

UNIVERSIDAD PERUANA UNION

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

E.A.P INGENIERÍA DE ALIMENTOS



Una Institución Adventista

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO

Extracción Supercrítica de Compuestos Fenólicos a partir
de Lías Obtenidas de los Residuos de la Producción de
Pisco

Msc. Angela María Farías Campomanes

Autor

Ing. Joel Coaquira Quispe

Asesor

Lima, junio del 2015

FARIAS CAMPOMANES, Angela María. Extracción supercrítica de compuestos fenólicos a partir de lías obtenidas de los residuos de la producción de pisco. Tesis (para optar título en Ingeniera de Alimentos). Ñaña, Lima 2015. 88 p.: 21 cm x 29.7 cm.

Asesor: Ing. Joel Coaquira Quispe

EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA/ DIÓXIDO DE CARBONO/
COSOLVENTE/ ETANOL/ PISCO/ RESIDUOS/*Vitis vinífera*.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Peruana Unión por abrirme sus puertas y permitir mi formación profesional.

A la Universidad Estadual de Campinas por el apoyo económico y la infraestructura para la realización de la presente tesis.

Al Prof. Ing. Joel Coaquira Quispe, por la credibilidad, asesoría y apoyo constante en el desenvolvimiento de este trabajo.

A la Profa. Dra. M. Angela A. Meireles, gracias por fortalecer con sus conocimientos y experiencia, mi formación profesional.

Al Sr. Luis A. Candela Quispe, por la donación de la materia prima y la confianza puesta en mi.

A mi familia, por el amor, paciencia, apoyo económico y emocional durante mi formación profesional.

A mi amigo, compañero, “parcero” y esposo, que estaba siempre cerca, muchas veces sin ser necesario, por haberme ayudado a tornarme una persona mejor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
I.1. Objetivos.....	3
I.1.1. Objetivo general	3
I.1.2. Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1. Compuestos bioactivos: fenólicos.....	4
II.2. Uva, pisco y subproductos	4
II.2.1. Uvina.....	5
II.2.2. Pisco	5
II.2.3. Proceso productivo	6
II.2.4. Situación actual.....	7
II.2.5. Residuo: Lías	8
II.3. Métodos de extracción	8
II.3.1. Extracción supercrítica.....	9
II.3.1.1. Curva global de extracción.....	10
II.3.2. Extracción soxhlet	12
II.3.3. Extracción en lecho agitado	13
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	15
III.1. Obtención y pre-procesamiento de la materia prima	15
III.2. Caracterización de la materia prima	15
III.2.1. Distribución del tamaño de partícula	15
III.2.2. Diámetro medio geométrico de partícula.....	16
III.2.3. Densidad real y aparente	16
III.2.4. Porosidad	17
III.2.5. Humedad	17
III.2.6. Lípidos	17
III.3. Métodos de extracción	17
III.3.1. Extracción supercrítica.....	18
III.3.1.1. Equipo de extracción.....	18

III.3.1.2. Preparación del lecho de extracción.....	19
III.3.1.3. Procedimiento operacional.....	20
III.3.1.4. Curvas globales de extracción.....	22
III.3.1.5. Cálculo de los parámetros cinéticos.....	23
III.3.2. Extracción soxhlet.....	24
III.3.3. Extracción en lecho agitado.....	24
III.3.4. Rendimiento global de extracción.....	25
III.4. Composición química de los extractos.....	25
III.4.1. Cromatografía en capa fina.....	25
III.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	27
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
IV.1. Caracterización de la materia prima.....	29
IV.2. Métodos de extracción.....	30
IV.2.1. Extracción Supercrítica.....	30
IV.2.1.1. Parámetros cinéticos.....	33
IV.2.2. Extracción Soxhlet.....	36
IV.2.3. Extracción en Lecho Agitado.....	37
IV.3. Composición química de los extractos.....	38
IV.3.1. Cromatografía en capa fina.....	38
IV.3.1.1. Extractos obtenidos por extracción supercrítica.....	38
IV.3.1.2. Extractos obtenidos por extracción soxhlet.....	44
IV.3.1.3. Extractos obtenidos por extracción en lecho agitado.....	46
IV.3.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	48
IV.3.2.1. Extractos obtenidos por extracción supercrítica.....	49
IV.3.2.2. Extractos obtenidos por extracción soxhlet y lecho agitado.....	57
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
REFERENCIAS.....	61
Anexo 1 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco.....	66
Anexo 2 Ajuste a tres rectas usando el software SAS.....	70
Anexo 3 Curvas de calibración construidas para el análisis de compuestos fenólicos por CLAE.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Flujograma simplificado del proceso de elaboración del pisco resaltando los residuos generados durante su elaboración.	7
Figura 2 Diagrama de fases.....	10
Figura 3 Curva global de extracción presentando las tres regiones.	11
Figura 4 Sistema de extracción soxhlet.....	13
Figura 5 Lías de pisco después del proceso de liofilización.	15
Figura 6 Unidad de extracción supercrítica SFE_I	18
Figura 7 Lecho de extracción usado para las extracciones SFE.	20
Figura 8 Flujograma de la unidad SFE_I (Farias-Campomanes & Meireles, 2013).	21
Figura 9 Distribución de las partículas de la materia prima.	29
Figura 10 Curva global de SFE de lías de pisco realizada a 40 °C y 20 MPa expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$	31
Figura 11 Curva global de SFE de lías de pisco realizada a 40 °C y 35 MPa expresa en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$	32
Figura 12 Ajuste de 3 rectas de la OEC obtenida a 20 MPa y 40 °C, expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$	33
Figura 13 Ajuste de 3 rectas de la OEC correspondiente al Exp. 1, obtenida a 35 MPa y 40 °C; expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$	34
Figura 14 Ajuste de 3 rectas de la OEC correspondiente al Exp. 2, obtenida a 35 MPa y 40 °C; expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$	36
Figura 15 Cinética de extracción en lecho agitado de lías de pisco.	38
Figura 16 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, sin tratamiento químico, visualizadas en luz ultravioleta a 254nm, utilizando FM2 como eluente.....	39
Figura 17 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, sin tratamiento químico, visualizadas en luz visible, utilizando FM3 como eluente.....	41
Figura 18 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, sin tratamiento químico, visualizados en luz ultravioleta a 366nm, utilizando FM3 como eluente.....	42

Figura 19 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, con tratamiento químico DPPH, visualizadas en luz visible, utilizando FM3 como eluente.....	43
Figura 20 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, con tratamiento químico AS, visualizadas en luz visible, utilizando FM3 como eluente.....	43
Figura 21 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet y colectados a 120 y 180 min de extracción. Placas eluidas con (a) FM1 (b) FM3 y (c) FM4, sin tratamiento químico y visualizadas en luz ultravioleta a 366 nm...	45
Figura 22 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet y colectados a 180 min de extracción; eluidas con FM1, con tratamiento químico NP y visualizadas en (a) luz ultravioleta a 366 nm, (b) luz ultravioleta a 254 nm y (c) luz visible.	46
Figura 23 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet y colectados a 180 min de extracción; eluidas con FM3, con tratamiento químico NP y visualizadas en (a) luz ultravioleta a 366 nm, (b) luz ultravioleta a 254 nm y (c) luz visible.	46
Figura 24 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción en lecho agitado, colectados durante la cinética de extracción, eluidas con (a) FM1 y (b) FM3, sin tratamiento químico, y visualizadas en luz ultravioleta a 366 nm.	47
Figura 25 Estructura química de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos de lías obtenidos por extracción supercrítica.	50
Figura 26 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido gálico, expresados en función de la razón S/F.....	50
Figura 27 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido protocateico, expresados en función de la razón S/F.....	51
Figura 28 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) de quercetina, expresados en función de la razón S/F.....	51
Figura 29 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado de quercetina, expresados en función de la razón S/F.....	52
Figura 30 – Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado I del ácido ferúlico, expresados en función de la razón S/F.	53
Figura 31 – Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado II de ácido ferúlico, expresados en función de la razón S/F.	53
Figura 32 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado de ácido <i>p</i> -cumárico, expresados en función de la razón S/F.	54
Figura 33 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido vanílico, expresados en función de la razón S/F.....	55

Figura 34 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido siríngico, expresados en función de la razón S/F..... 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición de la fase móvil y revelador utilizado de acuerdo a la clase de compuestos de interés.....	27
Tabla 2 Características físicas y químicas de las lías de pisco.	30
Tabla 3 Condiciones experimentales de extracción supercrítica.	30
Tabla 4 Parámetros cinéticos obtenidos a través del ajuste de tres rectas de los puntos experimentales obtenidos de la cinética de extracción a 20 MPa y 40 °C para el tiempo de proceso (t_p).	34
Tabla 5 Parámetros cinéticos para el tiempo de proceso (t_p) obtenidos a través del ajuste de tres rectas de los puntos experimentales obtenidos de la primera cinética de extracción (Exp. 1) a 35 MPa y 40 °C.	35
Tabla 6 Parámetros cinéticos para el tiempo de proceso (t_p) obtenidos a través del ajuste de tres rectas de los puntos experimentales obtenidos de la primera cinética de extracción (Exp. 2) a 35 MPa y 40 °C.	36
Tabla 7 Soluciones de muestras de extracto de lías de pisco obtenidas vía extracción en lecho agitado utilizadas en los análisis por TLC.....	47
Tabla 8 Compuestos fenólicos analizados en los extractos de lías de pisco.....	48
Tabla 9 Concentración total (g/kg extracto) de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos por extracción supercrítica.....	57
Tabla 10 Concentración total (g/kg extracto) de los compuestos fenólicos en los extractos de lías obtenidos por extracción soxhlet y lecho agitado.	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura A 1 Curva de calibración del ácido gálico.....	76
Figura A 2 Curva de calibración del ácido protocateico.....	76
Figura A 3 Curva de calibración del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico.	76
Figura A 4 Curva de calibración del ácido siríngico.....	77
Figura A 5 – Curva de calibración de la quercetina.	77
Figura A 6 Curva de calibración del ácido ferúlico.	77
Figura A 7 Curva de calibración del ácido <i>p</i> -cumárico.	78
Figura A 8 Curva de calibración de la (-) catequina.....	78
Figura A 9 Curva de calibración del resveratrol.....	78
Tabla A 1 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 20 MPa y 40 °C – Primer experimento.....	66
Tabla A 2 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 20 MPa y 40 °C – Segundo experimento.	67
Tabla A 3 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C – Primer experimento.....	68
Tabla A 4 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C – Segundo experimento.	69
Tabla A 5 Ajuste de la OEC de lías de pisco a 20 MPa y 40 °C.....	70
Tabla A 6 Ajuste de la OEC de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C - Primer experimento.....	72
Tabla A 7 Ajuste de la OEC de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C – Segundo experimento.....	74

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- AS - Anisaldehído sulfúrico
- B1 - Bomba de CO₂
- B2 - Bomba de Cosolvente
- BC - Baño de calentamiento
- BE - Baño de enfriamiento
- CE - Celda de extracción
- CER - Tasa de extracción constante (*Constant Extraction Rate*)
- CLAE - Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
- CO₂ - Dióxido de carbono
- DC - Tasa de extracción controlada por la difusión (*Diffusion Controlled*)
- DPPH - 2,2- diphenyl – 1- picrylhydrazyl
- EtOH - Etanol
- FC - Frasco de Coleta
- FER - Tasa de extracción decreciente (*Falling Extraction Rate*)
- FM - Fase móvil
- G - Ácido gálico
- GRAS - Reconocido generalmente como seguro (*Generally Recognized as Safe*)
- INDDA - Instituto de desarrollo agroindustrial
- L - Frasco de limpieza
- M - Manómetro
- M_{CER} - Tasa de transferencia de masa del periodo CER
- MI - Mezclador
- NP - 2-aminoetil-difenilborinato
- OEC - Curva global de extracción (*Overall Extraction Curve*)
- Q - Quercetina
- Q_{CO₂+EtOH} - Caudal másico del disolvente (dióxido de carbono+etanol)
- R - Rutina
- R_{CER} - Rendimiento del periodo de tasa de extracción constante
- R1 - Reservatorio de CO₂
- R2 - Reservatorio de cosolvente
- SFE – Extracción con fluido supercrítico (*Supercritical fluid extraction*)
- S/F - Razón entre el disolvente y la materia prima
- T - Termopar
- TC - Totalizador de caudal

t_{CER} - Duración del periodo de tasa de extracción constante

TLC - Cromatografía en capa fina (*Thin layer chromatography*)

t_p - Tiempo del proceso

VB – Válvula de bloqueo

VM – Válvula micrométrica

VR – Válvula de retención

Y_{CER} – Razón másica de extracto en la salida del lecho en el periodo CER

RESUMEN

El constante surgimiento de enfermedades degenerativas ha motivado la búsqueda de alimentos con beneficios a la salud. Los residuos del procesamiento de la uva han demostrado ser una fuente importante de flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenos, los cuales son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, cardioprotectora, entre otras. La extracción supercrítica con cosolvente, generalmente etanol, se mostró como la técnica más adecuada para la recuperación de compuestos fenólicos debido a su alta selectiva y porque el extracto es obtenido libre de disolventes orgánicos, muchas veces tóxicos. En este trabajo, se estudió el proceso de extracción supercrítica de compuestos fenólicos a partir del residuo de lías producidas durante la elaboración del pisco. Además, fue evaluada la eficiencia del proceso SFE a través de la comparación con los métodos convencionales de extracción como la extracción soxhlet y lecho agitado. Se utilizó etanol como cosolvente en la extracción supercrítica y como disolvente en las extracciones convencionales. Las curvas globales de extracción fueron construidas a 40 °C y presiones de 20 y 35 MPa, y fueron ajustadas a un *spline* de tres rectas. El tiempo del proceso y otros parámetros cinéticos de extracción fueron estimados. La composición de los extractos fue analizada por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Los mayores rendimientos de extracción fueron obtenidos vía extracción soxhlet ($27,6 \pm 0,4$ %, b.s.), seguido de la extracción por lecho agitado ($16,8 \pm 0,2$ %, b.s.) con el uso de razones de S/F y tiempo de extracción menores que los utilizados en el proceso de extracción supercrítica. La condición más favorable de extracción supercrítica fue 20 MPa y 40 °C y su rendimiento de extracción fue $10,3 \pm 0,2$ %, b.s. El análisis por CLAE determinó la presencia del ácido gálico, ácido protocateico, ácido vanílico, ácido siríngico, quercetina y sus derivados; y derivados del ácido ferúlico y cumárico; en los extractos de lías. Finalmente, el proceso de extracción supercrítica fue el método de extracción más eficiente para la obtención de compuestos fenólicos a partir de lías de pisco debido que fueron obtenidos extractos más concentrados en compuestos fenólicos.

Palabras claves: extracción supercrítica, dióxido de carbono, cosolvente, etanol, pisco, residuos, *Vitis vinífera*.

ABSTRACT

The increasing incidence of degenerative diseases has motivated the research on foods with specific health benefits. The grape (*Vitis vinifera*) processing wastes have demonstrated to be an important source of flavonoids, phenolic acids and stilbenes, which are widely known for their antioxidant, anticancer, antimicrobial, cardioprotective activities, among others. The supercritical extraction with co-solvent, usually ethanol, has been the most adequate extraction method for the phenolic compounds recovery because the extraction is selective and the extract does not present organic solvents traces, often toxic. In this work, the supercritical fluid extraction of phenolic compounds from lees, a pisco byproduct, was studied. Furthermore, the efficiency of the SFE process was evaluated through comparison with conventional extractions methods such as soxhlet and bed agitated. Ethanol was used as co-solvent in supercritical fluid extraction and as solvent in conventional extractions. Overall extraction curves were made to lees at 40 °C and 20 and 35 MPa, and were fitted to a spline of three straight lines. The process time and others extraction kinetic parameters were estimated. The extracts composition was analyzed by TLC and HPLC. The highest global extraction yield was obtained by soxhlet extraction ($27,6 \pm 0,4$ %, d.b.) followed by bed agitated extraction ($16,8 \pm 0,2$ %, d.b.); with S/F rates and extraction time lower than used on SFE process. The most favorable condition of SFE process was 20 MPa and 40 °C and the global extraction yield achieved at this condition was $10,3 \pm 0,2$ %, d.b. HPLC analysis determined the presence of gallic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, quecetin and its derivatives; and derivatives of ferulic and *p*-coumaric acids; in lees extracts. Finally, the supercritical fluid extraction process was the most efficient extraction method for obtaining phenolic compounds from lees, because the extracts were more concentrated in phenolic compounds.

Keywords: supercritical extraction, carbon dioxide, co-solvent, ethanol, pisco, byproduct, *Vitis vinifera*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (2012) reveló que el 50 % de muertes en el mundo durante el 2008, fueron causadas por enfermedades degenerativas: enfermedades cardíacas, respiratorias, todos los tipos de cáncer, accidente cerebro-vascular y diabetes. Las enfermedades degenerativas y el proceso de envejecimiento celular son causados por la interacción de los radicales libres, los cuales alteran el buen funcionamiento de la célula (Sharan, Odyuo & Purkayastha, 2011). Así, el deseo de la población de llevar una vida saludable ha motivado el consumo de alimentos con efectos benéficos a la salud, es decir, que se destaquen en la prevención de enfermedades. Los alimentos funcionales presentan ésta característica y su efecto se debe a la presencia de sustancias bioactivas (Paredes-López, Cervantes-Ceja, Vigna-Pérez & Hernández-Pérez, 2010).

Las sustancias bioactivas se encuentran ampliamente distribuidas en frutos y vegetales, y pueden ser clasificadas según su mecanismo de acción; como su actividad antioxidante, esto es, disminuyen los efectos de los radicales libres. Los polifenoles tienen actividad antioxidante y han sido encontrados en alimentos derivados de la uva y sus subproductos; siendo el caso del vino el más representativo. Estudios mostraron que factores como la variedad de la uva, condiciones de cultivo y procesamiento, entre otros, determinan la concentración final de polifenoles en el producto y en sus subproductos (Lafka, Sinanoglou & Lazos, 2007).

Actualmente, debido a la falta de estudios que demuestren la importancia de varios subproductos de la industria de alimentos, éstos son descartados en lugar de ser aprovechados. El Perú cuenta con una importante industria pisquera, la cual produce 7,2 millones de litros de pisco anuales (Ministerio de la Producción del Perú, 2014), y los principales subproductos generados durante su elaboración: bagazo de uva y lías, son desperdiciados. El pisco, al igual que el vino, es elaborado a partir de uva, la cual es una fuente importante de polifenoles (Szajdek & Borowska, 2008). El proceso de elaboración de pisco no incluye la adición de enzimas ni el uso de tiempos prolongados de maceración (Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales, 2006); este hecho favorece la permanencia de los polifenoles en lo que más adelante constituye el bagazo, principal subproducto de esta industria. Otro subproducto de la industria del pisco son las lías, las cuales aún no han sido ampliamente investigadas.

Las lías son obtenidas durante el trasiego del mosto que se realiza al finalizar la fermentación y están formadas principalmente por agua y en menor proporción por restos de levadura, tartratos y materiales de alto peso molecular presentes inicialmente en el mosto y que luego precipitan por el aumento de la concentración de alcohol (Silva, 2003). Se estima que 313 g de lías son obtenidas por cada litro de pisco (Farias-Campomanes & Meireles, 2013). Debido a la gran cantidad de subproductos generados por la industria pisquera, los mismos que representan serios problemas de almacenamiento, transformación y eliminación en términos ecológicos y económicos; la recuperación de compuestos fenólicos a partir de lías podría representar una fuente importante de ingreso y una alternativa para la mantención del equilibrio del medio ambiente, siempre que los procesos usados para su obtención sean adecuados.

Las técnicas de extracción convencionales utilizan grandes cantidades de uno o más solventes orgánicos, muchas veces tóxicos y de difícil separación. También, son realizadas a altas temperaturas, con agitación y por tiempo prolongado. Todas las técnicas de extracción objetivan la obtención de extractos con perfil químico específico, sin embargo, la principal desventaja de las técnicas convencionales es la baja selectividad de extracción (G. Bernardo-Gil, Ribeiro & Esquivel, 2002).

Tecnologías más respetuosas del medio ambiente, que no presentan riesgos para la salud y que garantizan una calidad superior del extracto están siendo desarrolladas. La extracción supercrítica usando como disolvente dióxido de carbono (CO₂) y cosolvente (etanol, agua, etc) es una tecnología limpia, debido que ambos solventes son considerados GRAS. Además, el uso de temperaturas moderadas y presión alta permiten la extracción de compuestos termolábiles de manera más rápida debido a un aumento en la tasa de extracción (Brunner, 2005). De esta manera, se hace necesaria la investigación del proceso de extracción supercrítica de lías obtenidas de la producción de pisco, identificando los parámetros de extracción que permitan obtener mayor rendimiento y selectividad de extracción.

Para los productores, la gran cantidad de subproductos generados durante la elaboración de pisco representa serios problemas de almacenamiento, transformación y eliminación en términos ecológicos y económicos. Por lo tanto, la obtención de productos de valor agregado a partir de los subproductos de la elaboración de pisco es una alternativa interesante para cumplir con las normas impuestas por el estado peruano, relacionadas a la gestión y manejo de residuos sólidos; y mantener el equilibrio del medio ambiente.

Así mismo, la extracción supercrítica tiene una alta eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos debido que el proceso utiliza temperatura de extracción amena y es realizado en ausencia de luz y aire, lo que conlleva a la conservación de las propiedades de los compuestos termolábiles y a la minimización del riesgo de producirse reacciones de degradación. Por lo tanto, determinar los parámetros de extracción que permitan obtener mayor rendimiento y calidad de extracto (perfil de compuestos fenólicos); permitirá el aprovechamiento de las lías de pisco y al mismo tiempo satisfacer la demanda de la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos.

I.1. Objetivos

I.1.1. Objetivo general

Estudiar la mejor condición de extracción supercrítica de compuestos fenólicos a partir del residuo de lías producidas durante la elaboración de pisco, usando dióxido de carbono supercrítico y etanol; a través de la determinación de los parámetros cinéticos del proceso y de la caracterización de los extractos.

I.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el residuo de lías de pisco;
- Construir las curvas globales de extracción (OECs);
- Calcular los parámetros cinéticos del proceso de extracción supercrítica;
- Caracterizar los extractos en relación a la presencia de flavonoides, fenólicos y actividad antioxidante a través de cromatografía en capa fina (TLC);
- Determinar la concentración de los principales fenólicos presentes en los extractos por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE);
- Comparar los resultados de extracción supercrítica y extracción convencional, en relación al rendimiento global y composición de los extractos.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Compuestos bioactivos: fenólicos

Estructuralmente, los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático con uno o más radicales hidroxilo (OH), que van desde moléculas simples a compuestos altamente polimerizados (Bravo, 1998). A pesar de su diversidad estructural, los compuestos fenólicos son referidos con frecuencia como polifenoles. Los principales polifenoles en la dieta son los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Santos, 2001).

Los polifenoles desempeñan un rol importante en la fisiología y morfología de las plantas; estos intervienen en el crecimiento y reproducción, proporcionando protección contra patógenos y predadores (Butler, 1992). Así mismo, los polifenoles contribuyen en el color y las características sensoriales de frutas y vegetales (Clifford, 1992). Los compuestos fenólicos tienen un amplio rango de propiedades benéficas a la salud. Estudios epidemiológicos, clínicos e *in vitro* reportaron actividad antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, cardioprotectora, entre otras (Beer, Joubert, Gelderblom & Manley, 2003; Cantos, Espín & Tomás-Barberán, 2002; Gusman, Malonne & Atassi, 2001). Además, la capacidad de secuestrar radicales libres, los cuales han sido implicados en más de 100 enfermedades; sin embargo, solo en algunos casos, su participación ha sido comprobada científicamente (Depablos & González, 2000); también es característica de este grupo de compuestos.

Los compuestos fenólicos son encontrados en pequeñas concentraciones en las plantas y sus frutos, destacándose la uva como una de las mayores fuentes de compuestos fenólicos (Perez-Jimenez, Neveu, Vos & Scalbert, 2010).

II.2. Uva, pisco y subproductos

Los fenólicos presentes en la uva están en mayor concentración en semillas y tallos que en la pulpa (Morales, 2005). De acuerdo con Abe, da Mota, Lajolo y Genovese (2007) los compuestos fenólicos presentes en la uva: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianinas y resveratrol; han demostrado ayudar a mejorar el metabolismo y prevenir problemas de salud.

La uva de la especie *Vitis vinífera* L. tiene gran importancia en la economía mundial, principalmente debido a su uso como materia prima para la producción de vinos y otros derivados. La especie *Vitis vinífera* L. fue introducida en el Perú por los españoles en el siglo XVI y fue cultivada por varias civilizaciones posteriores durante centenas de años lo que originó decenas de variedades, las denominadas castas, a través de selección artificial (Huertas Vallejos, 2004).

Hoy muchas variedades son conocidas por la producción de vinos blancos como es el caso de Chenin Blanc, Chardonay, Sauvignon Blanc y Muscat de Alejandria; y por la producción de vinos tintos como es el caso de Malbec, Cabernet Sauvignon, Merlot, Petit Sirah, Tanat y Petit Vardot. Sin embargo, las propiedades que presentan mejores características para la producción de pisco son Italia, Moscatel, Albilla, Torontel, Quebranta, Negra Criolla y Uvina, siendo que en este trabajo fueron utilizadas muestras de lías de la variedad Uvina.

II.2.1. Uvina

La uva variedad uvina tiene bayas redondas, achatas, pequeñas y son de color azul oscuro. Crece en racimos de forma cónica, tamaño medio y compacto, siendo la época de cosecha en marzo (Propisco, 2011). Inicialmente la uvina no era considerada de la especie *Vitis vinífera* L., pero era una variedad aceptada para la elaboración de pisco, hasta obtener los resultados del estudio ampelográfico realizado por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) que indicaría la especie a la que pertenecería. Hoy, la OIV reconoce la uvina como una cepa híbrida, es decir, una mezcla de especies *Vitis vinífera* L. y *Vitis estivalis* M. – cinerea E.; y a pesar de, la uvina no ser totalmente de la especie *Vitis vinífera* L., es considerada una “uva pisquera” cuando es cultivada en los distritos de Lunahuana, Pacarán y Zúñiga, los cuales pertenecen a la región de Cañete, Lima (Indecopi, 2011). La uvina ha sido utilizada en la producción de pisco hace más de 70 años. Los piscos producidos a partir de la uvina son agradables y bien estructurados. Los catadores de pisco definen el pisco obtenido de la variedad uvina como agradable, con característica herbácea y ligeramente astringente (Propisco, 2011).

II.2.2. Pisco

La producción de pisco se remonta a fines Del siglo XVI, en el Valle de Pisco, cuando la producción era artesanal y apenas para fines conmemorativos. Actualmente, con el aumento de la demanda, el número de bodegas registradas aumentó rápidamente. Sin embargo, la mayoría de esta bodegas aun pertenecen a productores

artesanales, pero existen también grandes industrias pisqueras que son las responsables por la exportación de este producto (Huertas Vallejos, 2004).

Pisco es el aguardiente obtenido exclusivamente por destilación de mostos frescos de uvas pisqueras recientemente fermentados, usando métodos que mantienen el principio tradicional de calidad establecido en las zonas de producción reconocidas (Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales, 2006). El pisco es una bebida alcohólica incolora o ligeramente ámbar con contenido medio de alcohol de 42°. A diferencia de otros aguardientes, el pisco no se rectifica, es decir, no utiliza otro producto para llegar al grado alcohólico característico (Schuler, 2004). El pisco es elaborado, exclusivamente, a partir de la especie *Vitis vinífera* L., denominadas uvas pisqueras; cultivadas en las zonas de producción reconocidas: Ica, Lima, Arequipa, Moquegua y Tacna. La uvas pisqueras se clasifican en no aromáticas: Quebranta, Negra criolla, Mollar y Uvina; y aromáticas: Italia, Moscatel, Albilla y Torontel (Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales, 2006).

II.2.3. Proceso productivo

De acuerdo con Calienes (2007) el proceso de producción del pisco puede ser dividido en 7 etapas: poda, vendimia, pisa, fermentación, destilación, maduración y embotellado, sin embargo, no existe un proceso de producción establecido. Como se muestra en la **Figura 1**, la producción de pisco comienza con la obtención del mosto fresco a través de la pisa de uva o molienda cuando es realizado a escala industrial. Luego, sucede la filtración del mosto con el objetivo de separar los residuos sólidos. La filtración puede ser realizada una o varias veces a fin de garantizar la calidad del pisco. El mosto filtrado reposa por uno o dos días, esta etapa es conocida como maceración. Después de la maceración, el mosto es transferido a otro recipiente donde reposa por aproximadamente 20 días, donde ocurre la fermentación del producto (Calienes, 2007).

El mosto fermentado, es transferido al alambique donde es sometido a calor, dando lugar al proceso de destilación. Durante la destilación, el primer producto que es obtenido recibe el nombre de “cabeza”, que debido a su alta concentración de alcohol es descartado. En seguida, se obtiene el “pisco” y finalmente la “cola”, ésta última también es eliminada. Los momentos en los cuales se separan la cabeza y la cola, son conocidos como cortes; los cortes deben ser realizados con cuidado para obtener un pisco de buena calidad (Calienes, 2007; Rovira, 1966). Después de la destilación, el pisco reposa 3 meses o más en recipientes llamados “botijas pisqueras”. Finalmente,

después del reposo prolongado también conocido como la etapa de maduración, el pisco puede ser embotellado (Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales, 2006).

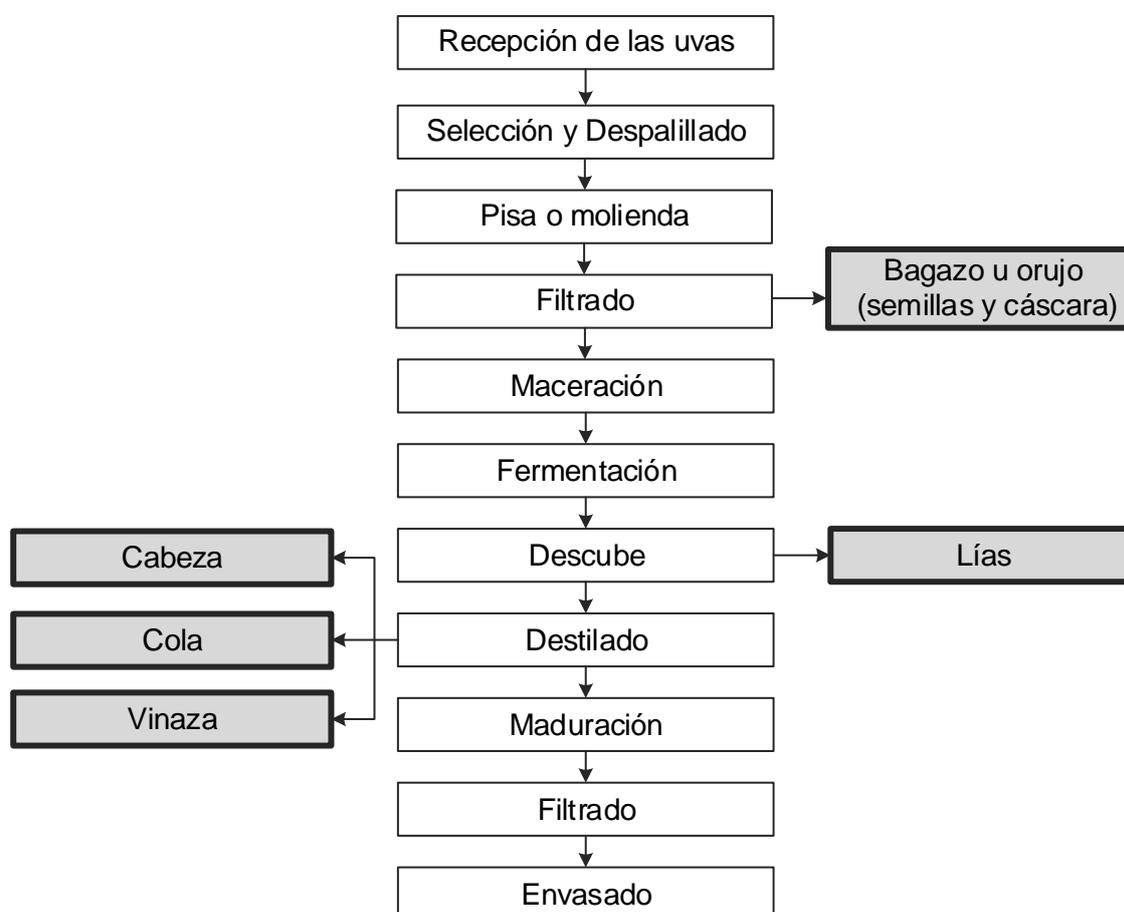


Figura 1 Flujograma simplificado del proceso de elaboración del pisco resaltando los residuos generados durante su elaboración.

II.2.4. Situación actual

En el Perú, aproximadamente 8000 kg de uva son producidos por hectárea y de 6 a 7 kg de uva son necesarios para producir 750 mL de pisco (Calienes, 2007). De acuerdo con la Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales (2006), de las 414 empresas productoras de pisco registradas en el año 2012, 43 % están ubicadas en el departamento de Lima y 40 % en Ica.

Con relación a la producción de pisco, ésta se cuadruplicó durante el periodo 2000 – 2013, siendo la producción en el 2013 de 7,2 millones de litros (Ministerio de la Producción del Perú, 2014). La exportación de pisco también aumentó durante los últimos años. Así, durante el primer semestre del 2013, fueron exportados 226 mil litros de pisco. Estados Unidos es el principal país importador de pisco (82 mil litros),

seguido de España (11 mil litros), Alemania (9 mil litros) y México (8 mil litros). Las exportaciones de pisco durante el primer semestre del 2013 sumaron US\$ 1 935 000,00 FOB.

II.2.5. Residuo: Lías

El bagazo de uva, las lías, la cabeza y la cola son subproductos de la industria del pisco. A pesar que el bagazo de uva y las lías son producidos en grandes cantidades, apenas el primero ha sido caracterizado y ampliamente estudiado en la obtención de aceite y compuestos bioactivos. Las lías o borras constituyen un residuo denso y son obtenidas durante el trasiego del mosto que se realiza al finalizar la fermentación. Las borras están constituidas principalmente por agua y en menor proporción por restos de levadura, tartratos y materiales de alto peso molecular presentes inicialmente en el mosto y que luego precipitan por el aumento de la concentración de alcohol (Silva, 2003).

La cantidad de lías obtenidas de un lote de producción depende de varios factores: los inherentes a la variedad, estado de madurez y estado higiénico de las bayas, los factores climáticos y las técnicas de operación adoptadas. Sin embargo, es posible estimar la cantidad de lías obtenidas de la producción de pisco a partir de datos referentes a la vinificación. Se sabe que en la vinificación es posible obtener de 1 a 5 kg de lías por cada 100 L de mosto producido. De esta manera, se puede obtener de 313 g de borras por cada litro de pisco producido (Farias-Campomanes & Meireles, 2013).

Actualmente, las lías de pisco son descartadas una vez que su recuperación es bastante compleja. No obstante, una pequeña cantidad de las lías son utilizadas para obtener alcohol vínico y tartrato de calcio del cual se obtiene ácido tartárico (Devesa-Rey et al., 2011); y el residuo de estos procesos es utilizado como fertilizante. También, a partir de las lías se obtiene levadura, material colorante y puede ser usada como alimento animal; sin embargo, el valor nutritivo bajo de las levaduras inviabiliza su uso (Silva, 2003).

II.3. Métodos de extracción

Existe en la literatura varias metodologías de obtención de extractos vegetales. Entre las metodologías disponibles, están aquellas que usan uno o varios solventes, realizadas a presión y temperatura en condiciones ambientales o diferentes a esta; e incluso métodos son asociados con el objetivo de obtener un extracto con perfil

químico deseable, alto rendimiento y que no presente características indeseables, como la presencia de compuestos coextraídos tales como ceras, clorofila y disolventes (Braga, 2005).

II.3.1. Extracción supercrítica

El interés por la extracción usando un fluido en estado supercrítico creció bastante durante los últimos años. La extracción supercrítica se trata de un proceso alternativo que atiende las restricciones impuestas por los órganos de salud, minimizando el impacto ambiental por la disminución de la emisión de residuos tóxicos, tornándose un campo promisor para la industria química, farmacéutica y de alimentos.

En general, la extracción supercrítica es una operación unitaria donde un disolvente en estado supercrítico, fluye por el lecho formado por una matriz sólida, extrayendo o separando los compuestos solubles en el disolvente. El estado supercrítico de un disolvente es alcanzando cuando las condiciones de presión y temperatura en las que se encuentra son mayores a sus valores críticos de presión y temperatura (P_c : presión crítica y T_c : temperatura crítica) como mostrado en la **Figura 2**. En este estado, la densidad, viscosidad y constante dieléctrica del disolvente pueden ser controladas por pequeñas variaciones de presión y temperatura (Vasconcellos, 2007).

Dióxido de carbono (CO_2) es el disolvente más utilizado en la extracción supercrítica porque sus valores de P_c y T_c son bajos (31,2 °C y 73,8 bar, respectivamente), es inerte, no inflamable, no corrosivo, barato, altamente disponible, inodoro, insípido, respetuoso del medio ambiente, tiene clasificación GRAS y; fácilmente, su selectividad puede ser cambiada por la adición de solventes como etanol u otros solventes polares (Brunner, 2005). Por casi tres décadas, el proceso de extracción supercrítica ha sido utilizado con éxito para la obtención de compuestos bioactivos a partir de productos naturales (Zabot, Moraes & Meireles, 2014). Estudios de extracción realizados con varias plantas, mostraron que los extractos obtenidos por extracción supercrítica presentaron mayor actividad antioxidante que los extractos obtenidos por métodos convencionales (Leal, 2005).

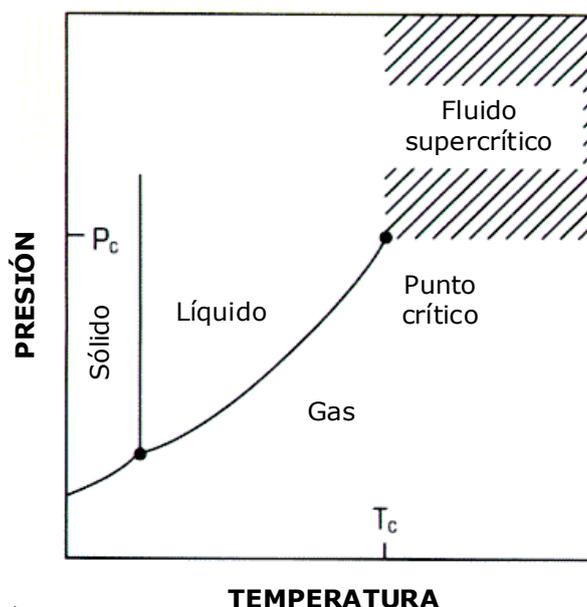


Figura 2 Diagrama de fases

Varias investigaciones relacionadas a la extracción de compuestos fenólicos a partir de semilla y cáscara de uva, usando CO_2 y cosolvente fueron desarrolladas. Estudios revelaron que un aumento en el porcentaje de cosolvente aumenta el rendimiento de extracción (Casas et al., 2010; de Campos, Leimann, Pedrosa & Ferreira, 2008); y que extractos obtenidos con etanol como cosolvente presentan mayor actividad antioxidante que los obtenidos apenas con CO_2 supercrítico (de Campos et al., 2008).

II.3.1.1. Curva global de extracción

Las curvas globales de extracción (OECs) expresan la tasa de extracción, esto es, la masa de extracto acumulada en función del tiempo o masa de disolvente utilizada. La tasa de extracción no es una función lineal del tiempo y, por esta razón, diversos comportamientos pueden ser observados para las curvas globales de extracción. El estudio de las OECs ayuda a definir los parámetros cinéticos del proceso, los cuales proveen informaciones importantes relativas al dimensionamiento industrial de una unidad de extracción con fluido supercrítico (Quispe-Condori, 2005; Vasconcellos, 2007)

Las OECs pueden ser divididas en tres regiones distintas como es ilustrado en la **Figura 3** (Meireles, 2007):

- Periodo de tasa de extracción constante (CER = *Constant Extraction Rate*), donde la retirada de extracto de la superficie externa de la partícula ocurre a una velocidad aproximadamente constante, por un fenómeno de convección;
- Periodo de tasa de extracción decreciente (FER = *Falling Extraction Rate*), cuando la resistencia a la transferencia de masa aumenta incluyendo, además del efecto convectivo en la fase fluida, el efecto difusional en la fase sólida debido al agotamiento del extracto en su superficie;
- Periodo de tasa de extracción controlada por la difusión (DC = *Diffusion Controlled*), donde la tasa de transferencia de masa es controlada principalmente por la difusión en la parte interna de la partícula sólida.

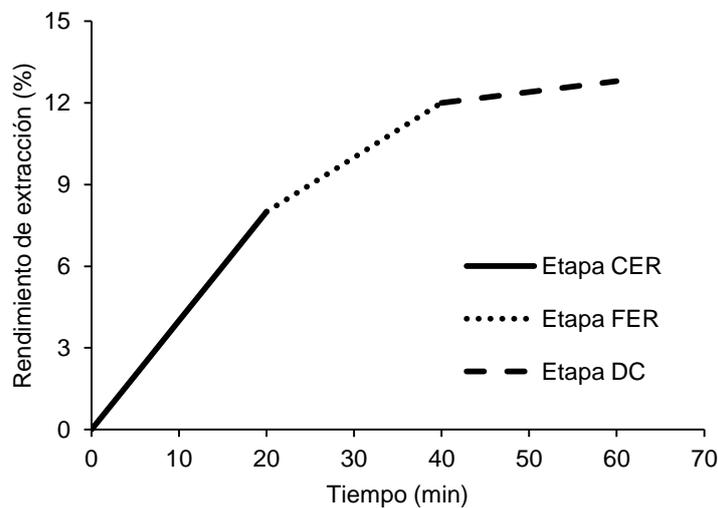


Figura 3 Curva global de extracción presentando las tres regiones.

Una OEC puede ser descrita por ajuste de las rectas (Meireles, 2007). La masa de extracto o rendimiento puede ser obtenida a partir de la ecuación 1 para el ajuste de dos rectas y a partir de la ecuación 2 para el ajuste de tres rectas.

$$m_{ext} = (b_0 - c_1 b_2) + (b_1 + b_2)t \tag{1}$$

$$m_{ext} = (b_0 - c_1 b_2 - c_2 b_3) + (b_1 + b_2 + b_3)t \tag{2}$$

donde:

b_i y c_i = Parámetros del modelo (adimensional).

c_1 = Tiempo de intersección de la primera con la segunda recta (min).

c_2 = Tiempo de intersección de la segunda con la tercera recta (min).

m_{ext} = masa de extracto (g) o rendimiento de extracción (%).

t = Tiempo (min)

La intersección entre las dos primeras rectas determina el fin del periodo de tasa de extracción constante (t_{CER}) y la intersección entre la segunda y tercera recta determina el fin del periodo de tasa de extracción decreciente (t_{FER}), donde se inicia el periodo de extracción controlada por la difusión. El estudio de las OECs ayuda a definir los parámetros cinéticos del proceso: t_{CER} (duración del período CER); M_{CER} (tasa de transferencia de masa del periodo CER); Y_{CER} (razón másica de extracto en la salida del lecho en el periodo CER) y R_{CER} (rendimiento del periodo CER), auxiliando en el desenvolvimiento del aumento de escala del proceso de extracción supercrítica (Moura et al., 2003).

II.3.2. Extracción soxhlet

La extracción soxhlet se realiza a través del reflujo de un disolvente en un proceso intermitente. El sistema soxhlet es mostrado en la **Figura 4**. El disolvente es inicialmente calentado y el vapor producido por el calentamiento es condensado. El disolvente condensado cae dentro de la cámara de extracción, que contiene el cartucho de papel filtro con la materia prima en su interior, y lentamente completa el volumen de la cámara con disolvente. La solubilización de las sustancias que serán extraídas ocurre en esta etapa. En seguida, la mezcla de disolvente y extracto es sifonada para el contenedor de disolvente. El proceso se repite hasta que la extracción sea completada. La extracción en sistema soxhlet es utilizada para la obtención de compuestos fenólicos, sin embargo presenta mayor aplicación en la obtención de aceite usando solventes de baja polaridad.

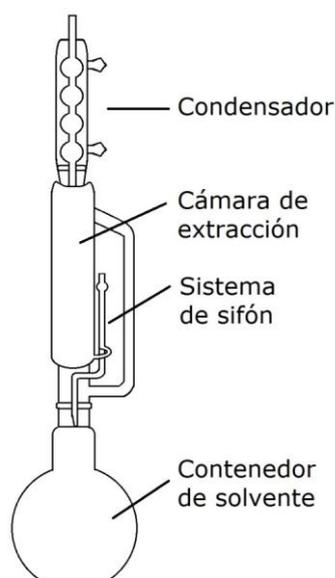


Figura 4 Sistema de extracción soxhlet.

Estudios relacionados a la extracción de compuestos fenólicos en sistema soxhlet usando semilla de uva como materia prima mostraron que 90 % de los compuestos fenólicos de la uva se encuentran en el tegumento de la semilla (Xu, Zhang, Wang & Lu, 2010). Por otro lado, el rendimiento de extracción en sistema soxhlet usando etanol es menor que el obtenido por lecho agitado; además, el uso de temperatura alta característica de la extracción soxhlet no afectó la actividad antioxidante de los extractos (Aleksovski, Sovová, Čurapova & Poposka, 1998).

II.3.3. Extracción en lecho agitado

La extracción sólido-líquido es el método más usado para la obtención de compuestos bioactivos. Factores como la razón materia prima-disolvente, tiempo de extracción, temperatura, tipo de disolvente; y procesos auxiliares como agitación, ultrasonido, entre otros; son considerados durante el proceso de extracción.

Cassaza, Aliakbarian, Mantegna, Cravotto y Perego (2010) estudiaron la extracción sólido-líquido de compuestos fenólicos de residuo de uva a 25 °C bajo agitación mecánica durante 19 horas, utilizando como solventes metanol y etanol. El extracto obtenido a partir de las semillas de uva se mostró más rico en polifenoles, flavonoides y *o*-difenoles totales que el extracto obtenido de la cáscara. Adicionalmente, Negro, Tommasi y Miceli (2003) concluyeron que la semilla de uva tiene mayor concentración de taninos condensados y proantocianidinas que la cáscara de uva.

Yilmaz y Toledo (2006) reportaron que, para la extracción de fenólicos, el uso de mezclas de solventes es más eficiente que el uso de solventes puros. Sin embargo, resultados similares de rendimiento de varias clases de fenólicos fueron obtenidos por el uso de solución acuosa de etanol y etanol acidificado (Bucic-Kojic, Planinic, Tomas, Bilic & Velic, 2007; Negro et al., 2003).

Por otro lado, Lafka et al. (2007) relataron que extractos obtenidos con etanol como único disolvente presentaron una pequeña diferencia en el rendimiento de fenólicos totales comparado a los extractos obtenidos con la mezcla etanol:agua (1:1) y metanol, no obstante, extractos etanólicos presentaron mayor actividad antioxidante.

De esta manera, el etanol se torna el disolvente de extracción más apropiado una vez que produce extractos ricos en compuestos fenólicos y con elevado poder antioxidante además de ser considerado un disolvente GRAS.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Obtención y pre-procesamiento de la materia prima

Las lías de pisco fueron obtenidas durante el trasiego del mosto, el cual se realiza al concluir la fermentación. Las lías, cuya consistencia es densa, fueron almacenadas en tanques plásticos oscuros de 50 L de capacidad y transportadas al INDDA (Instituto de Desarrollo Agroindustrial) para su liofilización. El secado por liofilización fue realizado con el objetivo de facilitar su transporte (producto seco) manteniendo sus propiedades inalteradas (**Figura 5**). Posteriormente, las lías liofilizadas fueron almacenadas en bolsas plásticas oscuras y mantenidas en congelador doméstico (Metalfrio, modelo DA420, Sao Paulo, SP, Brasil) hasta su uso.

Las lías de pisco fueron donadas por la empresa Bodega y Viñedos Candela S.A., situada en Lima, Perú. Las lías utilizadas en este estudio pertenecen a la variedad uvina y fueron colectadas de la vendimia realizada en el 2010.



Figura 5 Lías de pisco después del proceso de liofilización.

III.2. Caracterización de la materia prima

III.2.1. Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula fue determinada mediante el tamizado de masas de 50 g de materia prima. Fue utilizado un sistema vibratorio (Marconi, MA420, Piracicaba, SP, Brasil) de tamices (Serie Tyler, W.S. Tyler, Wheeling, EUA) con aberturas de 16 mesh (1,00 mm), 24 mesh (0,71 mm), 32 mesh (0,50 mm), 48

mesh (0,30 mm), 80 mesh (0,18 mm), 100 mesh (0,149 mm) y 200 mesh (0,074 mm). Las determinaciones fueron realizadas por 15 min y vibración nivel 5. Las masas de materia prima retenidas sobre los tamices fueron pesadas en balanza semi-analítica (Marte, modelo AS, Sao Paulo, SP, Brasil). Para las extracciones fueron utilizadas las masas de materia prima con tamaño de partícula entre 0,18 y 1 mm.

III.2.2. Diámetro medio geométrico de partícula

El diámetro medio geométrico de las partículas de la materia prima fue determinado de acuerdo con el método propuesto por ASAE (2003) conforme la ecuación 3.1.

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right]; \quad d_i = (d_i \times d_{i+1})^{0,5} \quad (3.1)$$

donde:

d_i = Abertura nominal del i-ésimo tamiz (mm).

d_{i+1} = Abertura nominal del tamiz $i+1$ (mm).

w_i = Masa de materia prima retenida en el i-ésimo tamiz (g).

III.2.3. Densidad real y aparente

La densidad real (d_r) de las partículas de las lías fue realizada a través de la técnica de picnometría con gas helio utilizando densímetro (Micromeritics, modelo AccuPyc II 1340 V1.02, EUA). El análisis fue desarrollado en la Central Analítica del Instituto de Química de la UNICAMP.

La densidad aparente (d_a) fue calculada a través de la masa de materia prima que fue utilizada en los experimentos de extracción supercrítica y el volumen de la celda de extracción (kg/m^3) conforme la ecuación 3.2.

$$d_a = \frac{M_{\text{exp}}}{v} \quad (3.2)$$

donde:

M_{exp} = Masa de materia prima usada en los experimentos (g).

v = Volumen de la celda de extracción (mL).

d_a = Densidad aparente (g/mL).

III.2.4. Porosidad

La porosidad total del lecho formado por las partículas de materia prima fue calculada usando la densidad real de las partículas y la densidad aparente del lecho de extracción de acuerdo con la ecuación 3.3.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad (3.3)$$

donde:

d_r = Densidad real de las partículas (g/mL).

d_a = Densidad aparente del lecho de extracción (g/mL)

ε = Porosidad del lecho más partículas (adimensional)

III.2.5. Humedad

La humedad fue determinada de acuerdo con el método gravimétrico de la AOAC (AOAC International 1997) método 931.04, basado en la remoción de agua por calentamiento a 105 ± 5 °C en estufa (Tecnal, modelo TE 395-1, Sao Paulo, SP, Brasil). Dos gramos de materia prima fueron colocados en crisoles previamente tarados permaneciendo en estufa por 24 h. Posteriormente, los crisoles conteniendo las muestras de materia prima fueron colocados en desecador, donde enfriaron hasta temperatura ambiente. El análisis fue realizado en triplicado.

III.2.6. Lípidos

Los lípidos totales fueron determinados a través de la extracción de la fracción lipídica por reflujo de éter de petróleo en sistema soxhlet (AOAC International 1997, método 963.15)

III.3. Métodos de extracción

Con el objetivo de comparar los resultados de rendimiento y composición química de los extractos obtenidos con fluido supercrítico, se estudiaron también los métodos convencionales de extracción: soxhlet y lecho agitado.

III.3.1. Extracción supercrítica

III.3.1.1. Equipo de extracción

Los experimentos de extracción supercrítica fueron realizados en la unidad de extracción SFE_I (**Figura 6**), construida en el Laboratorio de Extracción, Fraccionamiento e Identificación de Extractos Vegetales (LASEFI), la cual opera hasta una presión máxima de 35 MPa y caudal de disolvente máximo de $1,0 \times 10^{-4}$ kg/s. La celda de extracción tiene 3,41 cm de diámetro interno y 46 cm de altura, totalizando un volumen de 415 mL. La unidad de extracción SFE_I consiste de una bomba para CO₂ (Maximator, modelo PP111, Sao Paulo, SP, Brasil), una bomba HPLC para cosolvente (Thermo Separations Products, Waltham, USA), un baño de enfriamiento (Poly Science, modelo 9510, Nieves, USA) y un baño de calentamiento (Marconi, modelo MA184, Piracicaba, SP, Brasil) responsables por el mantenimiento de la temperatura de la celda de extracción y de la bomba de CO₂; un medidor de caudal (Lao, modelo G, Sao Paulo, SP, Brasil), termopares, válvulas de bloqueo y una válvula micrométrica (Autoclave Engineers, Erie, USA).



Figura 6 Unidad de extracción supercrítica SFE_I

Debido a la poca cantidad de materia prima disponible, una columna de teflón perforada, equivalente al 70 % del volumen del extractor fue introducida en el mismo con el fin de disminuir su volumen, disminuyendo también el tiempo de presurización y la pérdida de carga del sistema. La materia prima fue introducida en una celda de

nylon con abertura de 80 mesh y diámetro igual que el extractor. La altura de la celda nylon fue determinada por el espacio libre en el extractor.

III.3.1.2. Preparación del lecho de extracción

El preparo del lecho de extracción siguió el procedimiento padrón para todas las extracciones.

1. Con una de las extremidades de la celda de nylon cerrada, se deposita una capa de lana de vidrio en la base;
2. En seguida, con auxilio de una espátula, se depositan pequeñas cantidades de materia prima y se compacta el lecho con un bastón cilíndrico de acero inoxidable a fin de evitar la formación de caminos preferenciales;
3. Al depositar la totalidad de la masa de la materia prima, se deposita una segunda capa de lana de vidrio, y el volumen restante en la celda de nylon es completado con esferas de vidrio (5 mm de diámetro). La celda de nylon es cerrada con hilo;
4. Debido que en el sistema, el flujo del disolvente es de forma descendente, la celda de nylon es introducida por la parte inferior del extractor y en la misma posición en la que el lecho fue formado.

La densidad del lecho fue mantenida constante. Fueron utilizadas esferas de vidrio para completar el volumen de la celda de nylon y para mantener estable el flujo del CO₂ en el interior de la celda de extracción. Fue necesario el uso de una columna de teflón y esferas de vidrio para completar el volumen de la celda de extracción (**Figura 7**).

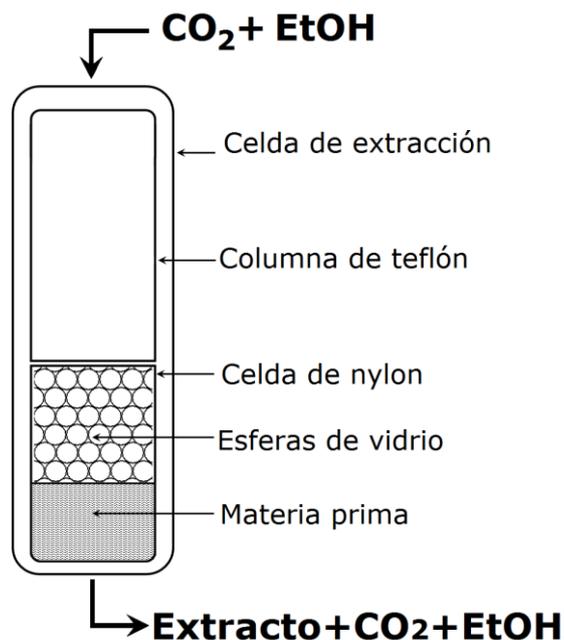
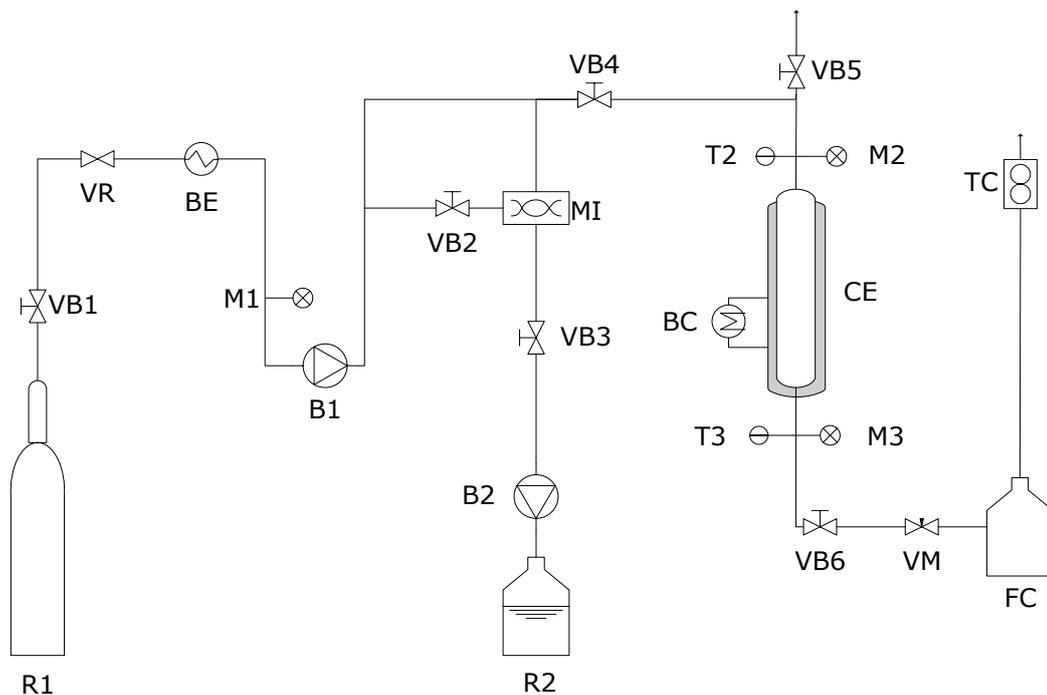


Figura 7 Lecho de extracción usado para las extracciones SFE.

III.3.1.3. Procedimiento operacional

El flujograma del equipo de extracción SFE_I es mostrado en la **Figura 8**. El proceso comienza cuando el CO_2 (99 % de pureza, Gama Gases Industriais, Campinas, SP) es refrigerado a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ para garantizar que el mismo llegue a la bomba (B1) en estado líquido. La bomba de cosolvente (B2) es utilizada apenas cuando hay necesidad del uso de un modificador en el proceso de extracción. En este caso, CO_2 y cosolvente son mezclados (MI) antes de entrar al extractor. Entonces, el disolvente de extracción pasa por la celda de extracción (CE) la cual contiene la materia prima en su interior. Después de la expansión que ocurre después de la válvula micrométrica (VM), el extracto y cosolvente son colectados en frascos colectores de vidrio (FC), los mismos que están inmersos en baño de hielo a presión atmosférica. El CO_2 en estado gaseoso transita por el totalizador de caudal (TC) y es entonces liberado para el ambiente.



B1: bomba de CO₂

B2: bomba de cosolvente

FC: frasco de colecta de extracto

CE: celda de extracción

M: manómetros

MI: mezclador

BE: baño de enfriamiento

BC: baño de calentamiento

R1: reservorio de CO₂

R2: reservorio de cosolvente

T: termopares

TC: totalizador de caudal

VB: válvula de bloqueo

VR: válvula de retención

VM: válvula micrométrica

Figura 8 Flujograma de la unidad SFE_I (Farias-Campomanes & Meireles, 2013).

El procedimiento operacional del equipo de extracción fue estándar para todas las extracciones.

1. Se insiere la columna de teflón y en seguida la celda de nylon, con materia prima en su interior, por la extremidad inferior de la celda de extracción CE y se cierra;
2. Se verifica que todas las válvulas estén cerradas;
3. Se encienden los baños termostáticos BE y BC y se espera que las temperaturas de extracción sean alcanzadas;
4. Se abren las válvulas VB1 y VR del cilindro de CO₂ R1 y se lee la presión en el manómetro M1;

5. Se abre la válvula VB4 para la presurización del sistema;
6. Alcanzada la presión de trabajo, la misma que puede ser observada en el manómetro M2, se realiza el periodo de extracción estática, manteniendo las válvulas VB4, VB6 y VM cerradas durante un tiempo previamente establecido;
7. Al finalizar el periodo de extracción estática, se abren las válvulas VB2, VB3, VB4, VB6 y VM;
8. El extracto es colectado en el frasco de vidrio de 100 mL (FC) el cual está inmerso en un baño de hielo;
9. Al finalizar la extracción, se cierra la válvula VB4 y se apagan las bombas de CO₂ y cosolvente;
10. Se cierran las válvulas VB1 y VR del cilindro R1;
11. Se espera la despresurización del sistema;
12. Se apagan los baños termostáticos BE y BC;
13. Después de enfriar la celda de extracción, ésta es abierta y la celda de nylon es retirada;
14. Se procede a la limpieza de la línea entre la celda de extracción CE y el frasco de coleta FC, utilizando etanol como disolvente. El extracto retenido en la línea es colectado en un frasco de vidrio y cuantificado.

III.3.1.4. Curvas globales de extracción

Las curvas globales de extracción (OECs) fueron realizadas a 40 °C y, 20 y 35 MPa, usando 90 % CO₂ supercrítico y como cosolvente 10 % de etanol al 96 % de pureza. Se utilizó 15 g de materia prima y 10 min de periodo estático. El procedimiento patrón del equipo SFE_I fue adoptado para la determinación de las OECs. El lecho de extracción fue preparado conforme el ítem 3.3.1.2. En intervalos de tiempo establecidos, el frasco colector fue substituido por otro limpio y previamente tarado. El intervalo de tiempo entre los frascos de colecta dependió del caudal empleado. De esta manera, los frascos fueron substituidos a cada 10, 20 o 30 min. El proceso de extracción finalizó cuando no se observó más la salida de extracto. La limpieza de la línea fue realizada con etanol y el extracto recuperado fue depositado en un frasco, llamado de frasco de limpieza.

Los frascos de colecta de extracto permanecieron por 15 min en la campana de extracción para garantizar la volatilización del CO₂. Posteriormente, los frascos de colecta de extracto y frascos de limpieza fueron acoplados en un rota-evaporador (Heildoph Instruments modelo Laborota 4001, Viertrieb, Alemania) con bomba al vacío (Heildoph Instruments, modelo Rotovac Control, Viertrieb, Alemania) a 40 °C y 0,011 MPa para remover el etanol. Las masas de extracto contenidas en los frascos fueron pesadas en balanza analítica (Sartorius, Modelo A200S, Gottingen, Alemania). Los experimentos fueron realizados en duplicado.

III.3.1.5. Cálculo de los parámetros cinéticos

Con los valores de rendimiento de extracción obtenidos experimentalmente, los parámetros cinéticos de la curva global de extracción: t_{CER} (duración del periodo de tasa de extracción constante – CER; min), M_{CER} (tasa de transferencia de masa del periodo CER; kg/s), Y_{CER} (razón másica de extracto en la salida del lecho; g extracto/g CO₂+etanol) y R_{CER} (rendimiento del periodo de tasa constante de extracción: CER; %) fueron determinados a través del ajuste a un *spline* de tres rectas. Para el ajuste fue utilizado el software SAS Learning Edition v9.2 y sus funciones PROC REG y PROC NLIN.

La primera etapa fue la obtención de los parámetros estimados Intercept, t_{min} , AL1 y AL2 a través de un ajuste lineal (PROC REG) de la curva de extracción. Luego, a través de un ajuste no lineal (PROC NLIN) de tres rectas fueron determinados los parámetros b_0 , b_1 , b_2 y b_3 correspondientes a los valores Intercept, t_{min} , AL1 y AL2 obtenidos en la primera etapa. Para estimar por primera vez los parámetros Knot1 y Knot2 fueron utilizados los puntos de intersección de la curva observados. A partir de esos datos iniciales (Intercept, t_{min} , AL1 y AL2, Knot1 y Knot2) el software SAS realizó el ajuste de la curva y generó los parámetros de la curva de extracción iterativamente. t_{CER} corresponde al valor Knot1 mientras que t_p fue definido como el punto de intersección entre las rectas que describen las etapas CER y DC.

Los parámetros para el t_p tales como la tasa de transferencia de masa en el t_p (M_p), razón másica de extracto en la fase fluida a la salida del extractor en el t_p (Y_p), razón másica de disolvente/materia prima en el t_p (S/F_p) y rendimiento en el t_p (R_p) fueron calculados por el modelo obtenido a través del ajuste al spline.

III.3.2. Extracción soxhlet

Las extracciones en sistema soxhlet fueron realizadas utilizando 8 g de materia prima con tamaño de partícula de $0,73 \pm 0,03$ mm y como disolvente de extracción fue utilizada una solución de etanol al 96 %.

Fueron confeccionados cartuchos de papel filtro (Qualy, JProLab, cód.3006-5, Paraná, Brasil) y en su interior fue depositada la muestra de materia prima. La razón de materia prima y disolvente usada fue 1:20. Así, fueron depositados 200 mL de disolvente en un balón con capacidad de 250 mL. En seguida, éste fue colocado en manta de calentamiento con controlador de voltaje (Fisaton, modelo 102, São Paulo, SP). El nivel de calentamiento de la manta fue establecido bajo el criterio de la obtención de reflujos de disolvente en intervalos de tiempo espaciados y el tiempo de extracción fue determinado de acuerdo a la composición del extracto. Al finalizar la extracción y después de enfriar el sistema, el extracto fue filtrado en papel filtro con el objetivo de retener la materia prima que pudo haber salido del cartucho. El extracto fue recogido en un frasco de vidrio, y en seguida éste fue acoplado en un rota-evaporador (Heildoph Instruments modelo Laborota 4001, Viertrieb, Alemania) con bomba al vacío (Heildoph Instruments, modelo Rotavac Control, Viertrieb, Alemania) a 40 °C y 0,011 MPa para remover el etanol. Después de la evaporación fue necesario el secado en disecador a temperatura y presión ambiente (25 °C y 0,1 MPa); y protegido de la luz, hasta alcanzar peso constante. Las masas de extracto contenidas en los frascos fueron pesadas en balanza analítica (Sartorius, Modelo A200S, Gottingen, Alemania). Los experimentos fueron realizados en duplicado.

III.3.3. Extracción en lecho agitado

Las extracciones en lecho agitado fueron realizadas utilizando 3 g de materia prima con tamaño de partícula de $0,73 \pm 0,03$ mm y como disolvente de extracción fue utilizada una solución de etanol al 96 %. La razón de materia prima y disolvente usada fue 1:10. De esta manera, fueron depositados 30 g de disolvente en erlenmeyers con capacidad de 250 mL. Los erlenmeyers fueron tapados con parafilm y colocados en una incubadora agitadora (Marconi, modelo MA 420, Piracicaba, SP) a 40 °C y 168 rpm durante 6 h. En intervalos de 30 min, los erlenmeyers fueron retirados de la incubadora, las soluciones de extracto fueron filtradas con papel filtro; y los extractos recuperados en frascos de vidrio. La filtración de los extractos fue realizada durante 10 min. La evaporación del disolvente fue realizada en rota-evaporador (Heildoph Instruments modelo Laborota 4001, Viertrieb, Alemania) con bomba al vacío (Heildoph

Instruments, modelo Rotovac Control, Viertrieb, Alemania) a 40 °C y 0.011 MPa. Después de la evaporación del disolvente, fue necesario secar los extractos en un desecador a presión y temperatura ambiente (25 °C y 0,10 MPa), protegido de la luz, para evitar degradación, hasta alcanzar peso constante. Finalmente, las masas de extracto contenidas en los frascos fueron pesadas en balanza analítica (Sartorius, Modelo A200S, Gottingen, Alemania). Los experimentos fueron realizados en duplicado.

III.3.4. Rendimiento global de extracción

El rendimiento global (X_0) de los procesos de extracción fue calculado relacionando la masa total de extracto ($m_{extracto}$) y la masa de la muestra de materia prima en base seca ($m_{materia-prima}$), de acuerdo con la ecuación 3.4.

$$X_0 (\%) = \frac{m_{extracto}}{m_{materia-prima}} \times 100 \quad (3.4)$$

donde:

$m_{extracto}$ = Masa de extracto (g).

$m_{materia-prima}$ = Masa de materia prima en base seca (g).

III.4. Composición química de los extractos

La composición química de los extractos obtenidos por extracción supercrítica y por los métodos convencionales de extracción, fue determinada por cromatografía en capa fina (*Thin layer chromatography* - TLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (*High-performance liquid chromatography* - HPLC).

III.4.1. Cromatografía en capa fina

Fue utilizada la técnica de adsorción por cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography* - TLC) y la metodología de análisis descrita por Wagner y Blad (1996) con algunas modificaciones. Con el objetivo de obtener mejor resolución de los resultados, disolventes como metanol (Tedia, lote 1007133R, EUA) y etanol (ABS ACS 99,5 %, Lote 17.439, Ecibra, Santo Amaro, SP) fueron utilizados para disolver los extractos (Wagner y Blad 1996). Los extractos fueron diluidos con auxilio de un baño de ultrasonido (Ultra sonic clean, Maxiclean 1400, Unique, Indaiatuba, SP). Quercetina (95 %, lote S38127-087, Sigma Aldrich) y rutina (95 %, lote 086K1245, Sigma Aldrich) fueron utilizados como referencia.

Placas de aluminio con una fina capa de gel de sílice, normal (Merck, CCF-C/25, Sílica gel 60, Darmstadt, Alemania) y UV sensible (Merck, CCF-C/25, Sílica gel 60 F₂₅₄, Darmstadt, Alemania) fueron usadas como fase estacionaria.

En seguida, en las cubas, que son recipientes de vidrio con tapa removible y espacio suficiente para almacenar la(s) placa(s), se depositaron 30 mL de fase móvil y se mantuvo la cuba tapada para que ocurriese la saturación de la atmosfera de la cámara. La saturación es indispensable para la buena migración de los compuestos.

Fueron estudiadas diferentes composiciones de fases móviles, de acuerdo con el grupo de compuestos de interés. Las fases móviles estaban formadas por mezclas de dos o más disolventes: acetato de etilo (Merck KGaA, Lote K37251523, Darmstadt, Alemania), cloroformo (Merck, lote K38554545, Alemania), hexano (Synth, PA ACS lote 63264), tolueno (Merck KGaA, lote K37362225, Darmstadt, Alemania) y agua; e incluso ácidos: ácido acético glacial (Ecibra PA ACS, lote 17.440, São Paulo, Brasil) y ácido fórmico (Vetec, lote 0902017, RJ, Brasil). En la **Tabla 1** se presenta la composición de las fases móviles utilizadas en los análisis.

Mientras ocurría la saturación de las cubas, fueron aplicadas muestras de extracto sobre las placas con ayuda de tubos capilares. Se dejó secar las placas y enseguida éstas fueron depositadas en las cubas con ayuda de pinzas evitando que el disolvente ascienda de forma irregular. Se esperó que la fase móvil alcanzara el límite trazado en la placa para ésta ser retirada con ayuda de pinzas. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y cuando estaban totalmente secas, se procedió a la revelación de las mismas.

La visualización de los compuestos que no eran visibles a la luz, fue realizada en luz ultravioleta (Multiband UV – 254-366nm, modelo UVGL-58, Mineralight® Lamp, Upland, CA, EUA) de longitud de onda corta ($\lambda = 254$ nm) y larga ($\lambda = 366$ nm) equipado con gabinete (UVP-Chromato-VUE, modelo CC-10, Upland, CA, EUA). Los compuestos que no emitieron fluorescencia en luz ultravioleta fueron visualizados pulverizando las placas con soluciones de reactivo revelador, los cuales fueron escogidos de acuerdo con los compuestos de interés (Wagner & Blad, 1996), conforme la **Tabla 1**.

Las soluciones de reactivo revelador fueron identificadas como AS, NP y DPPH. La solución del revelador anisaldehído sulfúrico (AS) fue preparada adicionando en un erlenmeyer de 250 mL, 0,5 mL de p-anisaldehído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, en ese orden

debido que la reacción es intensa. La solución del revelador 2-aminoetil-difenilborinato (NP) fue preparada adicionando en un erlenmeyer de 250 mL, 1 g de 2-aminoetil-difenilborinato y 100 mL de metanol. Finalmente, la solución del revelador DPPH fue preparada adicionando en un erlenmeyer de 250 mL, 0,4 g de DPPH y 250 mL de metanol. Después de la revelación de las placas, las placas fueron nuevamente visualizadas bajo luz ultravioleta. Las placas pulverizadas con AS, fueron colocadas en estufa a 100 °C por 10 min y después fueron visualizadas en luz visible y UV (Wagner & Blad, 1996).

Tabla 1 Composición de la fase móvil y revelador utilizado de acuerdo a la clase de compuestos de interés.

Compuestos de interés	Fase móvil	Revelador
Flavonoides glucosidados, antocianinas	FM1 (68:7:7:18) acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua.	NP
	FM2 (91:9) acetato de etilo: cloroformo	
Terpenoides	FM3 (70:30) hexano: acetato de etilo.	AS
	FM4 (97:3) tolueno: acetato de etilo.	
Antioxidantes	FM3 (70:30) hexano: acetato de etilo	DPPH

III.4.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia

El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de los extractos de los residuos de lías fue realizado utilizando un cromatógrafo HPLC Dionex (UltiMate 3000 Standard LC, California, EUA), controlado por el software Chromeleon 6.8, equipado con inyector automático, volumen de loop de 130 µL y detector de arreglo de fotodiodos (Dionex). La detección fue realizada a 254, 320 y 500 nm. El análisis por CLAE fue desarrollado en el Laboratório de Engenharia de Processos/FEA/UNICAMP.

La separación de los compuestos fue realizada usando una columna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 4,6 mm x 2,7 µm) a 50 °C. El flujo de la fase móvil fue 2 mL/min y el volumen de inyección 10 µL. La fase móvil fue compuesta por agua y acetonitrilo (acidificados al 1 % con ácido acético glacial) con gradiente lineal iniciando en 100:0 y llegando a 0:100 en 15 min.

La identificación de los compuestos fenólicos fue realizada por la comparación de los tiempos de retención y de los espectros de absorción, utilizando patrones de

ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, catequina y resveratrol (Sigma Aldrich).

La cuantificación de los compuestos fenólicos fue realizada por el método del patrón externo. Las curvas de calibración fueron construidas por la inyección en triplicado de las soluciones de patrones en cinco concentraciones diferentes, abarcando el intervalo de concentración esperado en las muestras de extracto.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Caracterización de la materia prima

Las distribución del tamaño de partícula de las lías después del proceso de liofilización es mostrado en la **Figura 9**.

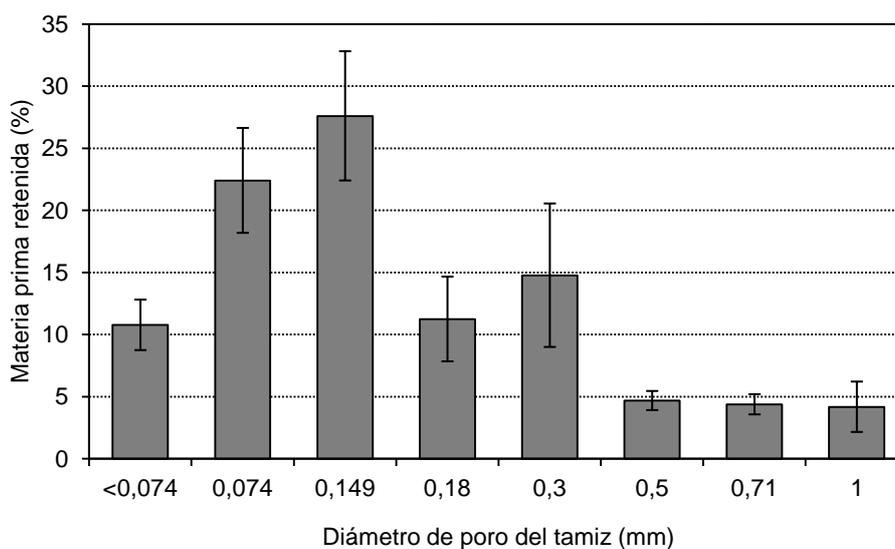


Figura 9 Distribución de las partículas de la materia prima.

El diámetro medio geométrico de las partículas (d_{mg}) de las lías fue calculado en $0,18 \pm 0,02$ mm. El uso de materia prima con tamaño de partícula menor a 0,18 mm es responsable por causar la obstrucción de las tuberías durante el proceso de extracción supercrítica; por ese motivo, se estableció el uso de materia prima con tamaño de partícula entre 0,18 y 1 mm en los experimentos de extracción supercrítica. Así mismo, a fin de permitir la comparación entre los métodos de extracción, materia prima con tamaño de partícula entre 0,18 y 1 mm fue utilizada en los experimentos de extracción convencional. Las informaciones obtenidas de la caracterización físico-química de las lías de pisco son mostradas en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Características físicas y químicas de las lías de pisco.

Diámetro medio geométrico de partículas (d_{mg})	0,44 ± 0,02	mm
Densidad real (d_r)	1631 ± 1	kg/m ³
Densidad aparente (d_a)	366,7	kg/m ³
Porosidad del lecho de extracción (ε)	0,78	-
Humedad	12,3 ± 0,2	%
Lípidos	1,43 ± 0,04	%

IV.2. Métodos de extracción

IV.2.1. Extracción Supercrítica

Los experimentos de extracción supercrítica fueron desarrollados usando 15 g de lías de pisco con tamaño medio geométrico de partícula de 0,44 ± 0,02 mm, la misma que fue usada para formar lecho de extracción cuya porosidad fue calculada en 0,78.

La materia prima, por tratarse de un producto liofilizado, consiste en una aglomeración de pequeñas partículas donde el exceso de presión, aplicado durante la formación del lecho, podría ocasionar la quiebra de estas estructuras. Así, debido que partículas con diámetro menor a 0,18 mm pueden causar la obstrucción de la tubería, el lecho de extracción fue formado cuidadosamente a través de la adición de pequeñas cantidades de materia prima, sin compactación excesiva. Este procedimiento fue adoptado para todas las extracciones realizadas a alta presión. En la **Tabla 3** son presentadas las condiciones experimentales de extracción y en el Anexo 1, los resultados experimentales de las OECs realizadas a 20 y 35 MPa.

Tabla 3 Condiciones experimentales de extracción supercrítica.

Temperatura (°C)	40			
	20		35	
Presión (MPa)				
Repetición	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Caudal de CO ₂ (10 ⁻⁵ kg/s)	11,3 ± 0,1	11,4 ± 0,1	11,3 ± 0,1	8,6 ± 0,5
Caudal del etanol (10 ⁻⁵ kg/s)	1,25	1,26	1,25	0,95
Tiempo de extracción (h)	8	8	8	6
S(CO ₂ +EtOH)/F	275	277	275	156
Rendimiento global (%)	10,73	10,26	7,56	5,73

En la **Figura 10** son ilustradas las OECs obtenidas a 20 MPa y 40 °C. El rendimiento de extracción aumenta con el tiempo; y durante el periodo de extracción estudiado (8 h) no fue posible agotar el lecho de extracción. Este comportamiento puede ser causado por una constante solubilización de compuestos de polaridad semejante a la del cosolvente; evitando que la masa de extracto en la salida cese.

Sin embargo, es posible observar que, aproximadamente, durante las primeras 2 h iniciales de extracción, la velocidad de extracción es superior.

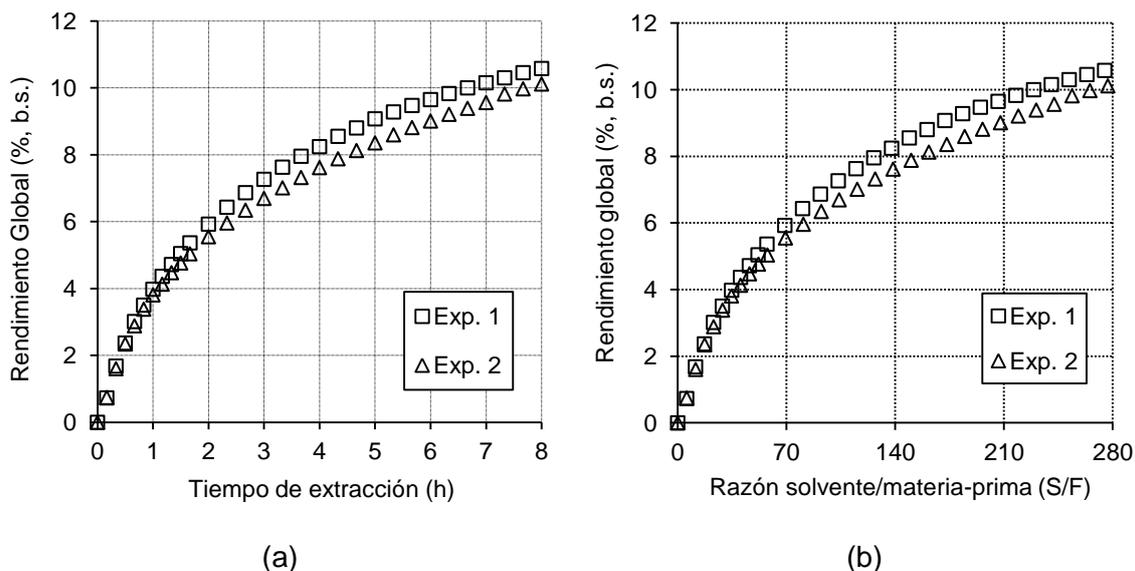


Figura 10 Curva global de SFE de lías de pisco realizada a 40 °C y 20 MPa expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$.

La **Figura 11** corresponde a los experimentos de extracción supercrítica realizados a 40 °C y 35 MPa, donde el efecto del cosolvente durante el proceso de extracción es nuevamente observado. Los experimentos realizados a 35 MPa fueron desarrollados usando caudal de disolvente diferente, conforme la **Tabla 3**. En la **Figura 11a** se observa que la velocidad de extracción disminuye cuando el caudal de disolvente más bajo es utilizado. Así, para el caudal de CO_2 de $(11,3 \pm 0,1) \times 10^{-5}$ kg/s y de etanol de $1,25 \times 10^{-5}$ kg/s, 86 % del extracto total es obtenido a las 6 h de extracción; mientras que para el mismo periodo de extracción y utilizando el caudal de disolvente más bajo, apenas 76 % del extracto total es recuperado.

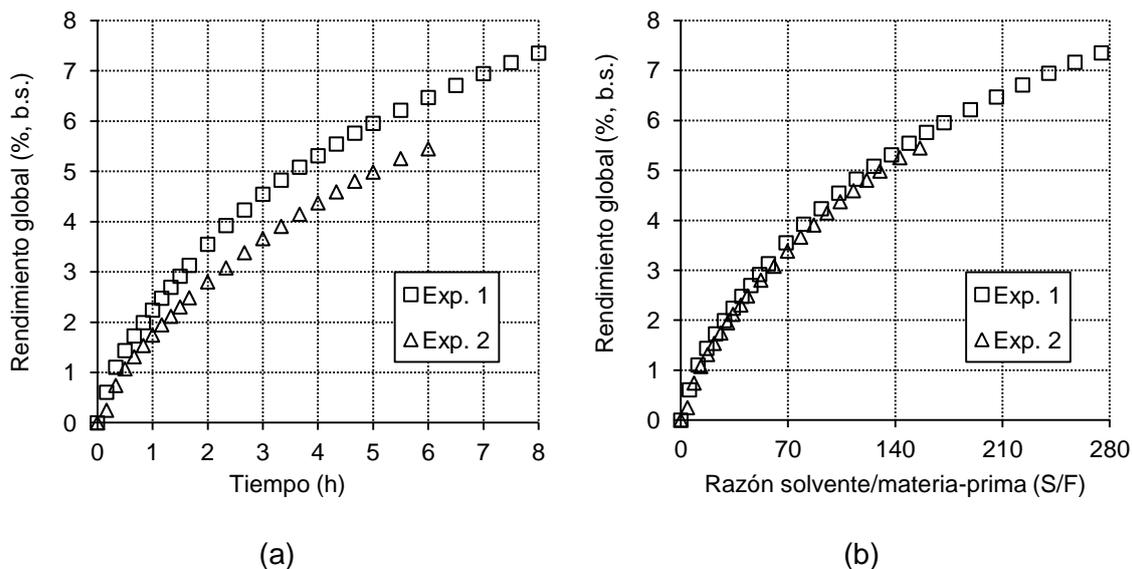


Figura 11 Curva global de SFE de lías de pisco realizada a 40 °C y 35 MPa expresa en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$.

Es posible eliminar el efecto del caudal del disolvente cuando las OECs son expresadas en función de la razón del disolvente y la materia prima, como representando en la **Figura 11b**. Así, como una muestra de la reproductibilidad del experimento, rendimientos de extracción muy cercanos fueron obtenidos para los experimentos 1 y 2 realizados bajo la misma condición de temperatura y presión.

Mediante la comparación de la **Figura 10** y **Figura 11** se concluye que el aumento de la presión de extracción tiene un efecto negativo sobre el rendimiento. La disminución del rendimiento causada por el aumento de la presión se debe a la formación de caminos preferenciales; esto es, que en lugar de, el disolvente atravesar la matriz vegetal de manera homogénea, éste la atraviesa por caminos específicos conocidos como “caminos preferenciales”, solubilizando apenas a aquellos compuestos que se encuentran próximos a él (Farias-Campomanes, Rostagno & Meireles, 2013). La formación de caminos preferenciales es frecuentemente observado en matrices vegetales con alta porosidad, tal como el lecho de extracción formado por las flores de macela (*Achyrocline satureioides*) cuya porosidad fue calculada en 0,72 (Takeuchi, 2009). El rendimiento global de extracción supercrítica del residuo de lías fue superior al rendimiento del residuo de bagazo de uva producido también durante la elaboración del pisco, el cual fue en torno del 5 % para 20 y 35 MPa (Farias-Campomanes, 2012).

En el caso de la extracción supercrítica del residuo de lías de pisco, un gran aumento del tiempo de extracción resultó en un ligero aumento del rendimiento. De

esta manera, para las extracciones realizadas a 35 MPa, las cuales tuvieron duración de 6 y 8 h, los rendimientos de extracción fueron 6,73 % y de 7,56 %, respectivamente.

IV.2.1.1. Parámetros cinéticos

La **Figura 12** presenta el ajuste de la OEC obtenida para el proceso de extracción supercrítica con cosolvente a 20 MPa y 40 °C. Debido a que los experimentos 1 y 2 fueron realizados con el mismo caudal másico, la OEC fue construida usando los promedios de los valores de rendimiento obtenidos para ambas extracciones (Exp. 1 y 2).

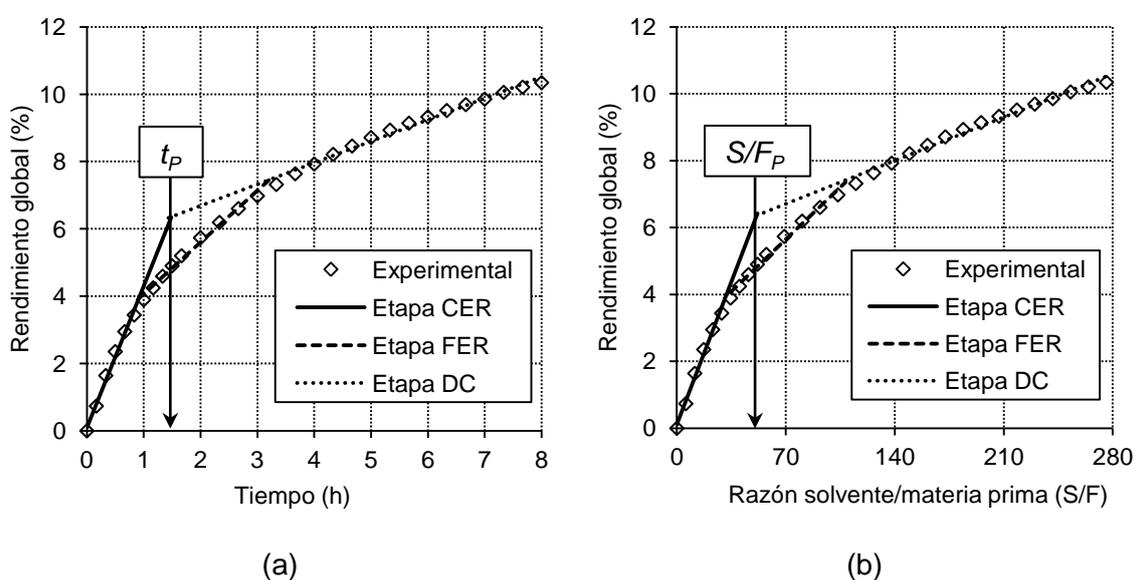


Figura 12 Ajuste de 3 rectas de la OEC obtenida a 20 MPa y 40 °C, expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$.

Las etapas CER y FER finalizan, aproximadamente, 1 y 3 horas después de iniciado el proceso de extracción, y el rendimiento alcanzado en estas etapas fue 4 % y 7,5 % (b.s.), respectivamente (**Figura 12**).

Procesos de extracción prolongados, generalmente, son traducidos como procesos costosos debido que demandan el consumo de grandes cantidades de disolvente, energía, agua, mano de obra, etc. Todos estos factores aumentan el costo de operación y conllevan al aumento del costo de manufactura del producto, en este caso, el extracto. De esta manera, establecer un tiempo de proceso que ofrezca la mejor relación entre el rendimiento de extracción y el costo de manufactura es de gran importancia para el éxito de una empresa. El tiempo del proceso (t_p) en la condición de extracción de 20 MPa y 40 °C fue establecido en 1,5 horas. En el t_p , el rendimiento de

extracción (R_P) fue calculado en 4,8 % (b.s.), equivalente al 46 % de la masa total extraíble en esta condición (**Tabla 4**). Así mismo, la tasa de extracción fue $11,8 \times 10^{-8}$ kg de extracto/s, la misma que es superior a la obtenida en la condición de extracción de mayor presión.

Tabla 4 Parámetros cinéticos obtenidos a través del ajuste de tres rectas de los puntos experimentales obtenidos de la cinética de extracción a 20 MPa y 40 °C para el tiempo de proceso (t_P).

t_P (h)	Q_{CO_2+EtOH} (kg _{CO2+EtOH} /s)	M_P (kg _{ext} /s)	Y_P (kg _{ext} /kg _{CO2+EtOH})	$S_{(CO_2+EtOH)}/F_P$ (kg _{CO2+EtOH} /kg _{MP})	R_P (%, b.s.)
1,5	$12,6 \times 10^{-5}$	$11,8 \times 10^{-8}$	$9,4 \times 10^{-4}$	51	4,8

Para la condición de extracción de 35 MPa y 40 °C, el ajuste de las OECs de los experimentos 1 y 2 fue realizado individualmente, ya que de acuerdo con la **Tabla 3**, el caudal másico de disolvente utilizado en los experimentos fue diferente.

La **Figura 13** muestra el ajuste de la OEC correspondiente al primer experimento (Exp. 1) realizado a 35 MPa, 40 °C y caudal másico total (CO₂+etanol) de $12,5 \times 10^{-5}$ kg/s. Debido que el aumento de la presión afectó negativamente el rendimiento de extracción, el periodo de la etapa CER fue más corto y la tasa de transferencia de masa (M_P), la razón másica de extracto en el disolvente (Y_P) y el rendimiento (R_P) en el t_P fueron menores para 35 MPa (**Tabla 5**).

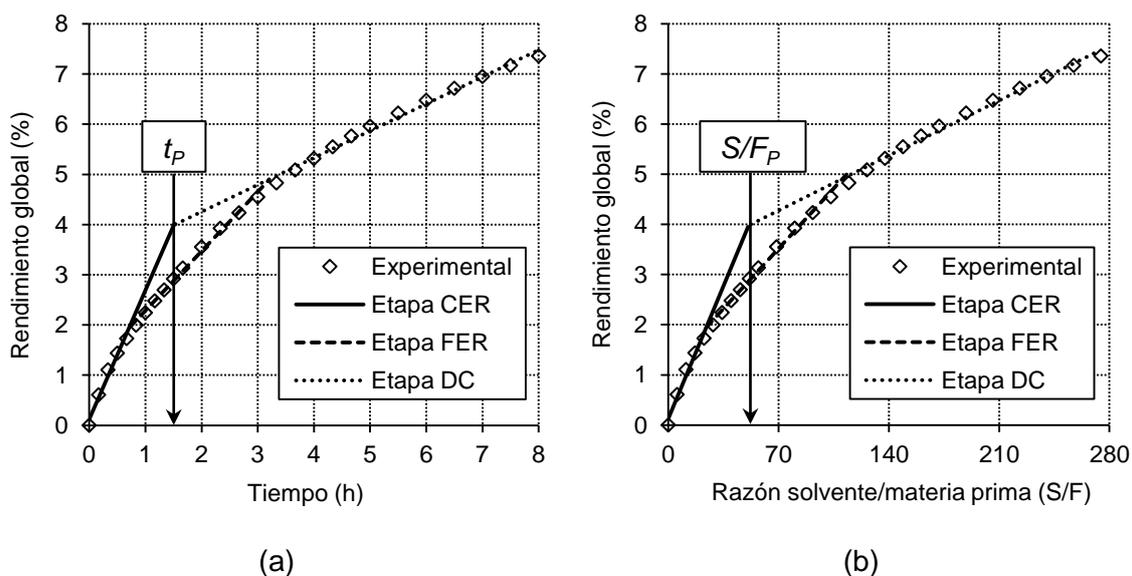


Figura 13 Ajuste de 3 rectas de la OEC correspondiente al Exp. 1, obtenida a 35 MPa y 40 °C; expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$.

Para el t_p estimado de 1,5 h, el rendimiento (R_p) fue 2,9 %, equivalente al 38 % del extracto total (**Tabla 5**). Así mismo, la masa de extracto solubilizada en el disolvente disminuyó en aproximadamente 50 % a la obtenida a 20 MPa, esta disminución de la solubilidad también puede ser resultado del efecto de compactación de la materia prima, causado por el aumento de la presión.

Tabla 5 Parámetros cinéticos para el tiempo de proceso (t_p) obtenidos a través del ajuste de tres rectas de los puntos experimentales obtenidos de la primera cinética de extracción (Exp. 1) a 35 MPa y 40 °C.

t_p (h)	Q_{CO_2+EtOH} (kg_{CO_2+EtOH}/s)	M_P (kg_{ext}/s)	Y_P (kg_{ext}/kg_{CO_2+EtOH})	$S_{(CO_2+EtOH)}/F_P$ (kg_{CO_2+EtOH}/kg_{MP})	R_p (%, b.s.)
1,5	$12,5 \times 10^{-5}$	$7,0 \times 10^{-8}$	$5,6 \times 10^{-4}$	52	2,9

La **Figura 14** presenta el ajuste de la OEC correspondiente al segundo experimento (Exp. 2) realizado a 35 MPa, 40 °C y caudal másico total (CO_2+EtOH) de $9,5 \times 10^{-5}$ kg/s.

Debido que el segundo experimento fue realizado utilizando un caudal más bajo y tiempo de extracción menor, el ajuste de la OEC realizada a 35 MPa varió con relación al primer experimento. El efecto de la disminución del caudal másico de disolvente fue observado en la razón entre el disolvente y la materia prima (S/F), y en la tasa de transferencia de masa (M_P). Un S/F de 40 fue necesario para obtener un rendimiento de 2,3 % (caudal másico bajo) mientras que un S/F de 52 proporcionó un rendimiento de 2,9 % (caudal másico alto). Así mismo, una M_P de $7,0 \times 10^{-8}$ kg_{ext}/s fue obtenida utilizando un caudal de $12,5 \times 10^{-5}$ $kg_{(CO_2+EtOH)}/s$ mientras que el uso del caudal de $9,5 \times 10^{-5}$ $kg_{(CO_2+EtOH)}/s$ permitió una M_P de $5,6 \times 10^{-8}$ $kg_{(extracto)}/s$. El t_p y la razón másica de extracto en la masa fluida permanecieron constantes (**Tabla 6**).

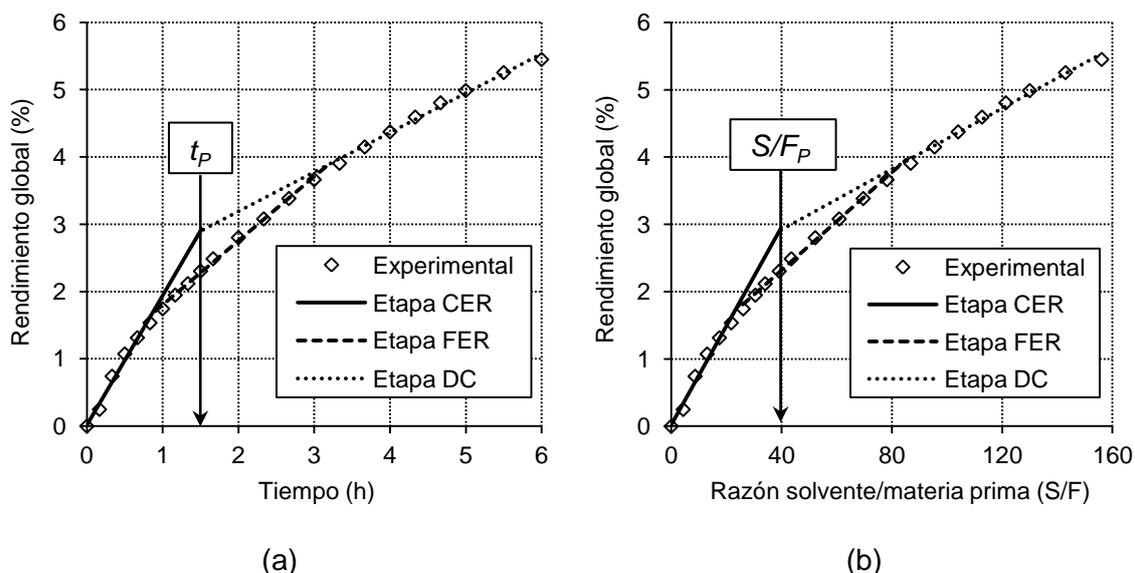


Figura 14 Ajuste de 3 rectas de la OEC correspondiente al Exp. 2, obtenida a 35 MPa y 40 °C; expresada en función (a) del tiempo de extracción y (b) de la razón $S_{(CO_2+EtOH)}/F$.

Tabla 6 Parámetros cinéticos para el tiempo de proceso (t_p) obtenidos a través del ajuste de tres rectas de los puntos experimentales obtenidos de la primera cinética de extracción (Exp. 2) a 35 MPa y 40 °C.

t_p (h)	Q_{CO_2+EtOH} (kg_{CO_2+EtOH}/s)	M_P (kg_{ext}/s)	Y_P (kg_{ext}/kg_{CO_2+EtOH})	$S_{(CO_2+EtOH)}/F_P$ (kg_{CO_2+EtOH}/kg_{MP})	R_P (%, b.s)
1,5	$9,5 \times 10^{-5}$	$5,6 \times 10^{-8}$	$5,8 \times 10^{-4}$	40	2,3

En el Anexo 2 son presentados los informes producidos por el software SAS para el ajuste de las OECs obtenidas a 20 y 35 MPa.

IV.2.2. Extracción Soxhlet

Las condiciones experimentales de la extracción por soxhlet fueron establecidas a partir de experimentos preliminares con otra materia prima con el mismo origen. La extracción soxhlet fue realizada usando una manta de calor en nivel 4,5. Etanol 96 % con caudal másico de $1,02 \times 10^{-4}$ kg/s fue utilizado como disolvente de extracción. Las extracciones fueron realizadas a una razón de S/F de 20 (m/m), durante 3 h. Los experimentos fueron realizados en duplicado. El rendimiento global de extracción fue calculado en $27,6 \pm 0,4$ %, rendimiento muy superior al obtenido

para el bagazo de uva, otro residuo de la industria del pisco, cuyo rendimiento máximo de extracción fue $10,4 \pm 0,5$ % (Farias-Campomanes et al., 2013).

IV.2.3. Extracción en Lecho Agitado

Las extracciones en lecho agitado fueron realizadas a 40 °C, usando etanol 96% como disolvente de extracción a razón S/F de 10, durante 6 h. Muestras de extracto fueron obtenidas cada 30 min.

Fueron tomadas algunas consideraciones durante la preparación de los 12 lechos de extracción. Debido que el tiempo de contacto entre el disolvente y la materia prima influye en el rendimiento de extracción, la preparación de los lechos de extracción fue realizada de manera que el tiempo de preparación entre la primera y la última muestra sea el menor posible.

Otro aspecto considerado de gran importancia pues influye directamente en la eficiencia de la extracción, es la razón S/F. De esta manera, se tuvo especial cuidado en la colocación de la capa de parafilm sobre los erlenmeyers, a fin de evitar su rompimiento o expulsión causados por el aumento de la temperatura y pérdida de disolvente en forma de vapor durante la extracción.

Finalmente, a fin de evitar oscilaciones de la temperatura durante las extracciones, fue considerado necesario un tiempo de acondicionamiento de la incubadora donde los experimentos fueron realizados. Los promedios de los rendimientos de extracción de tres experimentos y sus amplitudes, expresados en función del tiempo son presentados en la **Figura 15**.

El rendimiento global aumenta a lo largo del tiempo de extracción. Así, los rendimientos más altos fueron obtenidos durante las últimas 3 h de extracción. Con el fin de determinar si existe diferencia significativa entre los valores promedios de los rendimientos obtenidos en la cinética de extracción por lecho agitado, fue realizado el test de Tukey. De esta manera, a partir de los resultados arrojados por el test se concluyó que no existe diferencia significativa ($\alpha = 0,05$) entre los rendimientos obtenidos a lo largo de la cinética de extracción. El mayor rendimiento fue $16,8 \pm 0,2$ % (b.s.), obtenido durante 3,5 h de extracción.

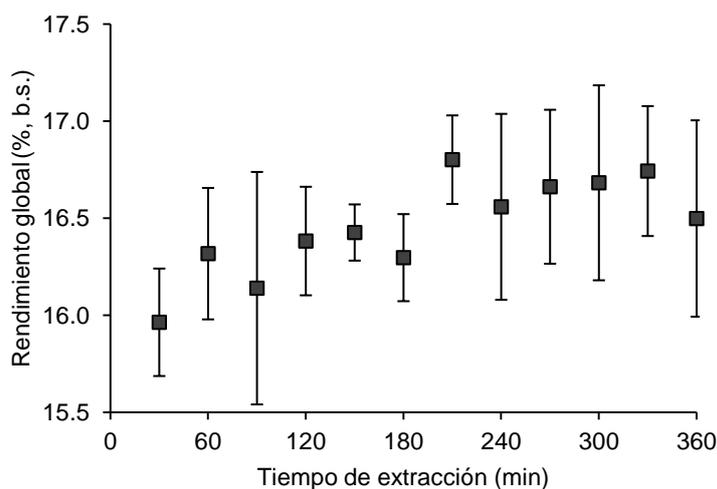


Figura 15 Cinética de extracción en lecho agitado de lías de pisco.

IV.3. Composición química de los extractos

IV.3.1. Cromatografía en capa fina

Por tratarse de un método simple, rápido, con buena resolución y económico, la cromatografía en capa fina (TLC) es una de las técnicas más utilizadas para la separación de componentes de una mezcla.

La dilución de los extractos fue realizada con etanol en una proporción de 15:1 (mg extracto/mL disolvente). Patrones de quercetina y rutina en las concentraciones de 0,30 y 0,23 mg/mL, respectivamente, fueron utilizados para auxiliar en la identificación de los componentes del extracto.

Las fases móviles estudiadas FM1 y FM3 fueron seleccionadas a través de experimentos preliminares (**Tabla 1**). La FM2 fue utilizada apenas para el análisis de los extractos obtenidos por extracción supercrítica.

IV.3.1.1. Extractos obtenidos por extracción supercrítica

Los extractos secos correspondientes a cada punto de las cinéticas de extracción, fueron analizados por TLC, incluyendo los extractos colectados en los frascos de limpieza (L).

Es importante esclarecer que en todos los análisis de TLC, así como en los análisis de CLAE, las soluciones de extracto analizadas corresponden a la muestra de extracto obtenida en cada tiempo de extracción sin acumular.

La **Figura 16** muestra el perfil químico de los extractos de lías de pisco obtenidos a 20 MPa (a) - 35 MPa (b) y 40 °C, eluidos con la fase móvil FM2 y sin la aplicación de revelador. Cuatro bandas de compuestos fueron identificadas. De acuerdo con Wagner y Blad (1996), substancias con por lo menos dos cromóforos, tales como los flavonoides, extinguen la fluorescencia y se presentan como zonas oscuras cuando son visualizados bajo luz UV a 254 nm. En la **Figura 16** es posible observar que los extractos obtenidos a 20 y 35 MPa presentan esta característica.

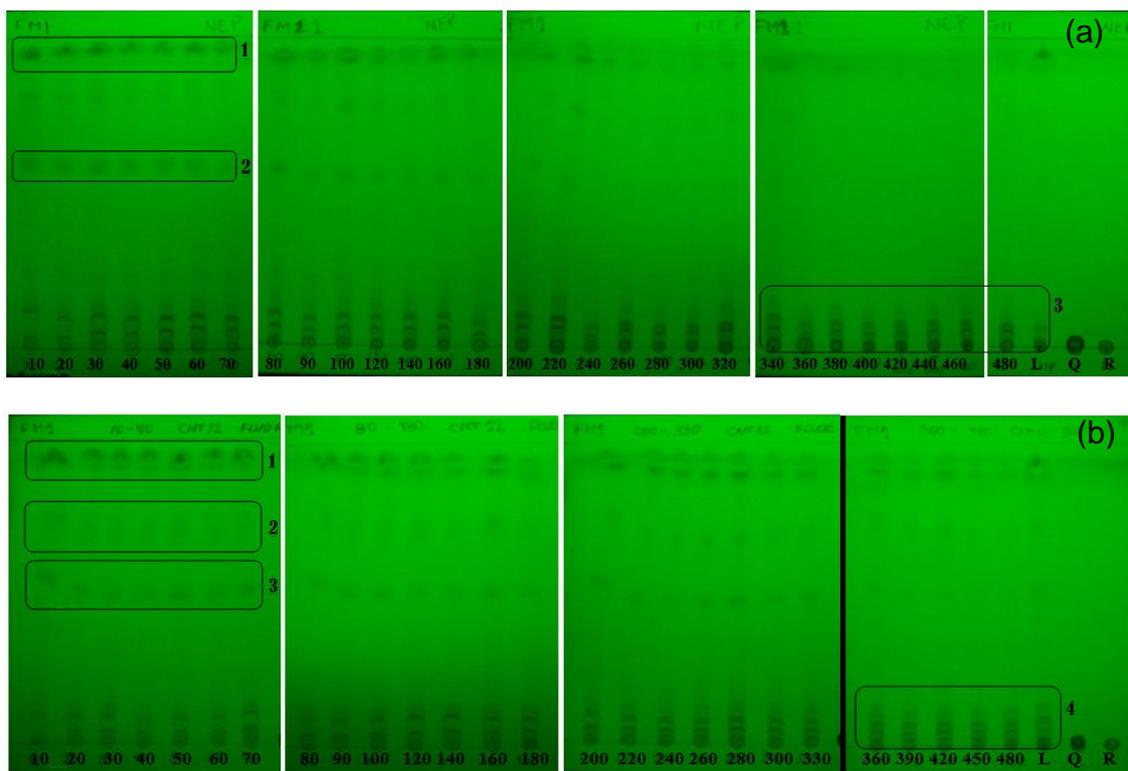


Figura 16 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, sin tratamiento químico, visualizadas en luz ultravioleta a 254nm, utilizando FM2 como eluente.

De acuerdo con su composición, la FM2 puede ser clasificada como una fase móvil de polaridad intermedia ya que está compuesta por acetato de etilo y cloroformo (91:9), los cuales son disolventes de polaridad intermedia y baja, respectivamente. Esta afirmación permite a su vez clasificar los compuestos contenidos en los extractos de acuerdo a su polaridad.

De esta manera, las bandas #3 y 4 de las Figuras 16a y 16b, respectivamente; estarán formadas por compuestos muy polares, tales como los flavonoides quercetina y rutina, los cuales no se desplazaron del punto de aplicación. El desplazamiento de las bandas #2 y #2 y 3 de las Figuras 16a y 16b, respectivamente, indica que hubo solubilización de los compuestos en la fase móvil, por lo tanto, esos compuestos serán

de polaridad intermedia. Por último, los compuestos de la banda #1 serán los menos polares ya que fueron completamente solubilizados y desplazados por la fase móvil estudiada.

Por otro lado, de acuerdo a la intensidad de las bandas, se puede afirmar que los flavonoides no identificados de las bandas #1 y 2 (Figura 16a) y #1 a 3 (Figura 16b) fueron mayormente extraídos durante los primeros 180 min de extracción, mientras que la extracción de los flavonoides agrupados en las bandas #3 y 4 de las Figuras 16a y 16b, respectivamente; aumentó con el tiempo de extracción. Este fenómeno puede ser explicado por un aumento de la disposición de éste grupo de compuestos en la molécula causado, principalmente, por el paso constante de disolvente. Los extractos obtenidos a 20 y 35 MPa presentaron perfil semejante.

Las Figuras 17, 18, 19 y 20 corresponden a las placas que fueron eluidas con la fase móvil FM3. La FM3 compuesta por hexano y acetato de etilo en una proporción de 70:30 (v/v) es considerada una fase móvil de baja polaridad y es recomendada por Wagner y Blad (1996) para la separación de óleos volátiles y compuestos de baja polaridad. Así, debido a las condiciones de extracción, la fase móvil FM3 permitió una mejor separación de los componentes del extracto. La **Figura 17** muestra el perfil químico de los extractos de lías de pisco obtenidos a 20 MPa (a) - 35 MPa (b) y 40 °C, sin aplicación de revelador, y visualizadas en luz visible. Son observadas 5 bandas, tres de color amarillo (#1, 3 y 5) y dos de color marrón (#2 y 4) en menor intensidad. Farias-Campomanes et al. (2013) señalan que estos compuestos no fueron detectados en los extractos de bagazo de uva cuando obtenidos y analizados bajo las mismas condiciones.

Los compuestos de las bandas #1 a 5, observadas en la **Figura 17** no corresponden a la quercetina, rutina ni compuestos fenólicos. Según Wagner y Blad (1996), el color amarillo observado bajo luz visible indicaría la presencia de carotenoides, los cuales fueron identificados en la uva por Kamffer (2009). Sin embargo, para confirmar la presencia de carotenoides en los extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica, es necesario un análisis más preciso. Mayor intensidad de las bandas de color amarillo fue observada en los extractos obtenidos a 35 MPa y 40 °C.

La **Figura 18** muestra el perfil químico de los extractos de lías de pisco obtenidos a 20 MPa (a) - 35 MPa (b) y 40 °C, sin aplicación de revelador, y visualizadas en luz ultravioleta de longitud de onda de 366 nm.

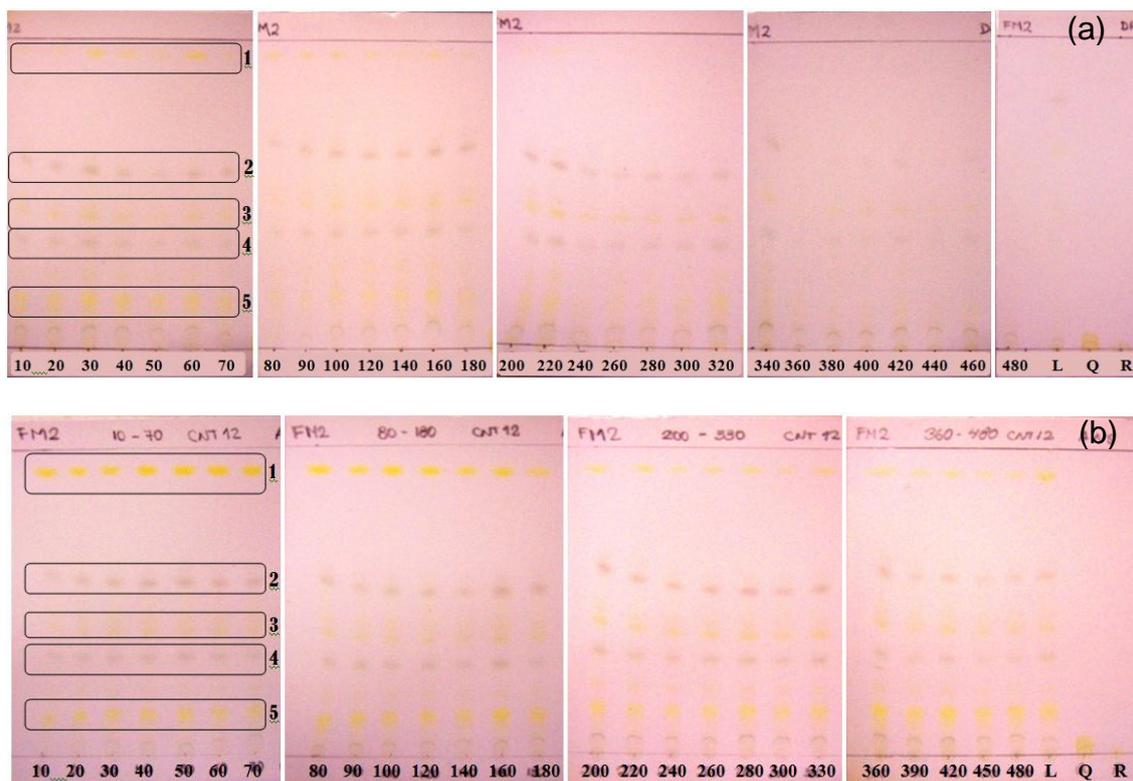


Figura 17 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, sin tratamiento químico, visualizadas en luz visible, utilizando FM3 como eluyente.

Doce bandas fueron observadas, 5 más que las observadas para los extractos de bagazo de uva obtenidos por extracción supercrítica bajo las mismas condiciones de extracción y análisis por TLC (Farias-Campomanes, 2012). De acuerdo con Wagner y Blad (1996) los flavonoides se caracterizan por presentar fluorescencia cuando son expuestos a la luz ultravioleta de longitud de onda de 365 nm; siendo predominantemente rojo-anaranjado para los flavonoides glucosidados. Los ácidos carboxílicos fenólicos aparecen como azul mientras que las cumarinas simples se presentan como azul-verdeado (Wagner & Blad, 1996). Bandas con esas características fueron observadas indicando la presencia de flavonoides, ácidos carboxílicos fenólicos y cumarinas en todos los extractos obtenidos a lo largo de la cinética de extracción. Así mismo, de acuerdo a la intensidad de las bandas observadas en la **Figura 18**, es posible afirmar que el compuesto de la banda #2 fue extraído, principalmente, al inicio del proceso, los compuestos de las bandas #4 a 8 fueron extraídos de manera constante, mientras que los compuestos de las bandas #1, 3 y 9 a 12 fueron extraídos predominantemente al final de la extracción (a partir del minuto 200).

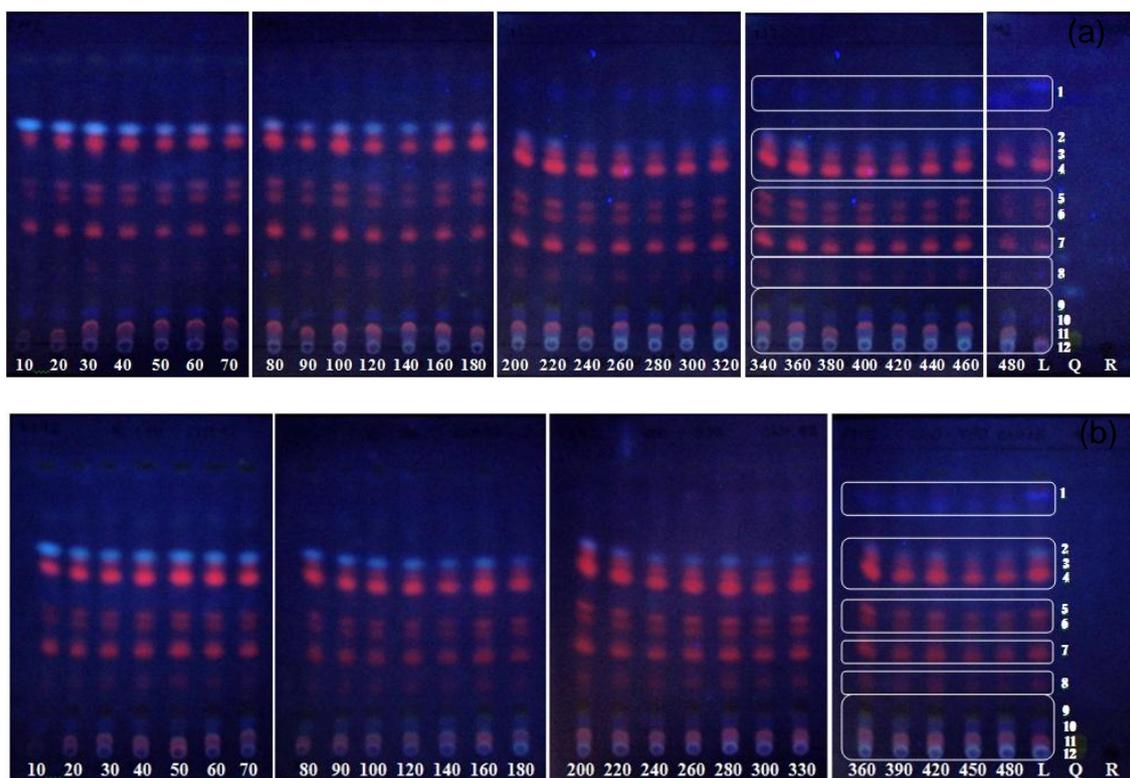


Figura 18 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, sin tratamiento químico, visualizados en luz ultravioleta a 366nm, utilizando FM3 como eluente.

La **Figura 19** muestra las bandas de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos de lías de pisco obtenidos a 20 MPa (a) - 35 MPa (b) y 40 °C, después de la aplicación de revelador DPPH, y visualizadas en luz visible. El DPPH es un radical estable que en contacto con una sustancia antioxidante donadora de hidrógeno puede ser reducido, ocurriendo una mudanza de color violeta (característico del radical) a amarillo mientras sucede la reacción. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración del compuesto con actividad antioxidante (Hirata, 2004). Mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante fue observada a partir los primeros 80 min de extracción. La **Figura 20** muestra las bandas de los compuestos presentes en los extractos, que reaccionaron con el revelador universal anisaldehído sulfúrico (AS). El revelador AS es principalmente utilizado para la detección de óleos volátiles, pero también detecta terpenoides y saponinas. Compuestos de óleo volátil presentan coloración azul oscuro, verde, rojo y marrón (Wagner & Blad, 1996).

En los extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a 20 MPa y 40°C fueron identificadas bandas de color verde, marrón, azul oscuro y rojo.

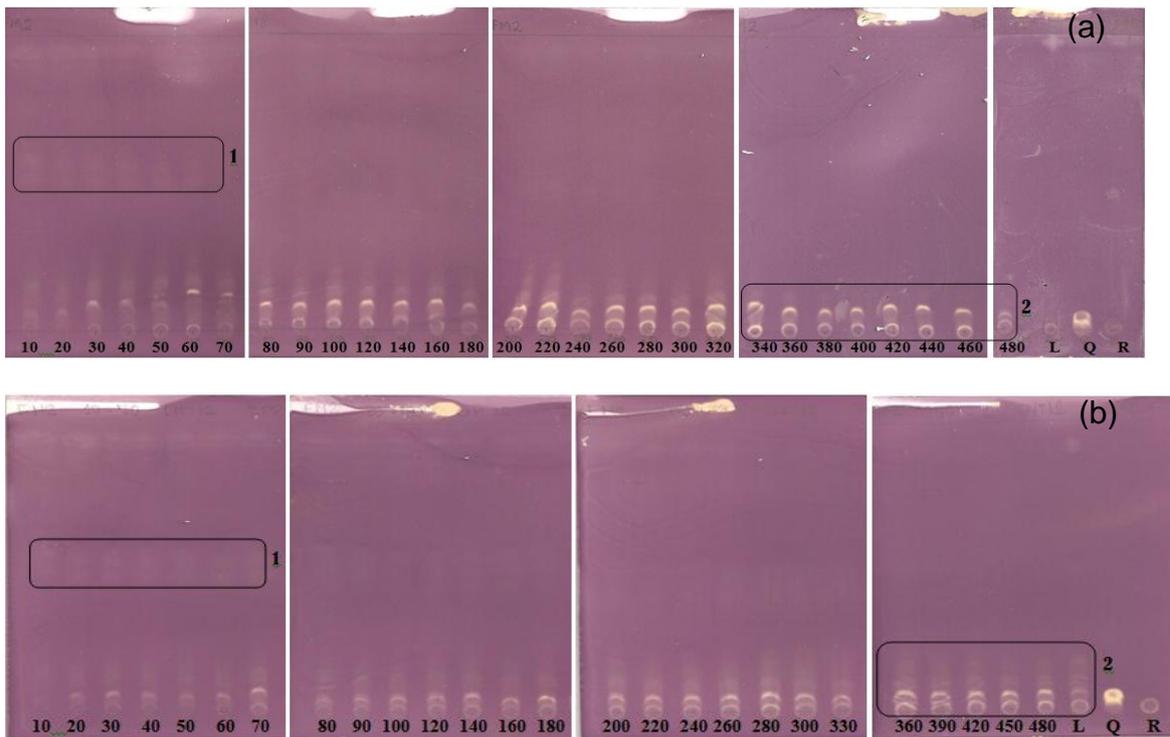


Figura 19 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, con tratamiento químico DPPH, visualizadas en luz visible, utilizando FM3 como eluente.

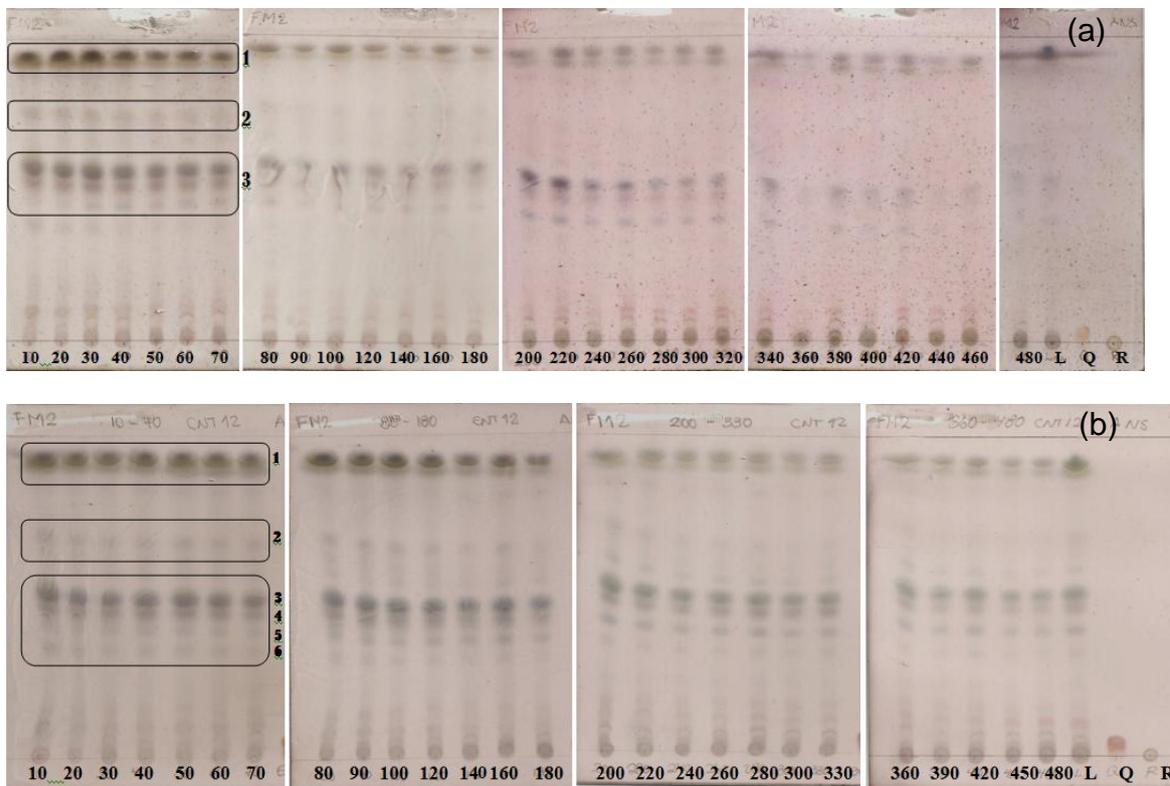


Figura 20 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica a (a) 20 MPa (b) 35 MPa y 40 °C, con tratamiento químico AS, visualizadas en luz visible, utilizando FM3 como eluente.

IV.3.1.2. Extractos obtenidos por extracción soxhlet

a. Experimentos preliminares

Fueron desarrollados experimentos preliminares con el objetivo de determinar la influencia del tiempo de extracción en la composición de los extractos y seleccionar las fases móviles que permitan la mejor separación de los componentes de los extractos.

Extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet fueron colectados a 120 y 180 min de extracción. Los análisis para la selección de las fases móviles fueron realizados utilizando los extractos obtenidos en los experimentos preliminares. Las fases móviles FM1, FM3 y FM4 de polaridad decreciente y cuya composición fue detallada en el Capítulo 3 fueron estudiadas en la separación de los extractos obtenidos vía soxhlet.

Los extractos en los cuales se utilizó como eluyente la fase móvil FM1 y FM3, fueron solubilizados en etanol, y en tolueno aquellos que utilizaron FM4 como eluyente. La proporción de extracto y disolvente de 15:1 (m/v) fue mantenida constante.

En la **Figura 21** se aprecia el efecto del tiempo de extracción (120 y 180 min) sobre la composición del extracto, así como la eficiencia de separación de las fases móviles en cada caso. Dentro del intervalo de tiempo estudiado, el aumento del tiempo de extracción no tuvo efecto en la composición de los extractos; sin embargo, el rendimiento de extracción fue influenciado positivamente. De esta manera, el tiempo de extracción soxhlet fue establecido en 180 min.

La fase móvil FM1 es recomendada para la separación de flavonoides, antocianinas y terpenoides, mientras que FM3 y FM4 son indicadas para la separación de óleos volátiles y demás compuestos poco polares (Wagner & Blad, 1996). Se observó que conforme disminuyó la polaridad del eluyente, se redujo el desplazamiento de los componentes del extracto a través de la placa; este comportamiento indicó que los extractos en estudio poseen polaridad intermedia. De esta manera, fueron seleccionadas la FM3 ya que permitió una mejor separación de los componentes del extracto, y la FM1 para el análisis de flavonoides en experimentos posteriores.

En la **Figura 21b** son distinguidos 7 compuestos presentes en los extractos de lías de pisco obtenidos vía extracción soxhlet. Por otro lado, de acuerdo a la intensidad de las bandas se concluye que la concentración de los extractos utilizados en los experimentos preliminares era baja. Por lo tanto, se determinó el uso de mayor cantidad de muestra en los análisis por TLC.

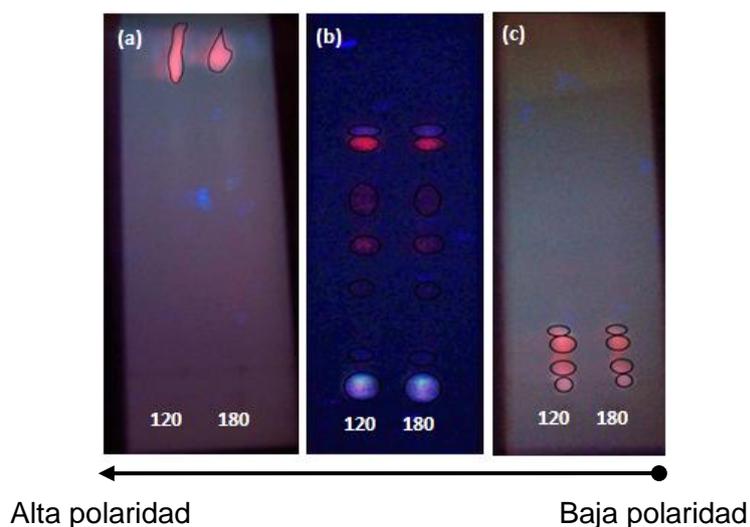


Figura 21 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet y colectados a 120 y 180 min de extracción. Placas eluidas con (a) FM1 (b) FM3 y (c) FM4, sin tratamiento químico y visualizadas en luz ultravioleta a 366 nm.

b. Experimentos de extracción

A fin de establecer la presencia de algunos ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos, fueron utilizados patrones de ácido gálico (G), quercetina (Q) y rutina (R) en los análisis. Así mismo, para garantizar un desplazamiento semejante, metanol fue el disolvente utilizado para la solubilización de los extractos. Con el objetivo de mejorar la resolución de las placas, se decidió aumentar el volumen de muestra depositado en la placa en lugar de aumentar la proporción extracto y disolvente (15:1, m/v).

Se confirma la ausencia de rutina en los extractos de los residuos de lías; sin embargo, no es posible determinar la presencia o ausencia del ácido gálico (**Figura 22**). Después de la aplicación del revelador NP para flavonoides, la rutina y quercetina reaccionaron emitiendo color amarillo (**Figura 22c**). Se sugiere la presencia de quercetina en los extractos de lías de pisco (Bo) obtenidos vía soxhlet debido que mostraron una banda con la altura y color de la quercetina. Así mismo, se observan bandas de color violeta, que indicaría la presencia de antocianinas (Wagner & Blad 1996).

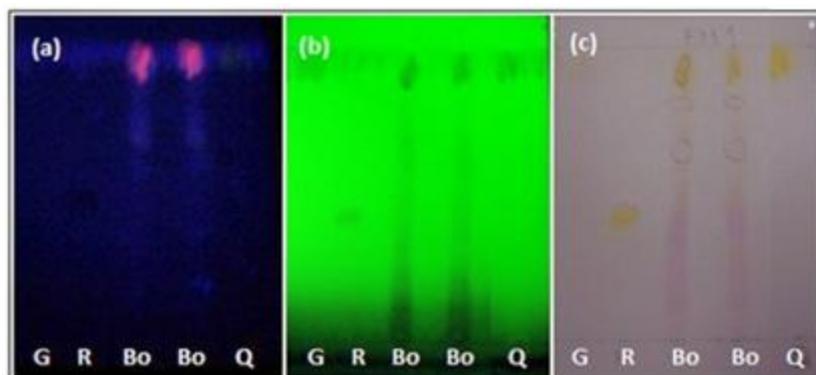


Figura 22 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet y colectados a 180 min de extracción; eluídas con FM1, con tratamiento químico NP y visualizadas en (a) luz ultravioleta a 366 nm, (b) luz ultravioleta a 254 nm y (c) luz visible.

La Figura 23 muestra las placas eluídas con FM3. Los resultados sugieren la presencia de ácidos carboxílicos y flavonoides glucosidados, los cuales presentan color azul y rojo-anaranjado cuando son visualizados en luz ultravioleta a 366 nm (Figura 23a).

Se sugiere la presencia de quercetina en los extractos (Figura 23c). No fue posible determinar la presencia o ausencia de rutina y ácido gálico por TLC.

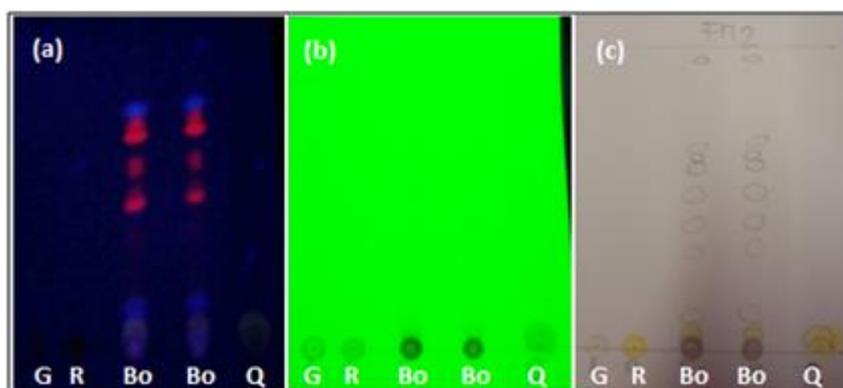


Figura 23 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción soxhlet y colectados a 180 min de extracción; eluídas con FM3, con tratamiento químico NP y visualizadas en (a) luz ultravioleta a 366 nm, (b) luz ultravioleta a 254 nm y (c) luz visible.

IV.3.1.3. Extractos obtenidos por extracción en lecho agitado

A fin de determinar la influencia del tiempo de extracción en la composición de los extractos obtenidos vía extracción en lecho agitado, fueron analizados los extractos colectados en algunos puntos de la cinética de extracción. Los extractos fueron solubilizados en metanol, en una proporción de extracto y disolvente de 15:1 (m/v). Los patrones de quercetina (Q) y rutina (R) fueron utilizados como referencia. Las fases móviles FM1 y FM3 fueron utilizadas como eluentes. Las soluciones de extracto,

obtenidos en la cinética de extracción, fueron enumerados con el objetivo de facilitar el análisis (**Tabla 7**).

Tabla 7 Soluciones de muestras de extracto de lías de pisco obtenidas vía extracción en lecho agitado utilizadas en los análisis por TLC.

Extractos obtenidos en la cinética de extracción en lecho agitado						
Numeración	1	2	3	4	5	6
Tiempo de extracción (min)	30	30	150	210	270	330

A través del análisis por TLC se sugiere la ausencia de rutina y la presencia de quercetina y otros flavonoides en los extractos (**Figura 24a**). Así mismo las bandas de color azul, azul brillante y rojo-anaranjado, visualizadas en la **Figura 24b**, sugieren la presencia de flavonoides glucosidados y ácidos carboxílicos fenólicos (Wagner & Blad, 1996). Por otro lado, se observa que el tiempo de extracción no tuvo influencia en la composición de los extractos pues las bandas mostraron la misma intensidad a lo largo de la cinética.

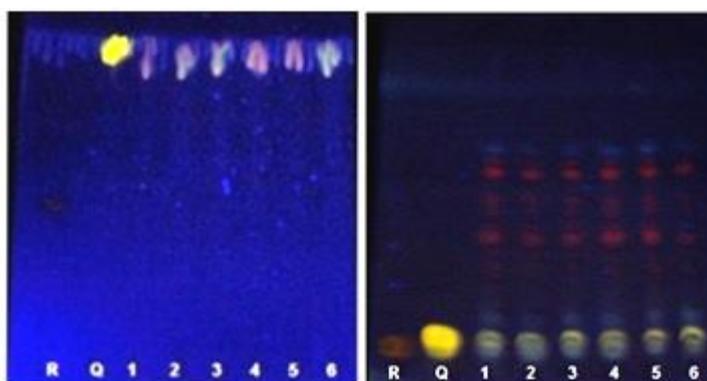


Figura 24 Placas de sílica gel con extractos de lías de pisco obtenidos por extracción en lecho agitado, colectados durante la cinética de extracción, eluidas con (a) FM1 y (b) FM3, sin tratamiento químico, y visualizadas en luz ultravioleta a 366 nm.

En conclusión, el análisis por TLC sugiere que los extractos de lías de pisco obtenidos por los tres métodos de extracción presentan una gran variedad de compuestos fenólicos y flavonoides. Rutina no fue detectada en ningún extracto mientras que el flavonoide quercetina fue hallado en mayor intensidad en los extractos obtenidos vía extracción soxhlet y lecho agitado.

IV.3.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia

Varios métodos de análisis por CLAE de compuestos fenólicos están disponibles en la literatura. Rostagno et al. (2011) identificaron y cuantificaron 19 compuestos fenólicos (ácidos y flavonoides) de diferentes materia primas. En este trabajo, la composición de los extractos obtenidos por extracción supercrítica, soxhlet y lecho agitado fue determinada por el método sugerido por Rostagno et al. (2011). Patrones de los compuestos fenólicos: ácidos fenólicos (ácido gálico, protocateico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico, *p*-cumárico y ferúlico), flavonoides (quercetina y catequina), y estilbeno (resveratrol) fueron utilizados en el análisis por CLAE de los extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica, soxhlet y lecho agitado. En la **Tabla 8** son presentados los tiempos de retención (t_R) y longitud de onda en la que fueron realizadas las lecturas.

Tabla 8 Compuestos fenólicos analizados en los extractos de lías de pisco.

Compuestos fenólicos	t_R (min)	λ_{max} (nm)
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Ácido gálico	1,67	254
Ácido protocateico	2,37	254
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,95	254
Ácido siríngico	3,44	280
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,84	320
Ácido ferúlico	4,18	320
<i>Flavonoides</i>		
Quercetina	5,73	254
Catequina	8,52	280
<i>Estilbeno</i>		
Resveratrol	5,20	305

La cuantificación de los compuestos fenólicos fue realizada a través de curvas de calibración (Anexo 3).

De acuerdo a la literatura, con frecuencia el ácido vanílico ha sido identificado como uno de los compuestos fenólicos mayoritarios en los extractos de uva (Oliveira, 2010; Shi, Yu, Pohorly & Kakuda, 2003). De esta manera, a fin de determinar la presencia y concentración del ácido vanílico en los extractos de lías, teniendo en cuenta la ausencia del patrón, el ácido vanílico fue identificado en los extractos de lías

de pisco a partir del orden de elución y espectro UV obtenido del análisis por CLAE. La concentración del ácido vanílico fue expresada en equivalentes de ácido gálico (GAE). Así mismo, en los extractos de lías fueron detectados compuestos con espectro UV muy semejante al de los compuestos fenólicos: ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y quercetina; más con tiempo de retención diferente. Estos compuestos fueron identificados como derivados del compuesto de espectro UV semejante; y sus concentraciones fueron expresadas en equivalentes del compuesto fenólico en cuestión.

IV.3.2.1. Extractos obtenidos por extracción supercrítica

Los extractos colectados a lo largo de las OECs, sin acumular, fueron analizados por CLAE. Los extractos de lías fueron obtenidos utilizando caudal másico diferente: $12,6 \times 10^{-5} \text{ kg}_{\text{CO}_2+\text{EtOH}}/\text{s}$ y $9,5 \times 10^{-5} \text{ kg}_{\text{CO}_2+\text{EtOH}}/\text{s}$ para 20 y 35 MPa, respectivamente. Por ese motivo, para facilitar la comparación de las condiciones de extracción, la concentración de los compuestos fenólicos en los extractos y su grado de extracción fueron expresados en función de la razón S/F. Los compuestos fenólicos son caracterizados por la presencia de uno o más grupos hidroxilo ligados a un átomo de carbono de un anillo aromático. Su estructura polar (grupo hidroxilo) y apolar (anillo aromático), así como la disposición espacial de los grupo hidroxilo en la molécula, determinan su solubilidad. Los compuestos fenólicos son solubles en una gran variedad de disolventes polares (agua, etanol, metanol) y apolares (cloroformo, acetona, etc).

Por otro lado, a temperatura constante, el aumento de la presión implica un aumento en la densidad del disolvente, y la densidad del disolvente está directamente asociada con el poder de solvatación (Brunner, 2005). De esta manera, el aumento de la presión favorece la solubilización de una gran variedad de compuestos en el disolvente. Estudios demostraron que el uso de presiones elevadas puede ser desfavorable en algunos casos, debido que la variedad de componentes en el extracto implica una pérdida de la selectividad de la extracción (Reverchon & Marrone, 1997).

El ácido gálico y el ácido protocateico tienen en su estructura molecular cuatro y tres grupos hidroxilo, respectivamente; los cuales están distribuidos armoniosamente en un anillo aromático (**Figura 25**). A su vez, la estructura molecular del flavonoide quercetina presenta cinco grupos hidroxilo distribuidos en tres anillos aromáticos. Por lo expuesto, la solubilización de éstos compuestos en el disolvente, el cual es principalmente compuesto por dióxido de carbono (90%), fue tan reducida que no

permitió observar la influencia del aumento de la densidad del disolvente. Así la concentración del ácido gálico, ácido protocateico, quercetina y su derivado en los extractos de lías de pisco fue aproximadamente igual en los extractos obtenidos a 20 y 35 MPa (Figuras 26a, 27a, 28a y 29a).

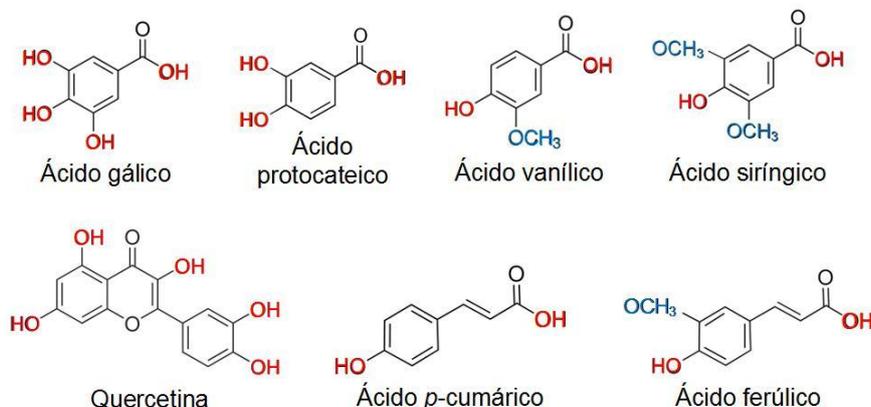


Figura 25 Estructura química de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos de lías obtenidos por extracción supercrítica.

El grado de extracción expresa la masa de un compuesto fenólico que se obtiene de la materia prima. El grado de extracción fue calculado a través de la multiplicación de la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto y el rendimiento global de extracción obtenido a lo largo de las OECs. Mayor grado de extracción fue alcanzado a 20 MPa para este grupo de fenólicos (Figuras 26b, 27b, 28b y 29b).

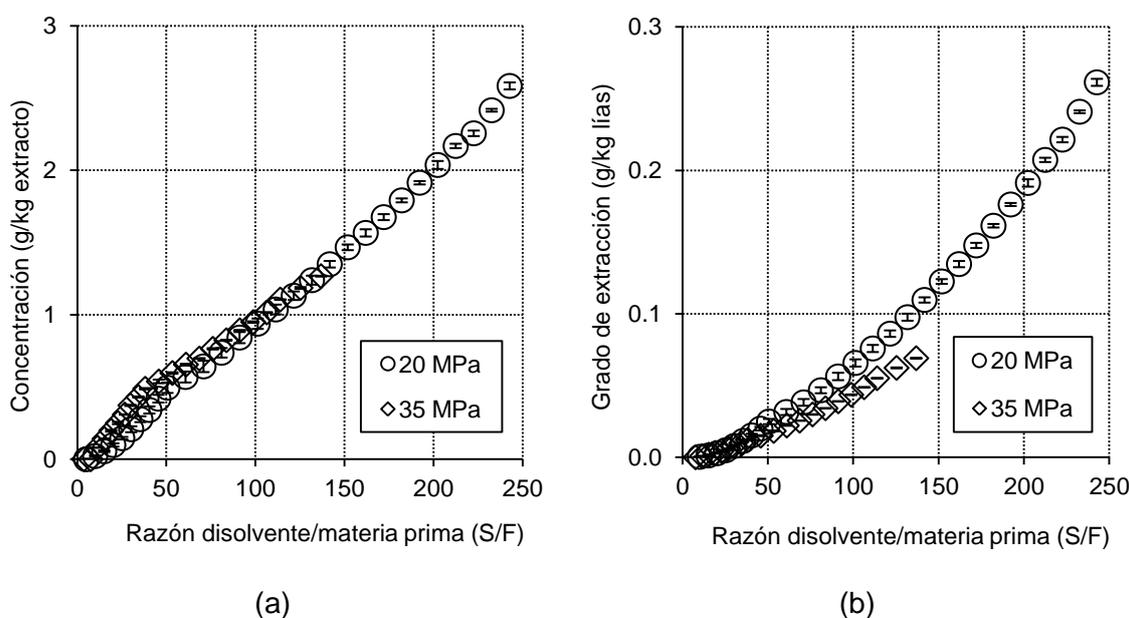
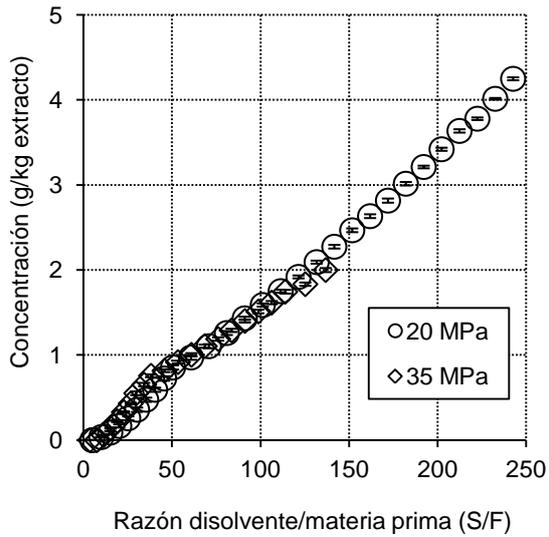
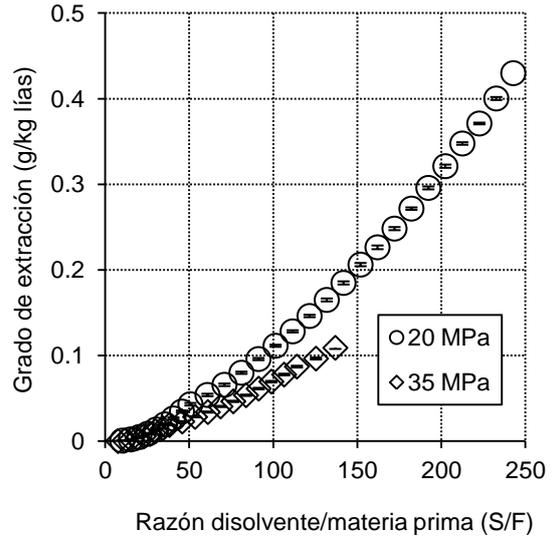


Figura 26 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido gálico, expresados en función de la razón S/F.

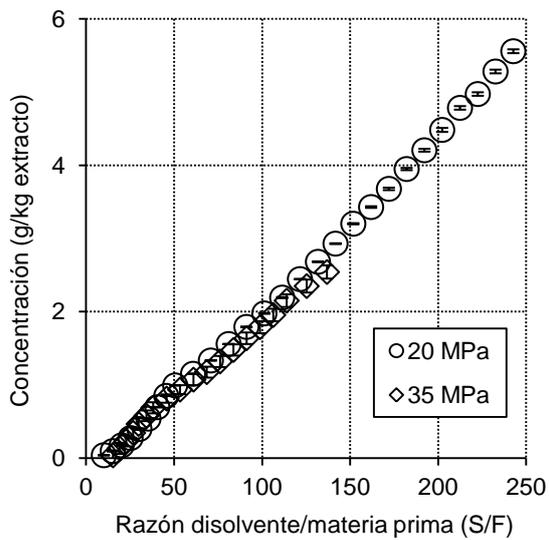


(a)

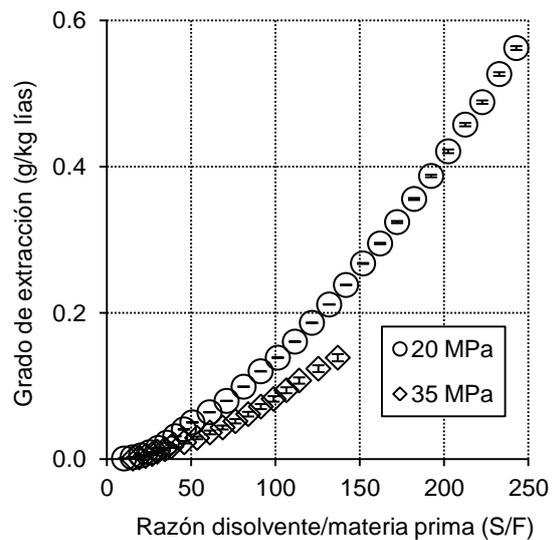


(b)

Figura 27 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido protocateico, expresados en función de la razón S/F.



(a)



(b)

Figura 28 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) de quercetina, expresados en función de la razón S/F.

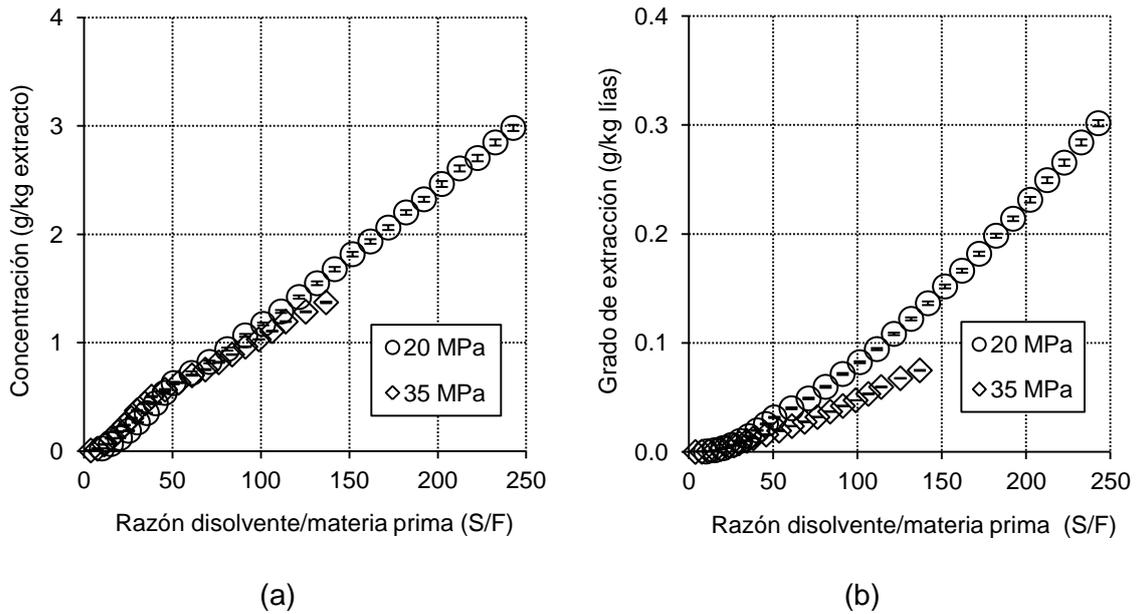
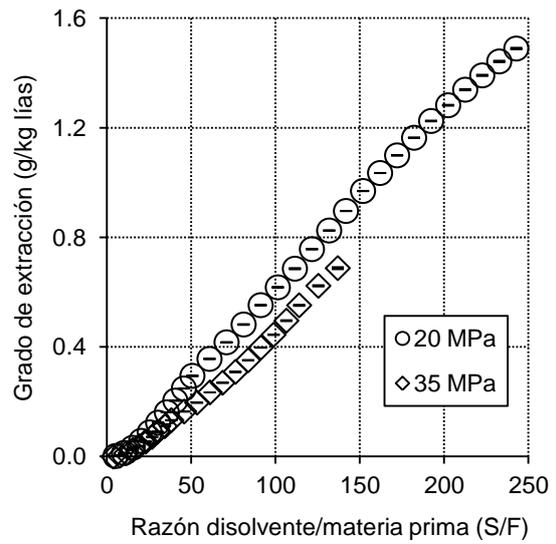
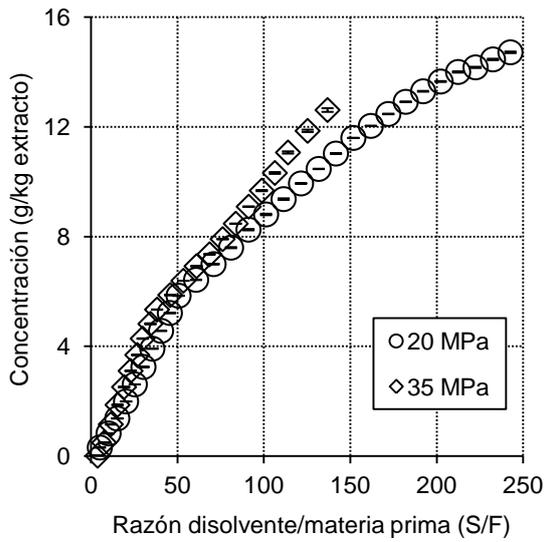


Figura 29 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado de quercetina, expresados en función de la razón S/F.

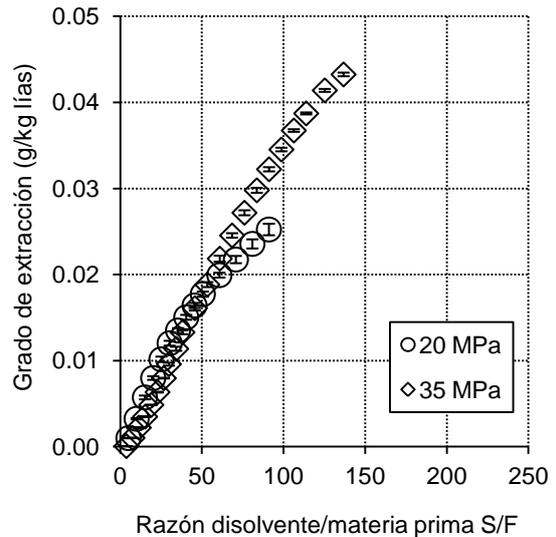
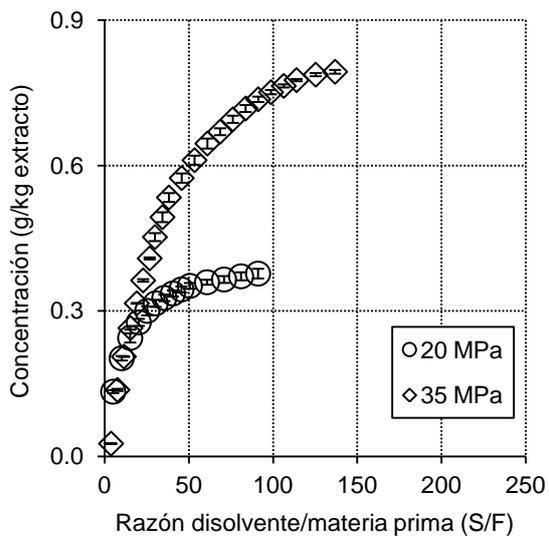
Debido al número y disposición de los grupos hidroxilo en la estructura molecular de los compuestos derivados de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico (**Figura 25**), éstos mostraron mayor solubilización que el ácido gálico, ácido protocateico, quercetina y su derivado. Además, su solubilidad en el disolvente fue favorecida por el aumento de la presión (**Figura 30a**). De esta manera, a pesar del bajo rendimiento global de extracción obtenido a 35 MPa, el grado de extracción de los fenólicos derivados del ácido ferúlico y *p*-cumárico fue semejante para ambas presiones (Figuras 30b, 31b, 32b).



(a)

(b)

Figura 30 – Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado I del ácido ferúlico, expresados en función de la razón S/F.



(a)

(b)

Figura 31 – Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado II de ácido ferúlico, expresados en función de la razón S/F.

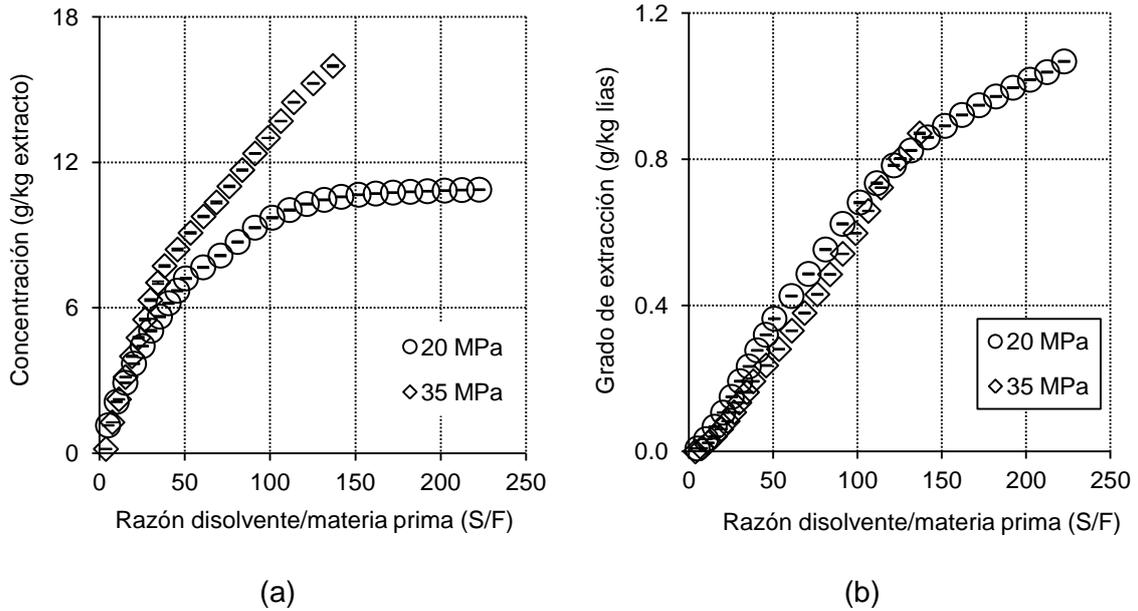
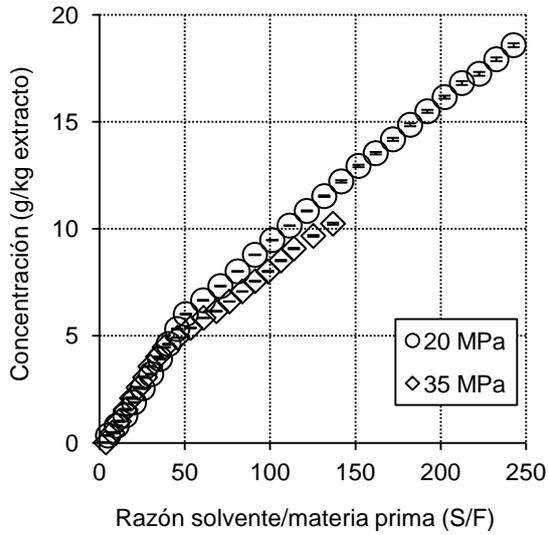


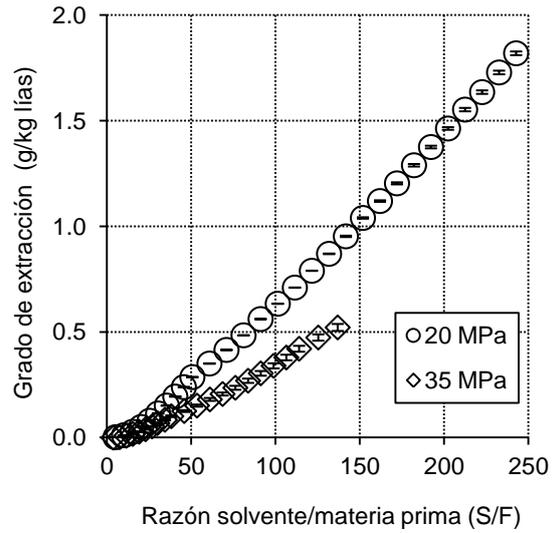
Figura 32 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del derivado de ácido *p*-cumárico, expresados en función de la razón S/F.

De acuerdo con la **Figura 25**, el ácido vanílico y siríngico son compuestos fenólicos menos polares y más solubles en dióxido de carbono y etanol que los ácidos: gálico y protocateico. Mayor concentración del ácido vanílico y ácido siríngico fue calculada para los extractos obtenidos a 20 MPa (Figuras 33 y 34)

Se cree que la mayor concentración el ácido vanílico y siríngico en los extractos puede estar relacionada con la localización de los mismos en las células de la materia prima. Así, el uso de la presión más baja de extracción (20 MPa), en la cual la densidad del disolvente es menor que a 35 MPa, favoreció la difusión del mismo al interior de las moléculas. También, cabe resaltar que el efecto de compresión que mostró el aumento de la presión sobre la matriz vegetal al interior de la celda de extracción, pudo haber participado dificultando la entrada del disolvente al interior de las moléculas de la materia prima. Mayor grado de extracción fue alcanzado a 20 MPa.

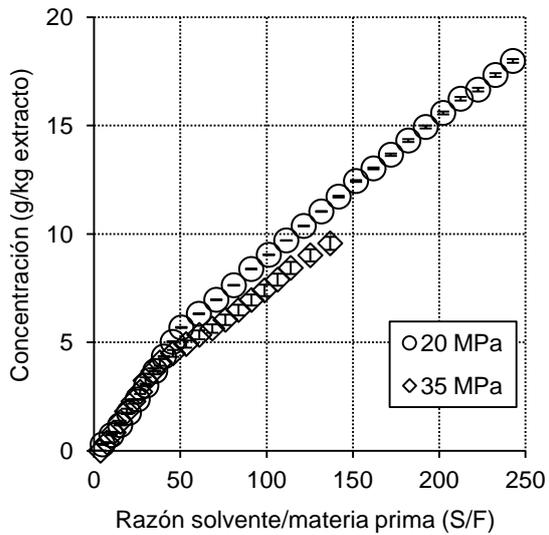


(a)

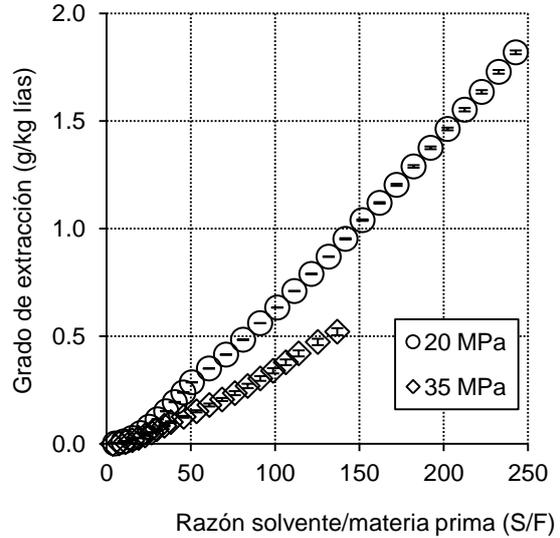


(b)

Figura 33 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido vanílico, expresados en función de la razón S/F.



(a)



(b)

Figura 34 Concentración en el extracto (a) y grado de extracción (b) del ácido síringico, expresados en función de la razón S/F.

La solubilidad de una mezcla de compuestos (ejemplo: compuestos de un alimento) en un medio (disolvente) no sigue el mismo comportamiento que un compuesto puro, pues existen factores que pueden interactuar facilitando o dificultando la solubilidad del mismo. Sin embargo, estudios de solubilidad de compuestos puros permiten entender el comportamiento de dicho compuesto frente a los cambios de presión y temperatura de determinado disolvente.

La solubilidad de los compuestos fenólicos en CO₂ supercrítico puro o en presencia de un modificador, ha sido ampliamente estudiada. Estudios han demostrado que el uso de modificadores como agua, metanol y etanol, favorecen a la eficiencia de extracción, aumentando la solubilidad de los compuestos fenólicos (Murga, Sanz, Beltrán & Cabezas, 2003).

De forma general, después de la presión de inversión (aproximadamente 15 MPa), la solubilidad de los ácidos fenólicos: ácido protocateico, vanílico, siríngico, ferúlico y *p*-cumárico, aumenta con el aumento de la presión y temperatura de extracción (Choi, Noh & Yoo, 1998; Murga, Sanz, Beltran & Cabezas, 2004; Murga et al., 2003; Sovová, 2001; Yang, Wei, Huang & Lee, 2013). Así mismo, Murga et al. (2003) explican que la presencia de un grupo hidroxilo (OH⁻) generalmente resulta en la disminución de la solubilidad y que una esterificación, es decir, la presencia de uno o más grupos metoxilo (COH₃) aumenta la solubilidad de la molécula en dióxido de carbono supercrítico. Así, bajo las mismas condiciones de presión y temperatura del dióxido de carbono supercrítico, se determinó que el ácido ferúlico es más soluble que el *p*-cumárico y que el ácido siríngico es más soluble que el ácido vanílico (Murga et al., 2004; Murga et al., 2003).

Los ácidos fenólicos mayoritarios en los extractos de lías obtenidos por extracción supercrítica son: el ácido vanílico, ácido siríngico, derivado I del ácido ferúlico y derivado de ácido *p*-cumárico (**Tabla 9**). Los extractos obtenidos a 20 y 35 MPa presentaron una concentración total de compuestos fenólicos de 77, 93 ± 0,33 g/kg y 56,39 ± 0,58 g/kg, respectivamente.

Tabla 9 Concentración total (g/kg extracto) de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos por extracción supercrítica.

Compuestos fenólicos	t _R (min)	20 MPa	35 MPa
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido gálico	1,67	2,58 ± 0,02	1,267 ± 0,003
Ácido protocatecuico	2,37	4,25 ± 0,02	2,00 ± 0,02
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,95	n.d.	n.d.
Ácido vanílico	3,27	18,6 ± 0,1	10,3 ± 0,1
Ácido siríngico	3,44	18,0 ± 0,1	9,6 ± 0,3
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,84	n.d.	n.d.
Ácido ferúlico	4,18	n.d.	n.d.
Derivado I de ácido ferúlico	6,04	14,72 ± 0,03	12,6 ± 0,1
Derivado de ácido <i>p</i> -cumárico	6,92	10,88 ± 0,02	15,98 ± 0,04
Derivado II de ácido ferúlico	7,21	0,38 ± 0,01	0,793 ± 0,004
<i>Flavonoides</i>			
Quercetina	5,73	5,56 ± 0,03	2,5 ± 0,1
Derivado de quercetina	6,58	2,98 ± 0,03	1,37 ± 0,01
Catequina	8,52	n.d.	n.d.
<i>Estilbenos</i>			
Resveratrol	5,20	n.d.	n.d.
Total		77,93 ± 0,33	56,4 ± 0,6

n.d.: no detectado

IV.3.2.2. Extractos obtenidos por extracción soxhlet y lecho agitado

Los extractos obtenidos por los métodos convencionales de extracción (soxhlet y lecho agitado) también fueron solubilizados en etanol y analizados por CLAE. En la **Tabla 10** son presentadas las concentraciones de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos.

El perfil de los compuestos fenólicos, así como su concentración, fue aproximadamente el mismo para los extractos de lías obtenidos por extracción soxhlet y lecho agitado.

A diferencia de los extractos de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica, el ácido *p*-cumárico (t_R = 6,92) y el derivado II del ácido ferúlico (t_R = 7,21)

no fueron detectados en los extractos. La ausencia de estos compuestos en los extractos obtenidos vía soxhlet y lecho agitado, puede ser causada a su baja solubilidad en el disolvente de extracción utilizado (etanol 96%). Los métodos convencionales de extracción: soxhlet y lecho agitado, permitieron obtener extractos con una concentración total de fenólicos de $2,47 \pm 0,65$ g/kg y $2,49 \pm 0,13$ g/kg, respectivamente.

Tabla 10 Concentración total (g/kg extracto) de los compuestos fenólicos en los extractos de lías obtenidos por extracción soxhlet y lecho agitado.

Compuestos fenólicos	t _R (min)	Soxhlet	Lecho agitado
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido gálico	1,67	0,4 ± 0,1	0,43 ± 0,04
Ácido protocateico	2,37	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2,95	n.d.	n.d.
Ácido vanílico	3,27	0,4 ± 0,1	0,42 ± 0,03
Ácido siríngico	3,44	0,4 ± 0,1	0,47 ± 0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,84	n.d.	n.d.
Ácido ferúlico	4,18	n.d.	n.d.
Derivado I de ácido ferúlico	6,04	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,01
Derivado de ácido <i>p</i> -cumárico	6,92	n.d.	n.d.
Derivado II de ácido ferúlico	7,21	n.d.	n.d.
<i>Flavonoides</i>			
Derivado I Quercetina	4,86	0,2 ± 0,1	0,13 ± 0,01
Quercetina	5,73	0,7 ± 0,2	0,66 ± 0,01
Derivado II Quercetina	6,58	0,11 ± 0,02	n.d.
Catequina	8,52	n.d.	n.d.
<i>Estilbenos</i>			
Resveratrol	5,20	n.d.	n.d.
Total		2,47 ± 0,65	2,49 ± 0,13

n.d.: no detectado

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El residuo de lías, obtenido del procesamiento de la uva durante la producción de pisco fue colectado, liofilizado y caracterizado. La densidad real, porcentaje de humedad y lípidos fueron calculados en $1631,1 \pm 0,1 \text{ kg/m}^3$, $12,3 \pm 0,2 \%$ y $1,43 \pm 0,04 \%$, respectivamente.

El proceso de extracción supercrítica del residuo de lías de pisco fue influenciado por la presión. El uso de presión alta en el lecho de extracción formando por lías de pisco liofilizadas, cuya porosidad fue determinada en 0,78, causó la compactación de la matriz sólida formando caminos preferenciales para el disolvente; los cuales comprometieron la eficiencia de la extracción. De esta manera, para un S/F de 275, los rendimientos de extracción obtenidos a 35 MPa y 20 MPa fueron 7,56 % y 10,73 %, respectivamente.

De acuerdo a las OECs, la etapa de extracción controlada por la difusión (DC) no fue alcanzada durante el periodo de tiempo estudiado. El uso de CO₂ supercrítico y etanol como cosolvente, promovieron la solubilización constante de compuestos de polaridad semejante. Por esa razón, después del uso de razones de S/F altos, extracto aún era colectado.

Los parámetros cinéticos de las OECs determinaron que mayor masa de extracto era solubilizada en el disolvente cuando era utilizada presión de extracción baja. Así mismo, es posible obtener 46 % del total de extracto obtenido en la OEC en 1,5 h de extracción supercrítica de lías de pisco realizada a 40 °C y 20 MPa con una razón S/F de 51. Por otro lado, 38 % del total del extracto es obtenido en 1,5 h de extracción a 40 °C y 35 MPa con una razón S/F de 52.

Extractos de lías de pisco fueron obtenidos por métodos convencionales de extracción: soxhlet y lecho agitado. Comparado con la extracción supercrítica, rendimiento de extracción superior fue obtenido vía soxhlet ($27,6 \pm 0,4 \%$, b.s.) y lecho agitado ($16,8 \pm 0,2 \%$, b.s.) con el uso de razones S/F y tiempo de extracción menores.

El análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de lías de pisco, permitió monitorear los experimentos de extracción e identificar la presencia de

quercetina en los extractos obtenidos vía extracción supercrítica, soxhlet y lecho agitado. También, permitió constatar que los extractos de lías de pisco son ricos en compuestos fenólicos y sustancias con actividad antioxidante.

El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) permitió verificar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos por los tres métodos de extracción. En los extractos del residuo de lías de pisco obtenidos por extracción supercrítica fueron identificados el ácido gálico, ácido protocateico, ácido vanílico, ácido sirínico, quercetina y derivados, derivados del ácido *p*-cumárico y ferúlico. Así mismo, se determinó la ausencia del ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, resveratrol y catequina en los extractos.

El proceso de extracción supercrítica fue el método más eficiente en la obtención de compuestos fenólicos a partir de lías de pisco debido que la extracción fue selectiva proporcionando extractos más concentrados en compuestos fenólicos.

Se recomienda el estudio del proceso de extracción supercrítica utilizando presiones de extracción intermedias (20-35 MPa) así como el uso de otros cosolventes de extracción (agua, metanol, entre otros) en diferentes porcentajes.

Se sugiere también evaluar la influencia del aumento del porcentaje del cosolvente y la influencia de éste en el rendimiento y selectividad de extracción.

Finalmente, se recomienda un estudio económico del proceso de obtención de compuestos fenólicos vía extracción supercrítica a fin de estimar su viabilidad económica.

REFERENCIAS

- Abe, L., da Mota, R., Lajolo, F. & Genovese, M. I. (2007). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* cultivars. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), 394-400.
- Aleksovski, S., Sovová, H., Čurapova, B. & Poposka, F. (1998). Supercritical CO₂ extraction and soxhlet extraction of grape seeds oil. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 17(2), 129–134.
- ASAE. (2003). **Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving** (pp. 602-605).
- Beer, D. D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. & Manley, M. (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 902-909.
- Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A. & Esquível, M. M. (2002). Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, 73, 14-21.
- Braga, M. (2005). *Obtenção de compostos bioativos de Curcuma longa L. e Lippia Alba M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo*. Unpublished Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2).
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M. & Velic, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1).
- Butler, L. G. (1992). *Protein polyphenol interactions: nutritional aspects*. Paper presented at the Proceeding of 16th International Conference of Grape Polyphenol.
- Calienes, C. A. (2007). *Cadeia do Valor do Pisco Peruano: O caso da Associação Perú Pisco Export*. Unpublished Dissertação de Mestrado em Administração, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Cantos, E., Espín, J. C. & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5691-5696.
- Casas, L., Mantell, C., Rodriguez, M., de la Ossa, E. J. M., Roldan, A., De Ory, I. et al. (2010). Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 304–308.
- Cassaza, A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100, 50-55.

- Choi, E. S., Noh, M. J. & Yoo, K.-P. (1998). Solubilities of o-, m- and p-coumaric acid isomers in carbon dioxide at 308.15-323.15 K and 8.5-25 MPa. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 43(6-8), 6.
- Clifford, M. N. (1992). *Sensory and dietary properties of phenols*. Paper presented at the Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol.
- Alcoholic Beverage: Pisco, Requirements, 211:001 C.F.R. (2006).
- de Campos, L. M. A. S., Leimann, F. V., Pedrosa, R. C. & Ferreira, S. R. S. (2008). Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99(17).
- Depablos, G. B. & González, E. A. (2000). Free radicals vs. aging. *Revista de la Facultad de Farmacia / Universidad de los Andes*, 38, 20-26.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M. & Moldes, A. B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31(11), 2327-2335.
- Farias-Campomanes, A. M. (2012). *Recovery of bioactive compounds by supercritical and conventional extraction from grape wastes of pisco industry*. University of Campinas, Brazil.
- Farias-Campomanes, A. M. & Meireles, M. A. A. (2013). Pisco Bagasse as a Potential Source of Bioactive Compounds – A Review. *Recent Patents on Engineering*, 7(1), 41-50.
- Farias-Campomanes, A. M., Rostagno, M. A. & Meireles, M. A. A. (2013). Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation. [Article]. *Journal of Supercritical Fluids*, 77, 70-78.
- Gusman, J., Malonne, H. & Atassi, G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, 22(8), 1111-1117.
- Hirata, L. L. (2004). *Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum*. Universidade Federal do Paraná, Brazil.
- Huertas Vallejos, L. (2004). Historia de la producción de vinos y piscos en el Perú. *Universum (Talca)*, 19(2), 44-61.
- Indecopi. (2011). Reglamento de la denominación de origen pisco. from <http://www.indecopi.gob.pe/repositorioaps/0/11/jer/denoinfoutilidenorige/Reglamento_DO-PISCO.pdf>
- Kamffer, Z. (2009). *Carotenoid and chlorophyll content of Vitis vinifera cv. Merlot grapes during ripening with reference to variability in grapevine water status and vigour*. Unpublished Master thesis, Stellenbosch University, South Africa
- Lafka, T. I., Sinanoglou, V. & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206-1214.

- Leal, P. F. (2005). *Obtenção de extratos vegetais com propriedades funcionais via tecnologia supercrítica: uso de CO₂ e CO₂ + H₂O*. Unpublished Dissertação de mestrado Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Meireles, M. A. A. (2007). Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In J. L. Martinez (Ed.), *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds* (pp. 243-274). Boca Raton: CRC Press-Taylor and Francis Group.
- Ministério de la Producción del Perú. (2014). Noticias del sector. Retrieved 10 de mayo de 2015, from <http://www.produce.gob.pe/>
- Morales, M. C. (2005). *Caracterización de fibra dietaria em orujo y capacidad antioxidante in vivo, hollejo y semilla*. Unpublished Monografía para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Moura, L. S., Carvalho-Junior, R. N., Quispe-Condori, S., Rosa, P. T. V., Ming, L. C. & Meireles, M. A. A. (2003). *Determination of the global yield for the system fenel (Foeniculum vulgare) + CO₂*. Paper presented at the Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids, Versailles, Francia.
- Murga, R., Sanz, M. T., Beltran, S. & Cabezas, J. L. (2004). Solubility of syringic and vanillic acids in supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 49, 779-782.
- Murga, R., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Cabezas, J. L. (2003). Solubility of three hydroxycinnamic acids in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 27, 239-245.
- Negro, C., Tommasi, L. & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41-44.
- Oliveira, D. A. (2010). *Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (Vitis vinifera) das variedades Merlot e Syrah*. Unpublished Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.
- Organización Mundial de la Salud (2012, 20 de setiembre de 2014). Causes of death 2008: data sources and methods. Geneva. Retrieved 20 de octubre de 2014, from http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf?ua=1
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M. & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life-A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 299-308.
- Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Vos, F. & Scalbert, A. (2010). Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8).
- Propisco. (2011). Uva de la variedad Uvina. Retrieved 8 de julio del 2013, 2011, from <http://www.propisco.org/variedades/uvina/>
- Quispe-Condori, S. (2005). *Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas da extração supercrítica de produtos naturais: Artemisia annua, Cordia*

- verbenacea, Ocimum selloi e Foeniculum vulgare*. Unpublished Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Reverchon, E. & Marrone, C. (1997). Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling. *Chemical Engineering Science*, 52, 3421-3428.
- Rostagno, M. A., Manchon, N., D'Arrigo, M., Guillamon, E., Villares, A., Garcia-Lafuente, A. et al. (2011). Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*, 685(2).
- Rovira, F. (1966). *La industria del pisco en el Perú, preparado por Fernando Rovira: colaboraron:uis Romero Chigne, Jorge Silva M. [y] Benedicto Cigüeñas*. Peru: Instituto Nacional de Promoción Industrial, Banco Industrial.
- Santos, C. S. (2001). *Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta*. Paper presented at the V Congreso Internacional Alimentación, Nutrición y Dietética, Madrid, España.
- Schuler, J. (2004). *Pasión por el pisco*. Lima: Editoriak Quebecor World Peru S.A.
- Sharan, R. N., Odyuo, M. M. & Purkayastha, S. (2011). Oxygen Free Radicals and Their Biomedical Implications: A Mini Review. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 8(4), 372-376.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E. & Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 291-299.
- Silva, L. M. L. R. d. (2003). Caracterização dos subprodutos da vinificação. *Revista Millenium on.line*, 28.
- Sovová, H. (2001). Solubility of ferulic acid in supercritical carbon dioxide with ethanol as cosolvent. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 46, 1255-1257.
- Szajdek, A. & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-153.
- Takeuchi, T. M. (2009). *Extração supercrítica de macela, cravo-da-índia e vetiver: aspectos tecnológicos e econômicos*. Unpublished Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Vasconcellos, C. M. C. (2007). *Extração supercrítica de óleos voláteis de Achyrocline satureioides (Macela) e Vetiveria zizanioides (Vetiver): determinação da cinética de extração e estimativa de custos de manufatura*. Unpublished Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Wagner, H. & Blad, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (Second ed.): Springer.
- Xu, C., Zhang, Y., Wang, J. & Lu, J. (2010). Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapeseeds. *Food Chemistry*, 122(3), 688-694.

- Yang, Y.-C., Wei, M.-C., Huang, T.-C. & Lee, S.-Z. (2013). Extraction of protocatechuic acid from *Scutellaria barbata* D. Don using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 81, 55-66.
- Yilmaz, Y. & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. [Article]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.
- Zabot, G. L., Moraes, M. N. & Meireles, M. A. A. (2014). Supercritical Technology Applied to the Production of Bioactive Compounds: Research Studies Conducted at LASEFI from 2009 to 2013. *Food and Public Health*, 4(2), 36-48.

ANEXOS

Anexo 1 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco.

Tabla A 1 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 20 MPa y 40 °C – Primer experimento.

t (min)	t (h)	E (g)	E ^{ac} (g)	CO ₂ ^{ac} (kg)	EtOH ^{ac} (kg)	S/F ^{ac} (b.s)	R (%, b.s.)	R ^{ac} (%, b.s.)
10	0,2	0,10	0,10	0,07	0,01	5,72	0,73	0,73
20	0,3	0,13	0,22	0,14	0,02	11,44	0,95	1,68
30	0,5	0,09	0,31	0,20	0,02	17,16	0,69	2,37
40	0,7	0,08	0,40	0,27	0,03	23,04	0,64	3,01
50	0,8	0,06	0,46	0,34	0,04	28,75	0,49	3,50
60	1,0	0,06	0,52	0,41	0,05	34,67	0,48	3,98
70	1,2	0,05	0,57	0,48	0,05	40,39	0,39	4,37
80	1,3	0,05	0,62	0,55	0,06	46,11	0,35	4,72
90	1,5	0,04	0,66	0,61	0,07	51,70	0,33	5,04
100	1,7	0,04	0,71	0,68	0,08	57,42	0,32	5,37
120	2,0	0,07	0,78	0,82	0,09	68,92	0,56	5,93
140	2,3	0,07	0,85	0,95	0,11	80,36	0,51	6,43
160	2,7	0,06	0,90	1,09	0,12	91,80	0,43	6,87
180	3,0	0,05	0,96	1,22	0,14	103,30	0,40	7,27
200	3,3	0,05	1,00	1,36	0,15	114,74	0,36	7,63
220	3,7	0,04	1,05	1,50	0,17	126,18	0,33	7,96
240	4,0	0,04	1,08	1,63	0,18	137,61	0,29	8,24
260	4,3	0,04	1,13	1,77	0,20	149,00	0,31	8,55
280	4,7	0,03	1,16	1,90	0,21	160,44	0,25	8,80
300	5,0	0,04	1,19	2,04	0,23	171,90	0,27	9,08
320	5,3	0,03	1,22	2,17	0,24	183,34	0,21	9,28
340	5,7	0,03	1,25	2,31	0,26	194,75	0,19	9,47
360	6,0	0,02	1,27	2,44	0,27	206,17	0,18	9,65
380	6,3	0,02	1,29	2,58	0,29	217,59	0,18	9,83
400	6,7	0,02	1,32	2,71	0,30	229,02	0,17	10,00
420	7,0	0,02	1,34	2,85	0,32	240,42	0,15	10,15
440	7,3	0,02	1,36	2,98	0,33	251,89	0,15	10,30
460	7,7	0,02	1,38	3,12	0,35	263,27	0,15	10,46
480	8,0	0,02	1,39	3,26	0,36	274,74	0,12	10,58
L		0,02	1,41	-	-	-	0,15	10,73

Tabla A 2 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 20 MPa y 40 °C – Segundo experimento.

t (min)	t (h)	E (g)	E ^{ac} (g)	CO ₂ ^{ac} (kg)	EtOH ^{ac} (kg)	S/F ^{ac} (b.s)	R (%, b.s.)	R ^{ac} (%, b.s.)
10	0,2	0,10	0,10	0,07	0,01	5,76	0,74	0,74
20	0,3	0,11	0,21	0,14	0,02	11,53	0,86	1,60
30	0,5	0,10	0,31	0,20	0,02	17,29	0,74	2,34
40	0,7	0,07	0,38	0,27	0,03	23,08	0,54	2,89
50	0,8	0,07	0,44	0,34	0,04	28,84	0,50	3,38
60	1,0	0,06	0,50	0,41	0,05	34,56	0,43	3,81
70	1,2	0,04	0,54	0,48	0,05	40,42	0,32	4,13
80	1,3	0,05	0,59	0,55	0,06	46,19	0,34	4,47
90	1,5	0,04	0,63	0,62	0,07	51,98	0,29	4,76
100	1,7	0,04	0,66	0,68	0,08	57,74	0,27	5,04
120	2,0	0,07	0,73	0,82	0,09	69,32	0,51	5,55
140	2,3	0,05	0,78	0,96	0,11	80,85	0,41	5,96
160	2,7	0,05	0,83	1,09	0,12	92,37	0,38	6,34
180	3,0	0,05	0,88	1,23	0,14	103,90	0,35	6,69
200	3,3	0,04	0,92	1,37	0,15	115,51	0,32	7,01
220	3,7	0,04	0,96	1,50	0,17	127,06	0,31	7,32
240	4,0	0,04	1,00	1,64	0,18	138,56	0,30	7,62
260	4,3	0,03	1,04	1,78	0,20	150,22	0,27	7,88
280	4,7	0,03	1,07	1,91	0,21	161,59	0,25	8,13
300	5,0	0,03	1,10	2,05	0,23	173,12	0,23	8,36
320	5,3	0,03	1,13	2,19	0,24	184,65	0,24	8,60
340	5,7	0,03	1,16	2,32	0,26	196,17	0,22	8,81
360	6,0	0,03	1,18	2,46	0,27	207,67	0,20	9,01
380	6,3	0,03	1,21	2,59	0,29	219,18	0,20	9,21
400	6,7	0,02	1,23	2,73	0,30	230,70	0,18	9,39
420	7,0	0,02	1,26	2,87	0,32	242,23	0,17	9,56
440	7,3	0,03	1,29	3,00	0,33	253,76	0,26	9,82
460	7,7	0,02	1,31	3,14	0,35	265,23	0,16	9,97
480	8,0	0,02	1,33	3,28	0,36	276,76	0,14	10,12
L	-	0,02	1,35	-	-	-	0,15	10,26

Tabla A 3 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C – Primer experimento.

t (min)	t (h)	E (g)	E ^{ac} (g)	CO ₂ ^{ac} (kg)	EtOH ^{ac} (kg)	S/F ^{ac} (b.s)	R (%, b.s.)	R ^{ac} (%, b.s.)
10	0,2	0,08	0,08	0,07	0,01	5,57	0,61	0,61
20	0,3	0,07	0,14	0,13	0,02	11,19	0,50	1,10
30	0,5	0,04	0,19	0,20	0,02	16,92	0,33	1,44
40	0,7	0,04	0,23	0,27	0,03	22,68	0,29	1,73
50	0,8	0,03	0,26	0,34	0,04	28,41	0,27	1,99
60	1,0	0,03	0,29	0,40	0,05	34,14	0,25	2,24
70	1,2	0,03	0,33	0,47	0,05	39,86	0,24	2,48
80	1,3	0,03	0,35	0,54	0,06	45,68	0,22	2,70
90	1,5	0,03	0,38	0,61	0,07	51,40	0,22	2,92
100	1,7	0,03	0,41	0,68	0,08	57,16	0,22	3,13
120	2,0	0,06	0,47	0,81	0,09	68,71	0,42	3,55
140	2,3	0,05	0,52	0,95	0,11	80,19	0,37	3,92
160	2,7	0,04	0,56	1,08	0,12	91,67	0,31	4,23
180	3,0	0,04	0,60	1,22	0,14	103,09	0,31	4,55
200	3,3	0,04	0,63	1,35	0,15	114,54	0,28	4,83
220	3,7	0,03	0,67	1,49	0,17	126,02	0,26	5,09
240	4,0	0,03	0,70	1,62	0,18	137,47	0,23	5,31
260	4,3	0,03	0,73	1,76	0,20	148,92	0,23	5,55
280	4,7	0,03	0,76	1,89	0,21	160,32	0,22	5,76
300	5,0	0,03	0,78	2,03	0,23	171,78	0,20	5,96
330	5,5	0,03	0,82	2,23	0,25	188,95	0,26	6,22
360	6,0	0,03	0,85	2,43	0,27	206,00	0,25	6,47
390	6,5	0,03	0,88	2,63	0,29	223,05	0,24	6,71
420	7,0	0,03	0,91	2,84	0,32	240,15	0,23	6,95
450	7,5	0,03	0,94	3,04	0,34	257,20	0,22	7,17
480	8,0	0,02	0,97	3,24	0,36	274,48	0,19	7,36
L	-	0,03	0,99	-	-	-	0,21	7,56

Tabla A 4 Datos experimentales de extracción supercrítica de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C – Segundo experimento.

t (min)	t (h)	E (g)	E ^{ac} (g)	CO ₂ ^{ac} (kg)	EtOH ^{ac} (kg)	S/F ^{ac} (b.s)	R (%, b.s.)	R ^{ac} (%, b.s.)
10	0,2	0,03	0,03	0,05	0,01	4,32	0,25	0,25
20	0,3	0,06	0,10	0,10	0,01	8,64	0,49	0,74
30	0,5	0,04	0,14	0,15	0,02	13,01	0,33	1,07
40	0,7	0,03	0,17	0,21	0,02	17,44	0,24	1,32
50	0,8	0,03	0,20	0,26	0,03	21,76	0,22	1,54
60	1,0	0,03	0,23	0,31	0,03	26,08	0,21	1,74
70	1,2	0,03	0,26	0,36	0,04	30,49	0,20	1,95
80	1,3	0,02	0,28	0,40	0,05	34,03	0,17	2,12
90	1,5	0,02	0,30	0,46	0,05	39,15	0,19	2,31
100	1,7	0,02	0,33	0,52	0,06	43,52	0,18	2,49
120	2,0	0,04	0,37	0,62	0,07	52,21	0,31	2,80
140	2,3	0,04	0,41	0,72	0,08	60,89	0,28	3,08
160	2,7	0,04	0,45	0,82	0,09	69,58	0,30	3,38
180	3,0	0,04	0,48	0,93	0,10	78,19	0,28	3,66
200	3,3	0,03	0,51	1,03	0,11	86,83	0,24	3,91
220	3,7	0,03	0,55	1,13	0,13	95,47	0,24	4,15
240	4,0	0,03	0,58	1,23	0,14	104,02	0,23	4,38
260	4,3	0,03	0,60	1,33	0,15	112,66	0,22	4,60
280	4,7	0,03	0,63	1,44	0,16	121,30	0,21	4,81
300	5,0	0,02	0,66	1,54	0,17	129,96	0,18	4,99
330	5,5	0,04	0,69	1,69	0,19	142,91	0,27	5,26
360	6,0	0,03	0,72	1,85	0,20	156,04	0,19	5,45
L	6,5	0,04	0,75	-	-	-	0,27	5,73

Anexo 2 Ajuste a tres rectas usando el software SAS

Tabla A 5 Ajuste de la OEC de lías de pisco a 20 MPa y 40 °C.

The NLIN Procedure							
Dependent Variable rend							
Method: Gauss-Newton							
Iterative Phase							
Iter	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	Sum of Squares
0	0.3912	0.0558	-0.0337	-0.0114	80.0000	200.0	5.0833
1	0.2623	0.0613	-0.0375	-0.0132	65.7984	198.8	4.5846
2	0.1744	0.0657	-0.0410	-0.0141	59.9676	195.5	4.3461
3	0.1000	0.0702	-0.0446	-0.0150	53.9811	192.3	4.2462
4	0.1000	0.0702	-0.0446	-0.0150	54.4610	192.5	4.2203
Estimation Summary							
Method		Gauss-Newton					
Iterations		4					
R		0					
PPC		0					
RPC(knot1)		0.008891					
Object		0.006102					
Objective		4.220318					
Observations Read		60					
Observations Used		60					
Observations Missing		0					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F		
Model	5	534.0	106.8	1366.63	<.0001		
Error	54	4.2203	0.0782				
Corrected Total	59	538.3					
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits				
b0	0.1000	0.1431	-0.1869	0.3868			
b1	0.0702	0.00473	0.0607	0.0797			
b2	-0.0446	0.00501	-0.0546	-0.0345			
b3	-0.0150	0.00178	-0.0185	-0.0114			
knot1	54.4610	4.4445	45.5503	63.3718			
knot2	192.5	12.1546	168.1	216.8			
Approximate Correlation Matrix							
b0	b1	b2	b3	knot1	knot2		
b0	1.0000000	-0.8257228	0.7781532	-0.0000000	0.3503926	-0.0000000	
b1	-0.8257228	1.0000000	-0.9423903	0.0000000	-0.7025641	0.0000000	
b2	0.7781532	-0.9423903	1.0000000	-0.3155233	0.5016766	-0.2506462	
b3	-0.0000000	0.0000000	-0.3155233	1.0000000	0.4523127	0.5477686	
knot1	0.3503926	-0.7025641	0.5016766	0.4523127	1.0000000	0.2389787	
knot2	-0.0000000	0.0000000	-0.2506462	0.5477686	0.2389787	1.0000000	

Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	0	0.000	0	0	0.1000	-0.09995
2	10	0.730	0	0	0.8019	-0.07194
3	20	1.682	0	0	1.5039	0.17808
4	30	2.371	0	0	2.2059	0.16509
5	40	3.014	0	0	2.9079	0.10610
6	50	3.504	0	0	3.6099	-0.10588
7	60	3.980	0	0	4.0649	-0.08492
8	70	4.365	0	0	4.3211	0.04394
9	80	4.718	0	0	4.5772	0.14079
10	90	5.045	10	0	4.8334	0.21164
11	100	5.366	20	0	5.0895	0.27650
12	120	5.927	40	0	5.6018	0.32520
13	140	6.432	60	0	6.1141	0.31791
14	160	6.867	80	0	6.6264	0.24062
15	180	7.266	100	0	7.1387	0.12732
16	200	7.629	120	0	7.5379	0.09109
17	220	7.957	140	20	7.7506	0.20643
18	240	8.244	160	40	7.9632	0.28077
19	260	8.553	180	60	8.1759	0.37711
20	280	8.803	200	80	8.3886	0.41445
21	300	9.075	220	100	8.6012	0.47379
22	320	9.281	240	120	8.8139	0.46713
23	340	9.474	260	140	9.0265	0.44747
24	360	9.651	280	160	9.2392	0.41181
25	380	9.831	300	180	9.4519	0.37915
26	400	10.001	320	200	9.6645	0.33648
27	420	10.154	340	220	9.8772	0.27682
28	440	10.303	360	240	10.0898	0.21316
29	460	10.455	380	260	10.3025	0.15250
30	480	10.579	400	280	10.5152	0.06384
31	0	0.000	0	0	0.1000	-0.09995
32	10	0.744	0	0	0.8019	-0.05794
33	20	1.604	0	0	1.5039	0.10008
34	30	2.341	0	0	2.2059	0.13509
35	40	2.886	0	0	2.9079	-0.02190
36	50	3.383	0	0	3.6099	-0.22688
37	60	3.810	0	0	4.0649	-0.25492
38	70	4.131	0	0	4.3211	-0.19006
39	80	4.474	0	0	4.5772	-0.10321
40	90	4.765	10	0	4.8334	-0.06836
41	100	5.039	20	0	5.0895	-0.05050
42	120	5.550	40	0	5.6018	-0.05180
43	140	5.960	60	0	6.1141	-0.15409
44	160	6.344	80	0	6.6264	-0.28238
45	180	6.695	100	0	7.1387	-0.44368
46	200	7.013	120	0	7.5379	-0.52491
47	220	7.321	140	20	7.7506	-0.42957
48	240	7.616	160	40	7.9632	-0.34723
49	260	7.882	180	60	8.1759	-0.29389
50	280	8.127	200	80	8.3886	-0.26155
51	300	8.357	220	100	8.6012	-0.24421
52	320	8.597	240	120	8.8139	-0.21687
53	340	8.814	260	140	9.0265	-0.21253
54	360	9.009	280	160	9.2392	-0.23019
55	380	9.210	300	180	9.4519	-0.24185
56	400	9.390	320	200	9.6645	-0.27452
57	420	9.562	340	220	9.8772	-0.31518
58	440	9.818	360	240	10.0898	-0.27184
59	460	9.973	380	260	10.3025	-0.32950
60	480	10.117	400	280	10.5152	-0.39816

Tabla A 6 Ajuste de la OEC de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C - Primer experimento.

The NLIN Procedure
Dependent Variable rend
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	Sum of Squares
0	0.1376	0.0261	-0.0116	-0.00463	80.0000	200.0	0.1344
1	0.0874	0.0283	-0.0130	-0.00556	63.5774	195.2	0.0928
2	0.0540	0.0299	-0.0144	-0.00580	58.0940	193.9	0.0713
3	0.0190	0.0320	-0.0162	-0.00611	50.7731	191.1	0.0629
4	0.0190	0.0320	-0.0162	-0.00611	51.5815	191.2	0.0598

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	4
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.015922
Object	0.049172
Objective	0.059809
Observations Read	23
Observations Used	23
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	5	59.6438	11.9288	3390.59	<.0001
Error	17	0.0598	0.00352		
Corrected Total	22	59.7036			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	0.0190	0.0429	-0.0715	0.1096	
b1	0.0320	0.00142	0.0290	0.0350	
b2	-0.0162	0.00150	-0.0193	-0.0130	
b3	-0.00611	0.000649	-0.00748	-0.00474	
knot1	51.5815	3.5512	44.0891	59.0738	
knot2	191.2	9.8163	170.5	211.9	

	b0	b1	Approximate Correlation Matrix			
			b2	b3	knot1	knot2
b0	1.0000000	0.8257228	0.7781532	-0.0000000	0.3041834	-0.0000000
b1	-0.8257228	1.0000000	-0.9423903	0.0000000	-0.6565424	0.0000000
b2	0.7781532	0.9423903	1.0000000	-0.2594960	0.4441295	-0.2248323
b3	-0.0000000	0.0000000	-0.2594960	1.0000000	0.4048713	0.1658640
knot1	0.3041834	0.6565424	0.4441295	0.4048713	1.0000000	0.2372635
knot2	-0.0000000	0.0000000	-0.2248323	0.1658640	0.2372635	1.0000000

Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	0	0.000	0	0	0.01905	-0.019048
2	10	0.250	0	0	0.33936	-0.089362
3	20	0.743	0	0	0.65968	0.083324
4	30	1.074	0	0	0.97999	0.094010
5	40	1.315	0	0	1.30030	0.014695
6	50	1.537	0	0	1.62062	-0.083619
7	60	1.745	0	0	1.80484	-0.059845
8	70	1.949	0	0	1.96351	-0.014506
9	80	2.119	0	0	2.12217	-0.003166
10	90	2.305	10	0	2.28083	0.024173
11	100	2.489	20	0	2.43949	0.049512
12	120	2.803	40	0	2.75681	0.046190
13	140	3.082	60	0	3.07413	0.007869
14	160	3.385	80	0	3.39145	-0.006453
15	180	3.665	100	0	3.70877	-0.043774
16	200	3.908	120	0	3.97241	-0.064406
17	220	4.151	140	20	4.16752	-0.016516
18	240	4.376	160	40	4.36263	0.013373
19	260	4.595	180	60	4.55774	0.037263
20	280	4.807	200	80	4.75285	0.054153
21	300	4.989	220	100	4.94796	0.041043
22	330	5.257	250	130	5.24062	0.016378
23	360	5.452	280	160	5.53329	-0.081288

Tabla A 7 Ajuste de la OEC de lías de pisco a 35 MPa y 40 °C – Segundo experimento.

The NLIN Procedure
Dependent Variable: rend
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase							Sum of Squares
Iter	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	
0	0.3228	0.0313	-0.0135	-0.00875	80.0000	200.0	0.3009
1	0.2622	0.0339	-0.0153	-0.00962	63.3809	199.4	0.2422
2	0.2174	0.0361	-0.0172	-0.00999	56.9796	197.4	0.2001
3	0.1693	0.0390	-0.0197	-0.0104	49.0230	195.3	0.1822
4	0.1183	0.0429	-0.0231	-0.0108	41.2860	193.1	0.1717
5	0.1183	0.0429	-0.0231	-0.0108	42.4302	193.2	0.1557

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	5
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.027714
Object	0.093114
Objective	0.155731
Observations Read	27
Observations Used	27
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	5	122.3	24.4521	3297.33	<.0001
Error	21	0.1557	0.00742		
Corrected Total	26	122.4			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.1183	0.0667	-0.0205	0.2570
b1	0.0429	0.00272	0.0372	0.0485
b2	-0.0231	0.00280	-0.0289	-0.0173
b3	-0.0108	0.000713	-0.0123	-0.00930
knot1	42.4302	3.7802	34.5689	50.2915
knot2	193.2	7.2476	178.1	208.2

Approximate Correlation Matrix						
	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2
b0	1.0000000	-0.8164966	0.7938117	0.0000000	0.3162265	-0.0000000
b1	-0.8164966	1.0000000	-0.9722168	-0.0000000	-0.6988750	0.0000000
b2	0.7938117	-0.9722168	1.0000000	-0.2153157	0.5695811	-0.1730657
b3	0.0000000	-0.0000000	-0.2153157	1.0000000	0.4317622	0.4915305
knot1	0.3162265	-0.6988750	0.5695811	0.4317622	1.0000000	0.2385090
knot2	-0.0000000	0.0000000	-0.1730657	0.4915305	0.2385090	1.0000000

Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	0	0.00000	0	0	0.11825	-0.11825
2	10	0.60726	0	0	0.54684	0.06042
3	20	1.10481	0	0	0.97543	0.12938
4	30	1.43701	0	0	1.40402	0.03299
5	40	1.72807	0	0	1.83261	-0.10454
6	50	1.99323	0	0	2.08618	-0.09295
7	60	2.24162	0	0	2.28356	-0.04195
8	70	2.47858	0	0	2.48095	-0.00237
9	80	2.69649	0	0	2.67833	0.01816
10	90	2.91669	10	0	2.87571	0.04098
11	100	3.13308	20	0	3.07310	0.05998
12	120	3.55215	40	0	3.46787	0.08428
13	140	3.92474	60	0	3.86263	0.06210
14	160	4.23408	80	0	4.25740	-0.02332
15	180	4.54724	100	0	4.65217	-0.10493
16	200	4.82763	120	0	4.97310	-0.14547
17	220	5.08593	140	20	5.15213	-0.06620
18	240	5.31375	160	40	5.33116	-0.01741
19	260	5.54690	180	60	5.51019	0.03671
20	280	5.76329	200	80	5.68922	0.07407
21	300	5.95835	220	100	5.86825	0.09010
22	330	6.21893	250	130	6.13679	0.08213
23	360	6.47265	280	160	6.40534	0.06731
24	390	6.71342	310	190	6.67388	0.03954
25	420	6.94810	340	220	6.94243	0.00567
26	450	7.16830	370	250	7.21097	-0.04267
27	480	7.35574	400	280	7.47952	-0.12378

Anexo 3 Curvas de calibración construidas para el análisis de compuestos fenólicos por CLAE.

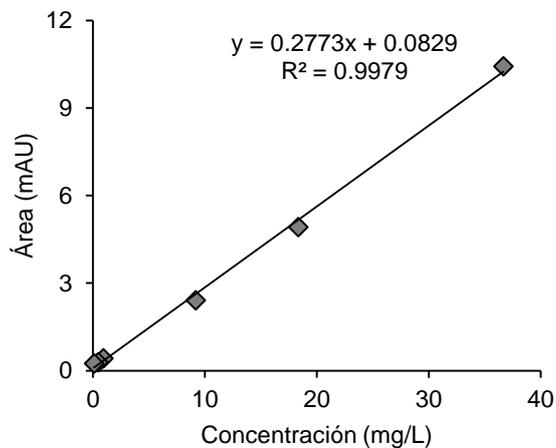


Figura A 1 Curva de calibración del ácido gálico.

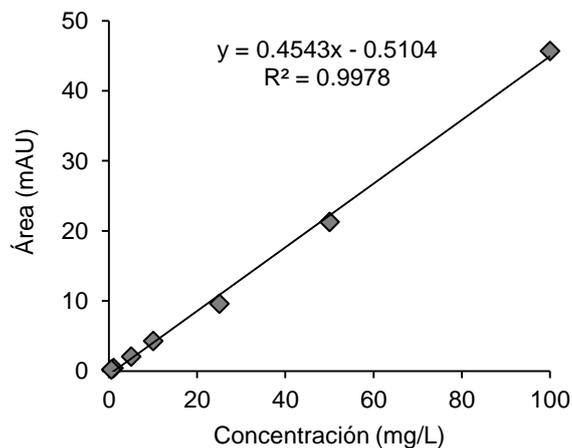


Figura A 2 Curva de calibración del ácido protocateico.

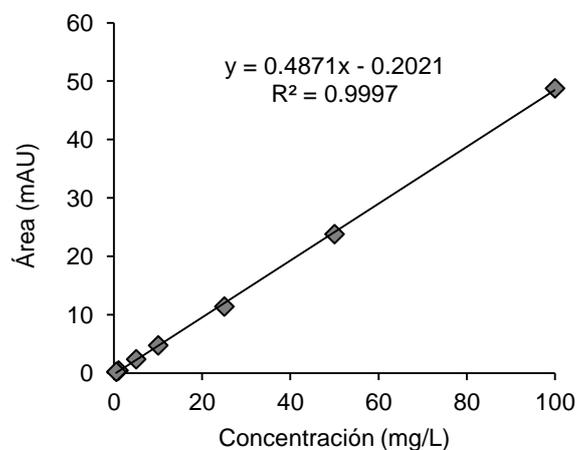


Figura A 3 Curva de calibración del ácido *p*-hidroxibenzoico.

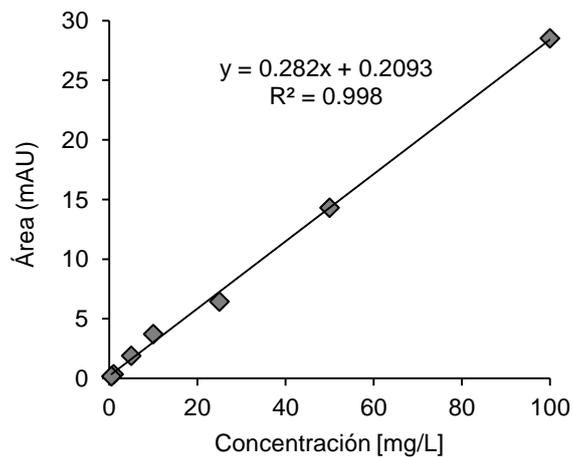


Figura A 4 Curva de calibración del ácido siríngico.

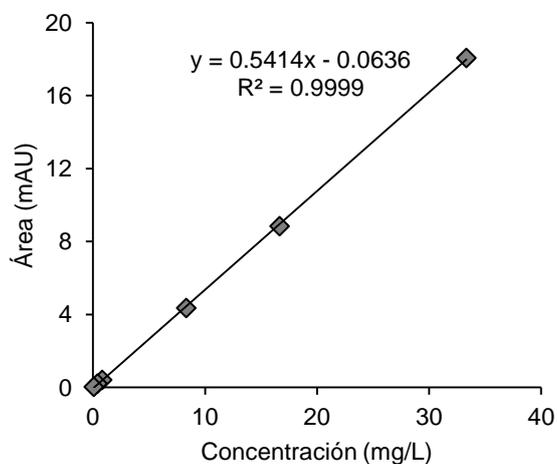


Figura A 5 – Curva de calibración de la quercetina.

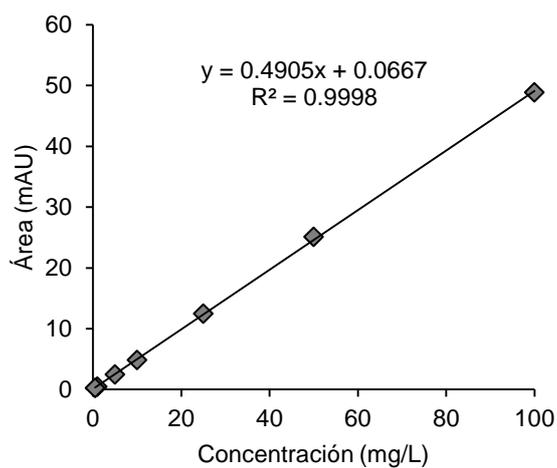


Figura A 6 Curva de calibración del ácido ferúlico.

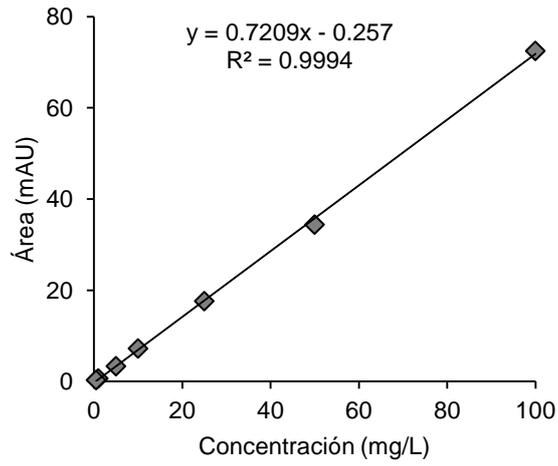


Figura A 7 Curva de calibración del ácido *p*-cumárico.

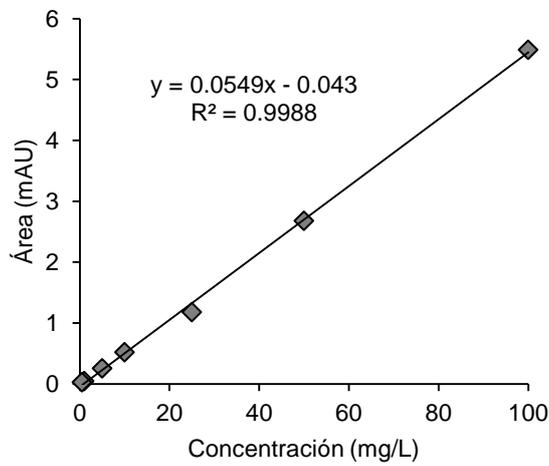


Figura A 8 Curva de calibración de la (-) catequina.

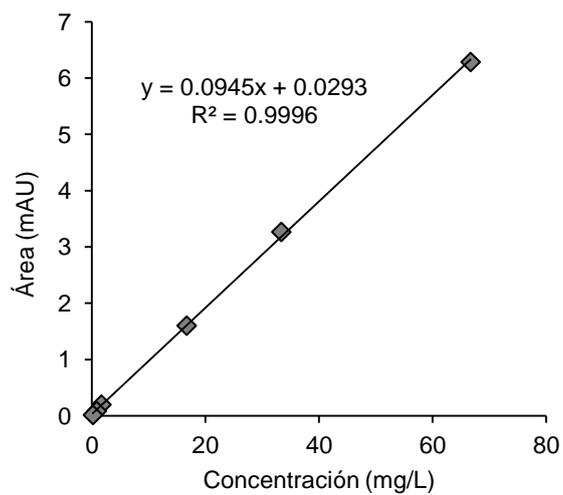


Figura A 9 Curva de calibración del resveratrol.