el segundo mecanismo, el antioxidante dona un electrón al radical libre, el cual se vuelve un catión radical (Valko *et al.*, 2007).

La problemática del daño oxidativo es que este genera un efecto en el cuerpo humano conocido como estrés oxidativo, producto de un desequilibrio entre los radicales libres y las especies antioxidantes. El estrés oxidativo se ha relacionado con la incidencia de enfermedades crónicas y el envejecimiento (Goodarzi *et al.*, 2018).

3.4. Extracción de biomoléculas a partir de fuentes vegetales

3.4.1. La extracción sólido-líquido

Una extracción se define como un proceso de separación basado en una diferencia en la solubilidad de los componentes involucrados. Se utiliza un solvente con el fin de solubilizar y separar un soluto de otros materiales con menor solubilidad en dicho solvente. Comúnmente, las extracciones se pueden clasificar en dos tipos: extracciones líquido-líquido y extracciones sólido-líquido (Berk, 2013).

La extracción sólido-líquido consiste en la remoción de un soluto presente en una fase sólida con la ayuda de un solvente. Su mecanismo de funcionamiento involucra el humedecer la superficie del sólido con el solvente, la penetración del solvente en el sólido, la disolución de los compuestos extraíbles, el transporte de los solutos desde el interior de las partículas sólidas a su superficie y la dispersión de los solutos en el seno del disolvente que rodea las partículas sólidas por difusión y agitación. En algunos casos, el paso de la solubilización

puede incluir cambios químicos promovidos por el solvente, como lo es la hidrólisis (Berk, 2013).

La eficiencia relativa de una extracción sólido líquido depende de diversos factores, tales como la polaridad del disolvente, el tamaño de partícula de la muestra, la relación sólido-líquido, la temperatura, el tiempo, entre otros.

3.4.2. Parámetros que influyen en la extracción sólido-líquido

3.4.2.1. Preparación previa del sustrato

El paso inicial en la extracción de compuestos bioactivos es la preparación de la muestra, de forma que se puedan preservar las biomoléculas presentes en el material antes de la extracción. Muestras provenientes de plantas tales como hojas, cortezas, raíces, frutas y flores pueden ser extraídas a partir del material seco o fresco. Otras etapas como la molienda y el secado pueden influir en la preservación de los compuestos fitoquímicos en los extractos finales (Azwanida, 2015).

La reducción del tamaño de partícula de la muestra aumenta la superficie de intercambio y por lo tanto la velocidad de extracción. Sin embargo, la presencia de partículas muy finas también puede provocar problemas tecnológicos en el caso de que precipiten y formen un lecho con poca permeabilidad hacia el disolvente al realizar la separación de los sólidos del extracto posterior a la extracción (D'Alessandro, 2013).

A la operación de secado se le atribuye el beneficio de que la muestra deshidratada tiene mayor capacidad de hincharse para hidratarse mejor, que produce un aumento de los poros en la pared celular de la matriz (Medina-Torres *et al.*, 2017).

3.4.2.2. Naturaleza del disolvente de extracción

La extracción de antioxidantes a partir de materiales sólidos provenientes de plantas comúnmente se hace utilizando mezclas acuosas de disolventes. Esto se basa en el principio de que, al extraer, los compuestos antioxidantes son transferidos del material sólido a la fase líquida de acuerdo con su afinidad al disolvente seleccionado (Xu y Howard, 2012).

Los compuestos fitoquímicos son parte de un grupo estructuralmente muy diverso que varía en un amplio rango de polaridades, donde la mayoría son solo moderadamente solubles en agua; por lo tanto, usualmente se requiere del uso de disolventes orgánicos. La selección de dicho disolvente es un punto crítico en la selección del procedimiento de extracción (Xu y Howard, 2012).

Los solventes polares usualmente se utilizan para extraer compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales. Normalmente se utilizan mezclas acuosas de metanol, etanol y acetona para extraer compuestos con mayor polaridad, mientras que compuestos con menor polaridad se suelen extraer con acetato de etilo o cloroformo. La presencia de agua permite hidratar la matriz del alimento y facilita la extracción (Xu y Howard, 2012).

En este sentido cabe destacar que no existe un solo disolvente que sea adecuado para extraer todos los compuestos antioxidantes de una matriz alimentaria, por lo que para ensayos de capacidad antioxidante se recomiendan al menos dos extracciones utilizando disolventes con polaridades diferentes (Xu y Howard, 2012).

El etanol se considera como un buen disolvente para la extracción de polifenoles ya que es seguro para el consumo humano.

3.4.2.3. Temperatura y tiempo de extracción

Existe un consenso con respecto al papel que ejercen el tiempo y la temperatura en los procesos de extracción. Estos parámetros están cercanamente relacionados con la efectividad del proceso y en el aspecto económico de la extracción. Específicamente se considera que mayores temperaturas de trabajo benefician la extracción al aumentar la solubilidad de los solutos y los coeficientes de difusión, porque se reduce la viscosidad del medio y porque se aumenta la permeabilidad de las paredes celulares (Meireles, 2009; D'Alessandro, 2013).

Sin embargo, al tratarse de compuestos fenólicos, cuando se mantienen temperaturas altas por períodos de tiempo extensos, pueden llegar a sufrir degradación (oxidación) y pérdida de bioactividad.

El tiempo de contacto entre las dos fases (sustrato y solvente) está ligado y define la cinética de la extracción que relaciona la concentración del compuesto extraído en función del tiempo. Por ello, conocer la ecuación que describe la cinética permite detener el proceso cuando se haya llegado al rendimiento buscado (Meireles, 2009).

3.4.2.4. Agitación del medio de extracción

En los procesos de extracción usualmente se utiliza algún tipo de sistema de agitación, de manera que la tasa de transferencia de masa aumente como producto de la turbulencia. Este parámetro se vuelve más importante aún, al tratarse de sustratos con tamaños de partícula pequeños ya que evita su precipitación, lo cual puede reducir la eficiencia de la extracción (Rostagno y Prado, 2013).

Adicionalmente, la dispersión del material en el medio líquido mediante la agitación facilita el contacto del sólido con el disolvente, que favorece la difusión de los compuestos de interés, y evita una super-saturación en la proximidad inmediata a la superficie del sólido (Rostagno y Prado, 2013).

3.4.2.5. Relación sólido-líquido

La relación sólido-líquido es la relación entre la cantidad de la fase líquida y la cantidad de la fase sólida utilizadas en una extracción sólido-líquido, expresada como la proporción de volumen o masa utilizados del disolvente con respecto a la masa del sustrato a ser extraído (Elboughdiri, 2018).

Esta relación ejerce un efecto sobre el rendimiento de extracción, donde entre mayor sea, más eficiente es la extracción. Este fenómeno responde a los principios de transferencia de masa. La fuerza que mueve la extracción es el gradiente de concentración, el cual es mayor a medida que la proporción del disolvente sea mayor con respecto al sólido (Elboughdiri, 2018).

Sin embargo, siempre se debe considerar la cantidad de disolvente que se consume en el proceso, lo cual tiene impacto sobre el aspecto económico, así como sobre la facilidad de separación del compuesto de interés a partir del extracto líquido (D'Alessandro, 2013).

3.5. Métodos de extracción sólido-líquido

3.5.1. Extracciones convencionales

Los métodos convencionales de extracción de fitoquímicos provenientes de las plantas incluyen la maceración, las infusiones y la extracción Soxhlet; debido a que las tres técnicas presentan las características ya mencionadas de extracción sólido-líquido, donde el disolvente se debe difundir en el material, para posteriormente solubilizar los compuestos de interés en la matriz, y que finalmente, el disolvente rico en compuestos bioactivos se difunda hacia afuera de las células vegetales (Tiwari, Brunton y Brennan, 2013).

3.5.1.1. Maceración

Esta técnica se basa en remojar el material de interés en un líquido a temperatura ambiente, por lo general en un recipiente cerrado. Se puede agitar para aumentar la tasa de extracción y el proceso puede durar desde horas hasta días. Una vez terminado el tiempo de extracción, el sólido se separa del líquido mediante filtración. La maceración se puede realizar en varias etapas, donde posterior a la filtración, el material se puede someter a extracciones adicionales con más disolvente fresco, sin embargo, este es uno de los procesos menos eficientes ya que consume mucho tiempo y disolvente. Su uso puede ser de interés en la obtención de compuestos termolábiles (Tiwari, Brunton y Brennan, 2013).

3.5.1.2. Infusión

Este proceso es similar a la maceración con la variante de que se lleva a cabo a una temperatura específica, por lo general mayor a la temperatura ambiente y hasta los 100 °C, durante un período específico que pueden ser minutos u horas. Las infusiones tradicionales se realizan con agua y también reciben una etapa final de filtración (Tiwari, Brunton y Brennan, 2013).

3.5.1.3. Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet radica en colocar el material a extraer en un dedal que es permeable hacia el disolvente. Se coloca un recipiente de recolección en la parte inferior y un condensador en la parte superior de donde se ubica el dedal; el disolvente ubicado en el recipiente de recolección se calienta hasta ser evaporado y llegar al condensador. El disolvente se condensa y cae en el dedal hasta alcanzar suficiente volumen para volver al recipiente de recolección. La separación de los compuestos de interés se da por el efecto de la destilación, ya que lo que se evapora es el disolvente mientras el soluto permanece en el recipiente de recolección. En esta técnica se deben tomar en cuenta el tipo de disolvente al igual que el tamaño de partícula dependiendo del fitoquímico de interés (Tiwari, Brunton y Brennan, 2013).

3.5.2. Extracciones alternativas

Los materiales vegetales han visto un interés creciente en su explotación con fines de aislar y purificar compuestos bioactivos. Las técnicas tradicionales para lograr esto involucran extracciones sólido-líquido convencionales como las que se discutieron con antelación. Estas técnicas han sido utilizadas por más de un siglo para el aislamiento de polifenoles.

Sin embargo, existen diversas desventajas en la aplicación de estas metodologías convencionales, como el consumo excesivo de tiempo, energía y disolventes que pueden contaminar el medio ambiente. Estos factores son los que han incentivado la exploración de técnicas más verdes y económicamente efectivas para la extracción de compuestos bioactivos, como los polifenoles, a partir de materiales vegetales (Ameer *et al.*, 2017).

Dentro de la gama de técnicas verdes y modernas se destacan las extracciones con fluidos supercríticos, asistidas por ultrasonido, asistidas por microondas, con líquidos presurizados y con agua caliente presurizada (Ameer *et al.*, 2017).

3.5.2.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Las ondas ultrasónicas son ondas de sonido de alta frecuencia entre los 20 kHz y los 2 MHz, ya que por encima de los 20 kHz estas ondas de sonido son imperceptibles para adultos jóvenes sanos. Estas ondas sonoras tienen un impacto significativo sobre medios elásticos tales como los disolventes líquidos y los tejidos suaves de plantas (Panja, 2017).

Las altas frecuencias del ultrasonido actúan como lo haría un pistón sobre un medio, ya que las ondas sonoras cambian su forma al viajar a través del él, que retoma su forma original en ausencia de dichas ondas. En este proceso, se produce dos efectos, el de cavitación, el cual consiste en la formación de burbujas microscópicas que al colapsar liberan energía, creando zonas de alta presión y temperatura (Panja, 2017), y el de fragmentación, donde la colisión entre las ondas ultrasónicas y las partículas sólidas puede generar una reducción del tamaño de partícula. Por lo tanto, en ambos efectos se fomenta la transferencia de masa (Medina-Torres *et al.*, 2017).

La formación y colapso de las burbujas de cavitación se da debido a la propagación de ondas mecánicas que generan ciclos de presiones altas y bajas y cambios de temperatura en el líquido, llamadas compresiones y rarefacciones, como se puede ver en la Figura 13 (Medina-Torres *et al.*, 2017).

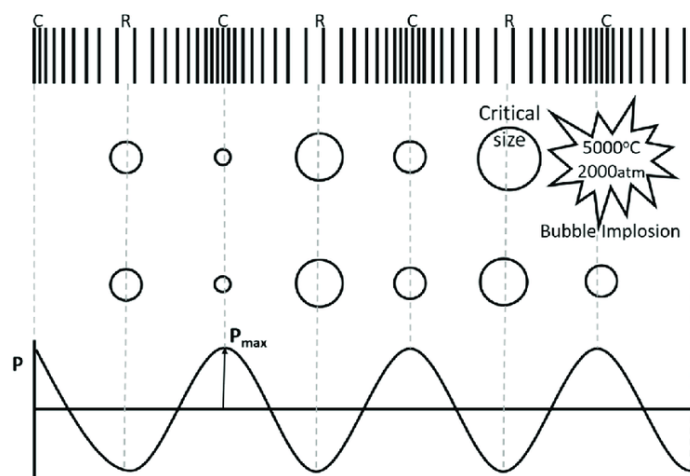


Figura 13. Proceso de compresión (C) y rarefacción (R) del líquido durante el efecto de la cavitación.

Las principales características de las ondas ultrasónicas son: la longitud de la onda, que es la distancia entre dos puntos de rarefacción o compresión; la amplitud, que indica altura máxima de la onda; la frecuencia, expresada en Hertz (Hz), que es el número de ciclos por unidad de tiempo o, en otras palabras, el número de ondas propagadas en un segundo; la potencia, expresada en Watts (W), que es la relación entre la energía transportada y el tiempo considerado (Medina-Torres *et al.*, 2017).

El efecto de la cavitación se puede describir en 4 etapas. En la primera etapa, al incidir las ondas ultrasónicas al medio, se generan las burbujas microscópicas en la superficie de la matriz a ser extraída. Posteriormente, las burbujas colapsan y liberan micro chorros a presión y con temperatura hacia la superficie.

En el tercer paso, la matriz se rompe y el disolvente entra en contacto con los compuestos de interés contenidos en las células vegetales. Por último, los compuestos disueltos son liberados y transportados al grueso del disolvente (Panja, 2017). Este fenómeno puede ser apreciado en la Figura 14.

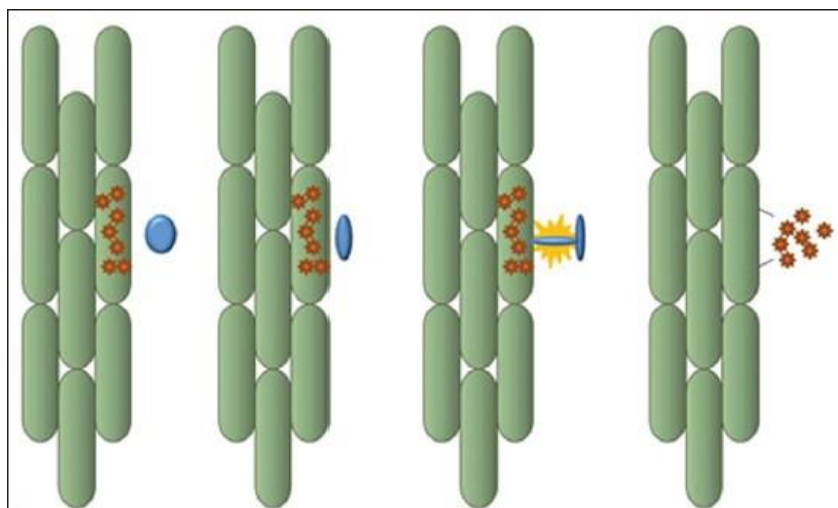


Figura 14. Etapas de la cavitación en un proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir de una matriz vegetal.

3.5.2.2. Variables que afectan la EAU

El ultrasonido puede ser aplicado de diferentes formas, ya sea de manera indirecta o directa y de forma continua o pulsada. Existen dos tipos de sistemas para la aplicación de ultrasonido; los baños ultrasónicos y los sistemas acoplados a una sonda. Los baños ultrasónicos trabajan de forma indirecta ya que las ondas ultrasónicas entran en contacto con el recipiente que contiene el medio de extracción, mientras que, en los sistemas acoplados a una sonda, ésta se introduce en el medio de extracción, y por lo tanto las ondas ultrasónicas se aplican directamente en el líquido (Medina-Torres *et al.*, 2017).

Adicionalmente al tipo de sistema de ultrasonido, se puede considerar el tiempo en el que se aplican las ondas; que puede ser de forma continua o controlado por pulsos o intervalos de aplicación y no aplicación del ultrasonido. La aplicación pulsada puede ser de utilidad para disminuir los costos energéticos de extracción al igual que puede ayudar con los riesgos atribuidos a largos períodos de aplicación continua que pueden fomentar la degradación y oxidación de los compuestos a extraer (Medina-Torres *et al.*, 2017).

La amplitud de la onda juega un papel importante en la intensificación de la extracción, ya que con su aumento también lo hace el número de ciclos de compresión y rarefacción de las ondas ultrasónicas que permite un mayor rendimiento de los compuestos de interés. Por otro lado, la frecuencia depende del equipo y se recomienda el uso de frecuencias no excesivamente altas dado que pueden degradar u oxidar los compuestos a ser extraídos al formar radicales hidroxilo altamente reactivos, por lo que se suele trabajar con frecuencias entre 20 kHz y 60 kHz (Medina-Torres *et al.*, 2017).

4. Materiales y métodos

4.1. Localización

Las pruebas de extracción y análisis de los polifenoles obtenidos se desarrollarán en los laboratorios de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), ubicados en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro Montes de Oca.

4.2. Materia prima

Se utilizó el subproducto de la operación de prensado de la pulpa de mora de la empresa Siwá Juices International, S.A., que procesa en la planta piloto del CITA. La mora (*Rubus adenotrichos*) utilizada es de la variedad Vino y se compra de productores de la zona de los Santos. El rendimiento del prensado con hidroprensa es de aproximadamente 78,7 %, por lo que un 21,3 % representa el subproducto de mora que actualmente es desechado.

El subproducto del despulpado se obtuvo de un único lote y se empacó el día de su procesamiento en bolsas laminadas metalizadas a - 20 °C (Micić *et al.*, 2015). Se ha reportado que, en la fruta fresca, el contenido de los compuestos de interés se mantiene hasta 7 meses al ser congelado de manera lenta a esta temperatura (Veberic *et al.*, 2014), por lo que se usó dentro de este período.

4.3. Extracción de polifenoles

4.3.1. Equipo de extracción

El esquema del equipo utilizado tanto en la EAU como en la EC se muestra en la Figura 15. Consta de un recipiente metálico con capacidad de 2000 mL dentro del cual se coloca el sistema de ultrasonido (una sonda sólida de alta ganancia con una punta de 2,54 cm de diámetro acoplada a un convertidor piezoeléctrico con un generador de 115 V, 750 W y 20 kHz) (Cole-Parmer, EUA), el agitador Eurostar 60 (Ika, Alemania) con propela tipo hélice de 3 hojas y un termómetro de alcohol. Todo este sistema a su vez se coloca dentro de un baño con circulación de agua para controlar la temperatura.

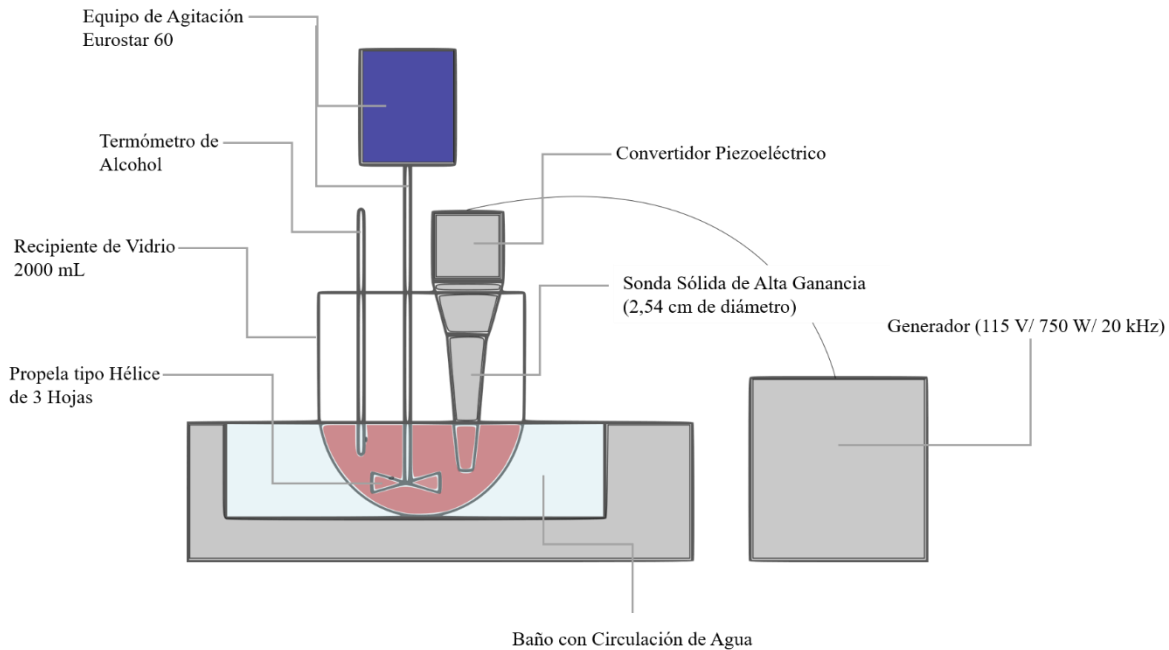


Figura 15. Esquema del equipo a ser utilizado en la Extracción Convencional (EC) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).

4.3.2. Sistemas de extracción

4.3.2.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La EAU se realizó en el equipo mostrado en la Figura 15, que trabaja a una frecuencia de 20 kHz, y que cuenta con un regulador de la amplitud suministrada con una escala con rango de 0 - 100%. Los demás parámetros de la extracción se presentan en apartados posteriores.

4.3.2.2. Extracción convencional (EC)

Para la EC se utiliza el mismo sistema descrito en la Figura 15, sin el uso de la sonda. Los demás parámetros de la extracción se presentan en apartados posteriores.

4.3.3. Evaluación del efecto de la preparación del subproducto de la mora

Se evaluó la EAU utilizando el subproducto de mora preparado con dos procedimientos diferentes:

a) Subproducto de mora fresco (SMF):

El subproducto del prensado de la mora que se descongeló a 5 °C, 24 horas antes de su uso en las extracciones.

b) Subproducto de mora seco y molido (SMS):

El subproducto del prensado descongelado a 5 °C, 24 horas antes, y deshidratado mediante secado de convección con aire caliente a 50 °C según lo aplicado por Conejo (2016) con un secador modelo 3526TB (Excalibur, EUA), con una carga por bandeja de 0,11 kg/m² hasta una humedad de equilibrio de 6,0-6,5 % (Micić *et al.*, 2015).

Posterior al secado, el residuo se molió utilizando un molino ultra centrífugo modelo ZM200 (Retsch, Alemania), con una malla de separación de 1 mm, a una velocidad de 8000 rpm y vibración de dosificación entre 2 y 8 según lo aplicado por Ávila (2018). El producto seco se empacó en bolsas metalizadas y se almacenó en refrigeración a 5 °C hasta su uso.

Los parámetros de las extracciones del SMF y SMS se presentan en el Cuadro III. El tiempo se estableció según lo realizado por Khan *et al.* (2010).

Cuadro III. Condiciones de extracción de polifenoles a partir del subproducto de mora.

Condición	Valor
Temperatura (°C)	25
Concentración de Etanol (%)	0
Amplitud (%)	20
Tiempo (min)	30

La velocidad de agitación utilizada permite que todas las partículas se encuentren en suspensión. En una prueba preliminar, se determinó que el sistema descrito funciona adecuadamente utilizando una relación en masa 6:1 disolvente/sustrato SMF, la cual se ajustó al SMS según la equivalencia masa producto/masa base seca entre ambos subproductos.

El fabricante del equipo de ultrasonido, recomienda que la sonda sólida de alta ganancia con punta de 2,54 cm se utilice con un volumen máximo de muestra de 1000 mL. Por ello, se utilizó una masa de SMF de 130 g y de agua de 780 g, lo cual genera un volumen por debajo del límite establecido. Para este sistema se determinó, que las partículas se mantienen en suspensión a una velocidad de 200 rpm, la cual se escogió como valor constante para las extracciones.

Para evaluar el desempeño de las extracciones se calculó el rendimiento de extracción de los compuestos de interés obtenidos, calculado según la ecuación 1.

$$E = \frac{C_{n \text{ compuesto en el extracto}} * V_{\text{balón}}}{C_{n \text{ compuesto en el subproducto}} * m_{\text{subproducto}}} * 100 \quad [1]$$

Donde,

E: rendimiento de extracción de los compuestos de interés (%)

$C_{n \text{ compuesto en el extracto}}$: concentración del compuesto de interés en el extracto (mg/mL)

$V_{\text{balón}}$: volumen del balón aforado (mL)

$C_{n \text{ compuesto en el subproducto}}$: concentración del compuesto de interés en el subproducto (mg/g)

$m_{\text{subproducto}}$: masa del subproducto utilizado en la extracción (g)

A su vez, el comportamiento cinético de la extracción se evaluó mediante un modelo de primer orden, utilizando el programa SigmaPlot 10.0 (Systat Software[®], USA), para la acumulación de polifenoles en la disolución, mostrado en la ecuación 2, ya que se ha encontrado que este modelo describe adecuadamente la extracción de polifenoles en matrices de material orgánico (Khan *et al.*, 2010; Sant'Anna *et al.*, 2012, Katsampa *et al.*, 2015; Valdés-Hernández, Cruz-Viera y Rodríguez-Comet, 2015; Quirós, 2016).

$$C_{i_t} = C_{i_\infty}(1 - e^{-kt}) \quad [2]$$

Donde,

C_{i_t} : contenido del compuesto de interés en el tiempo t (mg/mL).

C_{i_∞} : contenido del compuesto de interés en el tiempo final (mg/mL).

t: tiempo de extracción (min).

k: constante aparente de la velocidad de extracción de primer orden (min^{-1}).

En los extractos obtenidos, se determinó el contenido de los siguientes compuestos de interés: polifenoles totales (mg de AG/mL de extracto), antocianinas (mg de C3G/mL de extracto) y elagitaninos (mg de AE/mL de extracto) en los subproductos SMF y SMS.

Adicionalmente, a lo largo de las extracciones se tomaron muestras a los 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos, para un total de 8 tiempos (considerando el tiempo final de 30 minutos), y se determinó el contenido de los compuestos de interés, para evaluar las cinéticas de extracción y determinar el valor de la constante de velocidad (k).

Las muestras de cada extracción se tomaron con una pipeta y se colocaron en tubos de centrífuga de 5 mL previamente pesados, los cuales se centrifugaron durante 1 min a 4000 rpm. Se pesaron los tubos de centrífuga con la muestra recolectada. Posteriormente, se recolectó el líquido sobrenadante en un balón aforado de 10 mL y se pesó el tubo con el residuo sólido del extracto. Se completó el volumen de los balones con agua destilada. El extracto obtenido se trasvasó a botellas ámbar de 20 mL, que se almacenaron a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

Para la determinación de la concentración del compuesto de interés en el subproducto se llevó a cabo una extracción sólido-líquido convencional. Se pesaron 3 g de la SMF en un erlenmeyer de 250 mL, en conjunto con 12 g de etanol al 50 % para obtener una relación sólido-líquido 1:4 (Quirós, 2016). El erlenmeyer con el sólido y el disolvente se agitó en un baño de agua a $58\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.

Al terminar el tiempo de extracción, se filtró la mezcla al vacío hacia un kitasato utilizando un embudo Buchner y papel Whatman #4. Los sólidos restantes en el papel se

trasvasaron devuelta al Erlenmeyer. Se realizó la extracción dos veces más con el mismo sólido, añadiendo disolvente fresco, durante 30 minutos cada una, ya que se constató que con tres extracciones la mezcla quedaba incolora, indicando la extracción de la totalidad de los polifenoles disponibles. El extracto obtenido se trasvasó a botellas ámbar de, almacenadas a -18 °C hasta el momento de su análisis.

Los valores del rendimiento y de la constante de velocidad (k) de las extracciones, se utilizaron para seleccionar el método de preparación del subproducto. Además, a partir de las cinéticas de extracción del proceso escogido se estableció el tiempo de extracción a ser utilizado.

4.3.3.1. Análisis de datos

Se aplicó un diseño experimental irrestricto aleatorio de dos tratamientos, correspondientes a las extracciones con SMF y SMS. Los tratamientos se realizaron por triplicado y como variable respuesta se emplearon la k y el E de la extracción de polifenoles, antocianinas y elagitaninos. Se compararon las medias obtenidas para los valores de la constante k de las tres réplicas de cada cinética mediante una prueba t-student para un 95% de confianza.

Las cinéticas, realizadas por triplicado para cada modo de preparación (SMF y SMS), se obtuvieron al graficar la cantidad de compuesto de interés extraído con respecto al tiempo y se modelaron utilizando la ecuación de primer orden descrita en el apartado 4.3.3.

4.3.4. Evaluación de los parámetros de extracción de polifenoles asistida por ultrasonido

En este apartado, se analizó cómo la composición del disolvente, la temperatura y la potencia del ultrasonido afectan la extracción de polifenoles del subproducto de mora. Una vez establecido el tratamiento previo del sustrato, se procedió a realizar una EAU con mezclas de etanol y agua como disolvente para encontrar las condiciones que optimizan la extracción.

El diseño experimental empleado para la optimización de la extracción de polifenoles fue un diseño Central Compuesto Rotable (DCCR), con tres factores (X_1 , X_2 , X_3) y los niveles naturales de dichos factores ajustados a cinco niveles codificados (-1,68, -1, 0, +1, +1,68).

En el Cuadro IV se muestran las variables seleccionadas que influyen la extracción y los niveles sin codificar y codificados de las mismas. Estas variables y sus rangos se seleccionaron en función del concepto de la EAU como una tecnología verde.

Se utilizan las variables de temperatura y concentración de etanol, para establecer si se obtienen buenos resultados de extracción utilizando condiciones de mínima temperatura de extracción y concentración de disolvente. La amplitud se selecciona ya que es el único parámetro que puede ser controlado por el equipo de ultrasonido y es el que condiciona la intensidad de la cavitación ejercida.

Cuadro IV. Variables del diseño central compuesto y sus respectivos niveles codificados y sin codificar para analizar la EAU.

Variable		Niveles codificados				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
		Niveles sin codificar				
X_1	Temperatura (°C)	25	32,1	42,5	52,9	60
X_2	Concentración de Etanol (% m/m)	0	12,2	30	47,8	60
X_3	Amplitud (%)	20	32,2	50	67,8	80

Se consideraron los resultados obtenidos por Quirós (2016) quien aplicó el ultrasonido de manera indirecta, y encontró un punto óptimo de extracción a una temperatura de 58,4 °C y una concentración de 50 % m/m; por ello, en el diseño planteado no se excede de los 60 °C y 60 % m/m.

El número de puntos experimentales se definió según la ecuación [3]:

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad [3]$$

Donde,

N: número de puntos experimentales.

k: número de factores del diseño experimental.

n_0 : número de puntos centrales del diseño experimental.

Por lo tanto, el número de puntos experimentales es 20, considerando que se utilizan tres factores ($k=3$) y seis puntos centrales ($n_0=6$); esto resulta en la evaluación de 8 puntos factoriales y 6 puntos axiales, además de los 6 puntos centrales seleccionados. La corrida de los ensayos se realizó de forma aleatoria para minimizar el efecto de las variables no controlables.

En el Cuadro V se expone el diseño experimental para los 3 factores y sus 5 niveles, los niveles codificados se muestran entre paréntesis.

Cuadro V. Diseño Central Compuesto Rotable para la optimización de la EAU de polifenoles a partir del subproducto de mora.

Orden Estándar	Factores			Aleatorización del Orden Estándar
	X ₁ (°C)	X ₂ (% m/m)	X ₃ (%)	
1	32,1 (-1,0)	12,2 (-1,0)	67,8 (-1,0)	17
2	32,1 (-1,0)	12,2 (-1,0)	67,8 (1,0)	7
3	32,1 (-1,0)	47,8 (1,0)	32,2 (-1,0)	20
4	32,1 (-1,0)	47,8 (1,0)	67,8 (1,0)	11
5	52,9 (1,0)	12,2 (-1,0)	32,2 (-1,0)	16
6	52,9 (1,0)	12,2 (-1,0)	67,8 (1,0)	14
7	52,9 (1,0)	47,8 (1,0)	32,2 (-1,0)	8
8	52,9 (1,0)	47,8 (1,0)	67,8 (1,0)	10
9	25,0 (-1,682)	30,0 (0,0)	50,0 (0,0)	4
10	60,0 (+1,682)	30,0 (0,0)	50,0 (0,0)	5
11	42,5 (0,0)	0,0 (-1,682)	50,0 (0,0)	19
12	42,5 (0,0)	60,0 (+1,682)	50,0 (0,0)	2
13	42,5 (0,0)	30,0 (0,0)	20,0 (-1,682)	12
14	42,5 (0,0)	30,0 (0,0)	80,0 (+1,682)	18
15	42,5 (0,0)	30,0 (0,0)	50,0 (0,0)	3
16	42,5 (0,0)	30,0 (0,0)	50,0 (0,0)	13
17	42,5 (0,0)	30 (0,0)	50,0 (0,0)	9
18	42,5 (0,0)	30 (0,0)	50,0 (0,0)	1
19	42,5 (0,0)	30 (0,0)	50,0 (0,0)	6
20	42,5 (0,0)	30 (0,0)	50,0 (0,0)	15

En este apartado se utilizó el subproducto de la mora con el proceso de preparación que generó mejor rendimiento, es decir, SMS, seleccionado a partir de los resultados del apartado 4.3.3. Se mantuvo la relación de 6:1 disolvente/SMF y la velocidad de agitación de 200 rpm, correspondiente a una relación 25:1 disolvente/SMS al realizar la equivalencia de materia seca entre la SMF y la SMS.

Se realizaron los 20 ensayos bajo las combinaciones de las condiciones expuestas en el Cuadro V y el tiempo de extracción se definió según los resultados de las cinéticas obtenidas en el apartado 4.3.3, el cual fue de 20 minutos.

A las muestras del extracto obtenidas se les evaluó el contenido de polifenoles totales (mg de AG/mL de extracto), antocianinas (mg de C3G/mL de extracto) y elagitaninos (mg de AE/mL de extracto) al final del tiempo de extracción para poder encontrar mediante la superficie de respuesta las condiciones de temperatura, concentración de disolvente y potencia que generan los valores máximos de dichos contenidos.

4.3.4.1. Verificación de los modelos

Para verificar que los modelos matemáticos generados por el diseño Central Compuesto Rotable predican las variables respuesta adecuadamente, se llevaron a cabo dos ensayos adicionales, cada uno por triplicado, seleccionando dos puntos a criterio del investigador que se encuentren dentro de la zona óptima de extracción, para comparar los resultados experimentales con aquellos predichos por los modelos.

4.3.4.2. Análisis de datos

Se utilizó un diseño Central Compuesto Rotable de tres factores y cinco niveles (Cuadro IV) para aplicar la metodología de superficie de respuesta sobre el proceso de EAU de un subproducto de la semilla de mora. Con los resultados de los ensayos planteados en el Cuadro V se generaron los modelos matemáticos correspondientes a las superficies de respuesta para cada variable de interés (utilizando el programa Statistica 7 (Statsoft[®], EUA)).

Para seleccionar el modelo con mejor ajuste, ya sea el que considera solo los efectos lineales o el que considera tanto los efectos lineales como los cuadráticos, y analizar el ajuste

de los modelos obtenidos se tomó en cuenta el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{-adj}), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) del modelo, la distribución de residuos y los resultados del análisis de varianza (Soto, 2014; Mourabet *et al.*, 2017).

Se generaron y analizaron las representaciones gráficas de los modelos matemáticos y se obtuvieron las zonas óptimas de extracción, a partir de las cuales se seleccionaron dos conjuntos de factores de la EAU y se realizaron los ensayos mencionados previamente en el apartado 4.3.4.1.

Con los datos obtenidos de estas dos corridas experimentales, se verificó si los modelos matemáticos obtenidos predicen adecuadamente las variables respuesta al analizar el traslape de los intervalos de confianza, donde el intervalo de confianza del valor predicho por el modelo debe traslaparse con aquel del valor determinado experimentalmente para cada variable respuesta para que la verificación sea positiva.

Finalmente, utilizando el mismo programa estadístico, se empleó la función de deseabilidad para obtener las condiciones óptimas de extracción, en las cuales se maximiza el valor de las variables respuesta. Cada respuesta se convierte en una función de deseabilidad que puede variar entre 0 y 1, donde si la respuesta se encuentra en su óptimo, la función tiene un valor de 1 y si se encuentra fuera de un rango aceptable tiene un valor de 0.

4.3.5. Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles

Para determinar el efecto que tiene la aplicación de dicha tecnología verde sobre la extracción de polifenoles del subproducto de la mora, se compararon dos cinéticas de extracción. La primera cinética mediante una EC y la segunda mediante EAU, tal y como se ha hecho en otras investigaciones (Khan *et al.*, 2010; Pingret *et al.*, 2012).

Ambas extracciones se realizaron utilizando los parámetros determinados como óptimos en la sección anterior, correspondiente a la optimización mediante la superficie de respuesta. De esta manera, tanto la EAU, como la EC se llevan a cabo bajo las condiciones

que producen los mejores rendimientos de extracción, pero en la EC se prescinde del uso del ultrasonido.

En este apartado también se utilizó el subproducto de mora SMS, con el proceso de preparación seleccionado en el apartado 4.3.3. Se mantuvo la relación de 6:1 disolvente/SMF, correspondiente a una relación 25:1 disolvente/SMS al realizar la equivalencia de materia seca entre la SMF y la SMS, y la velocidad de agitación de 200 rpm.

Se realizaron muestreos una vez en cada repetición, a los 1, 3, 5, 7, 10, 15, 25, 35, 45, 60 minutos para un total de 10 tiempos. A estas muestras se les evaluó el contenido de polifenoles totales (mg de AG/mL de extracto), antocianinas (mg de C3G/mL de extracto) y elagitaninos (mg de AE/mL de extracto) y a las cinéticas se les determinó el valor de la constante k utilizando el modelo de primer orden descrito en la ecuación 2, para evaluar y comparar la velocidad de las extracciones. Además, se evaluó el rendimiento de extracción (E) al final del tiempo de muestreo.

Las muestras de cada extracción se tomaron con una pipeta y se colocaron en tubos de centrífuga de 5 mL previamente pesados, los cuales se centrifugaron durante 1 min a 4000 rpm. Se pesaron los tubos de centrífuga con la muestra recolectada. Posteriormente, se recolectó el líquido sobrenadante en un balón aforado de 10 mL y se pesó el tubo con el residuo sólido del extracto. Se completó el volumen de los balones con agua destilada. El extracto obtenido se trasvasó a botellas ámbar de 20 mL, almacenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

4.3.5.1. Análisis de datos

Se aplicó un diseño experimental irrestricto aleatorio de dos tratamientos, correspondientes a los tipos de extracción del SMS, EAU y EC. Los tratamientos se realizaron por triplicado, y como variable respuesta se emplearon la k y el E de la extracción de polifenoles, antocianinas y elagitaninos. Se compararon las medias obtenidas para los valores de rendimiento de los compuestos de interés y de la constante k de las tres réplicas de cada cinética mediante una prueba t-student para un 95% de confianza.

Las cinéticas, realizadas por triplicado para cada tipo de extracción (EC y EAU), se obtuvieron al graficar la cantidad de compuesto de interés extraído con respecto al tiempo y se modelaron utilizando la ecuación de primer orden descrita en el apartado 4.3.3.

4.3.6. Caracterización del extracto de polifenoles

El extracto obtenido a partir del subproducto de la mora mediante la EAU en sus condiciones óptimas es el que cuenta con los niveles más altos de los compuestos de interés, por lo cual se midió el contenido de polifenoles totales, el contenido de antocianinas, el contenido de elagitaninos y la capacidad antioxidante mediante los métodos expuestos en el apartado 4.4. Para esto se utilizaron los datos generados en la etapa de verificación del modelo.

Adicionalmente, como es de futuro interés el posterior secado del extracto líquido para su posible comercialización (no como objetivo de la presente investigación), se caracterizó su composición considerando aquellos factores que puedan ser de importancia conocer para llevar a cabo este tratamiento final. Con este fin, se le midió al extracto obtenido bajo las condiciones óptimas los sólidos totales, las cenizas totales, la acidez total, el contenido de etanol y el contenido de azúcares simples en ensayos por triplicado.

4.3.6.1. Análisis de datos

La caracterización del extracto polifenólico obtenido con el uso de ultrasonido aplicado de manera directa permitió comparar los resultados de los contenidos de polifenoles totales, antocianinas, elagitaninos, cenizas totales, etanol, azúcares simples, humedad, así como la determinación de la acidez y la capacidad antioxidante, con valores reportados en la literatura para valorar la viabilidad del uso de la EAU como método de obtención de un extracto de polifenoles a partir de la semilla de la mora.

4.4. Análisis fisicoquímicos

4.4.1. Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales de los extractos y del subproducto de mora se cuantificó usando el método empleado por el Laboratorio de Química del CITA denominado “Determinación de polifenoles” P-SA-MQ-048 (CITA, 2016a), el cual se basa en lo expuesto por Slinkard y Singleton (1977) y por Georgé *et al.* (2005).

Este método consiste en la cuantificación mediante espectrofotometría UV/Vis de los polifenoles presentes en una fruta, jugo o derivados posterior a la reacción redox que se desarrolla entre el reactivo de Folin Ciocalteu y los compuestos mencionados.

Se debe realizar una curva de calibración de ácido gálico, de manera que los datos obtenidos se interpolan en dicha curva para obtener el contenido de polifenoles totales como miligramos de ácido gálico en un litro de extracto (mg AG/L). Para esto, posterior a la preparación de la curva se separan las interferencias al retener los polifenoles mediante una extracción en fase sólida utilizando cartuchos OASIS.

Sin embargo, en la presente investigación, dada la naturaleza de la muestra, no se hizo uso de los cartuchos, ya que se determinó que las interferencias representan menos del 3 % del extracto.

4.4.2. Contenido de antocianinas y elagitaninos

Para la caracterización de los antioxidantes se cuantificaron las antocianinas y los elagitaninos contenidos en los extractos y en el subproducto de mora, utilizando el método empleado en el Laboratorio de Química del CITA denominado “Determinación de polifenoles por HPLC” P-SA-MQ-044 (CITA, 2016b), basado en el método de Mertz *et al.* (2007).

El método consiste en la separación y cuantificación de los polifenoles a través de las diferencias en la afinidad ante una fase móvil y una estacionaria. La fase móvil está formada por una disolución de ácido fórmico al 2 % y una disolución de acetonitrilo al 80 % y ácido fórmico al 2 %, en tanto que la fase estacionaria es una columna C18.

Las señales obtenidas se identifican en los espectros UV a 520 nm para las antocianinas, las cuales se expresan como equivalentes de cianidina 3-glucósido, y a 280 nm para los elagitaninos, expresados como equivalentes de ácido elágico. Para obtener los resultados se deben realizar curvas de calibración que utilizan cianidina 3-glucósido y ácido elágico como sustancias patrón.

4.4.3. Capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el método empleado por el Laboratorio de Química del CITA, denominado “Determinación de la actividad antioxidante Método ORAC” (CITA, 2016c), el cual se basa en lo expuesto por Fox y Whitesell (2000), Wu *et al.* (2004) y Prior, Wu y Schaich (2005).

La determinación consiste en seguir la cinética de la reacción de la fluoresceína en presencia de radicales libres, donde el ataque de estos últimos disminuye la fluorescencia de una disolución. Sin embargo, en presencia de una muestra con capacidad antioxidante la fluoresceína se protege, al igual que la fluorescencia de la disolución.

Se utiliza una disolución de Trolox como patrón de antioxidante y AAPH como fuente de radicales libres. Se reporta el resultado como micromol de Trolox equivalente por 100 g de muestra ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g muestra}$), al interpolar la concentración de la muestra de interés en una curva de la caída de fluorescencia contra la concentración de Trolox.

4.4.4. Humedad

La humedad del SMF y SMS y del extracto obtenido bajo las condiciones óptimas de extracción se determinó utilizando el método del Laboratorio de Química del CITA denominado “Humedad” P-SA-MQ-002 (CITA, 2017a), fundamentado en el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005).

La determinación se basa en medir la pérdida de masa que experimenta la muestra al usar una estufa de vacío o convección natural y provocar la evaporación de agua. Debido a la naturaleza de la muestra esta se hace pasar por un pre secado a 60 °C en una estufa de

convección y el secado se lleva a cabo en una estufa al vacío durante un mínimo de 14 horas hasta alcanzar masa constante.

4.4.5. Cenizas totales

Se midieron utilizando el método empleado por el Laboratorio de Química del CITA denominado “Cenizas Totales” P-SA-MQ-004 (CITA, 2017b) basado en lo expuesto en el método AOAC 940.26 (AOAC, 2005).

Este método consiste en la medición de la masa que resulta posterior a quemar las muestra a temperaturas entre 500 °C y 600 °C. Se acondicionó la muestra en una estufa a una temperatura de 100 °C. Posteriormente la muestra se incineró hasta obtener cenizas blancas y el crisol con la muestra alcanzó masa constante.

4.4.6. Acidez total

Se obtuvo utilizando el método empleado por el Laboratorio de Química del CITA denominado “Acidez Total”, P-SA-MQ-002 (CITA, 2017c) fundamentado en el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005c).

Se valoraron con NaOH 0,1 mol/L los ácidos presentes en la muestra hasta el punto final de la valoración, determinado potenciométricamente, una vez que la muestra a analizar es coloreada. La acidez se expresa como g de ácido por 100 g de muestra, considerando el factor del ácido málico ya que este es el que predomina en las moras (Zhao, 2007).

4.4.7. Contenido de etanol

Se determinó utilizando el método del Laboratorio de Química del CITA denominado “Etanol y Metanol en Frutas, Bebidas Fermentadas y Licores Destilados por Cromatografía Gases y HPLC” P-SA-MQ-052 (CITA, 2017d), que se referencia en los métodos de la AOAC 983.13, 973.23 y 984.14 (AOAC, 2005). El método consiste en identificar y cuantificar el etanol en la muestra utilizando cromatografía de gases.

4.4.8. Contenido de azúcares simples

Se cuantificó según el método del Laboratorio de Química del CITA denominado “Azúcares por HPLC” P-SA-MQ-006 (CITA, 2017e), fundamentado en lo expuesto por Sullivan y Carpenter (1993).

Para esta cuantificación se requiere extraer los azúcares de la muestra para inyectar el extracto en una columna cromatográfica adecuada que permita la separación de los azúcares presentes. Los pasos de cuantificación e identificación se realizan al inyectar patrones de concentraciones conocidas del azúcar, y esto permite identificar al analizar los tiempos de retención.

5. Resultados y Discusión

5.1. Evaluación del efecto de la preparación del subproducto de la mora

5.1.1. Polifenoles Totales

En la Figura 16 se presentan los modelos de primer orden con sus respectivas bandas de confianza para las cinéticas de extracción de polifenoles totales, utilizando SMS y SMF como sustrato.

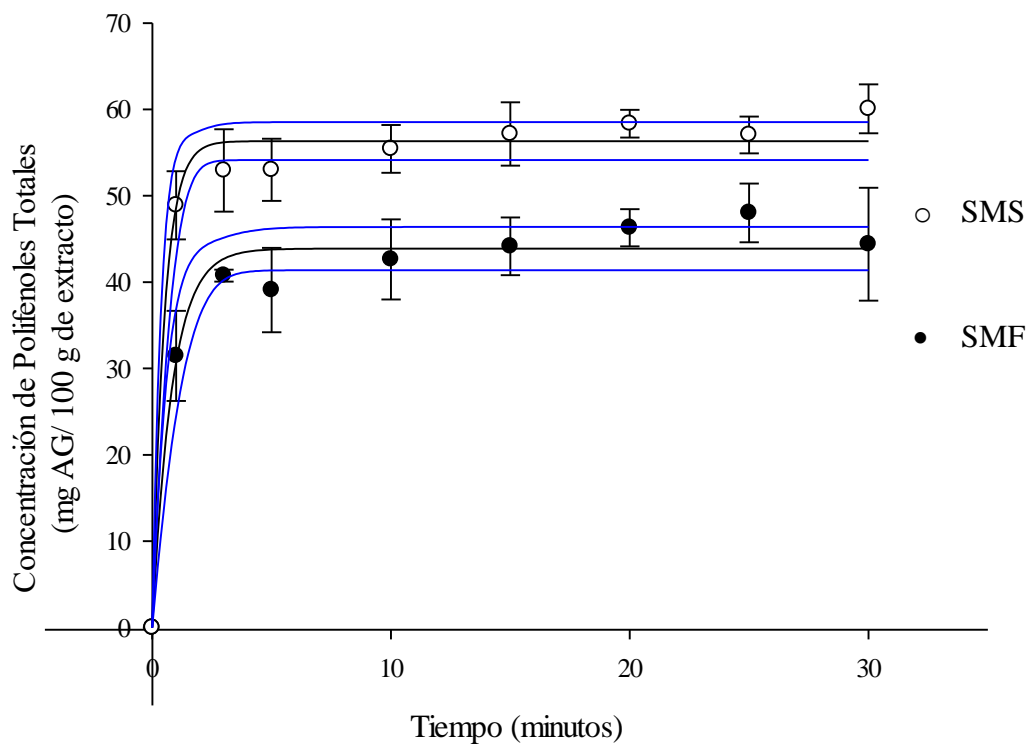


Figura 16. Cinéticas de extracción de PT del SMS y SMF (las bandas azules indican los intervalos de confianza al 95 % del modelo de primer orden).

Los parámetros de ajuste de los modelos de primer orden obtenidos para la extracción de PT utilizando la SMF y la SMS son el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p del modelo) y la probabilidad de falta de ajuste (pfa) y se exponen en el Cuadro VI.

Cuadro VI. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de polifenoles totales del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido.

Tratamiento	p modelo	R ²	R ² -adj	pfa ¹
SMF	<0,0001	0,9710	0,9668	0,9063
SMS	<0,0001	0,9852	0,9831	0,6246

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa (p<0,05).

Como se puede ver en el Cuadro VI, para un 95 % de confianza, el modelo de primer orden se ajusta adecuadamente para las cinéticas de extracción de los PT tanto del SMF como del SMS, ya que las probabilidades de los modelos son inferiores a 0,05, los valores de R² y, más importantemente, de R²-adj se acercan a 1 con valores superiores a 0,9. Adicionalmente, se puede ver que la pfa no es significativa, ya que los valores son superiores a 0,05; lo cual corrobora lo ya expresado.

En el Cuadro VII se presenta la concentración de PT al final de los 30 minutos de extracción, al igual que el rendimiento de extracción de PT y las constantes de velocidad de las cinéticas de primer orden, para la extracción de PT utilizando SMF y SMS como sustrato.

Cuadro VII. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de polifenoles totales del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido¹.

Tratamiento	PT 30 min (mg AG/100 g extracto)*	E (%)*	k (min ⁻¹)*
SMF	44 ± 6	4,0 ± 0,6	1,2 ± 0,4
SMS	60 ± 3	35 ± 2	2,0 ± 0,3

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=6). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores según prueba t-student (p<0,05).

En el Cuadro VII se puede apreciar que se obtienen valores significativamente mayores de contenido final de PT, de rendimiento de extracción (E) y de constante de velocidad (k) para la extracción de polifenoles, siguiendo un modelo de primer orden, utilizando la SMS, lo cual también se aprecia en la Figura 16. Esto quiere decir que no solo se extrae una mayor cantidad de polifenoles totales utilizando la SMS, sino que la velocidad

a la que se extraen es mayor, por lo que la eficiencia de la extracción es mayor al utilizar este sustrato en comparación con la SMF.

Esta diferencia se puede deber a que las extracciones sólido-líquido se ven afectadas por el tipo de tratamiento que se le dé al sustrato. Al secar y reducir de tamaño la semilla de mora, se aumenta el área superficial, con lo cual aumenta el área de intercambio entre el sólido y el líquido, y por ende también aumenta la velocidad de extracción. Además, los sólidos secos presentan una mejor capacidad de hidratación, lo que permite un mejor contacto entre el disolvente y, no solo la matriz sólida, sino también los compuestos de interés (D'Alessandro, 2013; Medina-Torres *et al.*, 2017).

5.1.2. Antocianinas

En la Figura 17 se presentan los modelos de primer orden con sus respectivas bandas de confianza para las cinéticas de extracción de antocianinas utilizando SMS y SMF como sustrato.

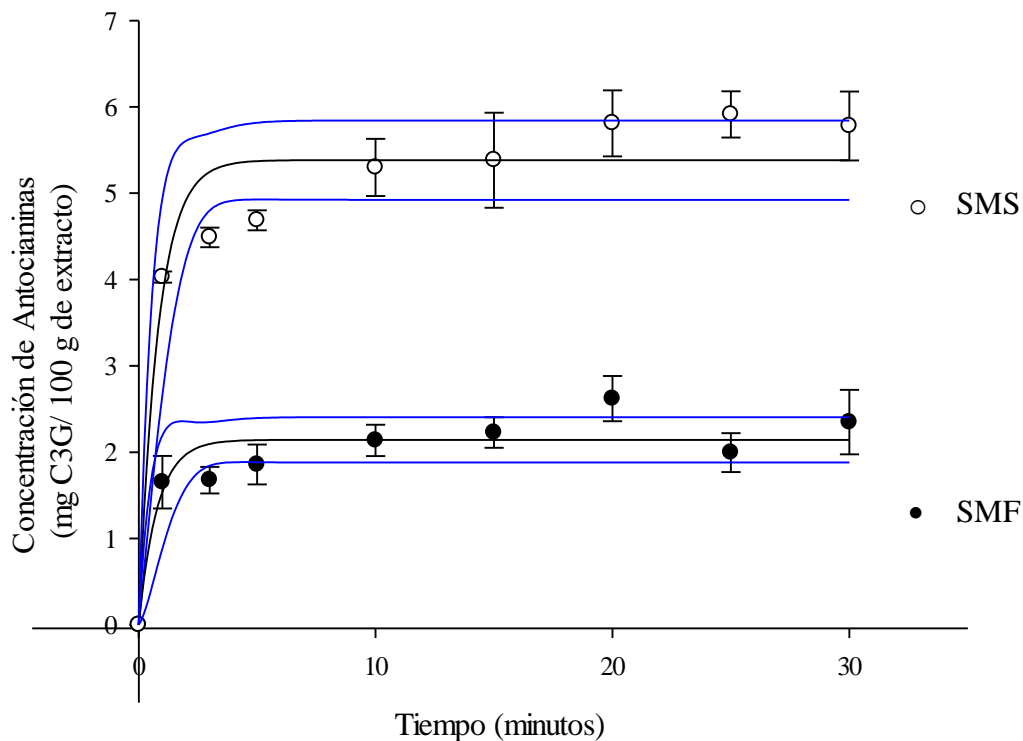


Figura 17. Cinéticas de extracción de AT del SMS y SMF (las bandas azules indican los intervalos de confianza al 95 % del modelo de primer orden).

Los parámetros de ajuste de los modelos de primer orden obtenidos para la extracción de antocianinas utilizando la SMF y la SMS son el R^2 , R^2 -adj), la p del modelo y la pfa, y se exponen en el Cuadro VIII.

Cuadro VIII. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de antocianinas del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido.

Tratamiento	p modelo	R^2	R^2 -adj	pfa ¹
SMF	0,0002	0,8763	0,8586	0,9731
SMS	<0,0001	0,9367	0,9276	0,1855

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa ($p < 0,05$).

Como se puede ver en el Cuadro VIII, para un 95 % de confianza, el modelo de primer orden se ajusta adecuadamente para las cinéticas de extracción de AT, tanto de SMF como de SMS ya que las probabilidades de los modelos son inferiores a 0,05, los valores de R^2 y, lo que es más importante, los R^2 -adj se acercan a 1 con valores superiores a 0,8; donde los modelos tienen un mejor ajuste para el caso de la SMS, con valores superiores a 0,9. Adicionalmente, se puede ver que la pfa no es significativa, ya que los valores son superiores a 0,05; lo cual corrobora lo ya expresado.

En el Cuadro IX se presenta la concentración de AT al final de los 30 minutos de extracción, al igual que el rendimiento de extracción de AT y las constantes de velocidad de las cinéticas de primer orden para la extracción de AT utilizando SMF y SMS como sustrato.

Cuadro IX. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de antocianinas del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido¹.

Tratamiento	AT 30 min (mg C3G/100 g extracto)*	E (%)*	k (min ⁻¹)
SMF	2,4 ± 0,4	4 ± 1	0,8 ± 0,9
SMS	5,8 ± 0,4	29 ± 5	1,4 ± 0,2

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba t-student ($p < 0,05$).

Para el caso de la extracción de antocianinas se encuentra diferencia significativa para el contenido final de AT en el extracto y para el rendimiento de extracción, donde se obtienen valores superiores al utilizar la SMS como sustrato. Lo cual también se observa en la Figura 17. Con respecto a la velocidad de la extracción se observa que no hay diferencia significativa, por lo que con ambos sustratos se extraería en un mismo lapso.

Sin embargo, se puede observar que el intervalo de confianza en el caso de la extracción de AT de la SMF es más alto que el de la SMS, lo que indica una mayor variabilidad en la extracción utilizando la SMF, y puede contribuir a la falta de diferencia significativa entre los resultados. Esto se puede atribuir al tamaño de partícula de este sustrato, el cual es mayor que en el caso de la SMS. Las partículas gruesas no solo interfieren en la toma de muestra, sino también afectan la homogeneidad del medio de extracción ya que se acumulan alrededor de los componentes del equipo de extracción.

Estos resultados, al igual que los de la extracción de PT, señalan que es más eficiente la extracción de AT utilizando la SMS en comparación con la SMF.

5.1.3. Elagitaninos

En la Figura 18 se presentan los modelos de primer orden con sus respectivas bandas de confianza para las cinéticas de extracción de elagitaninos utilizando SMS y SMF como sustrato.

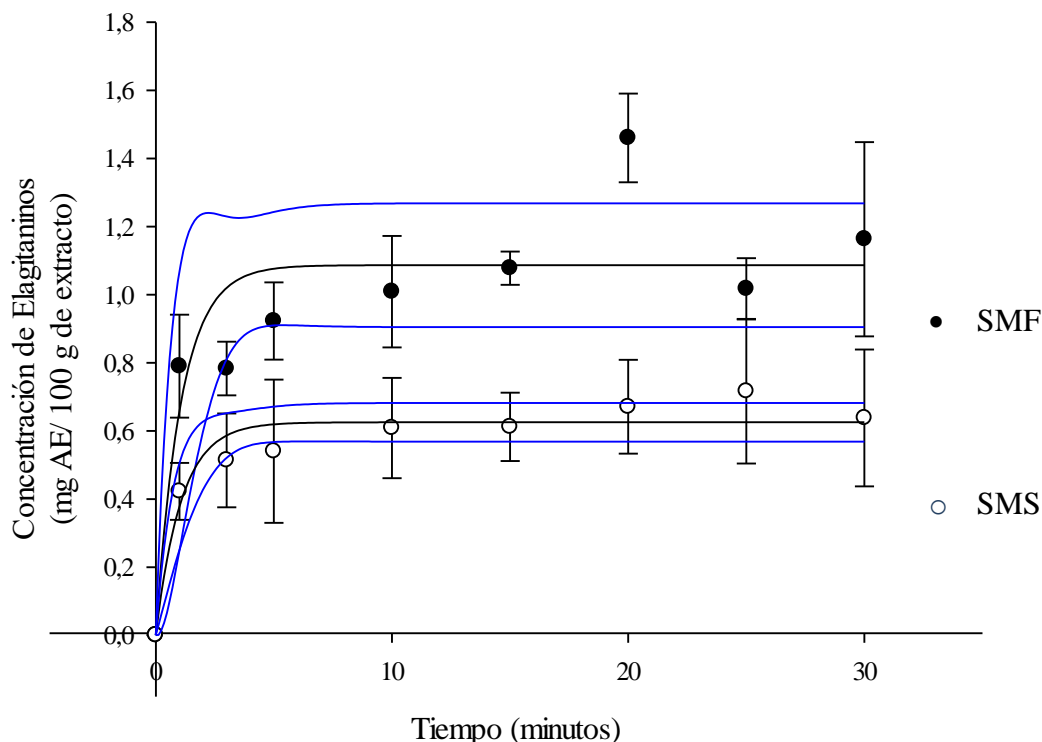


Figura 18. Cinéticas de extracción de ET del SMS y SMF (las bandas azules indican los intervalos de confianza al 95 % del modelo de primer orden).

Los parámetros de ajuste de los modelos de primer orden obtenidos para la extracción de elagitaninos utilizando la SMF y la SMS son el R^2 , el R^2 -adj, la p del modelo y la pfa, y se exponen en el Cuadro X.

Cuadro X. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de ET de SMS y SMF.

Tratamiento	p modelo	R^2	R^2 -adj	pfa ¹
SMF	0,0011	0,8012	0,7728	0,6281
SMS	<0,0001	0,9338	0,9243	0,7630

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa ($p < 0,05$).

Como se puede ver en el Cuadro X, el modelo de primer orden se ajusta adecuadamente para las cinéticas de extracción de ET tanto de SMF como de SMS ya que las probabilidades de los modelos son inferiores a 0,05.

Los valores de R^2 y, de forma más importante, los R^2 -adj se acercan a 1 con valores superiores a 0,9, en el caso de la SMS. Al analizar el R^2 y R^2 -adj del modelo de primer orden de la cinética de extracción de ET utilizando la SMF se observan valores de 0,80 y 0,77, los cuales son menos deseables, pero aun así se consideran favorables.

Estos resultados se pueden explicar en la Figura 18, donde se observan intervalos de confianza más amplios en el caso de la SMF, en comparación con la SMS, lo cual indica una mayor variabilidad en los resultados obtenidos para la extracción de esta, que puede interferir con la adecuación del modelo de primer orden a los resultados obtenidos. Finalmente, se puede ver que la pfa no es significativa en ambos casos, ya que los valores son superiores a 0,05; lo cual corrobora lo ya expresado.

En el Cuadro XI se presenta la concentración de ET al final de los 30 minutos de extracción, al igual que el rendimiento de extracción de ET y las constantes de velocidad de las cinéticas de primer orden para la extracción de ET utilizando SMF y SMS como sustrato.

Cuadro XI. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de elagitaninos del subproducto de mora utilizado fresco o seco y molido¹.

Tratamiento	ET 30 min (mg AE/100 g extracto)	E (%)	k (min ⁻¹)
SMF	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,6	0,7 ± 0,7
SMS	0,6 ± 0,2	2,0 ± 0,6	0,9 ± 0,7

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba t-student (p<0,05).

Para la extracción de ET, no se encuentra diferencia significativa para los parámetros concentración de ET, E y k. Sin embargo, como se ha venido mencionando, esto puede ser atribuido a la mayor variabilidad que incorpora el uso de la SMF.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se selecciona la SMS como sustrato para la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos.

5.1.4. Comportamiento general de las cinéticas

De forma general, tal y como se observa en otros estudios realizados sobre la extracción de compuestos fenólicos, se encuentra que el comportamiento de las cinéticas es de tal manera que presenta un rápido aumento en la concentración de los compuestos en los primeros minutos de la extracción hasta alcanzar un máximo, donde se presenta la estabilización de la concentración o se observa un descenso de la misma, posiblemente debido a la degradación de los compuestos de interés.

Espada-Bellido *et al.* (2019) encontraron un comportamiento similar en la extracción de polifenoles y antocianinas a partir de pulpa de mora *Rubus ulmifolius* L. utilizando EAU de forma directa que se obtuvo una concentración máxima a un tiempo de 10 minutos y a tiempos más prolongados se llegó a observar la degradación de los compuestos fenólicos.

Kadiri, Gbadamosi y Akanbi (2019) también describen una extracción más rápida para polifenoles en la cáscara de camote en los primeros 5 minutos y un incremento más lento hasta la obtención de la concentración máxima, donde posteriormente se observa la disminución de la concentración de polifenoles.

En el caso de las cinéticas obtenidas, para un tiempo de 30 minutos de extracción no se observa una disminución marcada en la concentración de PT, AT o ET. El tiempo seleccionado, donde se alcanzó la concentración máxima fue de 20 minutos; un tiempo reducido, similar al encontrado por Espada-Bellido *et al.* (2019). Este tiempo se estableció como el tiempo de extracción para las siguientes etapas del presente trabajo.

Con respecto al tamaño de partícula, Laroze *et al.* (2010) encontraron para la extracción de compuestos fenólicos a partir de diferentes bayas secas y molidas a distintos tamaños de partícula que, entre menor el tamaño de partícula, mayor el rendimiento de la extracción ya que facilita la transferencia de masa, y además permite la extracción de compuestos con mayor tamaño molecular que tardarían más en difundirse a través de la matriz sólida entera.

Esto también se ve reforzado por lo encontrado por Quirós (2016), donde se llevó a cabo una EAU pero con la semilla de mora entera y se encontró un tiempo máximo de

extracción de elagitaninos de 60 minutos, superior a los 20 minutos encontrados utilizando semilla de mora seca y molida.

Por otro lado, no es común encontrar mayor contenido de compuestos fenólicos en extractos a partir de matrices vegetales secas en comparación con su contraparte fresca, ya que el tratamiento térmico puede degradar los compuestos fenólicos (Diaconeasa, 2018 y Gąsecka *et al.*, 2019). Sin embargo, en el presente caso, los mayores rendimientos y constantes de velocidad superiores se pueden deber al factor de tamaño de partícula, ya que la semilla utilizada fresca posee un tamaño de partícula superior al de la seca y molida lo cual puede dificultar la difusión de los compuestos de interés.

5.2 Evaluación de las condiciones de extracción de polifenoles asistida por ultrasonido

Los resultados del DCCR para los factores temperatura, concentración de etanol y amplitud del ultrasonido en la extracción de polifenoles se presentan en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Valores obtenidos de las variables respuesta analizadas en los extractos, en la optimización de extracción de polifenoles del subproducto de mora seco y molido.

Factores			Variables Respuesta		
Temperatura (°C)	Concentración de Etanol (% m/m)	Amplitud (%)	Concentración Polifenoles Totales (mg AG/100 g SMS)	Concentración Antocianinas (mg C3OG / 100 g SMS)	Concentración Elagitaninos (mg AE / 100 g SMS)
32.1 (-1.0)	12.2 (-1.0)	32.2 (-1.0)	3722	128	78
32.1 (-1.0)	12.2 (-1.0)	67.8 (1.0)	3672	135	75
32.1 (-1.0)	47.8 (1.0)	32.2 (-1.0)	6376	153	175
32.1 (-1.0)	47.8 (1.0)	67.8 (1.0)	5415	150	173
52.9 (1.0)	12.2 (-1.0)	32.2 (-1.0)	4991	175	176
52.9 (1.0)	12.2 (-1.0)	67.8 (1.0)	6097	190	185
52.9 (1.0)	47.8 (1.0)	32.2 (-1.0)	7157	152	236
52.9 (1.0)	47.8 (1.0)	67.8 (1.0)	6432	159	255
25.0 (-1.682)	30.0 (0.0)	50.0 (0.0)	5695	160	193
60.0 (+1.682)	30.0 (0.0)	50.0 (0.0)	7307	185	427
42.5 (0.0)	0.0 (-1.682)	50.0 (0.0)	2761	116	30
42.5 (0.0)	60.0 (+1.682)	50.0 (0.0)	5837	107	115
42.5 (0.0)	30.0 (0.0)	20.0 (-1.682)	6299	191	329
42.5 (0.0)	30.0 (0.0)	80.0 (+1.682)	7044	183	329
42.5 (0.0)	30.0 (0.0)	50.0 (0.0)	5872	184	331
42.5 (0.0)	30.0 (0.0)	50.0 (0.0)	6747	183	336
42.5 (0.0)	30 (0.0)	50.0 (0.0)	7483	183	319
42.5 (0.0)	30 (0.0)	50.0 (0.0)	6736	182	332
42.5 (0.0)	30 (0.0)	50.0 (0.0)	7291	184	332
42.5 (0.0)	30 (0.0)	50.0 (0.0)	6685	184	331

* Para los factores se indica entre paréntesis las variables codificadas.

5.2.1. Aplicación del diseño central compuesto rotatable

Para la evaluación de las condiciones del proceso de extracción de polifenoles del SMS se aplicó la metodología de superficie de respuesta empleando un diseño central compuesto rotatable (DCCR). Los parámetros de ajuste de los modelos obtenidos para las variables respuesta estudiadas, el R^2 , el R^2 -adj, la p del modelo, la pfa y la distribución de los residuos se exponen en el Cuadro XIII.

Cuadro XIII. Parámetros de ajuste y bondad obtenidos para cada variable al aplicar la metodología de superficie de respuesta.

Variable	p del modelo ¹	R^2 *	R^2 -adj*	p de falta de ajuste**	Gráfica de residuos
PT	0,0001	0,92	0,86	0,76	Aleatorio
AT	0,0000002	0,98	0,96	0,000091 ⁺	Aleatorio
ET	0,0001	0,93	0,87	0,000065 ⁺	Aleatorio

*Valores marcados con (+) significan un valor de coeficiente de determinación (R^2) o coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj) bajo (<0,80).

**Valores marcados con (+) indican falta de ajuste para los factores

¹ Los análisis de varianza son presentados en Anexos.

El Cuadro XIII demuestra que los modelos generados con de los resultados del DCCR poseen valores de R^2 y R^2 -adj deseables. Los coeficientes de determinación y su forma ajustada indican qué porcentaje de la variación en la variable respuesta puede ser explicado por la variación de la variable independiente o los factores del modelo.

Su rango es de 0 a 1 o, si se desea ver en términos de porcentaje, de 0 % a 100 %. En el presente caso, se puede analizar que la variabilidad o las diferencias en el valor obtenido de concentración de PT, AT y ET en el extracto pueden ser explicadas en más de un 80 % (específicamente, 86 %, 96 % y 87 % para PT, AT y ET, respectivamente) por las diferencias en los factores utilizados, es decir, la temperatura, la concentración de etanol y la amplitud del ultrasonido utilizados en la extracción.

Además, se considera que las gráficas de los residuos demuestran aleatoriedad, es decir, que los valores de los residuos no demuestran de forma general un patrón, lo cual es indicativo del ajuste del modelo, ya que se puede ver la desviación de los datos predichos con respecto a los datos reales.

A continuación, en las Figuras 19 a 21, se presentan las gráficas de los residuos para las tres variables respuesta.

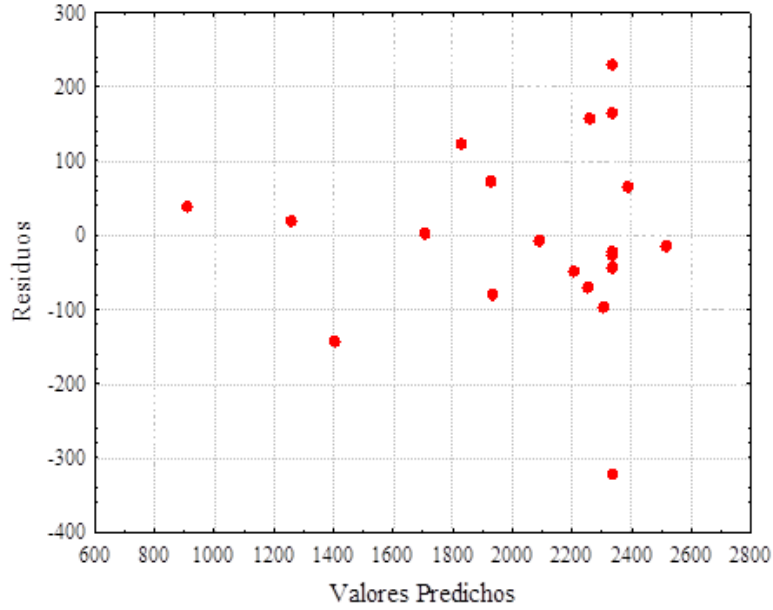


Figura 19. Valores predichos contra residuos para la variable concentración de PT (mg AG/100 g SMS).

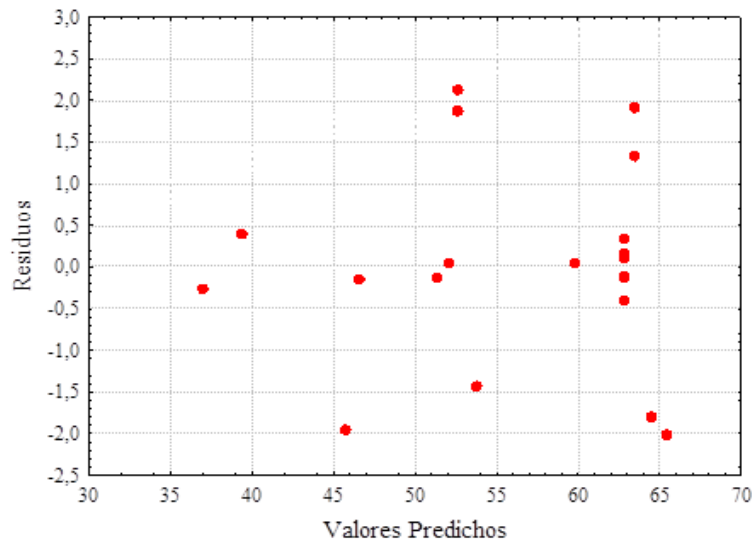


Figura 20. Valores predichos contra residuos para la variable concentración de AT (mg C3G/100 g SMS).

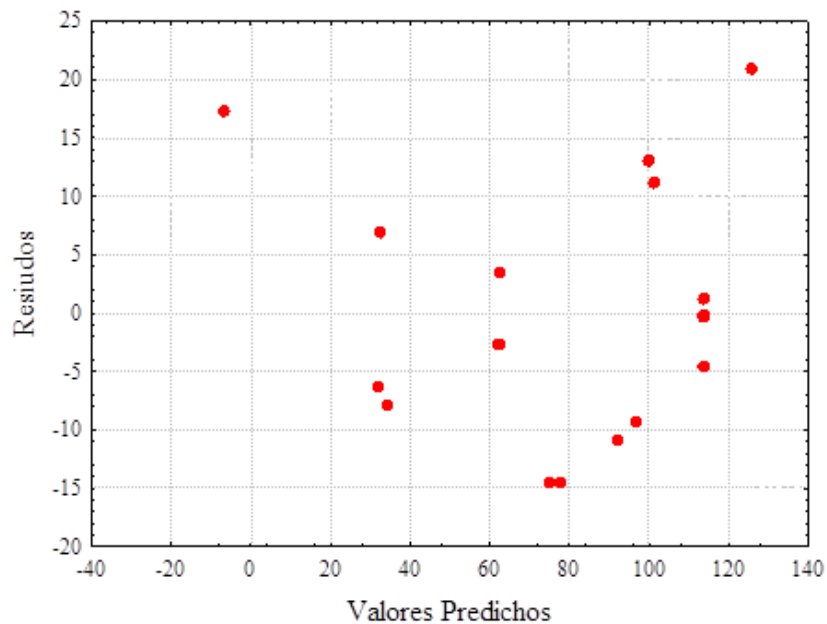


Figura 21. Valores predichos contra residuos para la variable concentración de ET (mg AE/100 g SMS).

De forma más específica, en las tres Figuras (19, 20 y 21), no se observa un desequilibrio en el eje y, ya que es equivalente el número de residuos que se encuentra por encima y por debajo de cero; de igual forma que no se observa un desequilibrio en el eje x. Tampoco es posible observar valores atípicos que comprometan el ajuste de los modelos.

De forma no tan marcada, lo que sí se puede observar es cierta heteroscedasticidad, donde los valores de los residuos aumentan a medida que aumenta el valor predicho. Esta observación indica que de forma inherente el modelo presenta buen ajuste, pero podría ser modificado para presentar uno mejor. Dado a estos resultados, se desprende que existe buen ajuste, sin embargo, puede haber una variable faltante en el modelo que pueda explicar de mejor manera la variación de las variables respuesta.

Por último, en el Cuadro XIII se puede observar que, tanto para los modelos de AT como de ET, se presenta una pfa significativa, al presentar valores menores a 0,05. Esto significa que se rechaza la hipótesis nula, la cual radica en que el error del modelo es igual

al error puro, y que se acepta la hipótesis alternativa, en la cual el error del modelo es superior al error puro y existe falta de ajuste.

El error puro representa la variabilidad inherente de la variable respuesta que no puede ser explicada por ningún modelo, mientras que la falta de ajuste se basa en la variabilidad de la variable respuesta que no puede ser explicada por el modelo en cuestión. Es importante mencionar que la existencia de la falta de ajuste no siempre significa que hacen falta términos de mayor orden en el modelo, sino que se puede dar debido a la ausencia de factores o términos en el modelo en cuestión (Montgomery, Peck y Vining, 2012).

Por lo tanto, se considera que con los presentes factores utilizados (temperatura, concentración de etanol y amplitud del ultrasonido), los modelos obtenidos presentan un ajuste favorable con los términos que son significativos; sin embargo, se percibe que se puede encontrar otro factor que logre explicar mejor la variabilidad de las variables respuesta.

Los modelos generados para las variables respuesta PT, AT y ET, con los factores codificados significativos para un 99% de confianza, se presentan en las ecuaciones [4], [5] y [6].

$$\text{Cn PT} = 6\,609,15 + 600,760\,T + 884,06\,\text{Cn E} - 920,00\,\text{Cn E}^2 \quad [4]$$

$$\begin{aligned} \text{Cn AT} = & 183,40 + 11,23\,T - 3,93\,T^2 - 2,12\,\text{Cn E} - 25,40\,\text{Cn E}^2 + 1,00\,A + 1,18\,A^2 - 11,60 \\ & T^* \text{Cn E} + 2,19\,T^*A - 2,45\,\text{Cn E}^*A \end{aligned} \quad [5]$$

$$\text{Cn ET} = 332,11 + 54,75\,T - 20,31\,T^2 + 34,24\,\text{Cn E} - 104,15\,\text{Cn E}^2 - 13,65\,A^2 - 8,10\,T^* \text{Cn E}^*A \quad [6]$$

Como se puede ver en la ecuación [4], en el caso de los polifenoles totales la temperatura, la concentración de etanol y su efecto cuadrático son los factores que tienen efecto significativo sobre la extracción de polifenoles totales de la SMS; mientras que las interacciones de los factores analizados no ejercen efecto sobre la concentración de los PT extraídos.

Al analizar la ecuación [5], se percibe que todos los factores y sus interacciones tienen un efecto sobre la concentración de AT; mientras que para la concentración de ET en la ecuación [6], la temperatura, la concentración de etanol y el efecto cuadrático de la amplitud son los que tienen un efecto significativo.

En los siguientes apartados, se presentan las superficies de respuesta que representan los modelos mencionados.

5.2.1.1. Comportamiento de la extracción de polifenoles totales

En la Figura 22 se presentan las gráficas de contorno obtenidas de los modelos de la extracción de PT de la SMS, las cuales exhiben la concentración de PT con respecto a los factores utilizados en la optimización.

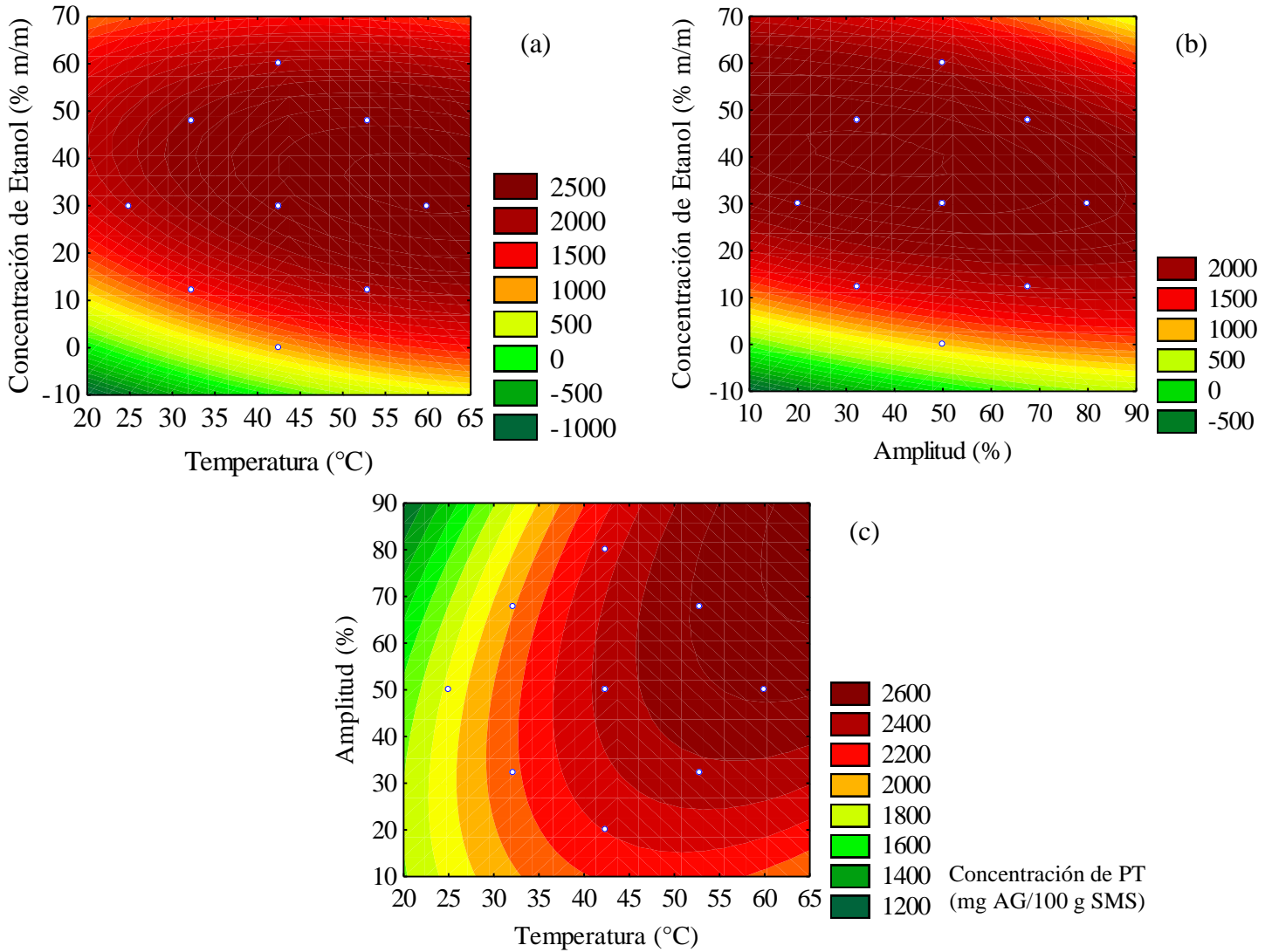


Figura 22. Gráficas de contorno para la optimización de PT (mg AG/100 g SMS) del SMS.

En la Figura 22 se puede observar el comportamiento descrito en la ecuación [4]. Al analizar las gráficas de contorno que incorporan la concentración de etanol se puede ver que los contornos demuestran cierta concavidad, y es por esto que el término cuadrático de la concentración de etanol tiene un efecto significativo sobre la concentración de polifenoles.

El efecto de la concentración de etanol sigue un comportamiento parabólico. El parámetro lineal tiene un efecto positivo, pero el cuadrático tiene un efecto negativo. Las concentraciones de PT son bajas a valores bajos de concentración de etanol, pero con el aumento de la concentración de etanol, las concentraciones de PT aumentan hasta un valor máximo, luego del cual disminuyen al aumentar más la concentración de disolvente.

El comportamiento del factor concentración de etanol en la extracción, se debe a un fenómeno de afinidad; el agua es un disolvente polar fuerte, mientras que el etanol presenta una polaridad más baja que esta. Los compuestos fenólicos presentan mayor afinidad al etanol a medida que este se mezcla con agua para aumentar su polaridad. Al mezclar el etanol con el agua, a determinada concentración se obtiene un disolvente de polaridad tal que es capaz de extraer compuestos de ambos lados del rango de polaridad (polaridad alta a baja) (Zhang *et al.*, 2007; Uma, Ho y Wan Aida, 2010).

Por otro lado, el etanol es un disolvente orgánico mientras que el agua es un disolvente inorgánico. Entonces al aumentar la concentración de agua, disminuye la afinidad de los compuestos de interés al medio al sobrepasar el 70 % de agua, ya que el disolvente aumenta en su carácter inorgánico (Zhang *et al.*, 2007).

Con un 99 % de confianza el efecto lineal de la temperatura tiene un efecto significativo sobre la concentración de polifenoles. Esto está de acuerdo con lo que se observa (principalmente en la gráfica 22c), ya que, al aumentar la temperatura, genera un aumento de forma directamente proporcional de la concentración de polifenoles, donde se puede ver que al subir en el eje de la temperatura las bandas rojas incrementan y al bajar en el mismo eje las bandas verdes se hacen evidentes.

Al incrementar la temperatura se puede dar un aumento en la solubilidad de los solutos en el disolvente al igual que en su coeficiente de difusión; sin embargo, dependiendo de la temperatura, se podría observar también un descenso en la concentración de los PT

debido a la degradación térmica de los compuestos, hecho que no se observa en la presente superficie (Lyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Uma, Ho y Wan Aida, 2010).

Para la amplitud, al ubicarse en el eje correspondiente, tanto en la gráfica (b) como la (c) no se percibe una diferencia marcada en la concentración de PT al aumentar o disminuir la magnitud de este factor.

5.2.1.2. Comportamiento de la extracción de antocianinas

En la Figura 23 se presentan las gráficas de contorno obtenidas para la optimización de la extracción de AT de la SMS, las cuales exhiben la concentración de AT con respecto a los factores utilizados en la optimización.

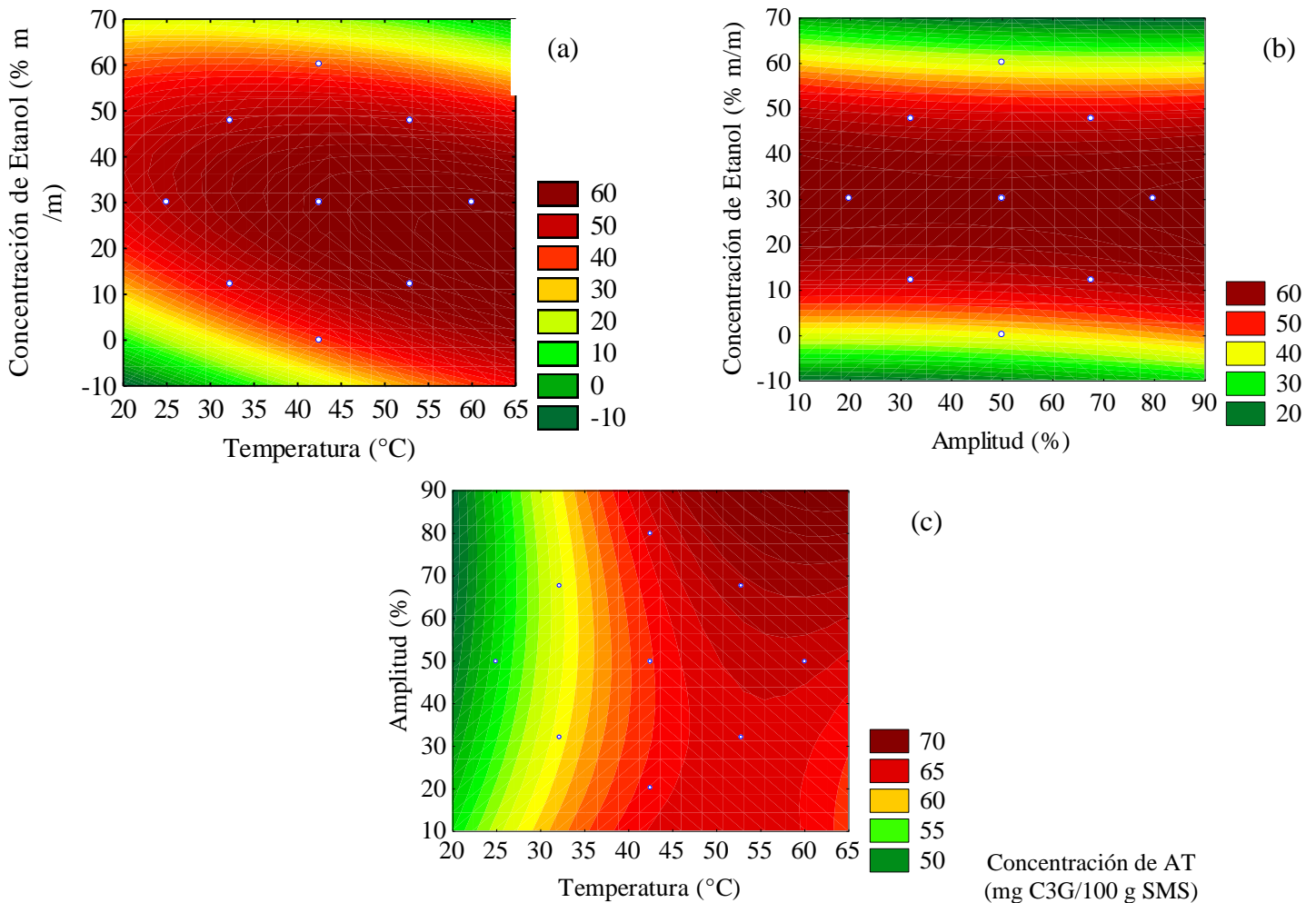


Figura 23. Gráficas de contorno para la optimización de AT (mg C3G/100 g SMS) del SMS.

En la Figura 23 se representa de forma gráfica el comportamiento de la concentración de antocianinas con respecto a los factores del modelo planteado en la ecuación [5]. En el caso de la concentración de AT, el modelo indica que todos los factores tienen un efecto significativo sobre ella.

La significancia de los factores cuadráticos indica de forma más marcada que las superficies de respuesta correspondientes presentan una forma cóncava. En el caso de la temperatura, el coeficiente de regresión del factor lineal posee mayor magnitud y, por lo tanto, mayor efecto, lo cual concuerda con lo observado en las superficies de respuesta obtenidas para la concentración de polifenoles totales, donde se da el aumento en la respuesta a medida que aumenta la temperatura.

Con respecto a la concentración de etanol, se observa el mismo comportamiento ya explicado para la concentración de polifenoles, donde se presenta concavidad. La magnitud del coeficiente de regresión es mayor para el efecto cuadrático de la concentración de etanol, y además presenta un signo negativo, el cual explica el sentido de la parábola.

Para la amplitud, los efectos lineal y cuadrático presentan magnitudes similares y positivas. Lo cual indica una forma directamente proporcional o la exponencialidad de la respuesta con respecto al factor. Sin embargo, de igual forma que con la respuesta de los PT, el efecto no presenta una tendencia marcada, ya que al colocarse en los ejes de amplitud de las gráficas de contorno que lo incorporan se tiene una concentración más o menos constante.

Por último, al haber interacciones entre los factores de la superficie de respuesta, se debe hablar del comportamiento combinado de la respuesta ante los factores. Se puede ver que la interacción entre la temperatura y la concentración de etanol, y entre esta última y la amplitud poseen un signo negativo, lo cual se ve influenciado por los signos negativos de la concentración de etanol, esto indica que la concentración de AT posee valores bajos cuando se tienen valores bajos de temperatura y etanol, al igual que de valores bajos de concentración de etanol y amplitud.

Sin embargo, también se tiene el caso de la interacción entre la temperatura y la amplitud, donde se muestra el comportamiento positivo, donde la concentración de AT aumenta a valores altos de temperatura y amplitud. Estas observaciones que coinciden lo que se ha explicado sobre los factores que pueden afectar la extracción. Lo que se debe considerar es que al ser negativo el factor cuadrático de la concentración de etanol, también se observan valores bajos de antocianinas al tener valores altos del factor de concentración de etanol aunque se tengan temperaturas y porcentajes de amplitud altos.

5.2.1.3. Comportamiento de la extracción de elagitaninos

En la Figura 24 se presentan las gráficas de contorno obtenidas para la optimización de la extracción de ET de la SMS, las cuales exhiben la concentración de ET con respecto a los factores utilizados en la optimización.

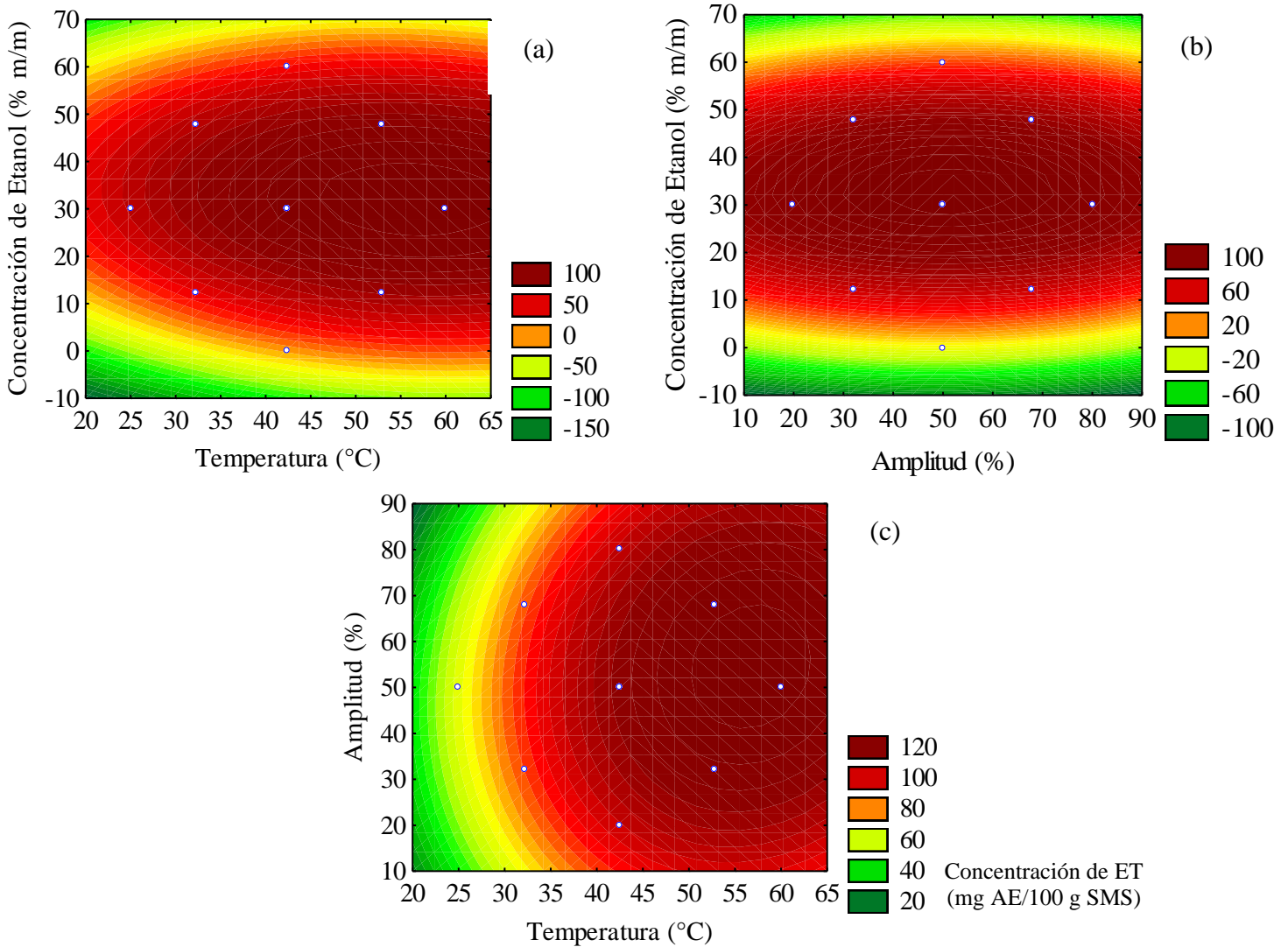


Figura 24. Gráficas de contorno para la optimización de ET (mg AE/100 g SMS) del SMS.

Con respecto al comportamiento de la concentración de ET debido a los factores del modelo, también se observa el comportamiento que se ha mencionado tanto para PT como para AT. Las gráficas de contorno se encuentran de acorde a lo que se plantea en los modelos.

Para la concentración de ET se observa un efecto significativo para los factores lineales y cuadráticos tanto de la temperatura como de la concentración. Los efectos cuadráticos en ambos casos presentan signos negativos, lo que le atribuye la dirección a la superficie de respuesta.

Los factores lineales poseen signo positivo, lo cual indica que a medida que aumentan la temperatura y la concentración de etanol, también lo hace la concentración de ET. Con la excepción de que, al sobrepasar cierta concentración de etanol, se tiene un descenso en la concentración de ET debido al factor cuadrático del mismo.

En el modelo también se encuentra efecto significativo del factor cuadrático de amplitud y con signo negativo, sin embargo, este comportamiento no se aprecia claramente en las gráficas de contorno, pero si se observa al analizar la función de deseabilidad más adelante en la Figura 25.

5.2.2. Zonas óptimas de extracción

En el Cuadro XIV se presentan las zonas de los gráficos de contorno en las cuales se obtienen concentraciones altas de los compuestos de interés.

Cuadro XIV. Ámbitos de los factores donde se obtuvo la zona óptima de cada variable respuesta.

Variable	Zona Óptima		
	Temperatura (°C)	Concentración de Etanol (% m/m)	Amplitud (%)
PT	43 - 60	21 - 53	41 - 80
AT	43 - 60	21 - 39	20 - 80
ET	45 - 60	17 - 39	41 - 68

Las zonas óptimas de extracción fueron utilizadas para seleccionar los puntos utilizados en la verificación de los modelos obtenidos para las superficies de respuesta planteadas. Por lo tanto, se seleccionó un primer punto óptimo (T=60 °C, EtOH=30 % m/m., 65 % de amplitud) y un segundo punto (T=43 °C, EtOH=53 % m/m y 32 % de amplitud), los cuales poseen valores opuestos dentro de la zona óptima de extracción.

5.2.3. Verificación de los modelos obtenidos en los puntos de mayor extracción

En el Cuadro XV se exponen los valores de las variables respuesta obtenidos experimentalmente, y aquellos obtenidos a través de los modelos calculados, con una confianza del 99 %.

Cuadro XV. Valores de las variables respuesta, predichos según el modelo, y obtenidos por experimentación durante la verificación de dos puntos en la zona óptima de la superficie de respuesta (significancia 0,01).

Punto seleccionado	Variable Respuesta (mg compuesto/ 100 g SMS)					
	PT		AT		ET	
	Predicho	Experimental	Predicho	Experimental	Predicho	Experimental
60 °C, 30 % m/m y 65 %	5 959 – 7 259	5 866 – 6 066	191 - 201	181 - 196	315 - 399	412 - 475
43 °C, 53 % m/m y 32 %	3 790 – 8 649	5 283 – 6 365	140 - 143	110 - 130	157 - 226	118 - 153

El objetivo de la verificación del modelo es que, al utilizar dos puntos dentro de la zona óptima de extracción, se obtengan rangos calculados por el modelo y obtenidos experimentalmente, bajo las mismas condiciones para los factores, y que estos se traslapen, lo cual permite comprobar la capacidad de los modelos generados para poder hacer predicciones.

En el Cuadro XV se puede observar que, con un nivel de confianza del 99 %, para el punto #1, se traslapan los rangos predichos y experimentales para las concentraciones de PT y AT, aunque no se traslapan los rangos para la concentración de ET. Para el punto #2, hay traslape en las concentraciones de PT, pero no lo hay para las concentraciones de AT y ET donde la tendencia es que los valores experimentales sean menores que los valores predichos.

Esto corrobora lo que ya se ha discutido, donde el modelo obtenido para PT reúne las características que lo hacen adecuado para predecir, mientras que los modelos de AT y ET presentan pfa significativa y demuestran no ser capaces de predecir correctamente.

5.2.3. Función de Deseabilidad

En la Figura 25 se presentan las gráficas del comportamiento de la concentración de PT, AT y ET, al igual que el valor de la deseabilidad.

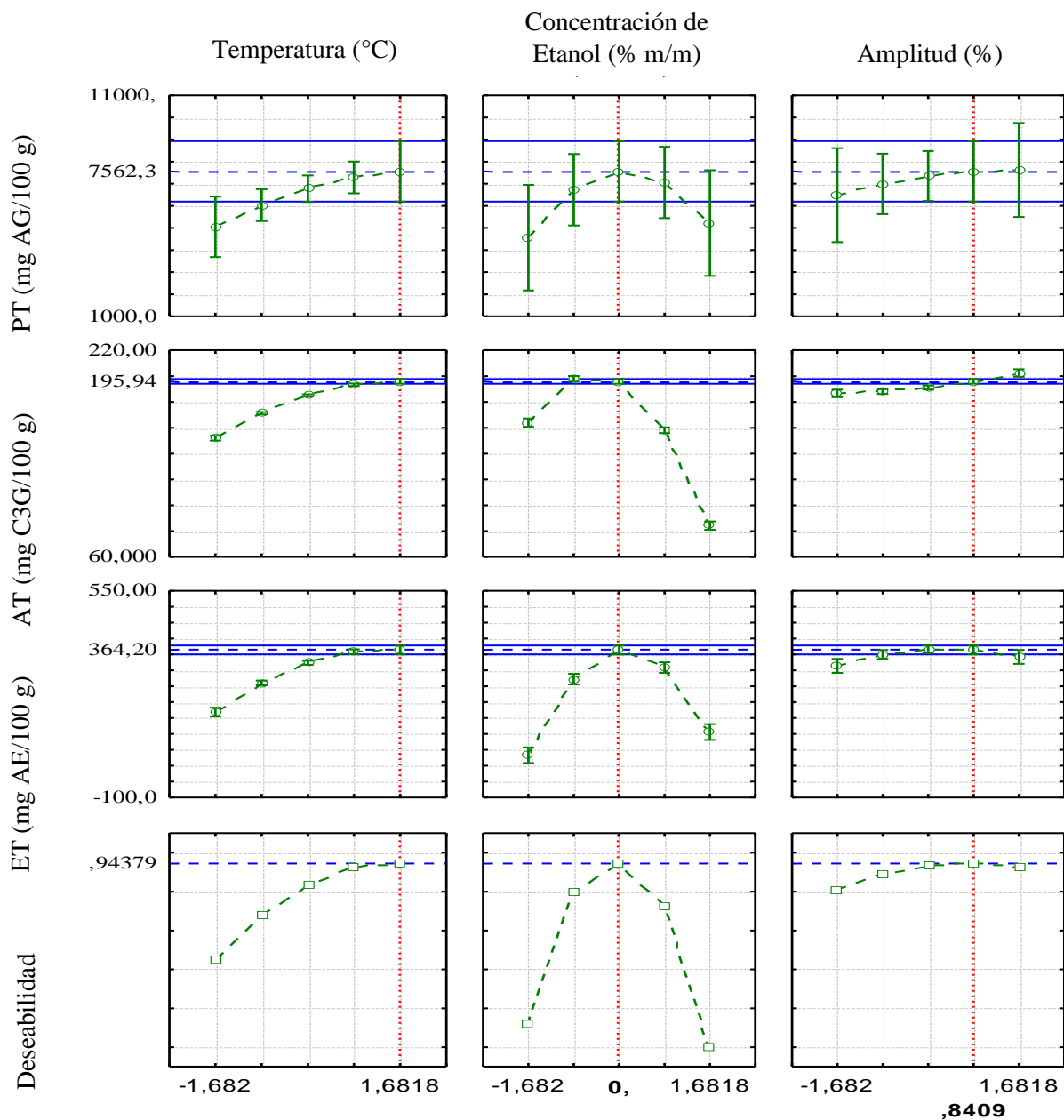


Figura 25. Gráficas de la función de deseabilidad.

La función de deseabilidad es una herramienta utilizada en la metodología de superficie de respuesta para optimizar simultáneamente múltiples variables respuesta. Mediante esta metodología se transforman las múltiples variables respuesta en un solo parámetro conocido como deseabilidad el cual representa la cercanía de una respuesta a su valor ideal y está ubicado entre 0 y 1. Entre más cercana sea la deseabilidad a 1, quiere decir que más se acerca la respuesta al valor óptimo (Raissi & Farsani, 2009)

En este caso, el punto óptimo combinado para las variables respuesta de concentración de PT, AT y ET se encuentra en la combinación de los factores correspondiente a una temperatura de 60 °C, 30 % m/m de concentración de etanol y 65 % de amplitud de ultrasonido (que se muestran codificados en la Figura 25), con una deseabilidad de 0,94.

Adicionalmente, al observar la Figura 25, se puede apreciar el comportamiento generalizado para las variables respuesta analizadas en los apartados 5.2.1.1, 5.2.1.2. y 5.2.1.3. La concentración de PT, AT y ET tienden al aumento y hacia una estabilización al aumentar la temperatura hasta alcanzar la temperatura máxima de 60 °C por lo que no se observa degradación de los compuestos. Este comportamiento se debe al efecto de la solubilización de solutos y aumento del coeficiente de difusión (Lyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Uma, Ho y Wan Aida, 2010).

En el caso de la concentración de etanol, la concentración de los compuestos de interés presenta una forma de parábola, donde la concentración óptima de compuestos fenólicos se obtiene a concentraciones medias de etanol, en este caso 30 %, debido a la afinidad que presentan los compuestos de interés tanto hacia el agua como hacia el etanol, tomando en cuenta las características de ambos.

En el caso específico de la concentración de AT, la concentración de etanol óptima de extracción se encuentra por debajo de 30 %, en comparación con los óptimos específicos para PT y ET. Lo cual responde a la afinidad de las antocianinas hacia el disolvente, donde presentan una mayor afinidad al agua.

Por último, se percibe un leve incremento de la concentración de polifenoles al aumentar la amplitud del ultrasonido y esto se puede deber al aumento en la transferencia de masa que se da por los mecanismos de acción del ultrasonido, el de cavitación y el de la fragmentación (Medina-Torres *et al.*, 2017; Panja, 2017).

Este efecto menos evidente del ultrasonido sobre las concentraciones de los compuestos de interés está de acorde a lo ya explicado para la variable del ultrasonido, donde se identifica como el factor que menor efecto ejerce.

5.3. Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las cinéticas de extracción de polifenoles

Una vez encontrado el punto óptimo de la EAU, se procedió a comparar la EAU con una EC bajo las mismas condiciones. Las condiciones óptimas encontradas son 60 °C, 30 % m/m y 65 %, sin embargo, se utilizó una temperatura de 25 °C, ya que se ha visto que el efecto del incremento de la temperatura puede opacar el efecto del ultrasonido en la extracción al disminuir la intensidad de la cavitación (Konwarh *et al.*, 2012; Mallakpour Dinari y Behranvand, 2013; Li *et al.*, 2014; Liao, Zheng y Qu, 2016).

Por lo tanto, la EAU se llevó a cabo bajo las condiciones de 25 °C, 30 % m/m y 65 % y la EC se llevó a cabo bajo las mismas condiciones, pero sin el uso del ultrasonido, es decir, a 25 °C y 30 % m/m. A continuación, se presentan los resultados para las extracciones realizadas.

5.3.1. Polifenoles Totales

En la Figura 26 se presentan las cinéticas, con sus respectivos modelos de primer orden, tanto de la EC como de la EAU de los PT de la SMS.

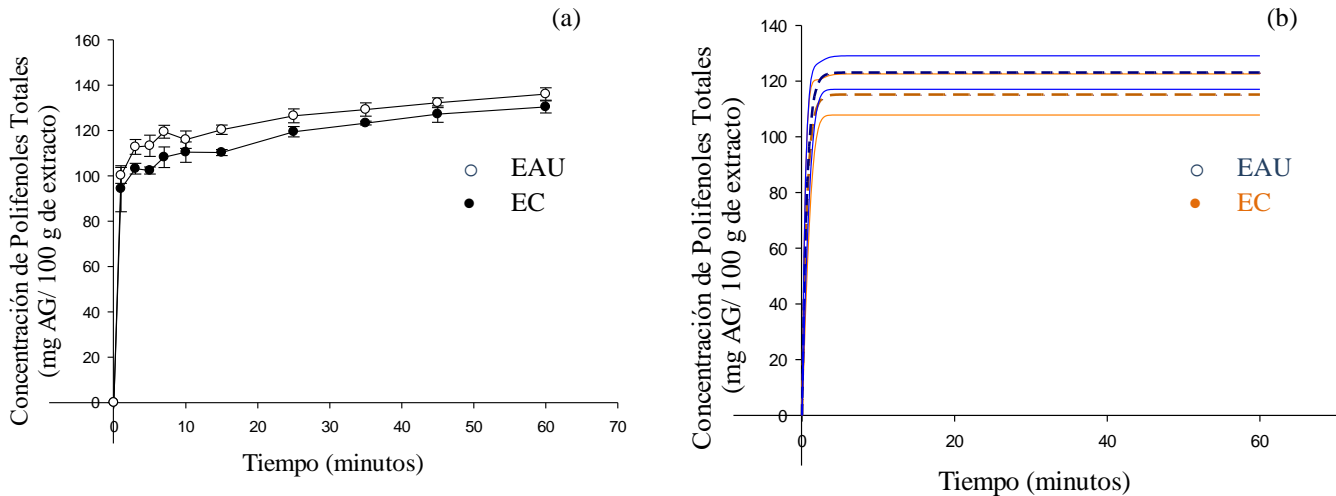


Figura 26. Cinéticas (a) y modelos (b) de extracción de polifenoles totales del SMS mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU).

Los parámetros de ajuste de los modelos de primer orden obtenidos para la EC y la EAU de polifenoles totales utilizando la SMS son el R^2 , el R^2 -adj, la p del modelo y la pfa y se exponen en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de polifenoles totales del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.

Tratamiento	p modelo	R^2	R^2 -adj	pfa ¹
EC	<0,0001	0,9341	0,9268	0,7988
EAU	<0,0001	0,9608	0,9564	0,7943

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa ($p < 0,05$).

Como se puede ver en el Cuadro XVI, el modelo de primer orden se ajusta adecuadamente para las cinéticas de extracción de PT a partir del SMS tanto utilizando una EC como una EAU ya que las probabilidades de los modelos son inferiores a 0,05, los valores de R^2 y, de forma más relevante, el R^2 -adj se acercan a 1 con valores superiores a 0,9. Adicionalmente, se puede ver que la pfa no es significativa, ya que los valores son superiores a 0,05; lo cual corrobora lo ya expresado.

En el Cuadro XVII se presenta la concentración de PT al final de los 60 minutos de extracción, al igual que el rendimiento de extracción de PT y las constantes de velocidad de las cinéticas de primer orden para la EC y EAU de PT utilizando SMS.

Cuadro XVII. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de polifenoles totales del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido¹.

Tratamiento	PT 60 min (mg AG/100 g extracto)	E (%)	k (min ⁻¹)
EC	130 ± 3	77 ± 4	1,8 ± 0,9
EAU	136 ± 3	73 ± 2	1,6 ± 0,2

¹Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=6). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba t-student ($p < 0,05$).

En el Cuadro XVII se puede ver que con un 95 % de confianza no se encuentra diferencia significativa entre la concentración de PT a los 60 minutos entre tratamientos,

como tampoco hay diferencias en los parámetros E ni k de las cinéticas de extracción de PT a partir del SMS utilizando una EC o un EAU.

Tomando en cuenta que el factor de la temperatura no es capaz de interferir con la intensidad del ultrasonido, ya que, utilizó una temperatura de 25 °C en ambos tipos de extracción, se puede ver que el factor ultrasonido no tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción de polifenoles ni sobre la constante de velocidad de la extracción.

Esto se podría deber a que, como se observó en la optimización de la EAU del SMS, hay indicios de que pueda existir un factor adicional que pueda explicar de mejor manera el comportamiento de la concentración de PT, diferente a la amplitud del ultrasonido, como por ejemplo la frecuencia o la potencia del ultrasonido. Si se planteara otro diseño considerando la variabilidad de estos factores, se podrían observar resultados diferentes.

La amplitud del ultrasonido es proporcional a la potencia suministrada, y se refiere al desplazamiento de la sonda en el medio en que se encuentra. Esto se observa como una vibración en la punta de la sonda. Por lo tanto, al aumentar la amplitud de la vibración, se transmite más potencia al fluido y se observan los efectos sonoquímicos (Capelo-Martínez, 2008).

Para llegar al umbral al cual se genera la cavitación, se requiere de una intensidad mínima, lo cual indica que no siempre se requieren amplitudes mayores para obtener los resultados necesarios (Capelo-Martínez, 2008). En este caso, se encontró un óptimo a 65 % de la amplitud de la vibración de la sonda en el medio que corresponde a la mezcla entre el disolvente y las partículas de la SMS.

El equipo en cuestión, posee una frecuencia fija de 20 kHz y tiene una potencia máxima de 750 W. La potencia suministrada, en el presente caso, es un parámetro variable ya que el equipo entrega potencias diferentes para lograr mantener la amplitud seleccionada según la oposición del medio. Por otro lado, la frecuencia del ultrasonido juega un papel importante, ya que determina el ciclo de rarefacción que permite que las burbujas se formen, este ciclo debe ser adecuado ya que podrían no formarse las burbujas de cavitación.

Adicionalmente, se ha encontrado que las burbujas de cavitación formadas en un medio tienen una frecuencia de resonancia natural, donde si se equipara la frecuencia del

ultrasonido con esta frecuencia se logra un punto donde las burbujas formadas resuenan y colapsan violentamente de forma que tienen un efecto significativo sobre la extracción de los compuestos de interés a través del efecto de la cavitación (Liao, Zheng y Qu, 2016).

Tomando en cuenta el mecanismo de acción del ultrasonido a través de cavitación y fragmentación, se puede pensar que, al utilizar la SMS como sustrato, puede verse disminuida la intensidad del efecto del ultrasonido una vez que el material ya sufrió una reducción de tamaño y posee un área superficial mayor a la del sustrato sin moler, al igual que presenta mayor poder de hidratación debido a su deshidratación previa.

Por último, también se realizó el cálculo de la potencia de la prueba, la cual establece cuál es la probabilidad de que la prueba utilizada detecte la diferencia entre los resultados. En este caso se encuentra que para los promedios presentados en el Cuadro XVII, en el caso de la concentración de PT se tiene una potencia de 34 %, para los valores de E y k de las cinéticas de extracción de PT se encuentran potencias de 6 % y 5 %, respectivamente.

Estos resultados sugieren que se debe aumentar el número de repeticiones para determinar si la falta de diferencia se debe a que el ultrasonido no genera algún efecto positivo o si se debe a la variabilidad del experimento que no permite evidenciar la diferencia.

5.3.2. Antocianinas

En la Figura 27 se presentan las cinéticas, con sus respectivos modelos de primer orden, tanto de la EC como de la EAU de las AT de la SMS.

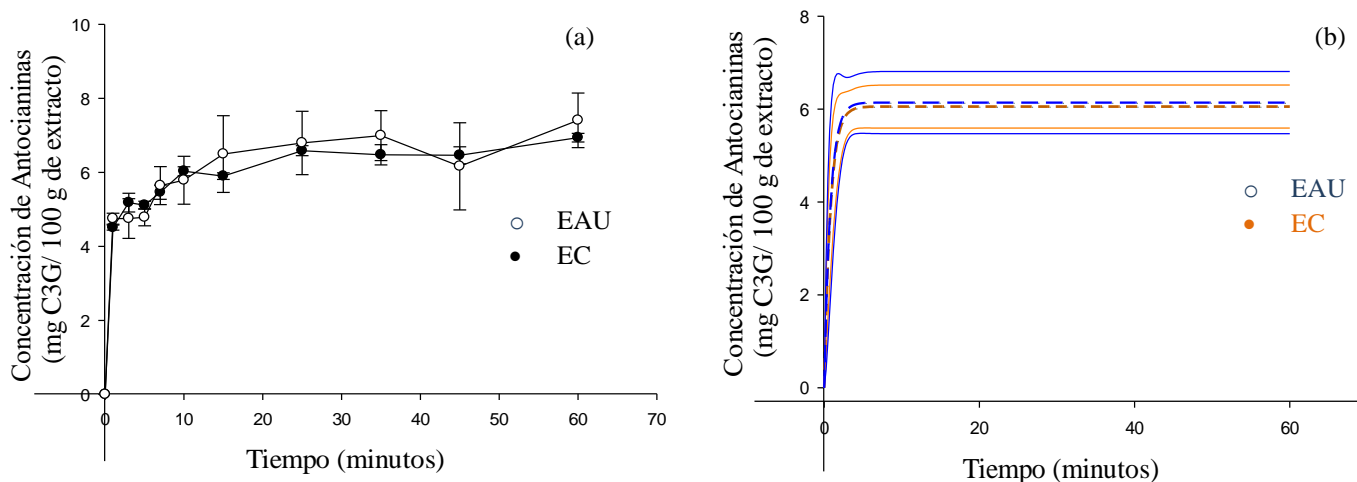


Figura 27. Cinéticas (a) y modelos (b) de extracción de antocianinas del SMS mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU).

Los parámetros de ajuste de los modelos de primer orden obtenidos para la EC y la EAU de antocianinas utilizando la SMS son el R^2 , el R^2 -adj, p del modelo y la pfa; y se exponen en el Cuadro XVIII.

Cuadro XVIII. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de antocianinas del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.

Tratamiento	p modelo	R^2	R^2 -adj	pfa ¹
EC	<0,0001	0,9126	0,9029	0,7796
EAU	<0,0001	0,8352	0,8169	0,7718

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa ($p < 0,05$).

Como se puede ver en el Cuadro XVIII, el modelo de primer orden se ajusta adecuadamente para las cinéticas de extracción de AT a partir del SMS tanto utilizando una

EC como una EAU, ya que las probabilidades de los modelos son inferiores a 0,05, los valores de R^2 y, de forma más importante, los R^2 -adj se acercan a 1 con valores superiores a 0,8. Adicionalmente, se puede ver que la pfa no es significativa, ya que los valores son superiores a 0,05; lo cual corrobora lo ya expresado.

En el Cuadro XIX se presenta la concentración de AT al final de los 60 minutos de extracción, al igual que el rendimiento de extracción de AT y las constantes de velocidad de las cinéticas de primer orden para la EC y EAU de PT utilizando SMS.

Cuadro XIX. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de antocianinas del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.

Tratamiento	AT 60 min (mg C3G/100 g extracto)	E (%)	k (min ⁻¹)
EC	6,9 ± 0,1	33 ± 5	1,2 ± 0,3
EAU	7,4 ± 0,7	36 ± 7	1 ± 2

†Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba t-student (p<0,05).

En el Cuadro XIX se puede ver que con un 95 % de confianza no se encuentra diferencia significativa entre la concentración de AT, el E ni k de las cinéticas de extracción de AT a partir del SMS utilizando una EC o un EAU.

5.3.3. Elagitaninos

En la Figura 26 se presentan las cinéticas, con sus respectivos modelos de primer orden, tanto de la EC como de la EAU de los ET de la SMS.

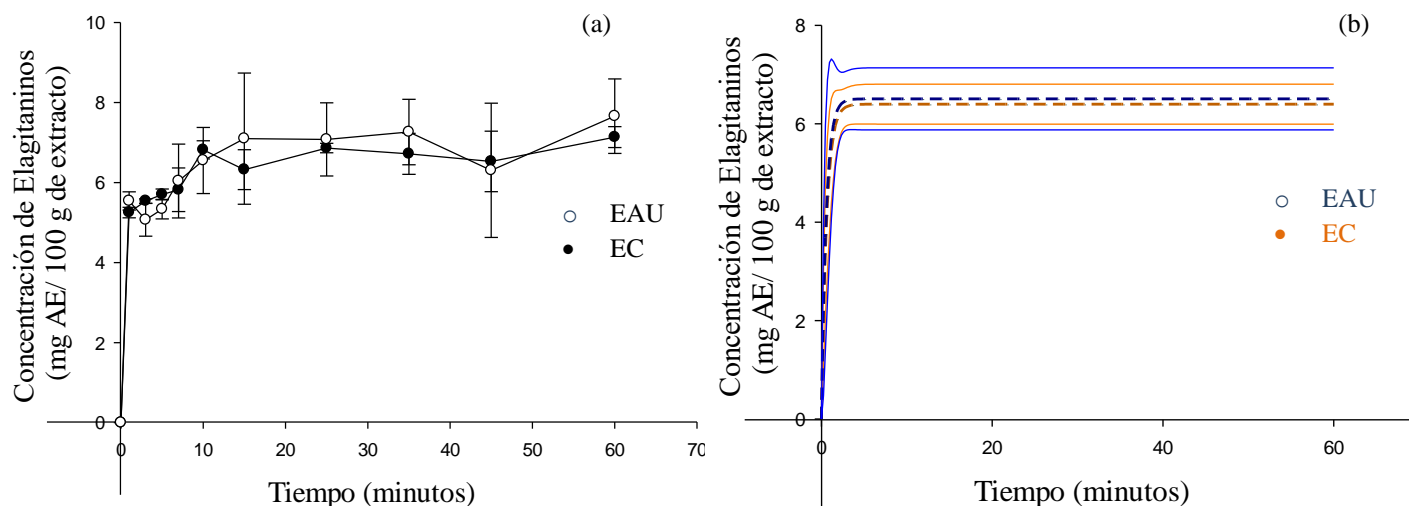


Figura 28. Cinéticas (a) y modelos (b) de extracción de elagitaninos del SMS mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU).

Los parámetros de ajuste de los modelos de primer orden obtenidos para la EC y la EAU de elagitaninos utilizando la SMS son el R^2 , el R^2 -adj, la p del modelo y la pfa y se exponen en el Cuadro XX.

Cuadro XX. Parámetros de ajuste y adecuación de los modelos de primer orden en la extracción de elagitaninos del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.

Tratamiento	p modelo	R^2	R^2 -adj	pfa ¹
EC	<0,0001	0,9356	0,9284	0,4706
EAU	<0,0001	0,8599	0,8443	0,6803

¹Valores marcados con asterisco indican una probabilidad de falta de ajuste significativa ($p < 0,05$).

Como se puede ver en el Cuadro XX, el modelo de primer orden se ajusta adecuadamente para las cinéticas de extracción de AT a partir del SMS tanto utilizando una EC como una EAU, ya que las probabilidades de los modelos son inferiores a 0,05, los

valores de R^2 y, de forma más importante, el R^2 -adj se acercan a 1 con valores superiores a 0,8. Adicionalmente, se puede ver que la pfa no es significativa, ya que los valores son superiores a 0,05; lo cual corrobora lo ya expresado.

En el Cuadro XXI se presenta la concentración de ET al final de los 60 minutos de extracción, al igual que el rendimiento de extracción de ET y las constantes de velocidad de las cinéticas de primer orden para la EC y EAU de ET utilizando SMS.

Cuadro XXI. Parámetros obtenidos mediante el modelo de primer orden para la extracción de elagitaninos del SMS mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.

Tratamiento	ETs 60 min (mg AE/100 g extracto)	PE (%)	k (min ⁻¹)
EC	7,1 ± 0,3	18 ± 6	2 ± 1
EAU	7,7 ± 0,9	19 ± 6	1,8 ± 0,9

†Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95% (n=3). Un asterisco en una misma columna significa que hay diferencias significativas entre los valores de extracción convencional y ultrasonido según prueba t-student (p<0,05).

En el Cuadro XVII se puede ver que con un 95 % de confianza no se encuentra diferencia significativa entre la concentración de los ET, el E ni la k de las cinéticas de extracción de ET a partir del SMF utilizando una EC o una EAU.

5.3.4. Generalidades del comportamiento de las cinéticas de extracción

De forma general, el resultado encontrado para las cinéticas que comparan la EAU y la EC radica en que no se encuentra diferencia entre los dos tipos de extracción, evidenciando en este caso, que el parámetro ultrasonido no ejerce un efecto potenciador para la extracción de polifenoles a partir del SMS.

D'Alessandro *et al.* (2014) encontraron para la extracción del fruto de *Aronia melanocarpa*, donde se varió la potencia del ultrasonido aplicado de forma directa, que la temperatura y la concentración de etanol en el disolvente son los factores que más afectan el rendimiento de la extracción, mientras que el ultrasonido afecta principalmente la cinética de la extracción y además su efecto es mayor al inicio de la extracción y a bajas temperaturas (20 °C).

Quirós (2016), en su extracción del subproducto de la mora fresco, se apoya en esta teoría, ya que tampoco encuentra un efecto positivo del ultrasonido aplicado de forma indirecta sobre la extracción de compuestos fenólicos. En su caso, al utilizar las condiciones de 60 °C, 57,1 % etanol y 2,5 relación líquido-sólido se considera que son muy favorables para la extracción de polifenoles y el efecto del ultrasonido se vuelve menos evidente.

En el presente caso, aunque se utilizó una temperatura baja (25 °C), no se evidenció el efecto del ultrasonido ni sobre el rendimiento, ni sobre la constante de velocidad de las cinéticas. Esto se puede deber a los factores que son capaces de opacar el efecto del ultrasonido mencionados con antelación en la discusión, como la concentración de etanol utilizada, el tamaño de partícula del SMS y que el parámetro del ultrasonido utilizado sea la amplitud.

Adicionalmente, al analizar las constantes de velocidad, se puede ver que son similares a aquellas obtenidas para el SMS en los apartados 5.1.1., 5.1.2. y 5.1.3., donde en promedio se obtiene una k aproximada de $1,5 \text{ min}^{-1}$. Entonces, se puede observar que la extracción máxima también se alcanza alrededor de los 20 minutos de extracción.

5.4. Caracterización del extracto de polifenoles

A continuación, se presenta la caracterización del extracto de compuestos fenólicos obtenido utilizando las condiciones óptimas de extracción.

Cuadro XXII. Parámetros obtenidos para la caracterización del extracto bajo las condiciones óptimas de extracción.

Parámetro	Valor BH ± DE
Sólidos Totales (%)	0,982 ± 0,008
Acidez (%)	0,00229 ± 0,00007
Cenizas (g/100 g de extracto)	0,024 ± 0,004
Azúcares (g/100 g de extracto)	No cuantificable*
Etanol (%)	25,03 ± 0,70
pH	3,520 ± 0,009
PT (mg AG/100 g SMS)	5 966 ± 76
AT (mg C3G/100 g SMS)	189 ± 6
ET (mg AE/100 g SMS)	444 ± 24
ORAC (µmol Trolox/L de extracto)	12 522 ± 83
ORAC (µmol Trolox/ g SMS)	273 ± 2

* Menor a 0,04 g/100 g de sacarosa y fructosa y menor a 0,05 g/100 g de glucosa.

Como se aprecia en el Cuadro XXII, la composición del extracto obtenido utilizando las condiciones óptimas de la EAU de la SMS demuestra que este contiene mayoritariamente una mezcla de etanol y agua y los compuestos de interés, ya que el contenido de sólidos totales, acidez, cenizas y azúcares se encuentra por debajo del 1,00 %.

El contenido de etanol obtenido es congruente con la metodología, ya que se verifica un valor de 25 %, donde la concentración inicial de etanol utilizada fue de 30 %, correspondiente a las condiciones óptimas de extracción de PT, AT y ET de la SMS usando EAU. La reducción en la concentración se puede deber a que el sistema de extracción utilizado es abierto y puede haber evaporación del disolvente en los 20 minutos de extracción.

En el Cuadro XXIII se exponen los contenidos de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante reportados por diferentes autores para diferentes matrices, similares a la que se trabajó en la presente investigación y del fruto de la mora completo. En el caso de los autores Soto (2014) y Quirós (2016), los valores presentados corresponden al contenido presente en

un subproducto de mora similar al SMF evaluado, compuesto principalmente por semillas y cáscara de la mora *Rubus adenotrichos*.

Cuadro XXIII. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de diferentes productos y subproductos vegetales.

Producto	PT	AT	ET	CA	Referencia
Subproducto de <i>R. adenotrichos</i> seco y molido	6485 ± 83 mg AG/100 g BS	205 ± 6 mg C3G/100 g BS	482 ± 26 mg AE/100 g BS	297 ± 2 μmol Trolox/ g BS	Presente estudio
Subproducto de <i>R. adenotrichos</i> fresco	1613 ± 176 mg AG/100 g BS	92 ± 4 mg C3G/100 g BS	423 ± 77 mg AE/100 g BS	175 ± 12 μmol Trolox/ g BS	Soto (2014).
Subproducto de <i>R. adenotrichos</i> fresco	2653 mg AG/100 g BS	248 mg C3G/100 g BS	-	-	Quirós (2016).
Subproducto de <i>R. adenotrichos</i> (extracto)	1728,5 mg AG/100 g BH	152,4 mg C3G/100 g BH	417,7 mg AE/100 g BH	-	Quirós (2016).
Mora <i>R. adenotrichos</i> (Santa María de Dota, Costa Rica)	520 ± 20 mg AG/100 g BH	77 ± 11 mg C3G/100 g BH	-	64,00 ± 4,00 μmol Trolox/ g BH	Acosta-Montoya <i>et al.</i> (2010).
	3 500 ± 100 mg AG/100 g BS	520 ± 60 mg C3G/100 g BS	20,2 ± 0,4 mg AE/100 g BS	432 ± 30 μmol Trolox/ g BS	

Cuadro XXIV. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de diferentes productos y subproductos vegetales.

Producto	PT	AT	ET	CA	Referencia
Mora (Diferentes cultivares)	822 – 844 mg AG/100 g BH	154 – 225 mg C3G/100 g BH	-	34 – 36 μ mol Trolox/ g BH	Kaume, Howard y Devareddy (2012)
	193 - 352 mg AG/100 g BH	67 – 127 mg C3G/100 g BH	-	-	
	495 - 583 mg AG/100 g BH	95 – 155 mg C3G/100 g BH	-	28 μ mol Trolox/ g BH	
	221 - 342 mg AG/100 g BH	38 – 72 mg C3G/100 g BH	-	-	
	114 – 178 mg AG/100 g BH	31 – 118 mg C3G/100 g BH	-	-	
Mora (Diferentes cultivares)	682 – 1056 mg AG/100 g BH	131 -256 mg C3G/100 g BH	8 – 27 mg AE/100 g BH	38 – 76 μ mol Trolox/ g BH	Siriwoharn <i>et al.</i> (2004)

Se aprecia que los valores de PT, AT, ET y CA en base seca considerando el SMS se comparan con aquellos que se reportan para el subproducto en su forma fresca sin moler (el subproducto obtenido del prensado de la mora sin tratamiento), donde en el caso de Soto (2014) los valores son menores para PT, AT y CA; se obtiene un contenido similar de ET.

Para Quirós (2016), que trabajó con el subproducto fresco sin moler, se presentan dos conjuntos de valores, ya que el primero corresponde a lo que se obtiene como contenido total extraíble y el segundo como los contenidos obtenidos a partir de una EC que fue optimizada, utilizando etanol como disolvente. En comparación con el contenido de PT y AT obtenido

para el subproducto fresco, se tiene que el contenido de PT utilizando el SMS es superior, mientras que el contenido de AT es similar al que se reporta para el subproducto fresco.

Lo que es importante recalcar es que, al cotejar los valores obtenidos en términos de los extractos en sus puntos óptimos, se observa un contenido superior de PT y contenidos similares de AT y ET, siendo que las condiciones de extracción utilizadas por Quirós (2016) son 58,4 °C, relación sólido-líquido de 1:4 y 50 % m/m de etanol con un tiempo de extracción de 120 minutos (utilizando el subproducto como SMF), mientras que las condiciones óptimas obtenidas para el SMS utilizando la EAU se dieron a 60 °C, relación sólido-líquido de 1:25 y 30 % de etanol con un tiempo de extracción de 20 minutos.

Esta comparación es positiva ya que se obtienen concentraciones de compuestos fenólicos comparables al utilizar una temperatura similar, pero con una concentración de etanol y un tiempo de extracción menores. Considerando que no se encontró que el efecto de la amplitud del ultrasonido generara una diferencia significativa con respecto a la extracción de compuestos fenólicos, se podría atribuir esta reducción en los parámetros de extracción al uso del subproducto de la mora en su forma seca y molida.

Por lo tanto, al comparar los valores reportados por estos dos autores en un producto similar al SMF para obtener un extracto etanólico, se puede observar que las condiciones de extracción encontradas, utilizando SMS, son favorables para la obtención de los compuestos de interés y se equiparan a aquellas encontradas por otros autores.

Con respecto a los valores de PT, AT, ET y CA reportados para la misma variedad de mora *Rubus adenotrichos*, pero del fruto entero, se puede observar que los valores de AT y CA son mayores para el fruto entero, pero se obtienen contenidos de PT y ET superiores al utilizar la SMS y las condiciones de extracción óptimas encontradas.

Este hallazgo es congruente con lo reportado en la literatura, ya que se ha encontrado que hay una mayor concentración de elagitaninos en las semillas, reportándose una pérdida del 50 % de los elagitaninos hidrolizados en la fruta sin las semillas en comparación con la fruta que aun las mantiene (Hager *et al.*, 2008).

Además, las antocianinas son compuestos hidrosolubles encontrados en las vacuolas del fruto de la mora (Horbowicz *et al.*, 2008) y considerando que el subproducto que se puede

obtener de este corresponde a un 20 % del peso de esta fruta, tiene sentido que se obtenga una mayor concentración de AT al considerar el 80 % restante que corresponde mayoritariamente a la fracción pulposa del fruto.

Adicionalmente, se obtiene que, para la CA, el valor obtenido para la extracción de la SMS utilizando las condiciones óptimas corresponde a un 65 % de aquel obtenido para el fruto entero de la mora de variedad *Rubus adenotrichos*; mientras que, para la concentración de AT, se obtiene un rendimiento de 35 %, el cual se puede considerar favorable si se piensa que lo que se usa es el subproducto de la mora y no el fruto entero.

Por último, con respecto a moras de otros cultivares, se puede ver que los valores obtenidos de PT, AT, ET y CA son superiores, o similares en el caso de las AT, en el caso del extracto obtenido bajo las condiciones óptimas de EAU utilizando la SMS de mora variedad *Rubus adenotrichos*.

Esta comparación con los resultados de otros autores demuestra que el uso de un subproducto del procesamiento de la mora (o desecho) para la obtención de un extracto con un alto contenido de compuestos fenólicos presenta resultados favorables que le aportan valor agregado al utilizar tanto el pretratamiento de secado y molienda como las condiciones de extracción encontradas (60 °C, 30 % (m/m) de etanol y 65 % de amplitud del ultrasonido).

6. Conclusiones

- La constante de velocidad y el rendimiento de la extracción de PT, al igual que los rendimientos de la extracción de AT al utilizar el SMS son mayores que los obtenidos con el SMF, por lo que se seleccionó este pretratamiento como el que genera resultados más favorables.
- La concentración de PT, AT y ET tiende al aumento y hacia una estabilización al incrementar la temperatura hasta alcanzar la temperatura máxima de 60 °C por lo que no se observa degradación de los compuestos.
- La concentración de PT, AT y ET presenta una forma de parábola con respecto a la concentración de etanol mostrando afinidad selectiva al disolvente.
- No se percibe un efecto marcado del ultrasonido sobre la concentración de PT, AT y ET de los extractos en las diferentes condiciones experimentales.
- Las condiciones óptimas de la EAU, utilizando la SMS, que generan el mayor contenido de PT, AT y ET en el extracto son 60 °C, 30 % (m/m) de etanol y 65 % de amplitud del ultrasonido.
- La constante de velocidad y el rendimiento de la extracción de PT, AT y ET al comparar la EC y la EAU bajo las mismas condiciones de temperatura y concentración de etanol no presentan diferencias significativas, por lo que no se encuentra que el ultrasonido ejerza un efecto diferente y positivo sobre la extracción.
- El extracto obtenido bajo las condiciones de EAU óptimas presenta contenidos menores al 1 % de posibles interferentes como sólidos totales, azúcares, cenizas y ácidos libres, mientras que presenta un contenido considerable de PT, AT y ETs.

7. Recomendaciones

- Se recomienda evaluar el efecto de diferentes tamaños de partícula del SMS, ya que un tamaño de partícula mayor podría evidenciar el efecto positivo del ultrasonido sobre la extracción.
- Evaluar también el uso del SMF, ya que este podría presentar mejores resultados al comparar la EAU con la EC. Esto debido a que se considera que las condiciones utilizadas para el SMS de molienda facilitan la extracción y no permiten que se observe el efecto positivo que puede tener el ultrasonido, ya que este actúa a través de la cavitación.
- Evaluar la posibilidad de utilizar la frecuencia del ultrasonido como factor en la optimización, la cual se utilizó fija en este experimento dado a que es la que aporta el equipo disponible. Esto porque se ha encontrado que las burbujas de cavitación formadas en un medio tienen una frecuencia de resonancia natural, donde si se equipara la frecuencia del ultrasonido con esta frecuencia se logra un punto donde las burbujas formadas resuenan y colapsan violentamente de forma que tienen un efecto significativo sobre la extracción de los compuestos de interés a través del efecto de la cavitación.
- Según el análisis estadístico de los modelos lineales y cuadráticos de la superficie de respuesta, se recomienda evaluar cuáles factores de forma real tienen un efecto sobre las variables respuesta, principalmente con respecto al ultrasonido. Como se mencionó en la recomendación anterior, para evaluar el ultrasonido se puede pensar en evaluar otros factores involucrados en la extracción asistida por ultrasonido. De lo contrario, se deben evaluar factores externos a la EAU que presenten un efecto más significativo sobre la variable respuesta.
- Se recomienda aumentar el número de repeticiones, es decir, el número de extracciones con y sin ultrasonido bajo las condiciones planteadas en el tercer objetivo para obtener una potencia de prueba mayor que permita eliminar la duda de si es el factor del ultrasonido el que no genera diferencia en los resultados o si es la

prueba que no es capaz de detectar la diferencia con el número de repeticiones utilizadas.

8. Bibliografía

- ACOSTA-MONTOYA, O.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C.; PÉREZ, A.M. y CASTRO, M.V. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltld.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*. 119: 1497 – 1501.
- AMEER, K.; SHAHBAZ, H.M. y KWON, J.H. 2017. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 00: 1 – 21.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis 18a ed. Methods 920.151, 940.26, 942.15, 983.13, 973.23 y 984.14. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- ÁVILA, D. 2018. Evaluación de las propiedades del subproducto industrial de semilla de mora molida y su uso como ingrediente en la elaboración de un producto horneado. Tesis de Lic. En Ingeniería en Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José.
- AZWANIDA, N.N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 4 (3): 1 – 6.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K. y SAMMAN, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191 – 203.
- BANERJEE, J.; SINGH, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; McFARLANE, D.; PATTI, A.F. y ARORA, A. 2017. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*. 225: 10 – 22.
- BARBA, F.J.; ZHU, Z.; KOUBAA, M.; SANT'ANA, A. y ORLIEN, V. 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 49: 96 – 109.

- BERK, Z. 2013. Food Process Engineering and Technology: A Volume in Food Science and Technology, 2^a ed. s.l., Academic Press.
- BIESALSKI, H.K.; DRAGSTED, L.O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜELLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P. y WEBER, P. 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. 25: 1202 – 1205.
- CASTRO, J. J. y CERDAS, M. M. 2005. Mora (*Rubus spp*): Cultivo y Manejo Poscosecha. San José, MAG.
- CAPELO-MARTÍNEZ, J.L., ed. 2008. Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications. s.l., Wiley-VCH.
- CITA. 2016a. Determinación de polifenoles, P-SA-MQ-048. Emisión N° 4. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016b. Determinación de polifenoles por HPLC, P-SA-MQ-044. Emisión N° 3. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016c. Determinación de la actividad antioxidante Método ORAC, P-SA-MQ-37. Emisión N° 9. San José, Costa Rica.
- CITA. 2017^a. Humedad, P-SA-MQ-002. Emisión N° 8. San José, Costa Rica.
- CITA. 2017b. Cenizas Totales, P-SA-MQ-004. Emisión N° 8. San José, Costa Rica.
- CITA. 2017c. Acidez Total, P-SA-MQ-011. Emisión N° 7. San José, Costa Rica.
- CITA. 2017d. Etanol y Metanol en Frutas, Bebidas Fermentadas y Licores Destilados por Cromatografía Gases y HPLC, P-SA-MQ-052. Emisión N° 1. San José, Costa Rica.
- CITA. 2017e. Azúcares por HPLC, P-SA-MQ-006. Emisión N° 12. San José, Costa Rica.
- CONEJO, V.J. 2016. Extracción de aceite de semilla de mora (*Rubus adenotrichos*), utilizando isopropanol como disolvente y evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, de calidad y estabilidad oxidativa. Tesis Lic. En Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José.

- CNP. 2017. Monitoreo de mercados de mora. Sistema de información agroalimentaria. Boletín N° 01/ Julio de 2017.
- DA PORTO, C.; PORRETTO, E. y DECORTI, D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20: 1076 – 1080.
- D’ALESSANDRO, L.G.; DIMITROV, K.; VAUCHEL, P. y NIKOV, I. 2014. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*. 92: 1818 – 1826.
- DIACONEASA, Z. 2018. Time-Dependent Degradation of Polyphenols from Thermally-Processed Berries and Their In Vitro Antiproliferative Effects against Melanoma. *Molecules*. 23 (2534): 1 – 18.
- ELBOUGHDIRI, N. 2018. Effect of Time, Solvent-Solid Ratio, Ethanol Concentration and Temperature on Extraction Yield of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Engineering, Technology & Applied Science Research*. 8 (2): 2805 – 2808.
- ESPADA-BELLIDO, E.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; ÁLVAREZ, J. A.; F. BARBERO, G. y AYUSO, J. 2019. Extraction of Antioxidants from Blackberry (*Rubus ulmifolius* L.): Comparison between Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction Techniques. *Agronomy*. 9 (11): 1 – 18.
- FAN-CHIANG, H.J. y WROLSTAD, R.E. 2005. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. *Journal of Food Science*. 70 (3): 198 – 202.
- FLORES, D.; MONTERO, A.; OROZCO, R. y ARGUELLO, F. 2003. Primer Foro – Taller Nacional sobre el cultivo de la mora (*Rubus* spp.). Cartago, ITCR.
- FOX, M. y WHITESELL, J. 2000. Química Orgánica, 2^{da} ed. Addison Wesley Longman: México.
- GANCEL, A.-L., FENEUIL, A., ACOSTA, O., PÉREZ, A.M. & VAILLANT, F. 2011. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant

- capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*). *Food Research International* 44(7): 2243-2251.
- GAŒECKA, M.; SIWULSKI, M.; MAGDZIAK, Z.; BUDZYŒSKA, S., STUPER-SZABLEWSKA, K.; NIEDZIELSKI, P. y MLECZEK, M. 2019. The effect of drying temperature on bioactive compounds and antioxidant activity of *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray and *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. *Journal of Food Science and Technology*.
- GEORGÉ, S.; BRAT, P.: ALTER, P. y AMIOT, M.J. 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (5): 1370-1373.
- GOODARZI, S.; RAFIEL, S.; JAVADI, M.; KHADEM HAGHIGHIAN, H.; NOROOZI, S. 2018. A Review on Antioxidants and Their Health Effects. *Journal of Nutrition and Food Security*. 3 (2): 106 – 112.
- HAGER, T.J.; HOWARD, L.R.; LIYANAGE, R.; LAY, J.O. y PRIOR, R.L. 2008. Ellagitannin Composition of Blackberry ss Determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 661 – 669.
- HALL, H.K. Y FUNT, R.C., eds. 2017. Blackberries and their Hybrids: Crop Production Science in Horticulture. Boston, CAB International.
- HARBORNE, J. B. y SIMMONDS, N. W. 1964. Biochemistry of Phenolic Compounds. Londres, Academic Press.
- HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. 2015. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*. 173: 501–513.
- HORBOWICZ, M.; KOSSON, R.; GRZESIUK, A. y DEŒSKI, H. 2008. Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*. 68 (1).

- IVANOVIC, J.; TADIC, V.; DIMITRIJEVIC, S.; STAMENIC, M.; PETROVIC, S. y ZIZOVIC, I. 2014. Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna”. *Industrial Crops and Products* 53: 274-281.
- JOO, M.; LEWANDOWSKI, N.; AURAS, R.; HARTE, J. y ALMENAR, E. 2011. Comparative shelf life study of blackberry fruit in bio-based and petroleum-based containers under retail storage conditions. *Food Chemistry*. 126 (4): 1734 – 1740.
- KADIRI, O., GBADAMOSI, S. O. y AKANBI, C. T. 2019. Extraction kinetics, modelling and optimization of phenolic antioxidants from sweet potato peel vis-a-vis RSM, ANN-GA and application in functional noodles. *Journal of Food Measurement and Characterization*.
- KATSAMPA, P.; VALSAMEDOU, E.; GRIGORAKIS, S. y MAKRIS, D.P. 2015. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*. 77: 535 – 543.
- KAUME, L.; HOWARD, L.R. y DEVAREDDY, L. 2012. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (23): 5716-27.
- KHAN, M.K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A.S.; DANGLES, O. y CHEMAT, F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 119 (2): 851-858.
- KONWARH, R.; PRAMANIK, S.; KALITA, D.; MAHANTA, C.L. y KARAK, N. 2012. Ultrasonication-A complementary ‘green chemistry’ tool to biocatalysis: a laboratory-scale study of lycopene extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 19 (2): 292 – 299.
- KOSMALA, M.; JURGOŃSKI, M.; JUŚKIEWICZ, J.; KARLIŃSKA, E.; MACIERZYŃSKI, J.; EDWARD RÓJ, E. Y ZDUŃCZYK, Z. 2017. Chemical

- Composition of Blackberry Press Cake, Polyphenolic Extract, and Defatted Seeds, and Their Effects on Cecal Fermentation, Bacterial Metabolites, and Blood Lipid Profile in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65 (27): 5470 – 5479.
- KULBAT, K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences*. 80 (2): 97 – 108.
- LA GACETA. 2010. Ley para la Gestión Integral de Residuos N° 8839. San José.
- LAROZE, L. E.; DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; ZÚÑIGA, M. E. y DOMÍNGUEZ, H. 2010. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*. 231 (5): 669–677.
- LI, D.J.; SONG, J.F.; XU, A.Q. y LIU, C.Q. 2014. Optimization of the ultrasound assisted synthesis of lutein disuccinate using uniform design. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21 (1): 98 – 103.
- LI, F.; CHEN, G.; ZHANG, B. y FU, X. 2017. Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents. *Food Research International*. 100 (2): 19 – 30.
- LIAO, J.; ZHENG, N. & QU, B. 2016. An Improved Ultrasonic-Assisted Extraction Method by Optimizing the Ultrasonic Frequency for Enhancing the Extraction Efficiency of Lycopene from Tomatoes. *Food Analytical Methods*. 9 (8): 2288 – 2298.
- LIVE SUPERFOODS. 2017. Live Superfoods Blackberry Powder. INTERNET. <https://livesuperfoods.com/live-superfoods-blackberry-powder.html>.
- LIYANA-PATIRANA, C. & SHAHIDI, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*. 93: 47 – 56.

- LUTZ, M.; HERNÁNDEZ, J. y HENRÍQUEZ, C. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. *CyTA – Journal of Food*. 13 (4): 541 – 547.
- MALLAKPOUR, S.; DINARI, M. y BEHRANVAND, V. 2013 Ultrasonic-assisted synthesis and characterization of layered double hydroxides intercalated with bioactive N, N'-(pyromellitoyl)-bis-l- α -amino acids. *RSC Advances*. 3 (45): 23303 – 23308.
- MARHUENDA, J.; ALEMÁM, M.D.; GIRONÉS-VILAPLANA, A.; PÉREZ, A.; CARAVACA, G.; FIGUEROA, F.; MULERO, J. y ZAFRILLA, P. 2016. Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and In Vitro Availability of Four Different Berries. *Journal of Chemistry*. 2016: 1 – 7.
- MAYOR-OXILIA, R. 2010. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 5 (2): 23 – 29.
- MEDINA-TORRES, N.; AYORA-TALAVERA, T.; ESPINOSA-ANDREWS, H.; SÁNCHEZ-CONTRERAS, A. y PACHECO, N. 2017. Review Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. 7 (47): 1 – 19.
- MEIRELES, M.A.A. 2009. Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications. Boca Raton, CRC Press.
- MENA, S. 2017. Análisis y Monitoreo de Mercados: Mora (Boletín N°01 Julio del 2017). INTERNET.
https://www.simacr.go.cr/images/SIIM/sector_agricola/Frutas/mora/2017/A_mora_01_01_07-2017.pdf
- MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GÜNATA, Z. y BRAT, P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichos*) by High-Performance Liquid chromatography with diode array detection and

- electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8616-8624.
- MICIĆ, D.M.; OSTOJIĆ, S.B.; SIMONOVIĆ, M.B; PEZO, L.L. y SIMONOVIĆ, B.R. 2015. Thermal behavior of raspberry and blackberry seed flours and oils. *Thermochimica Acta*. 617: 21 – 27.
- MONTGOMERY, D.C.; PECK, E.A. y VINING, G.G. 2012. Introduction to Linear Regression Analysis. 5^a ed. s.l., Wiley.
- MOURABET, M.; EL RHILASSI, A.; EL BOUJAADY, H.; BENNANI-ZIATNI, M. y TAITAI, A. 2017. Use of response surface methodology for optimization of fluoride adsorption in an aqueous solution by Brushite. *Arabian Journal of Chemistry*. 10: S3292-S3302.
- NOLLET, L.M.L. y TOLDRÁ, F., eds. 2012. Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods. Boca Raton, CRC Press.
- NUBELEAF. 2017. Best Selling Products. INTERNET. <http://nubeleaf.com/>
- OANCEA, S.; GROSU, C.; KETNEY, O. y STOIA, M. 2013. Conventional and Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Blackberry and Sweet Cherry Cultivars. *Acta Chimica Slovenica*. 60 (2): 383 – 389.
- OROZCO, R. 2011. Efectos de abonos orgánicos sobre las características agronómicas, el rendimiento y la calidad de fruta de la variedad de mora 'Vino' (*Rubus adenotrichus* Schtdl.), en dos zonas de Costa Rica. Tesis Doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo, con énfasis en Sistemas de Producción Agrícolas. Universidad Nacional. Heredia.
- PANJA, P. 2017. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in food Science*. 17: 1 – 10.
- PENA-PEREIRA, F. y TOBISZEWSKI, M., eds. 2017. The Application of Green Solvents in Separation Processes. s.l., Elsevier.

- PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.S.; Le BOURVELLEC, C.; RENARD, C.M.G.C. y CHEMAT, F. 2012. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. 111 (1): 73 – 81.
- PRADAL, D.; VAUCHEL, P.; DECOSSIN, S.; DHULSTER, P. y DIMITRIV, K. 2016. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*. 32: 137 – 146.
- PRIOR, R.L.; WU, X. y SCHAICH, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (10): 4290 – 4302.
- QSONICA. 2012. Ultrasonic Liquid Processors. INTERNET. <https://www.paralab.pt/sites/default/files/pdf/Q125.pdf>
- QUIRÓS, A.M. 2016. Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- RAISSI, S & FARSANI, R.-E. 2009. Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 51: 267-271.
- RODRÍGUEZ-CABO, T.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M. y CELA, R. 2018. Assessment of alcoholic distillates for the extraction of bioactive polyphenols from grapevine canes. *Industrial Crops and Products*. 111: 99 – 106.
- ROSTAGNO, M.A. & PRADO, J.M., eds. 2013. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Reino Unido, RSC.
- SADOWSKA, K.; ANDRZEJEWSKA, J. y KLÓSKA, L. 2017. Influence of freezing, lyophilisation and air-drying on the total monomeric anthocyanins, vitamin C and

- antioxidant capacity of selected berries. *International Journal of Food Science and Technology*. 2017: 1 – 6.
- SALMINEN, J.P. Y KARONEN, M. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*. 25: 325 – 338.
- SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A.; MARCZAK, L.D.F. y TESSARO, I.C. 2012. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*. 100: 82-87.
- SANTOS, S.S.; RODRIGUES, L.M.; COSTA, S.C. y MADRONA, G.S. 2017. Antioxidant compounds from blackberry (*Rubus fruticosus*) pomace: Microencapsulation by spray-dryer and pH stability evaluation. *Food Packaging and Shelf Life*. 20: b100177.
- SCHEEPENS, A.; TAN, K. y PAXTON, J.W. 2010. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. 5 (1): 75 – 87.
- SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E. y PEREIRA, C. B. 200. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (26): 8021–8030.
- SISTEMA COSTARRICENSE DE INFORMACIÓN JURÍDICA (SCIJ). 2010. Reglamento sobre el manejo de residuos sólidos ordinarios N° 36093-S. San José.
- SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. y SOCHOR, J. 2015. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (10): 24673 – 24706.
- SLINKARD, K. y SINGLETON, V.L. 1977. Total phenol analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49-55.

- SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*. 174: 1244 – 1262.
- ȘTEFĂNUȚ, M.N.; CĂȚA, A.; POP, R.; MOȘOARCĂ, C. Y ZAMFIR, A.D. 2011. Anthocyanins HPLC-DAD and MS Characterization, Total Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Berries Extracts. *Analytical Letters*. 44 (18): 2843-2855.
- STRUCK, S.; PLAZA, M.; TURNER, C. y ROHM, H. 2016. Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science and Technology*. 51: 1305 – 1318.
- SOTO, M. 2014. Obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos mediante la aplicación de tecnologías de membranas a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora. Maestría académica en Ciencia de Alimentos. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica.
- SULLIVAN, D.M. y CARPENTER, D.E. 1993. *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*. s.l., AOAC International.
- TENG, H. y CHEN, L. 2018. Polyphenols and Bioavailability: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- TIWARI, B.K.; BRUNTON, N.P. & BRENNAN, C.S., eds. 2013. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*. s.l., John Wiley & Sons.
- UMA, D.B.; HO, C.W.; WAN AIDA, W.M. 2010. Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolic Compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. *Sains Malaysiana*. 39 (1): 119–128.
- VALDÉS-HERNÁNDEZ, G.V.; CRUZ-VIERA, L. y COMET-RODRÍGUEZ, R. 2015. Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleífera* Lam. *Revista CENIC*. 46: 135 – 145.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44–84.
- VEBERIC, R.; STAMPAR, F.; SCHMITZERT, V.; CUNJA, V.; ZUOAN, A.; KORON, D. Y MIKULIC-PETKOVSEK, M. 2014. Changes in the Contents of Anthocyanins and Other Compounds in Blackberry Fruits Due to Freezing and Long-Term Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (29): 6926 – 6935.
- VERMERRIS, W. Y NICHOLSON, R. 2008. Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht, Springer.
- WATSON, R.; PREEDY, V.R. y ZIBADI, S., eds. 2018. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease. Londres, Academic Press.
- WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B., GEBHARDT, S.E. y PRIOR, R.L. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52 (12): 4026 – 4037.
- XU, Z. y HOWARD, L.R., eds. 2012. Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals. West Sussex, John Wiley & Sons.
- ZHANG, Z.S.; LI, D.; WANG, L.J.; OZKAN, N.; CHEN, X.D.; MAO, Z.H. y YANG, H.Z. 2007. Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*. 57: 17 – 24.
- ZHANG, L.; ZHOU, J.; LIU, H.; KHAN, M.A.; HUANG, K. y GU, Z. 2012. Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 235: 637 – 645.
- ZHAO, Y., ed. 2007. Berry Fruit: Value-added Products for Health Promotion. Boca Raton, CRC Press.

ZÚÑIGA, G. 2017. Rendimiento del Procesamiento de Mora en Hidroprensa. Centro de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), San Pedro. Consultado el 20 de octubre de 2017. Comunicación Personal.

9. Anexos

9.1. Análisis de Varianza de los Modelos de la Superficie de Respuesta

Cuadro XXV. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en 100 g de SMS.

Variable Respuesta	Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Polifenoles Totales	Regresión	3546282,450	9	394031,383	14,0	0,0001
	Residual	281336,273	10	28133,627		
	Falta de Ajuste	95240	5	19615	0,527	0,7505
	Error Puro	186096	5	37219		
	Total	3827619	19			
	R ²	0,93				
Antocianinas	Regresión	1464,646	9	162,738	60,0	0,0000002
	Residual	27,143	10	2,714		
	Falta de Ajuste	26,800	5	5,468	79,746	0,00009
	Error Puro	0,343	5	0,069		
	Total	1491,789	19			
	R ²	0,98				
Elagitaninos	Regresión	25323,356	9	2813,706	15,2	0,0001
	Residual	1853,012	10	185,301		
	Falta de Ajuste	1833,27	5	374,33	94,811	0,00006
	Error Puro	19,74	5	3,95		
	Total	27176,37	19			
	R ²	0,93				

9.2. Probabilidad de los coeficientes de regresión de los modelos

Cuadro XXVI. Probabilidad de los coeficientes de regresión de los modelos generados en la superficie de respuesta de polifenoles totales, antocianinas y elagitaninos en 100 g de SMS.

Variable Respuesta	p de los coeficientes de la regresión									
	Intercepto	T	T ²	E	E ²	A	A ²	T*E	T*A	E*A
Polifenoles Totales	0,0000	0,0110	0,3145	0,0021	0,0014	0,7773	0,5081	0,2880	0,4221	0,1460
Antocianinas	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0048	0,0020	0,0000	0,0005	0,0003
Elagitaninos	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3510	0,0003	0,0110	0,1051	0,5581