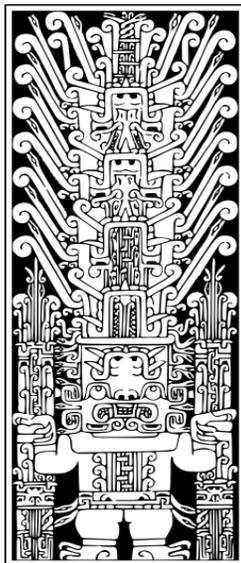


UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL

**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS
ALIMENTARIAS Y ACUICULTURA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ALIMENTARIA



**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE
SEMILLAS DE UVA QUEBRANTA (*Vitis vinífera*) CON CO₂
SUPERCRÍTICO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**

TESIS

Para optar al Título Profesional de:

INGENIERO ALIMENTARIO

Presentado por:

ANNA CLARA CHURATA HUANCA

LIMA – PERÚ

2018

DEDICATORIA

A mis padres, Humberto y Felipa, que con su amor, apoyo incondicional y ejemplo de perseverancia me ayudaron durante todos mis años de vida. Quienes depositaron su entera confianza en cada reto que se me presentó, es por ellos que voy creciendo emocional y profesionalmente. A mis hermanos que estuvieron conmigo en cada etapa apoyándome. Es por mi familia que soy lo que soy ahora, y que sin ellos, no hubiese podido ser.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por protegerme y guiarme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar cada obstáculo y dificultad a lo largo de mi vida.

A mis padres Humberto y Felipa, que siempre me alentaron y jamás dudaron en apoyarme a lo largo de cada etapa que viví. Ellos son mi principal motivo y significan todo para mí.

A mis hermanos Susan y Alejo, por siempre ayudarme y formar parte de esta etapa de mi vida.

A mis asesoras, las ingenieras Gladis Aldave y Maritza Barriga, por la ayuda y enseñanzas brindadas durante toda la elaboración de esta tesis.

Al convenio 315-PNICP-EC2014-INNOVATE PERÚ, por aportar el financiamiento que permitió la realización de este trabajo.

Y en general agradecer a todas las personas que de una forma u otra, participaron en la realización de esta investigación.

Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo extraer con CO₂ supercrítico el aceite de semillas de *Vitis vinifera* de la variedad Quebranta de Ica, aprovechando los residuos (orujo) generados del proceso de elaboración de pisco, y realizar su caracterización fisicoquímica y determinar su actividad antioxidante. Las semillas fueron secadas hasta alcanzar 6 – 7 % de humedad. Se realizó la extracción del aceite por el método convencional (soxhlet) con hexano y con el equipo extractor multisolventes utilizando CO₂ supercrítico. Para optimizar el rendimiento de la extracción del aceite con CO₂ supercrítico se utilizó el método superficie respuesta, mediante el diseño central compuesto sugeridos por el software Minitab versión 17. Se determinaron las características físicas del aceite (índice de refracción y densidad), químicas (índice de peróxidos, índice de anisidina, porcentaje de ácidos grasos e índice de yodo), composición de ácidos grasos por cromatografía de gases y actividad antioxidante empleando el método DPPH. El rendimiento de la extracción con hexano de las semillas fue 14,5 % y los parámetros optimizados de la extracción con CO₂ supercrítico fueron 188 bar, 33,5 °C y 57 g/min de CO₂ obteniéndose un rendimiento de 16,15%. Las características fisicoquímicas de la extracción con hexano fueron 1,4657 de índice de refracción, 0,9386 g/ml de densidad, 38,44 mEq peróxido/ kg de aceite del índice de peróxidos, 3,06 de índice de anisidina, 0,82% de ácidos grasos libres y 130,48 g/ 100g de índice de yodo. Y de la extracción optimizada con CO₂ supercrítico fueron 1,4672 de índice de refracción, 0,9200 g/ml de densidad, 2,28 mEq peróxido/ kg de aceite del índice de peróxidos, 2,30 de índice de anisidina, 1,55% de ácidos grasos libres y 126,9 g/ 100g de índice de yodo. El aceite estaba compuesto principalmente por los ácidos grasos oleico (ω 9) y linoleico (ω 6), obteniéndose para la extracción con hexano 20,20% y 65,95% respectivamente, y por la extracción con CO₂ supercrítico 20,05% y 66,45% respectivamente. Y una actividad antioxidante de 7,26 mM (convencional) y 7,80 mM (CO₂ supercrítico) equivalente a Trolox.

Palabras clave: Semillas de uva, aceite de semillas, extracción con CO₂ supercrítico, extracción con hexano.

Abstract

The objective of this research was the extraction of oil from *Vitis vinifera* seeds, a Quebranta variety from Ica, with supercritical CO₂. Taking advantage of the waste (pomace) generated from the production of pisco. Also, physicochemical characterization and antioxidant activity were determined. The seed was dried until it reached a humidity of 6 - 7 %. The extraction of the grapeseed oil was done by the conventional method with hexane and with the extractor of multi-solvent equipment using supercritical CO₂. In order to optimize the oil recovery with supercritical CO₂, the response surface methodology was used, suggested by the software Minitab version 17. The physical (refractive index, density), and chemical characteristics (peroxide value, p-anisidine value, free fatty acids, iodine value), as well as composition of fatty acids by gas chromatography and their antioxidant activity were determined by the DPPH method. The yield of the extraction with hexane of the seeds was 14.5% while the extraction with supercritical CO₂ was 16.15 %, with optimized parameters; 188 bar, 33.5 °C and 57 g/min of CO₂. The physicochemical characteristics of the extraction with hexane were 1.4657 of refractive index, 0.9386 g/mL of density, 38.44 mEq peroxide/kg oil of peroxide value, 3.06 p-anisidine value, 0.82 % of free fatty acids and 130.48 g/100 g of iodine value. Whereas with the optimized extraction with supercritical CO₂ were 1.4672 of refractive index, 0.9200 g/mL of density, 2.28 mEq peroxide/kg of oil of the peroxide value, 2.30 of p-anisidine value, 1.55 % of free fatty acids and 126.9 g/100 g of iodine value. The grapeseed oil was mainly composed of oleic (ω 9) and linoleic (ω 6) acids, obtaining 20.20 % and 65.95% respectively by the conventional method, and 20.05 % and 66.45 % respectively by extraction with supercritical CO₂. Likewise, an antioxidant activity of 7.26 mM (conventional) and 7.80 mM (supercritical CO₂) were obtained, equivalent to Trolox.

Keywords: Grape seed, seed oil, supercritical CO₂ extraction, extraction with hexane.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Introducción.....	1
CAPÍTULO 1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA	3
1.1 Formulación del problema	4
1.1.1 Problema general	4
1.1.2 Problemas específicos.....	4
1.2 Justificación	5
1.3 Objetivos de la investigación	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos	7
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Antecedentes de la investigación	8
2.2 Bases teóricas.....	11
2.2.1 Generalidades de la vid (<i>Vitis vinífera</i>)	11
2.2.2 Clasificación taxonómica de la vid (<i>Vitis vinífera</i>)	11
2.2.3 Uva Quebranta.....	12
2.2.4 Producción de uva en el Perú y en el mundo.....	13
2.2.5 Pisco	14
2.2.6 Producción de pisco en el Perú.....	15
2.2.7 Desechos de la producción de pisco	16

2.2.7.1 Orujo.....	17
2.2.7.2 Semillas de uva.....	17
2.2.8 Aceite de semillas de uva	18
2.2.9 Propiedades del aceite de semillas de uva	20
2.2.10 Ácidos grasos insaturados	21
2.2.11 Ácidos grasos esenciales (AGE).....	22
2.2.12 Antioxidantes.....	22
2.2.12.1 Determinación de la actividad antioxidante	23
2.2.13 Radicales libres (RL).....	24
2.2.14 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	25
2.2.15 Estrés oxidativo (EO)	25
2.2.16 Tipos de extracción del aceite	26
2.2.16.1 Extracción mecánica del aceite.....	27
2.2.16.2 Extracción con solventes	27
2.2.16.3 Extracción con enzimas	28
2.2.16.4 Extracción asistida por microondas	28
2.2.17 La tecnología de los fluidos supercríticos (FSC).....	28
2.2.17.1 Ventajas de los fluidos supercríticos	31
2.2.17.2 El CO ₂ como fluido supercrítico	31
2.2.17.3 Extracción con CO ₂ supercrítico	32
2.2.17.4 Características del aceite obtenido con CO ₂ supercrítico	34
2.2.17.5 Aplicaciones agroindustriales con FSC.....	34
2.2.18 Métodos de análisis de aceites.....	36
2.2.18.1 Índice de peróxidos.....	36

2.2.18.2 Índice de anisidina	36
2.2.18.3 Ácidos grasos libres	37
2.2.18.4 Índice de yodo	37
2.2.18.5 Índice de refracción	37
2.2.19 Cromatografía de gases (CG)	38
2.2.20 Diseño de experimentos (DOE).....	38
2.2.20.1 Clasificación de los diseños experimentales	39
2.2.20.2 Diseño Central Compuesto (DCC).....	41
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....	43
3.1 Tipo y diseño de investigación	43
3.1.1 Tipo de la investigación.....	43
3.1.2 Diseño de la investigación.....	44
3.2 Unidad de análisis.....	45
3.3 Población de estudio.....	46
3.4 Tamaño de muestra.....	46
3.5 Selección de muestra	46
3.6 Técnica recolección de datos.....	46
3.7 Materia prima	47
3.8 Procedimientos y técnicas	47
3.8.1 Materiales	47
3.8.2 Reactivos	48
3.8.3 Equipos	49
3.8.4 Acondicionamiento del fruto, orujo fresco, orujo seco y semillas de uva Quebranta.	50
3.8.5 Análisis químico proximal del fruto, orujo fresco, orujo seco y semillas de uva	

Quebranta.....	54
3.8.6 Análisis fisicoquímico de la uva Quebranta	54
3.8.7 Acondicionamiento de las semillas de uva Quebranta para la extracción de aceite....	54
3.8.8 Efecto del tamaño de partícula de las semillas de uva Quebranta en la extracción del aceite con CO ₂ supercrítico	58
3.8.9 Obtención del aceite de semillas de uva Quebranta por el método convencional.....	58
3.8.10 Obtención del aceite de semillas de uva Quebranta con CO ₂ supercrítico.....	58
3.8.11 Caracterización física del aceite de las semillas de uva Quebranta.....	61
3.8.11.1 Índice de refracción	61
3.8.11.2 Densidad	61
3.8.12 Caracterización química del aceite de las semillas de uva Quebranta.....	61
3.8.12.1 Índice de peróxidos.....	61
3.8.12.2 Índice de anisidina	61
3.8.12.3 Ácidos grasos libres	61
3.8.12.4 Índice de yodo	61
3.8.13 Análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta por cromatografía de gases	61
3.8.14 Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de semillas de uva Quebranta ..	62
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	64
41 Caracterización fisicoquímica de la uva, orujo fresco, orujo seco y semillas de uva ...	64
42 Efecto del tamaño de partícula de las semillas de uva Quebranta en la extracción del aceite de semillas de uva Quebranta con CO ₂ supercrítico	65
43 Extracción de aceite de semillas de uva Quebranta por el método convencional (soxhlet).....	66
44 Obtención del aceite de semillas de uva Quebranta con CO ₂ supercrítico.....	67
4.4.1 Diseño compuesto central.....	67

4.4.2 Parámetros óptimos	71
4.4.3 Validación de los parámetros optimizados	75
4.5 Caracterización física del aceite de las semillas de uva Quebranta.....	78
4.6 Caracterización química del aceite de las semillas de uva Quebranta.....	79
4.7 Análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta por cromatografía de gases	82
4.8 Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de semillas de uva Quebranta.....	83
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
Referencias bibliográficas	88
Anexos	100

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características físicas y químicas del aceite de semillas de uva	19
Tabla 2. Composición de ácidos grasos del aceite de semillas de uva determinado mediante CGL (% del total de ácidos grasos)	20
Tabla 3. Condiciones críticas de diferentes fluidos	30
Tabla 4. Niveles bajo y alto para el diseño central compuesto con en el software Minitab.	44
Tabla 5. Experimentos establecidos con el diseño central compuesto sugeridos por el software Minitab.....	45
Tabla 6. Puntos de la curva de calibración	62
Tabla 7. Composición proximal (%) de uva fresca, orujo fresco, orujo seco y semillas secas de uva.....	64
Tabla 8. Rendimientos obtenidos con la extracción de CO ₂ supercrítico y la evaluación del índice de peróxidos e índice de anisidina	68
Tabla 9. ANOVA de la regresión de Superficie Respuesta de P, T y F vs. Rendimiento (R) (g de aceite/ 100 g de semilla seca)	70
Tabla 10. Características físicas del aceite de semillas de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano (Soxhlet) y con CO ₂ supercrítico	78
Tabla 11. Características químicas del aceite de semilla de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano (Soxhlet) y con CO ₂ supercrítico	80
Tabla 12. Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano (Soxhlet) y con CO ₂ supercrítico (g/100g aceite)	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Racimo de uva Quebranta.	12
Figura 2. Evolución de la producción a nivel nacional de uva (miles de toneladas) 1996-2015.	14
Figura 3. Producción de pisco en el Perú (litros) 2012-2015.	16
Figura 4. Semillas de uva	18
Figura 5. Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT punto triple, PC: punto crítico, Pc: presión crítica, Tc: Temperatura crítica	29
Figura 6. Los tres periodos diferentes de extracción y la curva de extracción.	34
Figura 7. Clasificación de los diseños experimentales.	40
Figura 8. Representación y construcción de los DCC para $k = 2$ y 3 factores.	41
Figura 9. Equipo extractor multisolvente de fluidos supercríticos.	43
Figura 10. Diagrama de flujo del acondicionamiento de las semillas de uva Quebranta (<i>Vitis vinífera</i>).	51
Figura 11. a) Orujo fresco de uva Quebranta colocado en bandejas de plástico; b) orujo de uva Quebranta en bandejas colocado en el secador de aire frío	53
Figura 12. a) Triturado de las semillas de uva Quebranta con un molino; b) Tamizado de las semillas de uva Quebranta	55
Figura 13. Diagrama de extracción del aceite de semillas de uva Quebranta	57
Figura 14. Semillas de uva Quebranta trituradas y tamizadas antes de la extracción con CO_2 supercrítico y después de la extracción (desgrasada).	59
Figura 15. Recolección del aceite de semillas de uva extraído con CO_2 supecrítico.	60
Figura 16. Extracciones del aceite de semillas de uva Quebranta con CO_2 supercrítico comparando dos tamaños de partícula ($< 0,71$ y $0,85 - 1,00$ mm).....	66
Figura 17. Cinética de extracción de los rendimientos (R) obtenidos con CO_2 supercrítico de los dieciséis experimentos.	69

Figura 18. Diagrama Superficie de Respuesta a) Efecto de la temperatura vs. Flujo, b) Efecto de la presión vs. Flujo, c) Efecto de la presión vs. Temperatura.....	72
Figura 19. Diagrama de interacción: (a) Presión vs. Temperatura; (b) Presión vs. Flujo y (c) Temperatura vs. Flujo.....	73
Figura 20. Superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas en función de la presión (bar) y temperatura (°C).	74
Figura 21. Superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas en función de la temperatura (°C) y flujo (g/min).....	74
Figura 22. Superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas en función de la presión (bar) y flujo (g/min).....	75
Figura 23. Cinética de la extracción optimizada del aceite de semillas de uva con CO ₂ supercrítico.	76
Figura 24. Aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO ₂ supercrítico.....	76
Figura 25. Curva de calibración de Trolox.....	84

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Composición de minerales (mg/100g muestra) de uva fresca, orujo fresco, orujo seco y semillas secas de uva	100
Anexo 2. Composición de metales pesados (ppm) de uva fresca, orujo fresco, orujo seco y semillas secas de uva	100
Anexo 3. Rendimientos del aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO ₂ supercrítico de los dieciséis experimentos sugeridos por el software Minitab (g de aceite/100g de semillas secas).....	101
Anexo 4. Gráficos de la cinética de extracción del aceite de semillas de uva con CO ₂ supercrítico para los parámetros de presión, temperatura y flujo	102
Anexo 5. Cromatograma del aceite de semillas de uva Quebranta extraído por el método convencional (hexano).....	103
Anexo 6. Cromatograma del aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO ₂ supercrítico	104

Introducción

En el Perú, la producción de uva ha ido incrementándose, teniendo como principal productor Ica, seguido por Piura y Lima. Incrementándose también la producción de pisco, llegando en el 2015 hasta los 3 434 488 litros (INEI, 2015).

Estas destiladoras de alcohol, utilizan sólo el zumo de uva para la producción de pisco, por lo que se genera una gran cantidad de residuos como el orujo, que consiste en tallos de uva (25%), semillas (25%) y pieles (50%) que no son aprovechados, de tal manera que generan un impacto ambiental negativo. Parte de estos desperdicios orgánicos son las semillas. Dentro de los compuestos activos de las semillas, se encuentran abundantes polímeros derivados de catequina y epicatequina, denominados Procianidinas. Estos compuestos tienen una variedad de efectos biológicos como la actividad antioxidante, la captación de radicales libres, antiinflamatorios, antihipertensivos, antimutagénicos, antineoplásicos, antivirales, antibacterianos, antiúlceras estomacal, antitumorales, cicatrizantes, antihiperglucémicos, cardioprotectores, antihepatóxicos, anticataratas oculares y actúan como filtros solares (Duba & Fiori, 2015; Paladino & Zuritz, 2012; Bombardelli, Morazzoni & Carini, 1997; Padley, Gunstone & Harwood, 1994).

Además, también destacan por su alto contenido de aceite, que se encuentra entre 13,0 y 18,4 % de lípidos, presentando un alto porcentaje de ácidos grasos polinsaturados. Los más abundantes son el ácido oleico y el ácido linoleico, con 22 % y 67 % respectivamente (Moya, 2017; Padley *et al.*, 1994).

Tradicionalmente los aceites de semillas se extraen mediante disolventes orgánicos o técnicas mecánicas. La extracción con solvente orgánico proporciona un mejor rendimiento

de extracción, pero la técnica requiere recuperar el solvente a través de la destilación que puede degradar los compuestos térmicamente lábiles; además, la presencia de trazas de solvente residual en el producto final hace que el proceso sea menos atractivo desde el punto de vista ambiental y de salud. En la extracción mecánica, aunque la calidad del producto es superior, proporciona un rendimiento relativamente más bajo. El uso de la tecnología de fluidos supercríticos, utiliza como solvente CO₂ supercrítico para la extracción de aceite, este posee propiedades que pueden ajustarse para proporcionar extractos con composiciones deseables y que a su vez asegura un proceso de separación inocuo tanto para la salud humana como para el medio ambiente y con una mejor calidad de los productos (Duba & Fiori, 2015; De Melo, Silvestre & Silva, 2014).

La presente investigación comprende el estudio de la extracción y optimización del aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico, además la caracterización fisicoquímica, determinación del perfil de ácidos grasos y determinación de su capacidad antioxidante. En el capítulo 1 se menciona la situación problemática relacionada a la contaminación ambiental producida por la industria alimentaria, también la formulación del problema y los objetivos, así como la justificación.

El capítulo 2, comprende el marco teórico, los antecedentes de la investigación relacionados a técnicas de extracción de aceite y las bases teóricas, donde se explica los fundamentos de la extracción con CO₂ supercrítico.

En el capítulo 3, se muestra la metodología del experimento, el diseño de investigación y los análisis que se realizaron al aceite de semillas de uva extraído con CO₂ supercrítico y con el método convencional. En el capítulo 4 se detalla los resultados obtenidos (rendimientos) de cada extracción, su interpretación y discusión, así como en el capítulo 5 las conclusiones.

Capítulo 1

Situación problemática

La producción de uva en el Perú ha ido incrementándose desde 1995 hasta el 2015, y consigo la producción de pisco, teniendo como principal productor el departamento de Ica seguido por Piura y Lima (INEI, 2015). Sin embargo, existe un desaprovechamiento potencial de los residuos generados (cáscara y semillas) por esta industria, generándose un impacto ambiental negativo (Moya, 2017), ya que este subproducto es desechado o empleado como abono sin considerar su calidad para darle un valor agregado (Navas, 2009). Tales residuos comprometen gravemente los ecosistemas por su alta concentración de materia orgánica (González-Álvarez, Hincapié, Patiño, Alzate & Benavides, 2015).

1.1 Formulación del problema

1.1.1 Problema general

¿En qué medida se puede extraer el aceite con CO₂ supercrítico de las semillas de *vitis vinífera*, variedad Quebranta, subproducto de la elaboración de pisco, cuales son las características del aceite obtenido y cuál es el nivel de actividad antioxidante?

1.1.2 Problemas específicos

- ¿Cuáles son los parámetros óptimos para extraer con CO₂ supercrítico la mayor cantidad de aceite de las semillas de uva Quebranta?
- ¿Cuáles son las características físicas del aceite extraído con CO₂ supercrítico de las semillas de uva Quebranta?
- ¿Cuáles son las características químicas del aceite extraído con CO₂ supercrítico de las semillas de uva Quebranta?
- ¿Cuál es la composición de ácidos grasos del aceite de semillas de uva extraído con CO₂ supercrítico?
- ¿En qué medida el aceite de la semilla de uva quebranta extraído con CO₂ supercrítico tiene actividad antioxidante?

1.2 Justificación

Las semillas de uva, variedad Quebranta, residuo de la elaboración de pisco, no están siendo aprovechadas, siendo desechadas o empleadas como abono sin considerar su calidad nutricional, por lo que se dan a conocer diferentes trabajos, dándole un valor agregado a este desecho orgánico (Navas, 2009).

Estas semillas son de gran importancia, ya que poseen componentes con actividades antioxidantes capaces de inactivar los radicales libres responsables de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, entre los que destacan la vitamina E, carotenoides, polifenoles, etc., ya que presentan propiedades anticarcinogénicas, antimutagénicas, antivirales (Navas, 2010).

Diferentes investigaciones han demostrado que el aceite de semilla de uva destaca por su bajo contenido en ácidos grasos saturados y alto contenido en ácido oleico, $\omega 9$ (16%- 22%) y ácido linoleico, $\omega 6$ (63% - 71%), donde este último participa en la síntesis de las prostaglandinas y además su consumo reduciría el riesgo de desarrollar problemas cardíacos y circulatorios (Hidalgo, Gómez, Rojas, M. Soliz, R. Soliz, Quiroga, Saravia & Saavedra, 2016; Navas, 2010). También contiene componentes químicos con importancia biológica debido a la actividad antioxidante, entre los cuales se incluye a los fitoesteroles, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides (Shinagawa, Santana, Torres & Mancini-Filho, 2015).

Desde el punto de vista cosmético, el aceite de semilla de uva tiene alta afinidad con la piel, lo que permite la absorción eficiente del aceite al torrente sanguíneo, esta absorción

evita la desagradable sensación grasosa que dejan otros aceites corporales, por lo que se emplea en la elaboración de cremas, pomadas, labiales y aceites para masajes (Toro & Suárez, 2012).

El presente estudio contribuirá a brindar conocimiento del contenido de antioxidantes que posee el aceite de semillas de uva Quebranta, subproducto de la elaboración de pisco, el cual no se está aprovechando en el departamento de Ica, extraído con una tecnología limpia que es la de fluidos supercríticos por ser una alternativa que no genera un impacto ambiental negativo, ya que pueden obtenerse mejores resultados por tener la capacidad de disolver o extraer un número mayor de componentes con mejor calidad y mediante un proceso más eficaz, donde los solventes utilizados no son contaminantes.

Aprovechar estos residuos orgánicos en el Perú será beneficioso para el empresario y la población, ya que dándole un valor agregado generaría menos desechos, por lo tanto se generaría un impacto ambiental favorable, disminuyendo la contaminación ambiental.

Por ello, en la presente investigación se propone el aprovechamiento de residuos, proveniente de la elaboración de pisco disponible en el departamento de Ica, con el fin de extraer los aceites ricos en ácidos grasos esenciales (ácido linoleico $\omega 6$) que presentan actividad antioxidante, y generar conocimiento sobre sus características fisicoquímicas, utilizando una tecnología limpia, como es el uso del equipo extractor multisolvente que utiliza CO_2 supercrítico para la extracción de lípidos.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Extraer el aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico, caracterizar y medir su actividad antioxidante.

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer los parámetros óptimos (presión, temperatura, flujo) para extraer con CO₂ supercrítico la mayor cantidad de aceite de semillas de uva Quebranta.
- Determinar las características físicas (índice de refracción y densidad) del aceite de semillas de uva Quebranta.
- Determinar las características químicas (índice de peróxidos, índice de anisidina, índice de acidez e índice de yodo) del aceite de semillas de uva Quebranta.
- Determinar la composición de los ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta.
- Medir la actividad antioxidante del aceite de semillas de uva Quebranta.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Antecedentes de la investigación

Se han realizado diversas investigaciones con la semilla de uva sobre la valorización de los residuos del procesamiento de uva (Rouquié, Dahdouh & Delalonde, 2017) con la finalidad de darle valor a los residuos generados de las agroindustrias (vinícolas y pisqueras). Este residuo destaca por su contenido graso, ya que contiene ácidos grasos insaturados de gran valor, los cuales se estudiaron y evaluaron el rendimiento de extracción del aceite de semillas de uva, determinando también su caracterización y/o actividad antioxidante.

Estudios realizados demuestran que, el aceite extraído de las semillas de uva, independientemente de la variedad, posee como ventaja elevar el colesterol bueno HDL (High Density Lipoprotein) y reducir el colesterol malo LDL (Light Density Lipoprotein), lo cual es atribuido al alto contenido del ácido graso esencial linoleico ($\omega 6$). Así también, el aceite de semillas de uva reduce la agregación plaquetaria, ayuda a prevenir la hipertensión y a normalizar las lesiones causadas por la diabetes y la obesidad. Dentro de los compuestos activos se encuentran los polímeros derivados de catequina y epicatequina, denominados procianidinas, importantes por su actividad antioxidante (Mieres, Andrade, García & Londoño, 2012; Guerra & Zuñiga, 2003).

Gomez & Huacayo (2014) lograron extraer el aceite de semillas de uva mediante la técnica de prensado en frío a temperatura por debajo de 40 °C, logrando rendimientos del 7,2% a partir de la semilla seca. Encontraron también que la actividad antioxidante medido por el método DPPH del aceite fue 9,50 mM equivalente de Trolox.

El rendimiento de extracción del aceite de semilla de uva es fuertemente influenciado por el tamaño de partícula indican Farías & Matos (2009). Ellos realizaron la extracción por el método tradicional soxhlet, utilizando hexano como solvente, tomando en cuenta dos tamaños de partículas (0,8 y 2,6 mm) y dos temperaturas (70 y 90 °C). Para ambas temperaturas se encontraron mayor rendimiento de extracción con el menor tamaño de partícula (0,8 mm) que va desde 12,9% hasta 17,26% y con el mayor tamaño (2,6 mm) desde 3,94% hasta 4,54%.

Moya (2017) realizó la extracción del aceite de semillas de uva Borgoña mediante la técnica de prensado hidráulico empleando enzimas. Utilizando un tamaño de partícula de 0,5 mm encontró $9,03 \pm 0,61\%$ g de aceite extraído/100g de muestra seca. Determinó también el perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva, destacando los ácidos linoleico, oleico y palmítico, con $69,78 \pm 0,035\%$, $17,37 \pm 0,063\%$ y $7,72 \pm 0,148\%$ respectivamente.

Toro & Suárez (2012) realizaron la extracción de aceite utilizando el método tradicional soxhlet con hexano. Determinaron la caracterización del aceite de semillas *Vitis labrusca L*, encontrando importantes ácidos grasos como el linoleico (53,843%), el oleico (24,671%) y el palmítico (13,922%), y en pequeñas concentraciones los ácidos esteárico (4,81%), palmitoleico (0,550%), margárico (0,123%), y una alta actividad atrapadora del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) (42,62% de inhibición). Determinaron también su densidad ($0,9246 \text{ g/cm}^3$) e índice de refracción (1,4753 a 23 °C), y de acuerdo a la caracterización química el índice de acidez (2,1870 % de ácido oleico), índice de peróxidos (0 meq de O₂/kg), índice de saponificación (175,1161) meq KOH/g) e índice de yodo (136,6853 cg de I₂/g).

Lutterodt, Slavin, Whent, Turner & Yu (2011) extrajeron el aceite de semillas de uva por la técnica de prensado en frío, obteniendo ácidos grasos en abundancia como el linoleico

desde 66 g hasta 75,3 g/ 100g de ácidos grasos totales del aceite de semillas, y bajo en grasas saturadas. También midieron la actividad antioxidante utilizando el radical DPPH, que varió de 0,07 a 2,22 mmol equivalentes en trolox (TE) / g de aceite.

Así también Molero, Pereyra & Martínez (1996) realizaron una comparación del aceite de semillas de uva tipo Airen extraído con CO₂ supercrítico a 350 bar, 40 °C por 3 horas con el método convencional utilizando hexano como solvente por 20 horas, donde reportaron la composición de los ácidos grasos linoleico con 67,39 y 66,16%, oleico 19,06 y 19,59%, esteárico 5,07 y 5,60% linolénico 0,30 y 0,37%, palmitoleico 0,15 y 0,15% respectivamente.

Beveridge, Girard, Kopp y Drover (2005) extrajeron el aceite de semillas de uva con dióxido de carbono supercrítico de ocho variedades. Dichas extracciones duraron 6 horas, con una presión de 365 bar, 65 °C y con un flujo de CO₂ de 60 g/min. Encontrando rendimientos que variaron desde el 5,85% hasta 13,6%.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Generalidades de la vid (*Vitis vinífera*)

Es una planta leñosa trepadora que alcanza hasta más de 30 m si se deja crecer libremente. Su fruto, una baya comestible denominada uva, es redonda y encierra a las semillas llamadas pepitas, las cuales en número están de una a cuatro en el caso de las variedades iqueñas (CEDEP, 2007).

En nuestro país existen variedades de *Vitis vinífera* que se pueden agrupar a lo más en tres clases: para mesa, para vinos y piscos, y para pasas. Entre las variedades de uvas pisqueras tenemos la Quebranta, Italia, Negra Corriente, Moscatel, Albilla, Torontel (CEDEP, 2011).

2.2.2 Clasificación taxonómica de la vid (*Vitis vinífera*)

El Centro de Estudios para el Desarrollo y la Participación (2007) menciona que la vid, dentro del reino vegetal, está clasificada de la siguiente forma:

Tipo	: fanerógamas
Subtipo	: Angiosperma
Clase	: Dicotiledóneas
Grupo	: Dialipétalas
Orden	: Ramnales
Familia	: Vitáceae
Género	: Vitis
Especie	: Vitis vinífera

En nuestro país se encuentran variedades que se agrupan en las siguientes clases: Para mesa, vinos, piscos, y pasas; siendo la uva quebranta, la utilizada para uva de mesa como para vinificación (vinos tintos y rosados) y elaboración de pisco.

2.2.3 Uva Quebranta

La uva Quebranta, es una variedad de uva negra, resultado de la adaptación de una variedad de las Islas Canarias al clima peruano, por ello, se considera como una variedad propia del Perú. Es de color rosado violáceo de buen vigor que se utiliza para la elaboración de piscos no aromáticos (Ver figura 1). Su racimo es de forma cónica mediano, y la baya ovalada con diámetros de 1.5 cm. La cáscara es delgada y frágil con gran riqueza en azúcares pero bajo contenido de acidez (4 a 4,5 g/L de ácido tartárico) y su principal lugar de producción es Ica (Hatta, 2004; CEDEP, 2012).



Figura 1. Racimo de uva Quebranta.

Fuente: CITE agroindustrial, 2000.

Es la variedad pisquera más importante, apreciada por su productividad, desarrollando características ideales para un destilado de alta calidad. Considerada una mutación de la negra Criolla, pero también vinculada a la Mollar; no se podría descartar un origen común con ésta ya que ambas comparten perfiles organolépticos similares y han convivido en viñedos por mucho tiempo.

Las uvas negras fueron uno de los muchos insumos que trajeron los españoles. La “negra criolla” y la “mollar” son dos variedades de la fruta que llegó con la conquista. Al ser combinadas con el clima pedregoso y desértico de la región costera de Paracas, adquirieron nuevas características. El resultado fue la uva “Quebranta”, mantenida imperturbable durante más de 400 años de historia (Wong, 2013).

2.2.4 Producción de uva en el Perú y en el mundo

La producción de uva en el Perú ha tenido un incremento acelerado desde 1995 hasta el 2015 (véase Figura 2). De acuerdo al Ministerio de la Producción, en el 2015 se ha logrado una producción nacional de 597 939 toneladas de uva, siendo el principal departamento productor Ica, seguido por Piura y Lima.

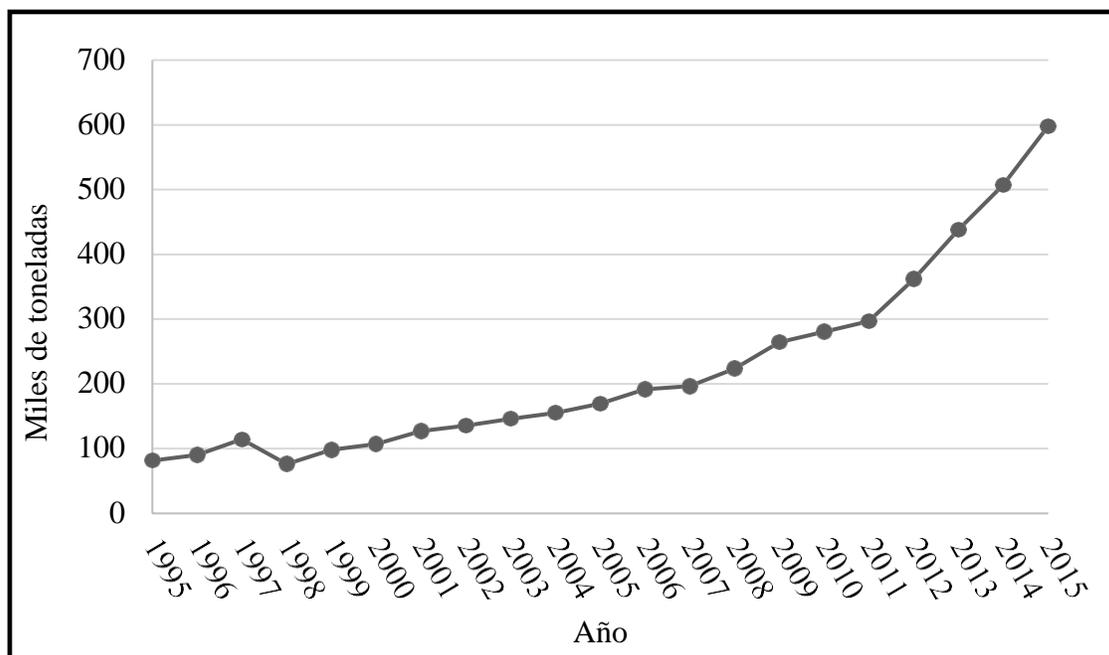


Figura 2. Evolución de la producción a nivel nacional de uva (miles de toneladas) 1996-2015.

Fuente: INEI, 2015 & MINAG, 2015.

La producción mundial de uva alcanzó los 75,8 millones de toneladas en el 2016 (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2017), donde los principales productores son Italia, Francia y España (Toro & Suarez, 2012). Cabe señalar que el 72% de la producción mundial de uva es destinada para la elaboración de vinos, 21,5% como uva de mesa y el 6,5% como uva seca (PNUD-Citevid, 2004).

2.2.5 Pisco

La NTP 211.001 define el Pisco como un aguardiente obtenido exclusivamente por destilación de uvas pisqueras (Quebranta, Negra Criolla, Mollar, Italia, Moscatel, Albilla, Torontel, Uvina). Está constituido por una variedad de compuestos volátiles, como terpenos, alcoholes superiores, ésteres, metanol, acetaldehído, ácido acético y furfural (Hatta, Domenech & Palma, 2009).

El sabor y aroma de pisco son otorgados por el sabor de la fruta y flores, dependiendo de la variedad de uva empleada y también por la presencia de algunos compuestos formados durante los procesos de fermentación y destilación (Toledo, 2012).

Los tipos de pisco según la NTP 211.001 son:

- a) **Pisco puro:** Es el pisco obtenido exclusivamente de una sola variedad de uva pisquera.
- b) **Pisco mosto verde:** Es el pisco obtenido de la destilación de mostos frescos de uvas pisqueras con fermentación interrumpida.
- c) **Pisco acholado:** Es el pisco obtenido de la mezcla de uvas pisqueras, aromáticas y/o no aromáticas. Mostos de uvas pisqueras aromáticas y/o no aromáticas. Mostos frescos completamente fermentados (vinos frescos) de uvas aromáticas y/o no aromáticas, y piscos provenientes de uvas pisqueras aromáticas y/o no aromáticas.

2.2.6 Producción de pisco en el Perú

La producción de pisco en el Perú según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (2015) ha ido aumento desde 2012 hasta el 2015, con 2 829 893 litros y 3 434 488 litros respectivamente, como se muestra en la Figura 3.

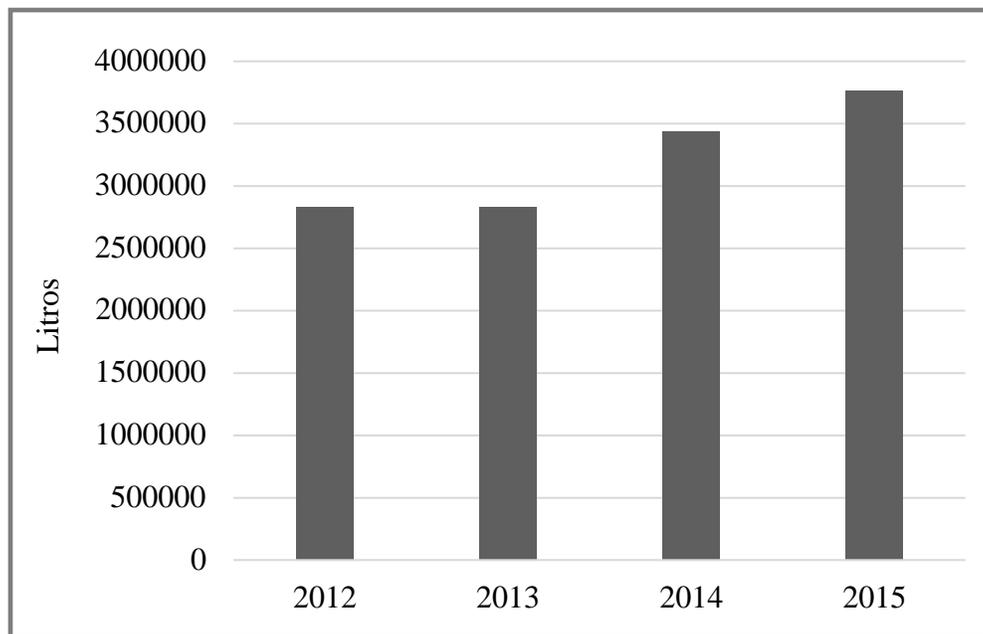


Figura 3. Producción de pisco en el Perú (litros) 2012-2015.

Fuente: INEI, 2015.

Esta producción genera desechos que no tienen ningún otro uso industrial, ya que no son aceptados en la producción debido a que sus componentes alteran su sabor o le proporciona una textura mucho más áspera al degustarlo. No utilizan las semillas para hacer nuevas plantaciones de uva, puesto que aplican la técnica de acodo (enterrar un sarmiento para hacer brotar raíces), y el orujo normalmente se destina para alimentar a los animales (Ramos, 2015).

2.2.7 Desechos de la producción de pisco

El principal desecho que se genera tras la elaboración de pisco es el orujo.

2.2.7.1 Orujo

El orujo es el resto sólido excedente de la producción de vinos y piscos. Luego de la vendimia, quedan partes sólidas que no generan ningún valor agregado a la elaboración de vinos o piscos (Ramos, 2015).

El orujo consiste en tallos de uva (25%), semillas (25%) y pieles (50%) que no son aprovechados, de tal manera que generan un impacto ambiental negativo (Duba & Fiori, 2015).

2.2.7.2 Semillas de uva

Las semillas están formadas por dos capas envolventes, a modo de corteza y por un contenido llamado albumen, donde en su interior y en la parte angosta de la semilla, se encuentra el germen o embrión de la nueva planta. Las capas exteriores se conocen como testa y tegmen, que son leñosas y duras, además de ser ricas en taninos. El albumen, donde descansa el embrión, contiene aceite, llamado aceite de semilla de uva, el cual se puede extraer de distintas maneras. El aceite bruto de estas semillas se enrancia muy rápido al contacto con el aire y si entra en la producción de vino y piscos les agregaría un olor y sabor desagradables (Ramos, 2015).

Las semillas representan el 10 a 12% del 100% de orujo húmedo. El procesado de estas semillas no es fácil, dada su naturaleza leñosa, que la hace difícil de laminar (véase Figura 4) (Moya, 2017).

Se ha encontrado que uno de los principales beneficios que tienen las semillas de uva para la salud es que tienen gran cantidad de antioxidantes OPC (complejos oligo-méricos y poliméricos), incluso mayor a los encontrados en el hollejo y en el vino, los cuales protegen

al organismo de los radicales libres, evitando así el envejecimiento y deterioro prematuro de órganos, tejidos y células. Así también, contiene vitaminas C, E, betacaroteno, aparte de bioflavonoides y otros antioxidantes, como los esteroides y los tocoferoles que potencializan su capacidad antioxidante (Hidalgo *et al.*, 2016).



Figura 4. Semillas de uva.

Fuente: CITE agroindustrial, 2000.

Las semillas de la baya corresponden hasta un 6% del peso total de la uva y están compuestas principalmente de agua (25-45%), compuestos glucídicos (34-36%), taninos (4-10%), compuestos nitrogenados (4-6,5%), minerales (2-4%), lípidos (13-20%) (Zuñiga, 2005).

2.2.8 Aceite de semillas de uva

El aceite de semillas de uva consiste en triglicéridos principalmente, que son ricos en ácidos grasos insaturados como el ácido oleico y linoleico (Hanganu, Todasca, Chira, Maganu & Rosca, 2012).

A continuación se muestra la norma del Codex Alimentarius (CODEX STAIN 210-1999) que estableció características físicas y químicas para el aceite de semillas de uva que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Características físicas y químicas del aceite de semillas de uva

Características	Valor
Densidad relativa (x° C la agua a 20°C)	0,920- 0,926
Densidad aparente (g/ml)	x=20°C
Índice de refracción (ND 40°C)	1,467- 1,477
Índice de yodo	128-150

Fuente: CODEX, 1999.

Este aceite es rico en ácidos grasos insaturados, que representan más del 89% de la composición total del aceite, muchos de los cuales son ácidos grasos esenciales (Davidov-Pardo & McClements, 2015), tal como se evidencia en la Tabla 2 según la norma CODEX STAIN 210-1999.

Tabla 2

Composición de ácidos grasos del aceite de semillas de uva determinado mediante CGL (% del total de ácidos grasos)

Ácidos grasos	Valor
C6:0	ND
C8:0	ND
C10:0	ND
C12:0	ND
C14:0	ND-0,3
C16:0	5,5-11,0
C16:1	ND-1,2
C17:0	ND-0,2
C17:1	ND-0,1
C18:0	3,0-6,5
C18:1	12,0-28,0
C18:2	58,0-78,0
C18:3	ND-1,0
C20:0	ND-1,0
C20:1	ND-0,3
C20:2	ND
C22:0	ND-0,5
C22:1	ND-0,3
C22:2	ND
C24:0	ND-0,4
C24:1	ND

ND – no detectable, definido como = 0.05 %

Fuente: CODEX, 1999.

2.2.9 Propiedades del aceite de semillas de uva

El aceite de semillas de uva tiene propiedades terapéuticas excepcionales. Su aplicación es muy amplia, desde la cosmética hasta la industria alimentaria (Hanganu *et al.*, 2012).

El alto contenido de ácidos grasos insaturados (alrededor del 85-90%) convierten el aceite en un producto de alta calidad nutricional, que presenta propiedades para la prevención de trombosis, habitabilidad de enfermedades cardiovasculares, reducción de colesterol en el suero, dilatación de los vasos sanguíneos y la regulación de los nervios autónomos (Luque-Rodriguez, Luque de Castro & Pérez-Juan, 2005).

Además, el aceite de semilla de uva contiene niveles altos de taninos a comparación de otros aceites de semillas y 0,8-1,5% de lípidos insaponificables, principalmente esteroides, como el β -sitosterol, campesterol y stigmasterol. La actividad antioxidante de estos compuestos hace que este aceite sea muy resistente a la peroxidación y adecuado para usarlo como ingrediente cosmético. En este sentido, se usa para el tratamiento de piel seca y protección contra el envejecimiento. Ayuda a equilibrar el pH de la piel, es hipoalergénico, no irrita la piel y ayuda piel irritada para volverse suave y calmada (Luque-Rodriguez *et al.*, 2005). Además el β -sitosterol puede prevenir la liberación de mediadores proinflamatorios por el macrófago oxidado de lipoproteína de baja densidad (LDL) sobre el estrés oxidativo y la síntesis de eicosanoides (Vivancos & Moreno, 2008).

Otro componente que posee el aceite de semillas de uva es la vitamina E, conocido como tocotrienol, que posee efectos antitumorales y antioxidantes (Shinagawa *et al.*, 2015).

2.2.10 Ácidos grasos insaturados

Ácidos grasos con uno o más enlaces dobles presentes en los triglicéridos líquidos a temperatura ambiente (aceites). Son de origen tanto animal como vegetal. Los ácidos grasos monoinsaturados se encuentran principalmente en aceites vegetales (en proporciones variables de mayor a menor en: aceite de oliva, ajonjolí, soya, girasol y algodón) y en la palta.

Estos ácidos monoinsaturados disminuyen la oxidación de colesterol LDL y cuando reemplazan a los ácidos grasos saturados disminuyen el colesterol LDL sin mayor cambio en el colesterol HDL. Los ácidos grasos poliinsaturados de las series omega 3 y omega 6 son considerados esenciales desde el punto de vista nutricional (Rengifo, 2014).

2.2.11 Ácidos grasos esenciales (AGE)

Los lípidos dietarios son una gran familia de compuestos de naturaleza apolar. La mayoría de ellos pueden ser sintetizados por células de mamíferos, exceptuando algunos ácidos carboxílicos específicos, conocidos como ácidos grasos esenciales (AGE) (Galgani, 2004), debido a la falta de enzimas responsables de la síntesis de estos ácidos grasos. Por ello, es necesario su ingesta diaria (Göktürk & Akkurt, 2001).

Estos son los ácidos linoleico (AL) y linolénico (ALN). Su importancia nutricional radica fundamentalmente en ser precursores de ácidos grasos de mayor longitud de cadena y grado de insaturación (ácido araquidónico -AA- y ácido docosahexaenoico -DHA-), los que poseen potentes efectos biológicos. De esta forma, los AL y ALN pudieran ser prescindibles en la dieta si los AA y DHA son ingeridos en cantidad suficiente (Galgani, 2004).

2.2.12 Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los cuales son captados por los radicales libres, cumpliendo una función preventiva en el desarrollo del envejecimiento y de ciertas enfermedades neurodegenerativas (Toro & Suárez, 2012).

El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, su acción se debilita y en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (García, L., García, L. V., Rojo & Sánchez, 2001).

Muchos de los compuestos antioxidantes poseen actividades antiinflamatorias, antiateroscleróticas, antitumorales, antimutagénicas, anticancerígenas, antibacterianas y antivirales en mayor o menor medida (Uttara, Singh, Zamboni & Mahajan, 2009). Los cuales se ha clasificado en endógenos (sintetizados por el organismo) como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, entre otros, y exógenos, (provenientes de fuentes externas) los cuales se encuentran en los alimentos naturales, como las vitaminas A, E y C, los β -carotenos, luteína, flavonoides, licopeno, ácido tióico o lipoico, los cofactores (cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio) que son necesarios para la actividad del sistema enzimático endógeno (Delgado, Betanzos & Sumaya, 2010).

2.2.12.1 Determinación de la actividad antioxidante

Brand-Williams, Cuvelier & Berset, (1995) mencionan que se han utilizado diferentes métodos para medir la resistencia de un lípido a la oxidación cuando se encuentran en presencia de posibles antioxidantes. Estas pruebas generalmente se realizan en un medio lipídico o de emulsión. Pues la autooxidación es un proceso lento y radical que se desarrolla a través de una reacción en cadena incluidos los pasos de inducción, propagación y terminación. Durante el período de inducción, se forman radicales alquilo que experimentan reacción con moléculas de oxígeno para formar hidroperóxidos y radicales de peróxido durante la fase de propagación.

Un método que se utiliza para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos, es utilizando un radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

(Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995), el cual consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hasta un amarillo pálido por la presencia de compuestos antioxidantes, en este proceso se da la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante, y que es medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 517 nm. Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden tal que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo (Guija-Poma, Inocente-Camones, Ponce-Pardo & Zarzosa-Norabuena, 2015; Ramos, Castañeda & Ibáñez, 2008).

2.2.13 Radicales libres (RL)

Un radical libre tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, además por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial. De hecho un radical libre puede afectar un millón de moléculas durante la reacción en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de las llamados especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species) (Coronado *et al.*, 2015).

Los radicales libres se liberan durante el metabolismo humano, y también se producen por contaminantes ambientales, (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Se pueden relacionar con el consumo o uso de tóxicos como el alcohol, tabaco y drogas o debido a una alimentación no adecuada,

exposición a fertilizantes o pesticidas. Se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psíquico (Coronado *et al.*, 2015).

2.2.14 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Son una variedad de moléculas y radicales libres con un electrón desapareado, que derivan del oxígeno (molécula básicamente oxidante), a tal punto que es el principal responsable de la producción de las especies reactivas de oxígeno, y se les conoce como moléculas radicales y no radicales siendo agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (Avello & Suwalsky, 2006; Turrens, 2003).

Estas moléculas (ERO) se vuelven muy reactivas ya que toman el electrón que les hace falta de una molécula vecina, provocando así la oxidación de ésta última, convirtiéndose en un RL, capaz de oxidar a otra molécula cercana, induciendo una reacción en cadena (Delgado *et al.*, 2010).

2.2.15 Estrés oxidativo (EO)

El aumento de la concentración de RL, provoca un desbalance entre la velocidad de formación y su neutralización por el sistema antioxidante endógeno en el organismo, dando lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo (EO), capaz de producir severos daños celulares (Delgado *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas, en donde hay una asociación directa o indirecta con la exposición a los radicales libres. Ejemplos de estas patologías son: la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer, el Alzheimer, Parkinson, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, catarogénesis, degeneración de la retina, fibroplasia retrolental, enfermedades autoinmunes, artritis

reumatoide, diabetes mellitus, síndrome metabólico, anomalías cardiovasculares, hipertensión, trastornos nefrológicos, enfisema pulmonar, infarto, artritis reumatoide, anemia, hepatitis, pancreatitis, envejecimiento, enfermedad de Werner (envejecimiento prematuro), aparición de arrugas prematuras y la resequedad de la piel, disfunción endotelial, dermatitis, entre otras (Delgado, Betanzos & Sumaya, 2010; Avello & Suwalsky, 2006; Tomás-Barberán, 2003;)

El oxígeno, que es necesario para la vida, es también indirectamente responsable de muchos efectos negativos. Éstos son debidos a la producción de radicales libres, que son tóxicos para las células (anión superóxido, radical hidroxilo, peroxilo, peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y peroxinitritos). Estos radicales libres son responsables del daño celular que se puede producir indirectamente por deterioro oxidativo en ácidos grasos insaturados y ADN. Los sistemas de defensa del organismo incluyen a determinados enzimas y a los neutralizadores (captadores) de radicales libres. Los últimos son moléculas fácilmente oxidables. Los sistemas neutralizadores de los radicales libres utilizan varios mecanismos como son las vitaminas (E y C), los enzimas (superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa, etc.) y otros captadores de radicales no-vitamínicos de la dieta entre los que destacan los polifenoles. La eficacia de este sistema depende de factores relacionados con el genoma, como es el caso de los sistemas enzimáticos de defensa, y de la nutrición para los captadores de radicales vitamínicos o no-vitamínicos (Tomás-Barberán, 2003).

2.2.16 Tipos de extracción del aceite

A través del tiempo los aceites provenientes de semillas oleaginosas de distintas clases han tenido diferentes usos y aplicaciones, también se han creado diversos métodos para la extracción del mismo, sin embargo un paso básico para esta extracción es la trituración de la

semilla. Actualmente la extracción de aceite para los diferentes tipos de semillas sin importar las características específicas de estas se lleva a cabo con equipos genéricos (Arce, 2015).

Los principales métodos de extracción de los aceites son la extracción mecánica, extracción con solventes.

2.2.16.1 Extracción mecánica del aceite

La extracción mecánica de aceite se realiza a través de máquinas con diferentes aplicaciones tecnológicas, que tiene como propósito aplicar presión sobre las semillas para extraer el aceite. Generalmente utilizan prensas tipo Ram o Expeller. La tipo Ram constan de un cilindro y un pistón en las que se aumenta la presión hasta extraer el aceite, y las de tipo Expeller está conformada por un tornillo y una camisa, donde a medida que avanza el tornillo aumenta la presión y provoca la salida del aceite (Arce, 2015).

2.2.16.2 Extracción con solventes

La extracción normalmente se lleva a cabo con el equipo soxhlet, es una técnica convencional para extraer lípidos. Las desventajas que presenta es el uso de grandes volúmenes de disolventes peligrosos e inflamables. Posibles emisiones tóxicas durante la extracción, el uso de solventes costosos y de alta pureza, se trata de un procedimiento laborioso y lento (Naudé, De Beer, Jooste, Van Der Merwe & Van Rensburg, 1998).

Los procesos de extracción deben ser amigables con el medio ambiente y no causar problemas de contaminación, y esta técnica de extracción no cumple con este criterio, ya que genera volúmenes de contaminación (Naudé *et al.*, 1998).

2.2.16.3 Extracción con enzimas

Los efectos de utilizar enzimas en el campo alimentario han sido estudiados, ya que se extraen rendimientos elevados de los aceites y mayor calidad de la torta. Sin embargo, un impedimento para su uso, es que el costo de la enzima es muy alto y velocidad de reacción es lenta (Nazir *et al.*, 2009).

Este proceso es muy similar a la extracción de aceite con agua, solo que a la solución, después de regular el pH, se agrega una mezcla de enzimas como la lipasa, celulosa, ultra SP-L, promozima. Cabe anotar que mediante este método, usando enzimas acuosas y bajo unas condiciones de operación óptimas, algunos autores afirman que se puede extraer hasta el 75% del aceite presente en la semilla (Arce, 2015).

2.2.16.4 Extracción asistida por microondas

La extracción de lípidos asistida por microondas se caracteriza por ser una técnica que disminuye el tiempo y aumenta la eficiencia del proceso. Este método fue comparado con otros procedimientos de destrucción celular como autoclave, molino de bolas, resonancia inducida y shock osmótico, seguidos todos por una extracción con la mezcla metanol-cloroformo (González *et al.*, 2009).

2.2.17 La tecnología de los fluidos supercríticos (FSC)

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia que se encuentra por encima de su temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c), y se caracteriza por tener propiedades intermedias entre los líquidos y gases. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas

propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Vivar, 2013; Velasco *et al.*, 2007).

La Figura 5 presenta la relación de los estados sólido, líquido y gaseoso en función de la temperatura y presión, donde en el punto triple coexisten las tres fases. Cuando la sustancia está por encima de su punto crítico no es un líquido ni un gas propiamente dicho, pero posee propiedades de ambos. En este estado, el material es compresible, ya que se comporta como un gas, llena y toma la forma de su contenedor (características que no tiene cuando está en estado líquido), no obstante tiene la densidad y poder disolvente de un líquido (Vásquez, 2008).

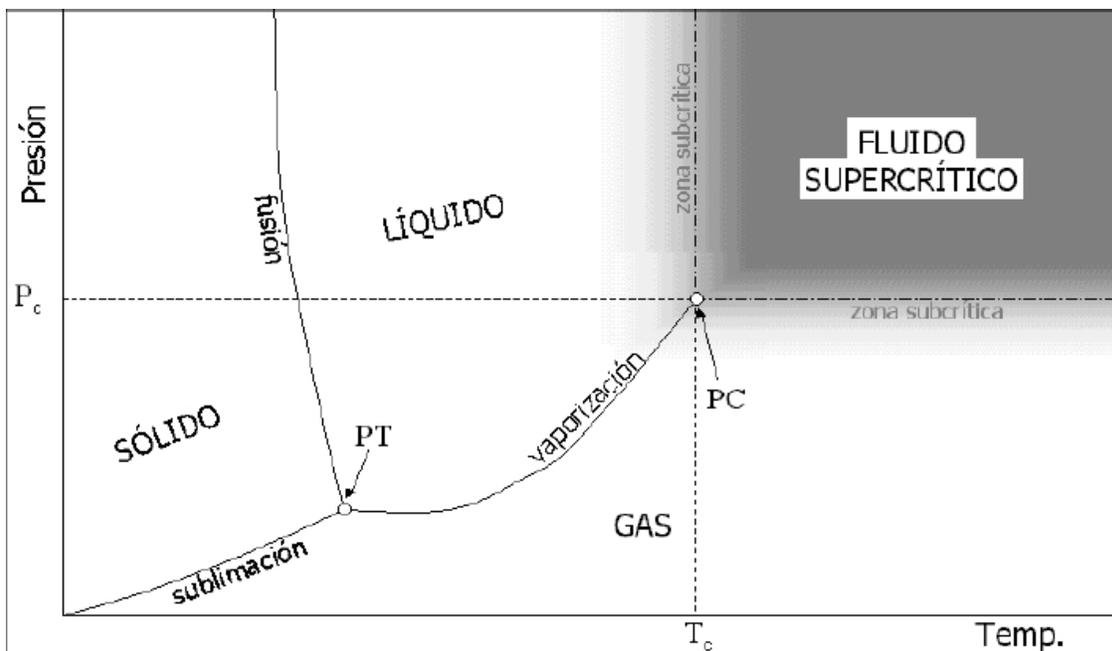


Figura 5. Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT punto triple, PC: punto crítico, P_c : presión crítica, T_c : Temperatura crítica.

Fuente: Velasco, 2007.

Los FSC tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Velasco, 2007), ya que tienen alta difusividad y menor densidad, viscosidad y tensión superficial (Conde, 2009).

En la Tabla 3 se muestran las propiedades críticas de algunos compuestos comúnmente usados como fluidos supercríticos, con sus respectivos valores de temperatura crítica (T_c), presión crítica (P_c), densidad crítica (ρ_c) y parámetro de solubilidad (δ).

Tabla 3
Condiciones críticas de diferentes fluidos

	T_c (°C)	P_c (atm)	ρ_c (g cm ⁻³)	δ (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})
Helio	-268	2,2	0,070	1,0
Hidrógeno	-240	12,8	0,031	2,6
Nitrógeno	-147	33,5	0,313	4,7
Xenón	16,6	57,6	1,113	6,1
Dióxido de carbono	31	72,9	0,466	7,5
Etano	32,2	48,2	0,203	5,8
Óxido Nitroso	36,4	71,5	0,452	7,2
Hexafluoruro de azufre	45,5	37,1	0,738	5,5
Amoniac	132,4	111,3	0,235	9,3
n-Butano	152	37,5	0,228	5,3
Dióxido de nitrógeno	158,3	100	0,271	11,0
n-Pentano	196,5	33,3	0,237	5,1
n-Hexano	234,2	29,3	0,233	4,9
Metanol	239,4	79,9	0,272	8,9
Acetonitrilo	274,8	47,7	0,253	6,3
Agua	374,1	217,6	0,322	13,5

Fuente: Velasco, 2007.

2.2.17.1 Ventajas de los fluidos supercríticos

Según Ruiz (1996) y Velasco (2007) existen diversas ventajas sobre la aplicación de los fluidos supercríticos:

1. Se requiere menores tiempos de extracción.
2. Poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos.
3. Existe una fácil separación de los solutos del fluido supercrítico. Esto no es posible en las extracciones convencionales, produciéndose contaminaciones indeseables del producto.
4. Ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea.
5. La selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de operación temperatura (sin afectar los compuestos termolábiles) y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico.
6. Posibilidad de realizar fraccionamientos.
7. La extracción con fluidos supercríticos no deja residuos químicos.
8. La extracción con CO₂ supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje.

2.2.17.2 El CO₂ como fluido supercrítico

El CO₂ (dióxido de carbono) es el fluido supercrítico comúnmente utilizado en aplicaciones de alimentos, debido a que no es tóxico, no es inflamable, no es corrosivo, es incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar (Tabla 3), se consigue con diferentes grados de pureza, se

puede trabajar a bajas temperaturas, por lo tanto, se pueden separar compuestos termolábiles. Se puede obtener a partir de procesos de fermentación alcohólica y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos. Además, el CO₂ disuelve compuestos no polares o ligeramente polares; la potencia del disolvente para compuestos de bajo peso molecular es alta y disminuye al aumentar el peso molecular; tiene alta afinidad con compuestos orgánicos oxigenados de peso molecular medio; los ácidos grasos libres y sus glicéridos exhiben bajas solubilidades; los pigmentos son aún menos solubles; el agua tiene baja solubilidad a temperaturas menos a 100 °C; las proteínas, polisacáridos, azúcares y sales minerales son insolubles; y es capaz de separar compuestos que son menos volátiles (Velasco, 2007; Brunner, 2005).

2.2.17.3 Extracción con CO₂ supercrítico

La extracción con fluidos supercríticos ha ido ganando una aceptación mucho más amplia. Potencialmente causa menos condiciones adversas al aceite, debido a la baja temperatura del fluido extractante, que generalmente es CO₂ para el caso de los lípidos. La temperatura y presión óptimas son críticas porque afectan el rendimiento de extracción y la composición del extracto. Además, existe una reducción significativa en el uso de disolventes orgánicos y reducción de desperdicios (Sahena *et al.*, 2009).

La extracción supercrítica ocurre básicamente en dos pasos: la solubilización de los compuestos químicos presentes en la matriz sólida y su separación en el solvente supercrítico. Durante la extracción, el solvente fluye a través de la matriz, solubilizando los compuestos que este contiene. Después, el solvente sale del extractor que contiene los compuestos solubilizados, y por reducción de presión y/o aumento de la temperatura, se elimina el disolvente del extracto (Da Silva *et al.*, 2015).

La tendencia de la curva de extracción puede verse afectada fácilmente por la velocidad del flujo del disolvente y el tamaño de las partículas.

La curva de extracción se divide en tres periodos (Figura 6) diferentes:

- a) **Periodo de extracción constante (CER; siglas en inglés de Constant Extraction Rate):** donde la superficie externa de las partículas se cubre con soluto (soluto fácilmente accesible) y la convección es el mecanismo dominante de transferencia de masa.
- b) **Periodo de caída de la extracción (FER; siglas en inglés de Falling Extraction Rate):** donde aparecen fallas en la capa externa de aceite y el mecanismo de difusión comienza a operar de forma combinada con la convección.
- c) **Tasa de extracción baja (LER; siglas en inglés de Low Extraction Rate):** o período controlado por difusión (DC), donde la capa externa de aceite prácticamente ha desaparecido y la transferencia de masa se produce principalmente por difusión dentro de las partículas sólidas (Da Silva *et al.*, 2015).

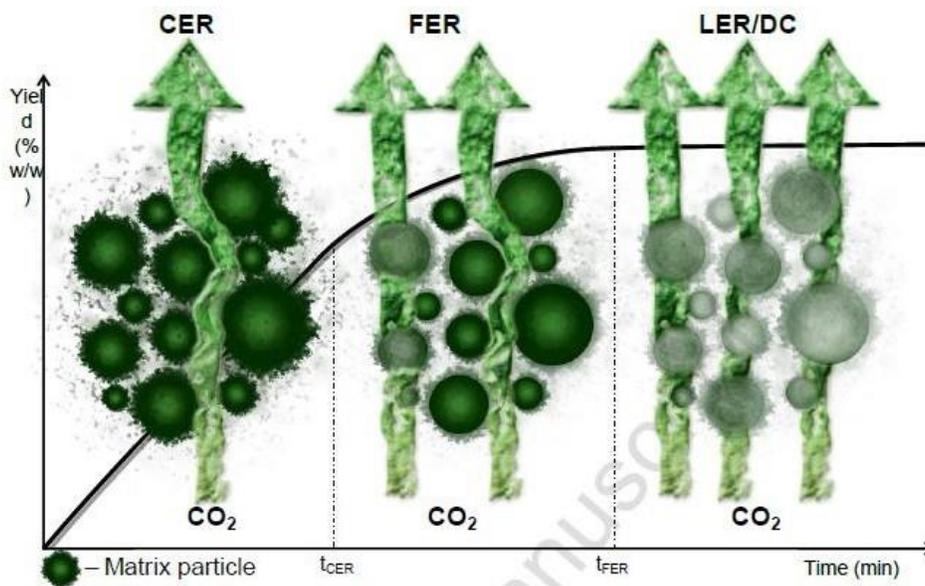


Figura 6. Los tres periodos diferentes de extracción y la curva de extracción.

Fuente: Da Silva *et al.*, 2015.

2.2.17.4 Características del aceite obtenido con CO₂ supercrítico

Tiene una serie de ventajas en relación con el obtenido con disolvente como el hexano, pues, tiene un contenido de Fe y P más bajo, debido a la baja solubilidad de los fosfolípidos. El aceite obtenido es menos coloreado debido a la baja solubilidad de los carotenos y otros pigmentos en el CO₂ supercrítico, por lo que no es necesario refinarlo. La aplicación de la tecnología verde, da lugar a un aceite que está compuesto casi exclusivamente por lípidos no polares, sin contaminación con fosfolípidos (Ciani *et al.*, 2002).

2.2.17.5 Aplicaciones agroindustriales con FSC

La extracción con FSC es altamente efectivo para aplicaciones alimentarias, químicas, de eliminación de residuos y en la industria del petróleo (Velásquez, 2008). Tiene aplicaciones como el fraccionamiento de aceites y grasas, extracción de antioxidantes naturales,

extracción de alcaloides, aromas y especias (Velasco *et al.*, 2007) y principalmente la extracción de aceites alimentarios (Esquível & Bernardo-Gil, 1993).

Las aplicaciones de la extracción supercrítica se detallan a continuación (Vivar, 2013):

- En los aceites vegetales:

Extracción de aceites comestibles de soja, cacahuete, colza.

Extracción de aceite de oliva.

- En las grasas animales:

Purificación de aceites animales.

Extracción de colesterol de aceites de pescado y carnes rojas.

- En los aditivos:

Extracción de aceites esenciales de naranja y plantas aromáticas.

Extracción de colorantes alimentarios.

Extracción de pimentón y mostaza.

- En las bebidas:

Extracción de lúpulo.

Extracción de aromas de bebidas alcohólicas.

- En los lácteos:

Extracción del colesterol de la leche.

Fraccionamiento de ácidos grasos de la leche.

2.2.18 Métodos de análisis de aceites

2.2.18.1 Índice de peróxidos

Los peróxidos son producto de la degradación lipídica provocada por el oxígeno frente a los ácidos grasos no saturados, en presencia de factores prooxidantes. Su determinación se realiza por titulación yodométrica, utilizando almidón como indicador (Parada, 2005).

Este índice indica el estado de oxidación inicial del aceite en miliequilaventes de oxígeno activo por kilogramo de aceite o grasa, permitiendo detectar la oxidación antes de que se note organolépticamente (Ayala, 2011).

2.2.18.2 Índice de anisidina

La utilidad del índice de peróxidos se limita a medir las etapas iniciales de reacción de la oxidación lipídica. Por ello, la historia oxidativa completa de un aceite no se revela en su índice de peróxidos. El índice de anisidina es un parámetro adecuado para evaluar su historia y prever su comportamiento futuro, cuanto mayor sea su índice de anisidina menor será su tiempo de inducción, o sea, menor el periodo de tiempo en el que esencialmente no hay oxidación y por lo tanto, la formación de peróxidos es nula o muy pequeña, y la autooxidación del material graso comenzará más rápidamente (Grompone, 1991).

La NTP 209.217 define por convención como 100 veces la absorbancia medida en una celda de 1 cm de una solución resultante de la reacción de 1 gramo de aceite o grasa en 100 ml de una mezcla de solvente y reactivo anisidina.

2.2.18.3 Ácidos grasos libres

Es una medida del grado de descomposición lipolítica de los glicéridos. Son los miligramos de KOH necesarios para saturar (neutralizar) los ácidos libres contenidos en un gramo de muestra. El resultado de la titulación con álcali en presencia de fenolftaleína se puede expresar también como porcentaje de ácido oleico o grado de acidez (1% de acidez expresada como ácido oleico = 3.6° de acidez) (Ayala, 2011; Parada, 2005).

2.2.18.4 Índice de yodo

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los ácidos grasos que componen un aceite o grasa. Será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas, basándose en la adición de halógenos a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Por definición, corresponde al “número de gramos de yodo absorbidos por 100 g de aceite o grasa”. El punto final se registra por la desaparición del complejo azul del yodo con el almidón. Esta determinación es quizá el mejor método para clasificar los aceites, pues permanece casi inalterada por los ligeros cambios en el estado del mismo; además, permite caracterizar la muestra dando una base para saber si ésta es pura o se encuentra mezclada. Para su determinación suelen usarse el método de Hanus y el de Wijs (Ayala, 2011; Parada, 2005).

2.2.18.5 Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y su velocidad en la sustancia en estudio. En los aceites, el índice de refracción se encuentra estrechamente relacionado a la densidad, masa molecular y constitución del aceite y sirve para identificarlo; también disminuye en forma casi lineal al aumentar el índice de

yodo. El índice de refracción puede determinarse con un refractómetro de Abbé, que abarca una zona de refracción más amplia. La temperatura del aceite y la longitud de onda de la luz influyen mucho en los valores obtenidos (Parada, 2005).

2.2.19 Cromatografía de gases (CG)

Los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de que se reparten entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es transportar este último a través de la columna (Skoog *et al.*, 2008).

2.2.20 Diseño de experimentos (DOE)

Montgomery (2004) menciona que el DOE es una herramienta de importancia fundamental en el ámbito de la ingeniería para mejorar el desempeño de un proceso de manufactura. La aplicación de las técnicas del diseño experimental en las fases iniciales del desarrollo de un proceso pueden redundar en:

- Mejoras en el rendimiento del proceso.
- Variabilidad reducida y conformidad más cercana con lo proyectado.
- Reducción del tiempo de desarrollo.
- Reducción de los costos globales.

2.2.20.1 Clasificación de los diseños experimentales

Existen muchos diseños experimentales para estudiar la gran diversidad de problemas o situaciones que ocurren en la práctica. Esta cantidad de diseños hace necesario saber cómo elegir el más adecuado para una situación dada y, por ende, es preciso conocer cómo es que se clasifican los diseños de acuerdo con su objetivo y su alcance.

Los aspectos que más influyen en la selección de un diseño experimental, en el sentido de que cuando cambian por lo general nos llevan a cambiar de diseño, son:

1. El objetivo del experimento.
2. El número de factores a estudiar.
3. El número de niveles que se prueban en cada factor.
4. Los efectos que interesa investigar (relación factores-respuesta).
5. El costo del experimento, tiempo y precisión deseada.

Estos cinco puntos no son independientes entre sí, pero es importante señalarlos de manera separada, ya que al cambiar cualquiera de ellos generalmente cambia el diseño experimental a utilizar. Con base en algunos de estos cinco puntos es posible clasificar los diseños como lo hacemos a continuación:

1. Diseños para comparar dos o más tratamientos.
2. Diseños para estudiar el efecto de varios factores sobre la(s) respuesta(s).
3. Diseños para determinar el punto óptimo de operación del proceso.
4. Diseños para la optimización de una mezcla.
5. Diseños para hacer el producto o proceso insensible a factores no controlables.

En la Figura 7 se muestra la clasificación general de los diseños experimentales de acuerdo con su objetivo. Dentro de cada rama se pueden clasificar de acuerdo al número de factores, al tipo de efectos que se pretende estudiar y según las restricciones existentes. En la misma figura se listan los diseños particulares más representativos de cada rama (Gutierrez & De la Vara, 2008).

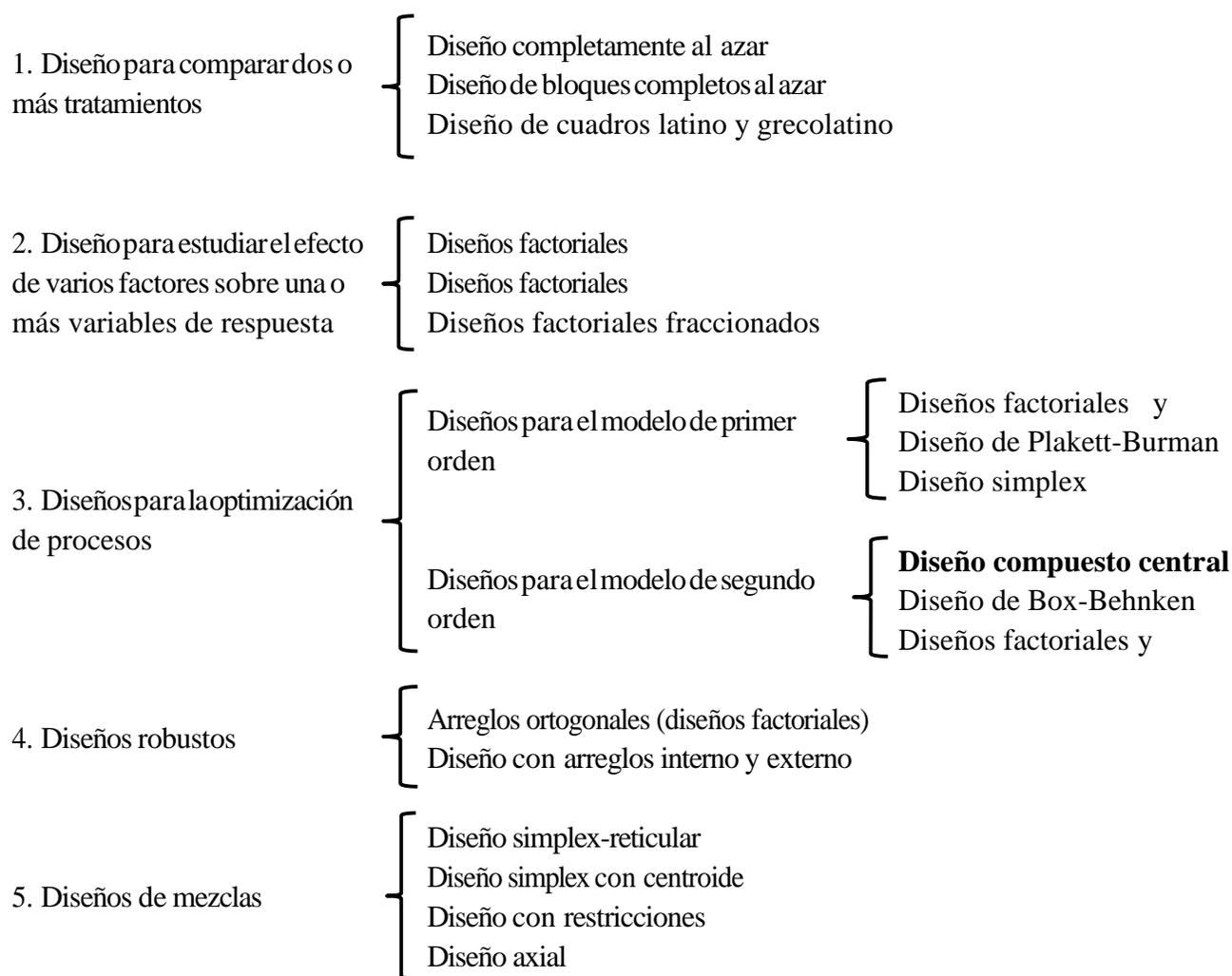


Figura 7. Clasificación de los diseños experimentales.

Fuente: Gutierrez & De la Vara, 2008.

2.2.20.2 Diseño Central Compuesto (DCC)

El diseño de composición central es el más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden esto debido a su gran flexibilidad; se puede construir a partir de un diseño factorial completo 2^k o fraccionado 2^{k-p} agregando puntos sobre los ejes y al centro, y se compone de tres tipos de puntos (Gutierrez & De la Vara, 2008):

1. Una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado. A esta parte del DCC se le llama porción factorial.
2. n_0 puntos o repeticiones al centro del diseño, con $n_0 \geq 1$.
3. Dos puntos sobre cada eje a una distancia a del origen. Estos puntos se llaman porción axial. La manera en que se ensamblan y el DCC resultante se muestran en la Figura 8, para los casos de dos y tres factores.

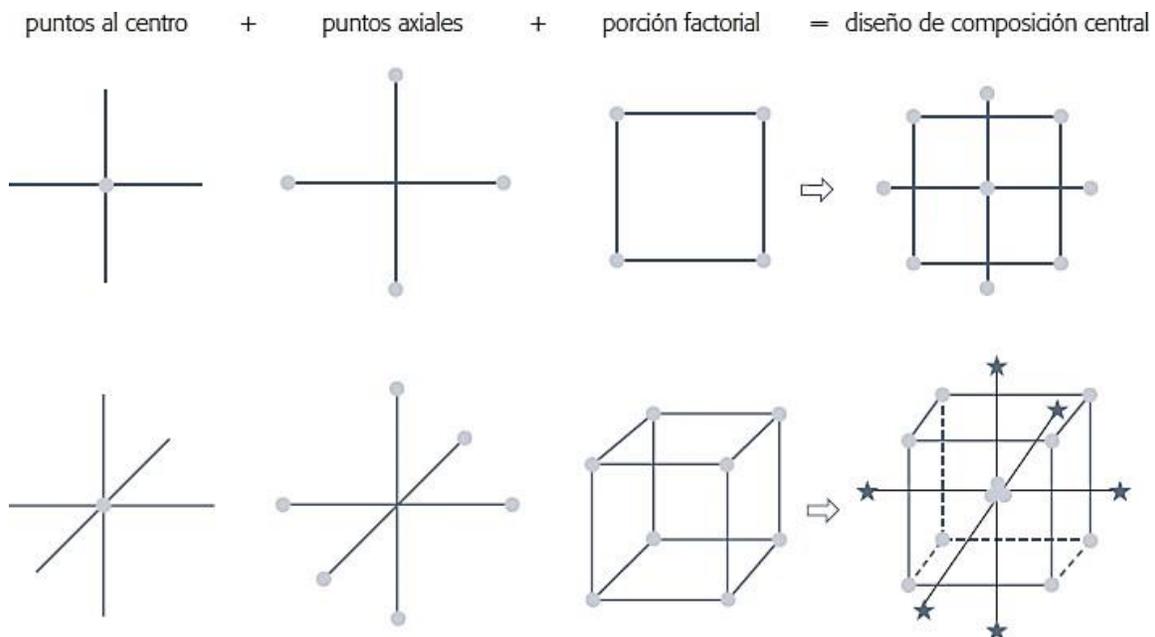


Figura 8. Representación y construcción de los DCC para $k = 2$ y 3 factores.

Fuente: Montgomery, 2004.

Las variables que representan los factores x_i en cada punto del diseño son llamados variables codificadas, y los factores como tal son llamadas variables naturales que representan las cantidades involucradas en el estudio (Montgomery, 2004). Éstas se relacionan mediante la expresión:

$$x_i = \frac{X_i - a}{b}$$

Donde x_i ($i = 1, 2, \dots, k$ factores) toma valores adimensionales de $-1, +1$; J es el valor de la variable natural o factor de estudio; a es el valor natural del punto medio entre valor alto (+1) y el bajo (-1), y b es el valor de la diferencia entre el valor (+1) o el bajo (-1) y el valor medio. Las variables J , a y b tienen las mismas unidades de cantidad y se obtienen a través de ensayos experimentales preliminares (Montgomery, 2004).

Capítulo 3

Metodología

3.1 Tipo y diseño de investigación

3.1.1 Tipo de la investigación

La presente investigación fue de tipo experimental, donde se acondicionaron las semillas de uva Quebranta para la extracción del aceite por el método convencional con hexano y por CO₂ supercrítico con el equipo extractor multisolventes (Véase figura 9), donde se consideraron tres variables independientes que fueron la presión (bar), temperatura (°C) y flujo de CO₂ (g/min).



Figura 9. Equipo extractor multisolvente de fluidos supercríticos.

Fuente: Elaboración propia

3.1.2 Diseño de la investigación

Con el objeto de optimizar el rendimiento (Variable dependiente) de aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico, se empleó el método superficie respuesta mediante el diseño central compuesto (DCC) con el software Minitab versión 17 utilizando tres variables independientes (P, T, F). Los niveles altos y bajos (Tabla 4) fueron establecidos mediante diversas pruebas preliminares y considerando las condiciones supercríticas del CO₂ (Tabla 5).

El DCC estableció dieciséis experimentos, dentro de los cuales se ha considerado una repetición en el punto central.

Tabla 4

Niveles bajo y alto para el diseño central compuesto con en el software Minitab.

	Nivel bajo	Nivel alto
A. Presión (bar)	170	250
B. Temperatura (°C)	40	60
C. Flujo (g/min)	30	50

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5

Experimentos establecidos con el diseño central compuesto sugeridos por el software Minitab.

N° Experimentos	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo (g/min)
1	170	40	30
2	250	40	30
3	170	60	30
4	250	60	30
5	170	40	50
6	250	40	50
7	170	60	50
8	250	60	50
9	142,7	50	40
10	277,3	50	40
11	210	33,2	40
12	210	66,8	40
13	210	50	23,2
14	210	50	56,8
15	210	50	40
16	210	50	40

Fuente: Software Minitab versión 17

3.2 Unidad de análisis

Se utilizaron semillas de uva Quebranta secas y trituradas, que fueron recolectadas a partir del orujo, residuo de la elaboración de pisco procedente de Ica.

3.3 Población de estudio

El orujo de uva Quebranta es el residuo que se genera de la elaboración de la industria de pisco el cual fue donado por bodega Yanquiza del distrito de Subtanjalla, provincia de Ica, ubicado a 424 m.s.n.m. (latitud 14° 1'17.82"S, longitud 75°44'35.43"O).

3.4 Tamaño de muestra

Se recolectó 60 kilogramos de orujo fresco el cual fue transportado a la planta de producción del Instituto Tecnológico de la Producción.

3.5 Selección de muestra

Se realizó un pre-secado al orujo de uva Quebranta residuo de la elaboración de pisco, luego se separó las semillas de la cáscara descartando el hollejo y ramas. Una vez separadas las semillas se volvieron a secar hasta reducir su humedad a 6 - 7%, y se guardaron en bolsas de polietileno oscuras en refrigeración hasta su uso (7 °C).

3.6 Técnica recolección de datos

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones de la planta y laboratorios del Instituto Tecnológico de la Producción y los análisis químicos se llevaron a cabo en el laboratorio de fisicoquímica acreditado (LABS-ITP). La extracción del aceite de semillas de uva Quebranta se realizó con el método convencional y con el extractor multisolvente donde se obtuvieron extractos de aceite según el diseño establecido en la Tabla 5, determinando el rendimiento en relación a 100 g de semillas.

3.7 Materia prima

- Semillas de uva secas y trituradas de la variedad Quebranta

3.8 Procedimientos y técnicas

3.8.1 Materiales

- Baguetas
- Balón de digestión de proteínas
- Balones esmerilados de 250 mL
- Bandejas de acero inoxidable
- Bandejas de plástico
- Beacker de 10 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml
- Bolsas plásticas de polietileno
- Bureta de 5 ml
- Celdas de vidrio de 1 cm
- Crisoles de porcelana
- Cucharas de acero inoxidable
- Dedales
- Embudos
- Fiolas 10 ml, 25 ml, 100 ml
- Gradillas para tubos de ensayo
- Matraces 250 ml con tapa esmerilada
- Micropipetas de 100 μ L, 1000 μ L
- Papel aluminio
- Pesa filtros
- Pipetas pasteur descartables
- Pipetas volumétricas de 1 ml, 5 ml, 25 ml
- Piscetas con agua destilada
- Probetas de 30 ml, 50 ml, 100 ml

- Tamices marca Retsch (mesh 18, 20 y 25)
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo de 9 ml

3.8.2 Reactivos

- Ácido acético glacial
- Ácido sulfúrico
- Catalizador (Sulfato de cobre con sulfato de sodio de 1/10)
- Cloroformo HPLC
- Éter etílico anhidro
- Hexano Acs
- Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH): Alfa Aesar
- Reactivo de Trolox: Sigma-Aldrich, Merck
- Reactivo indicador rojo de metilo/azul de metileno
- Reactivo p-anisidina
- Metanol HPLC
- Solución ácido acético: cloroformo (3:2)
- Solución de ácido clorhídrico 6 N
- Solución de ácido sulfúrico 0,1 N
- Solución de almidón 1 %
- Solución de fenolftaleína 0,5 %
- Solución de hidróxido de sodio NaOH 0,1 N, 0,02 N
- Solución de Wijs
- Solución estándar de tiosulfato de sodio 0,1 N y 0,01 N
- Solución saturada de yoduro de potasio
- Sulfato de sodio anhidro

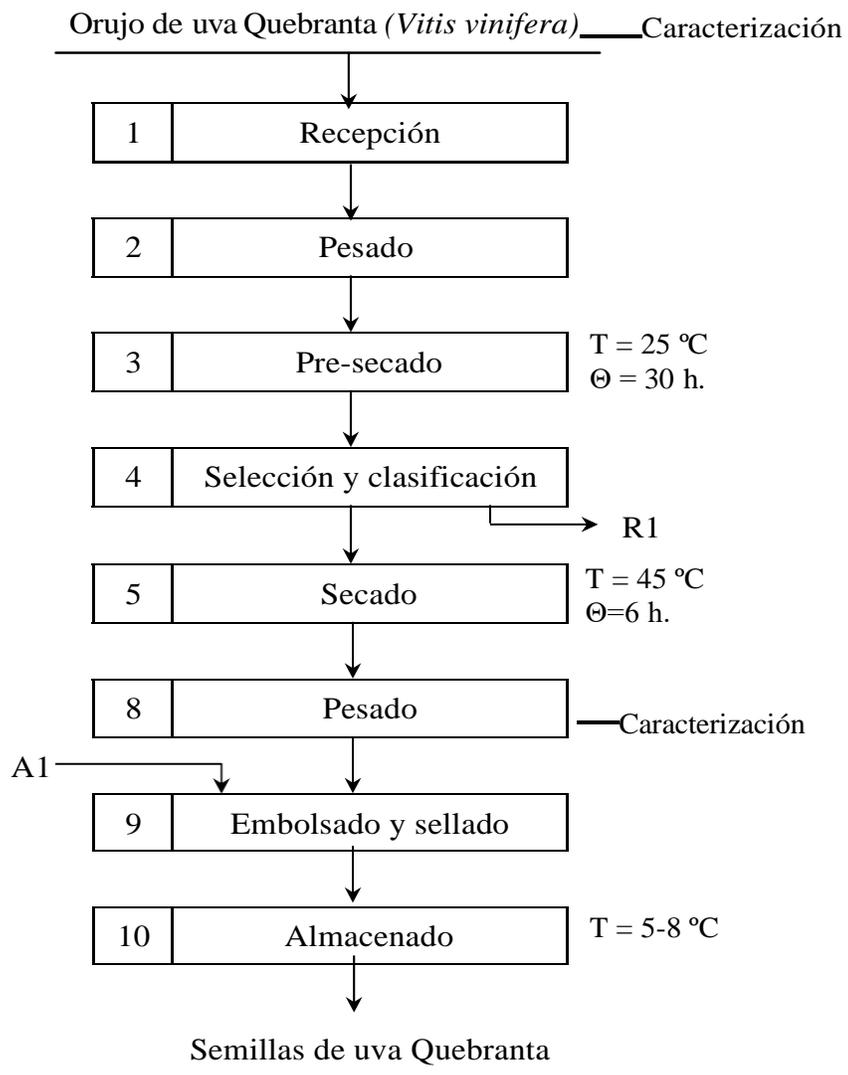
3.8.3 Equipos

- Agitador de tubos de ensayo marca: Barnstead Thermolyn, modelo: M16710.33
- Aparato soxhlet marca: Yamato, modelo: BS-64
- Balanza analítica marca: Ohaus, modelo: DV214C, Resolución 0.1 mg
- Campana extractora de gases para ácidos marca: Noys, modelo: Draft chamber's
- Campana extractora de gases para solventes orgánicos marca: Barker Company, modelo: Chemgard FH-S
- Centrífuga eléctrica marca: Thermo Centra, modelo: CL-2
- Cocinilla eléctrica marca: Centrales, modelo: 9457
- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem X con detector tipo FID
- Desecador con silicagel
- Envasadora al vacío DGUV Test Multivac NG 10121 GS
- Equipo destilador de amoniaco, modelo: Parnas-Wagner
- Equipo digestor de proteínas marca: Gerhardt, modelo: Kjeldhatherm
- Equipo extractor de fluidos supercríticos marca Top industrie 2802.0000 (Francia)
- Espectrofotómetro UV visible marca: Perkin Elmer, modelo: Lambda 950
- Estufa de convección forzada Venticell MM Group
- Estufa marca: Binder, modelo: ED-15
- Molino marca: IKA A11 basic, modelo: A11 B500
- Mufla de calcinación
- Potenciómetro Mettler Toledo modelo Seven Easy
- Refractómetro Eclipse BS45-02
- Refrigeradora marca: ThermoFisher Scientific, modelo: RCRF-252A14
- Secador de aire frío ASAHI OMIYA 1-CHOME NISHI-KU
- Vernier marca: Stanley

3.8.4 Acondicionamiento del fruto, orujo fresco, orujo seco y semillas de uva

Quebranta

Las bayas frescas de uva Quebranta se trituraron y se realizó la caracterización (°Brix, pH, diámetro y composición química). De igual forma el orujo fresco de uva Quebranta recepcionado de la bodega Yanquiza del distrito de Subtanjalla se trituró y se realizó la caracterización. Continuándose con el acondicionamiento de las semillas de uva Quebranta que se muestra en la Figura 10.



Leyenda	
A1:	Bolsas plásticas de polietileno
R1:	Hollejo, pedúnculos

Figura 10. Diagrama de flujo del acondicionamiento de las semillas de uva Quebranta (*Vitis vinífera*).

Fuente: Elaboración propia.

Descripción de las etapas del proceso de acondicionamiento de las semillas de uva

Quebranta (*Vitis vinífera*)

- **Recepción.-** Se recepcionó el orujo fresco en el laboratorio de físico-química en el Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), residuo procedente de la elaboración de pisco del departamento de Ica.
- **Pesado.-** Se pesó el orujo recepcionado en una balanza electrónica de plataforma.
- **Pre-secado.-** Se llevó a secar en un secador de aire frío a 25 ± 1 °C por 30 horas, (hasta llegar a una humedad aproximada de 13 %), colocando la materia prima en bandejas de plástico extendiéndola, de tal forma que cubra toda la superficie, tal como se aprecia en la Figura 11.
- **Selección y clasificación.-** Se seleccionaron y clasificaron las semillas descartando la cáscara, pedúnculos y otros residuos que se encontraron.
- **Secado.-** Se secaron las semillas seleccionadas en una estufa a 45 ± 1 °C por 6 horas en una estufa de convección forzada, colocándolas en bandejas de acero inoxidable (hasta llegar a una humedad aproximada de 7 %) y se realizó la caracterización.
- **Pesado.-** Se pesó las semillas secas.
- **Embolsado y sellado.-** El embolsado se realizó en bolsas plásticas de polietileno y se sellaron de forma hermética para luego colocarse en envases plásticos que no permitan el paso de la luz y evitar el deterioro de los compuestos fenólicos.
- **Almacenado.-** Se almacenó en refrigeración a (5-8 °C) hasta su uso.



Figura 11. a) Orujo fresco de uva Quebranta colocado en bandejas de plástico; b) orujo de uva Quebranta en bandejas colocado en el secador de aire frío

Fuente: Elaboración propia.

3.8.5 Análisis químico proximal del fruto, orujo fresco, orujo seco y semillas de uva

Quebranta

Los siguientes métodos fueron determinados según los procedimientos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2005), % de humedad (925.40) , % de grasa (948.22), % de proteínas (N X 6.25) (950.48), % de cenizas (950.49), se determinaron por duplicado siguiendo los métodos estándar y el % de carbohidratos totales se calculó como la diferencia a un total de 100%.

3.8.6 Análisis fisicoquímico de la uva Quebranta

Se determinó los grados Brix a las bayas frescas de la variedad Quebranta con un refractómetro, el pH con un potenciómetro, el diámetro con un vernier, así como también la longitud de las semillas.

3.8.7 Acondicionamiento de las semillas de uva Quebranta para la extracción de aceite

Una vez obtenidas las semillas de uva Quebranta, se procedió a triturarlas con un molino (véase Figura 12a), luego se pasó por tres tamices diferentes (mesh 18, 20, 25) de diámetro de criba 1,00, 0,85 y 0,71 mm respectivamente, tal como se evidencia en la Figura 12b. Se trabajó con dos tamaños de partícula, uno de diámetro entre 0,85 y 1,00 mm, y el otro tamaño < 0,71mm.

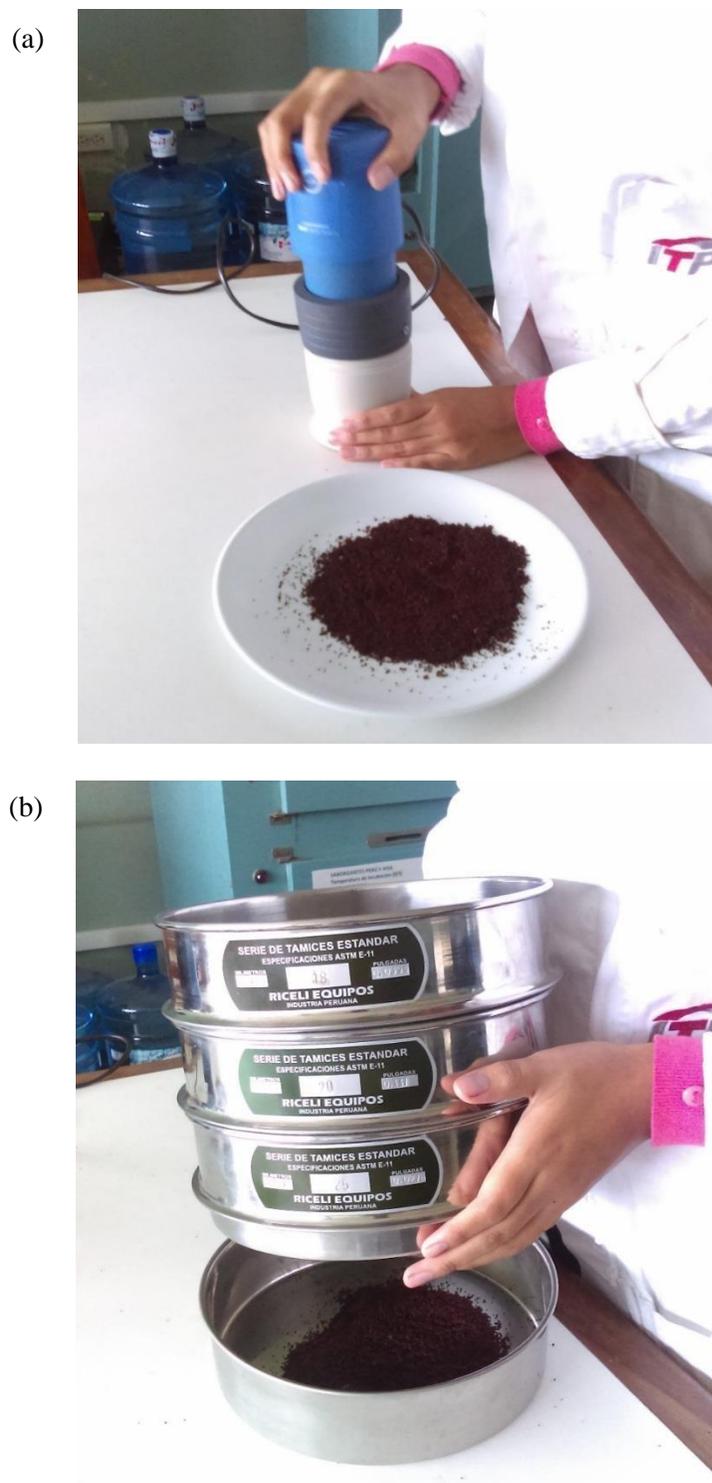


Figura 12. a) Triturado de las semillas de uva Quebranta con un molino; b) Tamizado de las semillas de uva Quebranta.

Fuente: Elaboración propia

Se realizaron extracciones del aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico (extractor multisolvente de fluidos supercríticos) por triplicado, utilizando ambos tamaños de partícula, para así seleccionar el tamaño con el cual se trabajará (dieciséis ensayos) y permitirá extraer un mayor rendimiento. Una vez seleccionado el tamaño de partícula (< 0,71 mm) se procedió con las extracciones convencionales (soxhlet) y con CO₂ supercrítico. A estos aceites obtenidos se les determinó la caracterización física (índice de refracción y densidad), química (índice de peróxidos, índice de anisidina, ácidos grasos libres e índice de yodo), se cuantificó el perfil de ácidos grasos con un cromatógrafo de gases y se evaluó la actividad antioxidante por el método DPPH, tal como se muestra en la Figura 13.

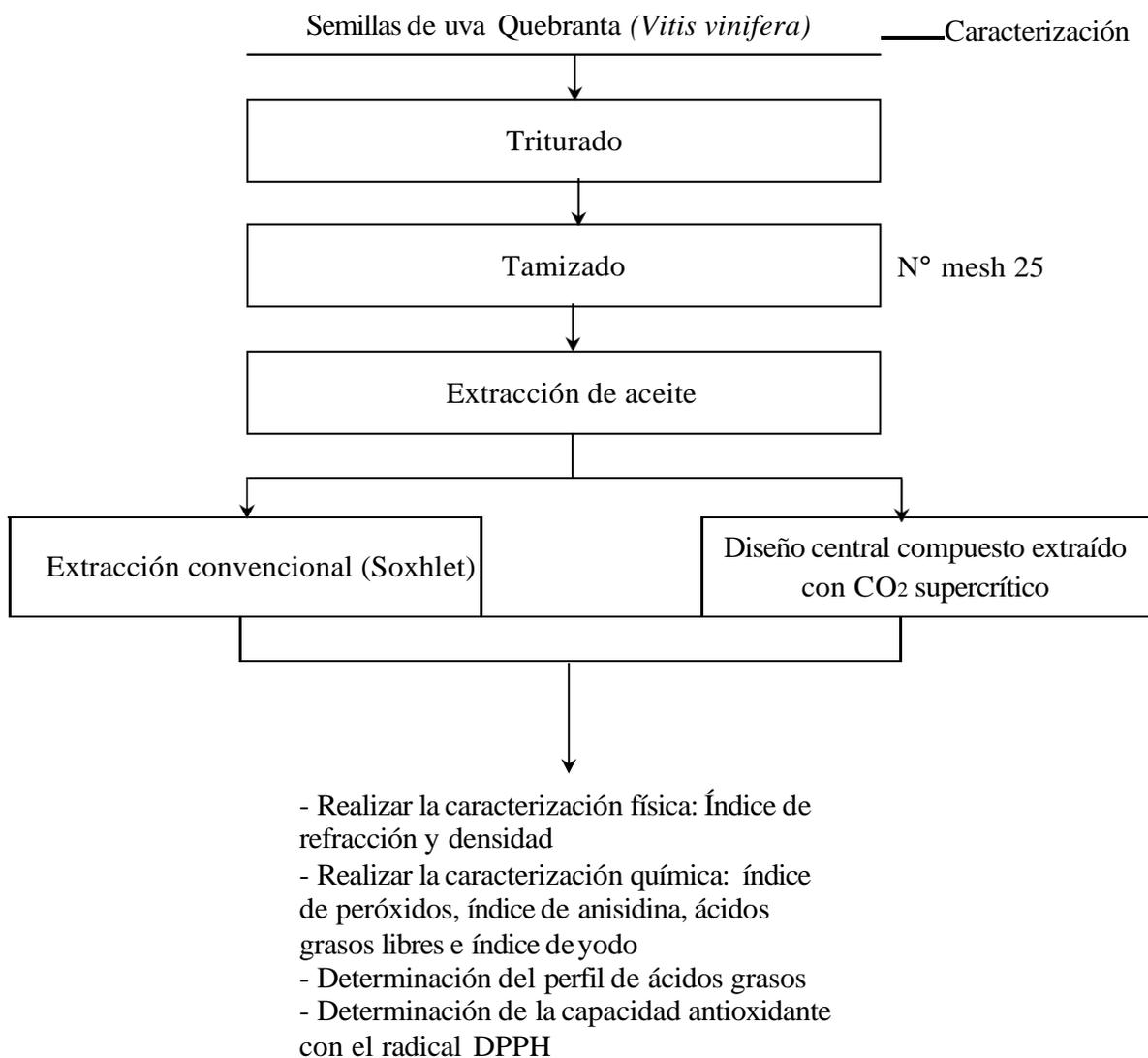


Figura 13. Diagrama de extracción del aceite de semillas de uva Quebranta

Fuente: Elaboración propia

3.8.8 Efecto del tamaño de partícula de las semillas de uva Quebranta en la extracción del aceite con CO₂ supercrítico

Para definir el tamaño de partícula se realizaron extracciones por triplicado con CO₂ supercrítico para seleccionar el tamaño que nos permita mayor rendimiento de extracción del aceite de semillas de uva, que fueron trituraron previamente en un molino y se pasaron por tres tamices diferentes de número de mesh 18, 20 y 25 (1,00, 0,85 y 0,71 mm respectivamente). Se consideraron dos tamaños de partículas, uno < 0,71 mm y el otro en el rango de 0,85 a 1,00 mm y se realizaron extracciones con CO₂ supercrítico por triplicado a 300 bar de presión, 45 °C de temperatura y a un flujo de 70 g/min.

3.8.9 Obtención del aceite de semillas de uva Quebranta por el método convencional

Se utilizó $6,0 \pm 1,0$ g de semillas secas previamente trituradas y tamizadas para su extracción, siguiendo el método recomendado por Toro y Suárez (2012). La extracción se llevó a cabo utilizando la técnica soxhlet empleando como solvente n-hexano, en una relación muestra: solvente de 1:10 y un tiempo de extracción de cuatro horas. El extracto se concentró evaporando el solvente con gas nitrógeno.

3.8.10 Obtención del aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico

Para realizar las extracciones, se utilizó el equipo extractor de fluidos supercríticos, que empleó dióxido de carbono líquido como solvente de extracción, pasa a través de un intercambiador de calor, donde es enfriado por una solución glicólica. El equipo utiliza también una bomba de pistón para aumentar la presión del sistema. El líquido de CO₂ a altas presiones se vuelve supercrítico en un intercambiador de calor que tiene un circuito de control

de temperatura. El fluido pasa a través del recipiente extractor de 250 ml, dentro del cual se utilizó una cesta cilíndrica de 29 mm de diámetro y 147 mm de altura, la cesta consistía en un cilindro hueco cerrado en el cual por ambos extremos se colocaron unos filtros metálicos. Por cada extracción se utilizó lotes de 34 ± 2 g de semillas de uva Quebranta previamente trituradas y tamizadas, estas semillas presentaron inicialmente un color marrón (homogéneo) y finalizada la extracción las semillas desgrasadas perdieron color, tal como se muestra en la Figura 14.



Figura 14. Semillas de uva Quebranta trituradas y tamizadas antes de la extracción con CO_2 supercrítico y después de la extracción (desgrasada).

Fuente: Elaboración propia

El sistema se presurizó hasta llegar a la presión deseada, luego se mantuvo en ese valor ajustando una válvula de forma manual. La temperatura del reactor y el flujo de CO_2 se controlaron con el software del equipo. La presión, temperatura y flujo de CO_2 se mantuvieron constantes durante el proceso de extracción de los ensayos. Finalmente se

colectó en un tubo el extracto lipídico (véase Figura 15), se añadió nitrógeno y almacenó hasta su caracterización físico-química.

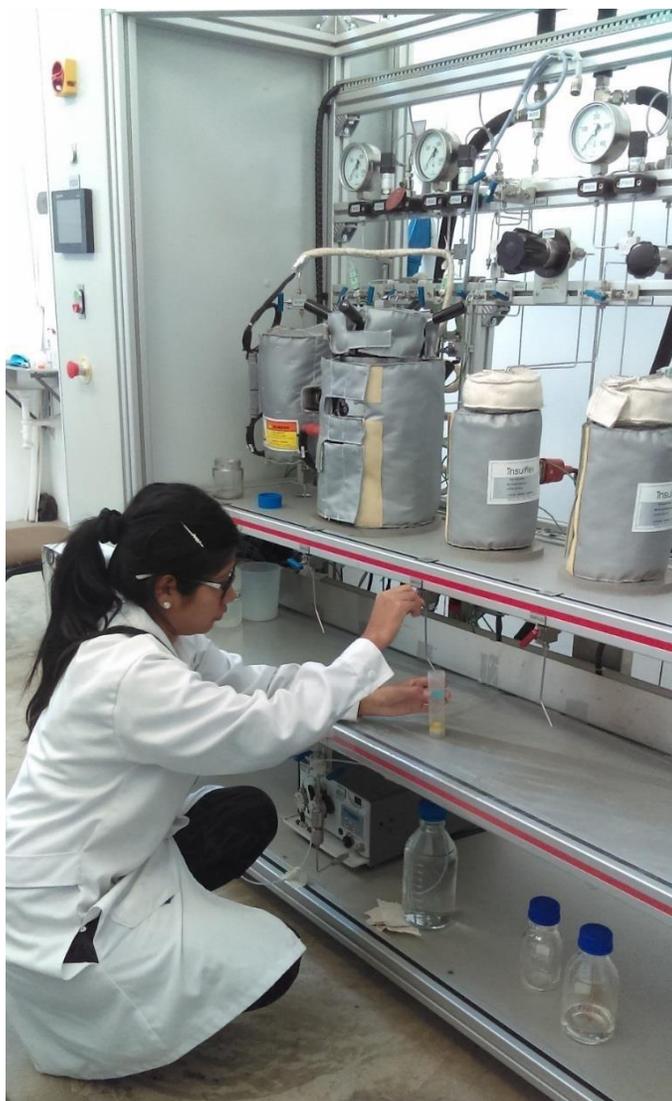


Figura 15. Recolección del aceite de semillas de uva extraído con CO₂ supercrítico.

Fuente: Elaboración propia

La variable respuesta fue el rendimiento (R), obtenido pesando el aceite (m_{aceite}) y calculado como porcentaje de masa seca (ms) de la semilla de uva Quebranta según la ecuación 1:

$$\square (\%) = \frac{\square \square \square \square \square \square}{\square \square} \square 100 \dots (1)$$

3.8.11 Caracterización física del aceite de las semillas de uva Quebranta

3.8.11.1 Índice de refracción

Se realizó de acuerdo a la norma de la AOAC 921.08.

3.8.11.2 Densidad

Se realizó según la norma AOAC 920.212.

3.8.12 Caracterización química del aceite de las semillas de uva Quebranta

3.8.12.1 Índice de peróxidos

Se analizó según la norma AOAC 965.33

3.8.12.2 Índice de anisidina

Se analizó según la NTP 209.217.

3.8.12.3 Ácidos grasos libres

Se determinó de acuerdo a la norma AOAC 940.28.

3.8.12.4 Índice de yodo

Se determinó según la norma AOAC 920.158.

3.8.13 Análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta por cromatografía de gases

Según el método de Prevot y Mordret (1976) se realizó la determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta de la extracción convencional por soxhlet y de la extracción con CO₂ supercrítico, donde se utilizó un cromatógrafo de gases,

que posee un detector de ionización de llama. La composición de los ácidos grasos del aceite se obtiene por medio de las áreas bajo la curva correspondientes a cada éster.

3.8.14 Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de semillas de uva

Quebranta

En función a la captación del radical DPPH

Se utilizó el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) desarrollado por Brand-Williams (1995). La actividad antioxidante del aceite de semilla de uva Quebranta se expresó en mM equivalente a Trolox /g de aceite.

Procedimiento

- Se realizó dilución del aceite en metanol (0,3:10).
- Se preparó seis puntos (P1, P2, P3, P4, P5 Y P6) y un blanco (BK) de la curva a diferentes concentraciones de trolox.
- Estos se protegieron de la luz en todo momento.

Tabla 6

Puntos de la curva de calibración.

	BK (μL)	P1 (μL)	P2 (μL)	P3 (μL)	P4 (μL)	P5 (μL)	P6 (μL)
Metanol	6000	190	180	170	160	150	140
DPPH (0.1 mM)	-	5800	5800	5800	5800	5800	5800
Trolox (1 mM)	-	10	20	30	40	50	60

Fuente: Elaboración propia.

- Se agregó 200 μL del aceite diluido y 5800 μL de DPPH.
- Se agitaron los tubos de ensayo, protegiéndose de la luz en todo momento y se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

Capítulo 4

Resultados y discusiones

4.1 Caracterización fisicoquímica de la uva, orujo fresco, orujo seco y semillas de uva

Los °Brix de las bayas frescas de uva Quebranta fue $22,13 \pm 1,29$, el pH $3,82 \pm 0,02$, el diámetro promedio medido a 40 unidades fue $17,72 \pm 1,15$ mm y la longitud de las semillas $0,58 \pm 0,04$ mm. La composición química de las semilla de uva Quebranta se observan en la Tabla 7, y adicionalmente la composición de minerales y metales pesados de uva fresca, orujo fresco, orujo seco y semillas secas de uva se muestran en el Anexo 1 y 2 respectivamente.

Tabla 7

Composición proximal (%) de semillas secas de uva Quebranta

Componente	Semillas secas
Humedad	$6,49 \pm 0,09$
Grasa	$14,50 \pm 0,29$
Proteínas	$6,68 \pm 0,44$
Cenizas	$2,49 \pm 0,01$
Carbohidratos	$69,84 \pm 0,19$

Fuente: Elaboración propia.

Estos valores de proteínas y cenizas se encuentran en el rango que determinaron Özcan, Ünver, Gümüş y Akın (2012) encontrando que las semillas de uva contienen 5,24% a 7,54% de proteínas y 1,2 % a 2,6 % de cenizas, con un % de humedad que varió de 6,72% a 8,62%.

Así también, Hidalgo, Gómez, Rojas, Soliz M., Soliz, R., Quiroga, Saravia y Saavedra (2016) encontraron valores cercanos de las semillas de uva, siendo 10% de materia grasa, 8% de proteínas y 3% de cenizas.

4.2 Efecto del tamaño de partícula de las semillas de uva Quebranta en la extracción del aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico

Los rendimientos obtenidos con ambos tamaños de partícula presentaron una diferencia significativa. El rendimiento a los 120 minutos de extracción con CO₂ supercrítico para el tamaño de partícula mayor (0,85 – 1,00 mm) fue $6,67 \pm 0,26\%$ de aceite, mientras que el rendimiento del tamaño de partícula $< 0,71$ mm resultó $12,23 \pm 0,48\%$ de aceite. Por lo que el tamaño de partícula influye en el rendimiento del aceite tal como se comprueba en este trabajo (Figura 16), obteniéndose mayor rendimiento con el menor tamaño de partícula ($< 0,71$ mm). Este incremento ocurre porque existe una mayor superficie expuesta que facilita la difusión del aceite mencionan Farías & Matos (2009). Al respecto, Farías & Matos (2009) realizaron la extracción del aceite de semilla de uva (*Vitis vinífera*) con un equipo Soxhlet (hexano) donde utilizaron dos niveles de temperatura y tamaños de partícula de 70, 90 °C y 0,8, 2,6 mm respectivamente, obteniendo rendimientos para 90°C de 3,94% y 4,11% con el mayor tamaño de partícula (2,6 mm), y 17,26% y 17,19% con el menor (0,8 mm). Y para 70 °C obtuvieron 4,54% y 4,48% para 2,6 mm, y 12,9% y 14,46% para 0,8 mm. Navas (2010) también trabajó con diferentes tamaños de partícula para la extracción del aceite de semillas de uva mediante dos métodos (soxhlet y solvente en frío éter dietílico), utilizando rangos de tamaños diferentes, obteniendo mayores rendimientos con el menor tamaño de partícula con los dos métodos de extracción.

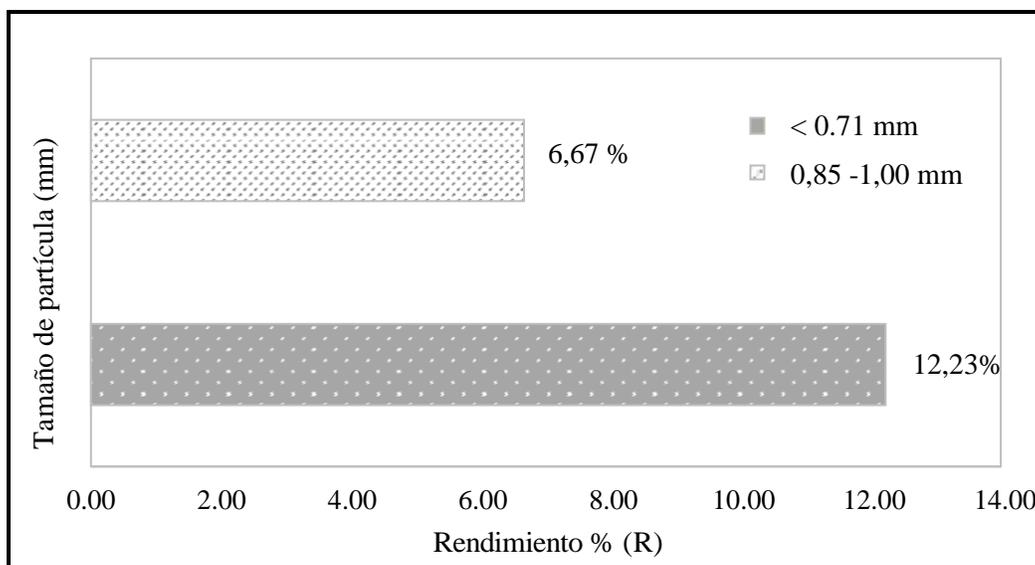


Figura 16. Extracciones del aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico comparando dos tamaños de partícula (< 0,71 y 0,85 – 1,00 mm).

Fuente: Elaboración propia

4.3 Extracción de aceite de semillas de uva Quebranta por el método convencional (soxhlet)

Los resultados obtenidos mediante el método convencional de $14,5 \pm 0,29$ g de aceite/100 g de semilla seca. Los valores encontrados por otros autores son comparables con los encontrados en este estudio. Al respecto Göktürk, Özkan, y Sema (2007) determinaron que los contenidos de aceite de las semillas de uva variaron entre el 12,35% y 16,00% por el método soxhlet.

Franco-Mora, Salomon-Castaño, Morales, Castañeda-Vildózola y Rubí-Arriaga (2015) encontraron que la semilla de uva silvestre contiene $16,8 \pm 0,84$ % en promedio, extraído con hexano por el método convencional a partir de dos cosechas.

4.4 Obtención del aceite de semillas de uva Quebranta con CO₂ supercrítico

4.4.1 Diseño compuesto central

La metodología utilizada generó dieciséis ensayos que se detallan en la Tabla 8 con sus respectivos resultados de porcentaje de aceite extraído a las dos horas con CO₂ supercrítico (adicionalmente en el Anexo 3 se muestran los resultados de los rendimientos de extracción de los dieciséis experimentos cada 15 minutos) y los valores de oxidación primaria (I. Peróxidos) y secundaria (I. Anisidina), así como la cinética de extracción en la Figura 17, donde se ve cómo se incrementa el rendimiento de la extracción del aceite de semillas de uva Quebranta a través del tiempo.

Tabla 8

Rendimientos obtenidos con la extracción de CO₂ supercrítico y la evaluación del índice de peróxidos e índice de anisidina

N° Experimentos	Variable independiente			Variable dependiente		
	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Flujo (g/min)	Rend 2h	Peróxidos mEq peróxido/ kg de aceite	Anisidina (s/u)
1	170	40	30	6,05	0,772	5,323
2	250	40	30	11,31	2,061	3,171
3	170	60	30	2,00	1,875	4,460
4	250	60	30	10,90	1,274	4,336
5	170	40	50	11,95	1,124	4,203
6	250	40	50	12,44	0,485	3,046
7	170	60	50	3,66	0,715	4,323
8	250	60	50	10,36	0,182	3,304
9	142,7	50	40	3,11	0,543	3,700
10	277,3	50	40	12,43	0,678	3,300
11	210	33,2	40	11,11	2,302	2,940
12	210	66,8	40	6,30	2,300	3,200
13	210	50	23,2	6,20	1,185	4,009
14	210	50	56,8	11,75	1,900	2,340
15	210	50	40	9,86	2,340	2,157
16	210	50	40	10,42	1,340	2,310

Rend 2h - Rendimiento a las 2 horas (g aceite/ 100 g de semilla seca)

Fuente: Elaboración propia

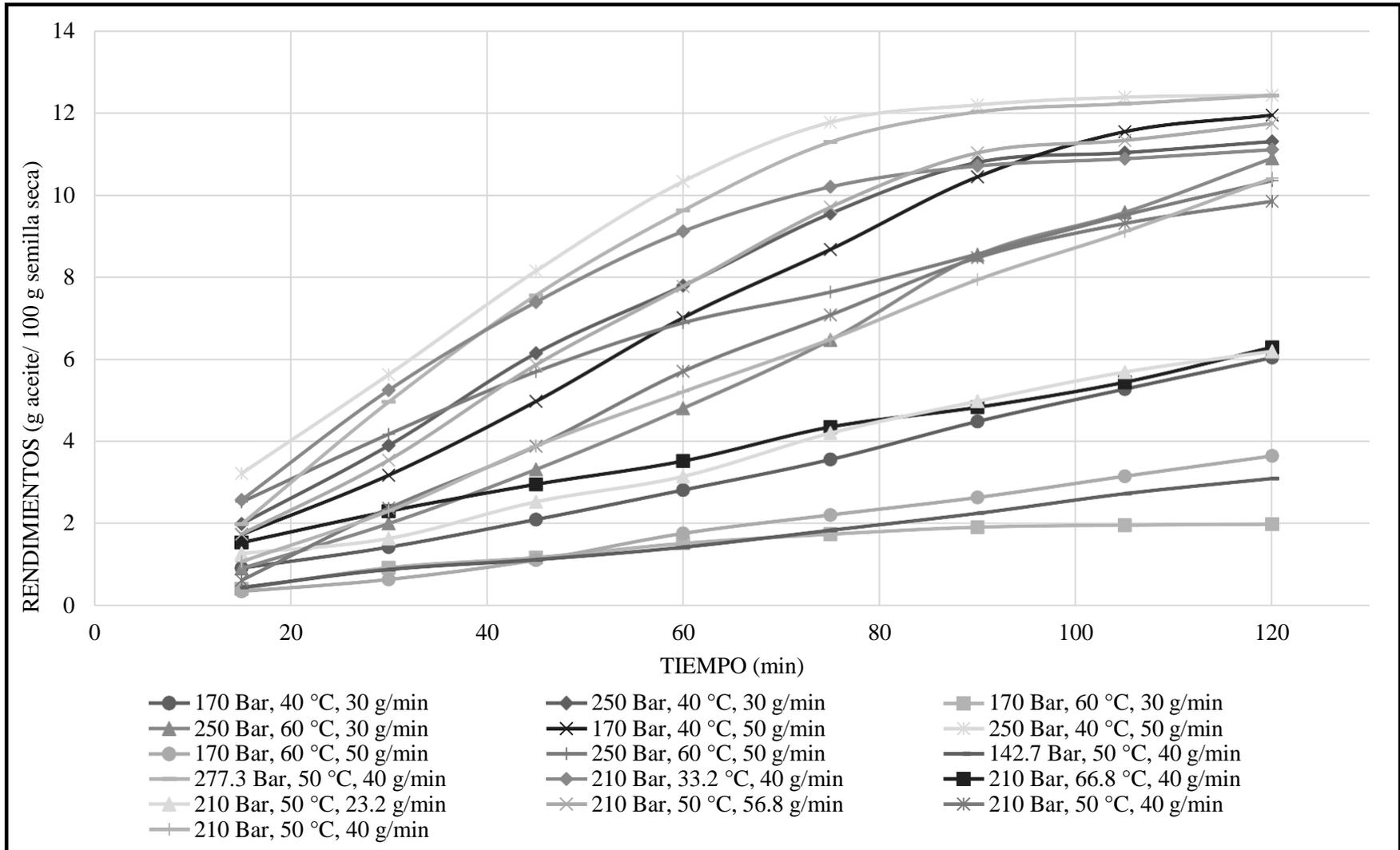


Figura 17. Cinética de extracción de los rendimientos (R) obtenidos con CO₂ supercrítico de los dieciséis experimentos.

Fuente: Elaboración propia

El análisis del DCC indica que existe efecto de la presión ($p=0.00$), temperatura ($p=0.00$) y flujo ($p=0.001$) (véase Anexo 4), y un efecto combinado de estas variables en la extracción con CO_2 del aceite de las semillas de uva, influyendo en el rendimiento del aceite de semillas de uva Quebranta (Tabla 9).

Tabla 9

ANOVA de la regresión de Superficie Respuesta de P, T y F vs. Rendimiento (R) (g de aceite/ 100 g de semilla seca)

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P-Value
Modelo	9	190,831	21,203	36,18	0
Lineal	3	162,934	54,311	92,66	0
P	1	101,871	101,871	173,81	0
T	1	39,394	39,394	67,21	0
F	1	21,669	21,669	36,97	0,001
Cuadrático	3	5,842	1,947	3,32	0,098
P*P	1	5,675	5,675	9,68	0,021
T*T	1	1,884	1,884	3,21	0,123
F*F	1	1,173	1,173	2	0,207
2-Way Interaction	3	22,055	7,352	12,54	0,005
P *T	1	11,5	11,5	19,62	0,004
P*F	1	6,57	6,57	11,21	0,015
T*F	1	3,985	3,985	6,8	0,04
Error	6	3,517	0,586		
Lack-of-Fit	5	3,36	0,672	4,28	0,351
Pure Error	1	0,157	0,157		
Total	15	194,347			

GL – Grado de libertad

F – Valor Fisher

Fuente: Software Minitab versión 17

4.4.2 Parámetros óptimos

Los parámetros de optimización después de analizar el DCC para obtener el mayor rendimiento de aceite de semillas de uva es a 188 bar, 33,5 °C y 57 g/min. Tales condiciones óptimas fueron similares a las obtenidas por Aizpurua-Olaizola, Ormazabal, Vallejo, Olivares, Navarro, Etxebarria y Usobiaga (2014), quienes establecieron que la extracción óptima del aceite de semillas de uva, a partir de 0,25 g de muestra, es a 35 °C, 2 ml/min de flujo de CO₂ y a una presión de 253 bar para un tiempo de 5 minutos de extracción.

El programa estadístico Minitab determinó el siguiente modelo predictivo de optimización:

$$R = -40,7 + 0,208 P - 0,060 T + 1,247 F - 0,000493 P*P - 0,00459 T*T - 0,0036 F*F + 0,00308 P*T - 0,00218 P*F - 0,00740 TF$$

Donde:

P: Presión (bar)

T: Temperatura (°C)

F: Flujo de CO₂ (g/min)

En la Figura 18 se muestran los gráficos de superficie respuesta, donde se muestra que los R mayores se obtienen a menores temperaturas y mayor flujos (Figura 18a), a mayores presiones y mayores flujos (Figura 18b), y a menores temperaturas y mayores presiones (Figura 18c).

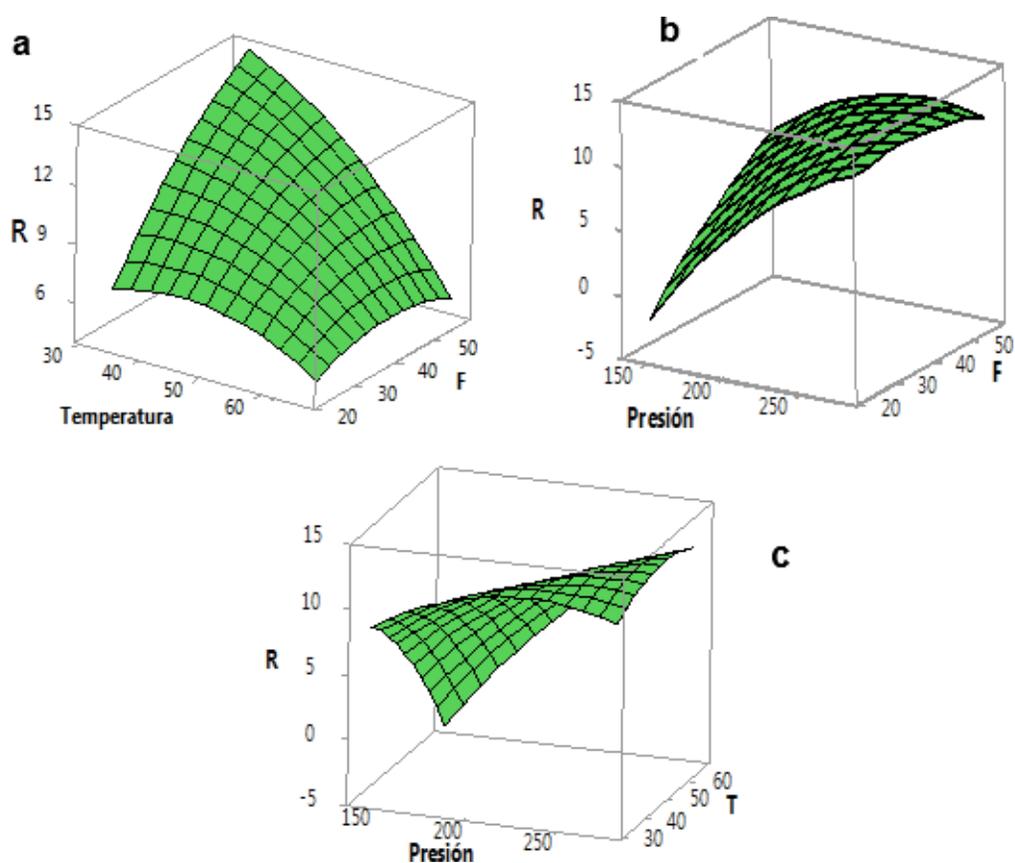


Figura 18. Diagrama Superficie de Respuesta a) Efecto de la temperatura vs. Flujo, b) Efecto de la presión vs. Flujo, c) Efecto de la presión vs. Temperatura.

Fuente: Software Minitab versión 17

Por otro lado, en la Figura 19a (Presión vs. Temperatura) se muestra que hay un mayor rendimiento de extracción (R) a menores temperaturas y mayores presiones. En la Figura 19b (Presión vs. Flujo) se obtiene un mayor rendimiento a mayores presiones y mayores flujos de CO₂ supercrítico. Mientras que en la Figura 19c (Temperatura vs. Flujo) es evidente que obtenemos mayores rendimientos a menores temperaturas y mayores flujos de CO₂.

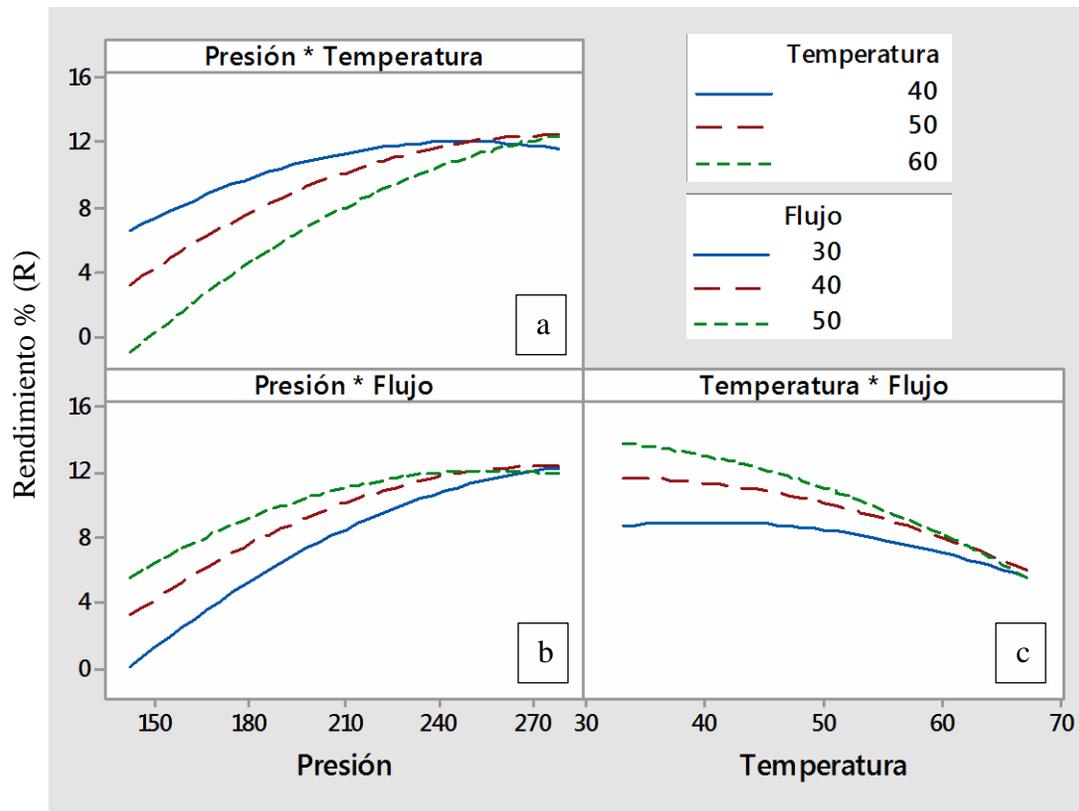


Figura 19. Diagrama de interacción: (a) Presión vs. Temperatura; (b) Presión vs. Flujo y (c) Temperatura vs. Flujo.

Fuente: Software Minitab versión 17

En la Figura 20, se observa la superficie de respuesta de la extracción de aceite con CO_2 supercrítico para las 2 horas, evidenciándose que a presiones mayores y temperaturas menores se obtiene mejores rendimientos de aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO_2 supercrítico.

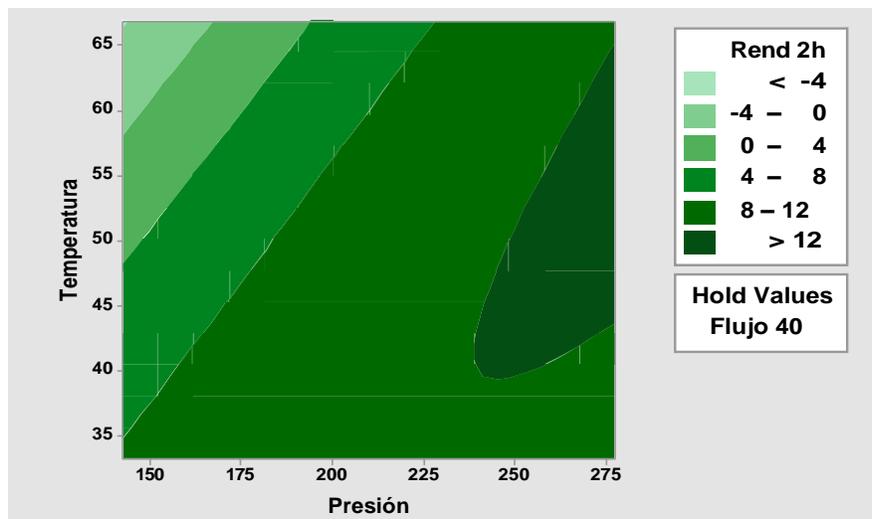


Figura 20. Superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas en función de la presión (bar) y temperatura (°C).

Fuente: Software Minitab versión 17

En la Figura 21 se observa que la superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas a flujos mayores y temperaturas menores se obtiene un mayor porcentaje de aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO₂ supercrítico.

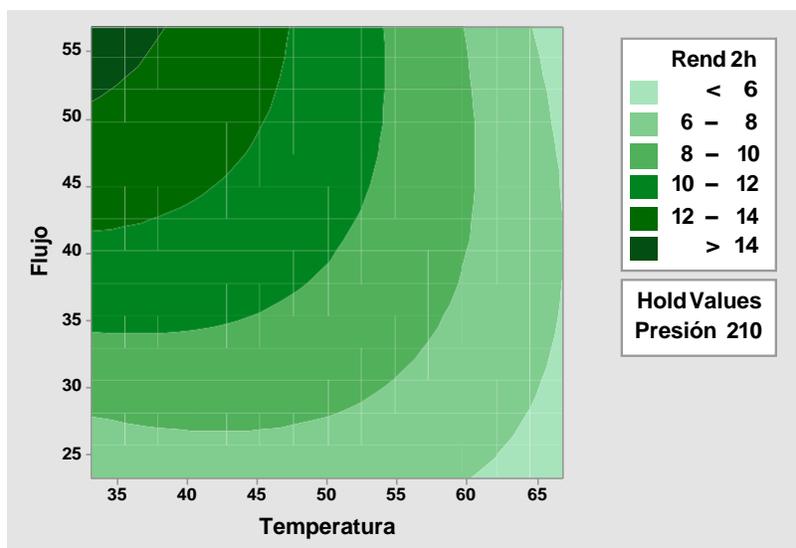


Figura 21. Superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas en función de la temperatura (°C) y flujo (g/min).

Fuente: Software Minitab versión 17

En la Figura 22 se muestra la superficie de respuesta del rendimiento de extracción en 2 horas del aceite de semillas de uva Quebranta utilizando CO₂ supercrítico, aquí se observa que a medida que la presión es mayor y el flujo es mayor se obtiene un mayor porcentaje de extracción de aceite.

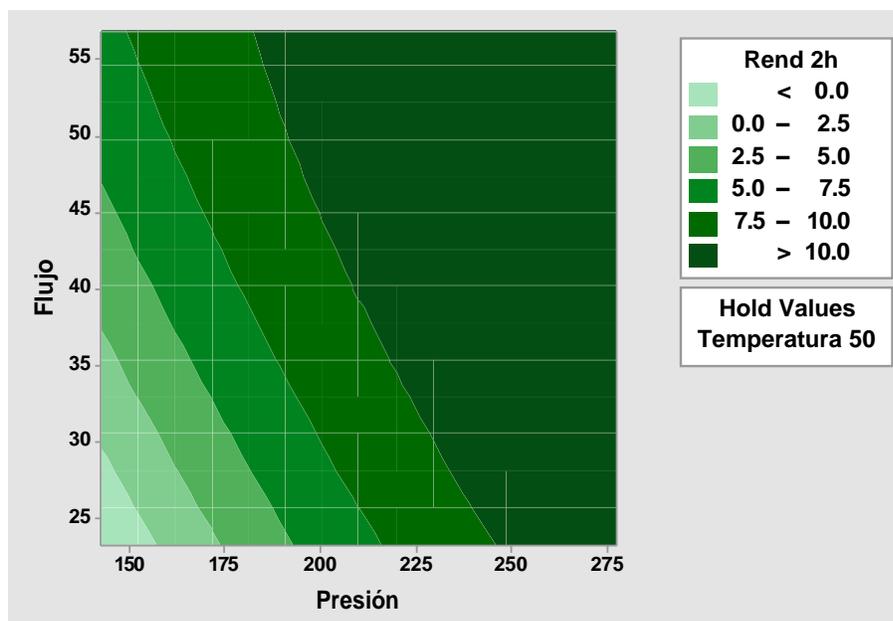


Figura 22. Superficie de respuesta del rendimiento de 2 horas en función de la presión (bar) y flujo (g/min).

Fuente: Software Minitab versión 17

4.4.3 Validación de los parámetros optimizados

Se realizó la extracción de aceite de semillas de uva Quebranta según las condiciones óptimas de $P=188$ bar, $T= 33,2$ °C, $F= 57$ g/min, donde se obtuvo mayor cantidad de aceite ($13,48 \pm 0,40$ %) comparándolo con los dieciséis experimentos y una cinética de extracción que se evidencia en la Figura 23. Este aceite presentó un color amarillo intenso, tal como se evidencia en la Figura 24.

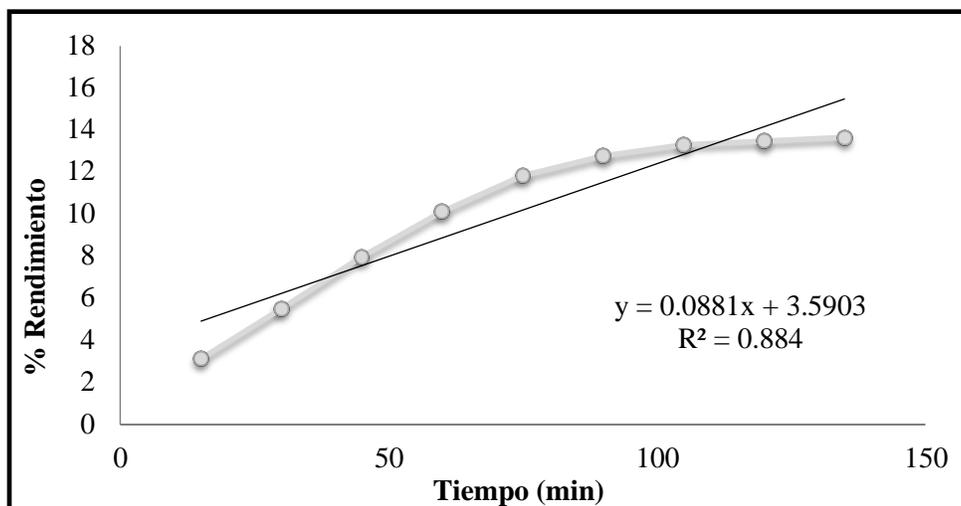


Figura 23. Cinética de la extracción optimizada del aceite de semillas de uva con CO₂ supercrítico.

Fuente: Elaboración propia



Figura 24. Aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO₂ supercrítico.

Fuente: Elaboración propia

Passos, Silva R., Da Silva, Coimbra y Silva C., (2009) realizaron la extracción del aceite de semillas de uva utilizando CO₂ supercrítico a 40 °C, con un flujo de 10,2 g/min y a tres presiones (160, 180, 200 bar) obteniendo como mayor rendimiento (a partir de las presiones trabajadas) 11,5%, quienes resaltan que cuanto mayor es la presión, mayor será la potencia del disolvente. Göktürk, Özkan, y Sema (2007) encontraron que los rendimientos del aceite de semillas de uva oscilaban entre el 5,85% a 13,6% extrayéndolo también con dióxido de carbono supercrítico.

Beveridge, Girard, Kopp y Drover (2005) realizaron la extracción del aceite de semillas de uva con dióxido de carbono supercrítico, donde determinaron que el aceite extraído muestra una región de extracción rápida, seguida por una región de extracción de rendimiento lento. Debiéndose a que existen dos mecanismos de extracción, una es rápida a partir de la superficie y subsuelo poco profundo, seguido por la extracción controlada por difusión del aceite que se encuentra profundamente fijado. Esto se evidencia en la Figura 17, donde inicialmente se extrae rápido y luego la curva empieza a declinar.

Esquível y Bernardo-Gil (1993) extrajeron aceite de orujo de aceituna con CO₂ supercrítico, y comprueban que la solubilidad del aceite disminuye con el aumento de la temperatura. Así como también la solubilidad aumenta con la presión y disminuye con el aumento de la temperatura.

A su vez, Fiori, Lavelli, Duba, Sri Harsha, Mohamed y Guella (2014) realizaron la extracción del aceite de semillas de uva a 500 bar con una temperatura de 50 °C y a un flujo de 8 g/ min, donde evidencian que la cinética de extracción tiene una tendencia lineal al principio, debido al aceite libre, seguido de una extracción lenta (achatación de la curva) que se debe al aceite ligado, obteniendo rendimientos de van desde 10,1 % hasta 15,5 %.

Duba y Fiori (2015) extrajeron el aceite de semillas de uva con CO₂ supercrítico utilizando rangos de temperatura desde 40 °C hasta 70 °C y presión desde 200 bar hasta 500 bar, obteniendo mayor cantidad de aceite a menores temperaturas y mayores presiones.

4.5 Caracterización física del aceite de las semillas de uva Quebranta

Los resultados de la caracterización física (índice de refracción, densidad) del aceite de semillas de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano y con CO₂ supercrítico se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Características físicas del aceite de semillas de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano (Soxhlet) y con CO₂ supercrítico

Aceite de semillas de uva Quebranta	Índice de refracción (40°C)	Densidad (g/ml)
Extracción convencional (soxhlet)	1,4657 ± 0,001	0,9386 ± 0,01
Extracción con CO₂ supercrítico	1,4672 ± 0,001	0,9200 ± 0,02

Fuente: Elaboración propia

El CODEX STAIN (1999) estableció que el rango permitido del índice de refracción para el aceite de semillas de uva es 1,467 – 1,477 a 40 °C. Estando dentro de este rango el resultado de la extracción con CO₂ supercrítico (1,4671), más no de la extracción convencional (1,4656). Navas (2010) extrajo el aceite de las semillas de uva con solvente en frío,

encontrando valores de índice de refracción de 1,4367-1,4518 (40 °C), estando por debajo de los valores obtenidos en este estudio.

Según el CODEX STAIN (1999) los valores permitidos de densidad para el aceite de semillas de uva son 0,920-0,926 g/ml (20 °C). Por otro lado Navas (2010) encontró otro rango de densidad para el aceite de semillas de uva, 0,9251-0,9343 g/ml (25 °C).

Así también, Franco-Mora, Salomon-Castaño, Morales, Castañeda-Vildózola y Rubí-Arriaga (2015) realizó la extracción del aceite de semillas de uva (vid silvestre) por el método convencional, obteniendo densidades desde 0,88 hasta 0,91 g/ml de aceite.

Yousefi, Nateghi y Gholamian (2013) extrajeron el aceite de semillas de uva por soxhlet (éter de petróleo), obteniendo valores de índice de refracción de 1,473-1,470 (40 °C) y densidad 0.919-0.924, estando estos resultados alejados de los determinados en este estudio.

El índice de refracción es un factor de calidad, que aumentará a medida que aumenten los compuestos de oxidación (peróxidos, aldehídos, alcoholes), estos pueden combinarse entre sí y producir otros compuestos con alto peso molecular que causa el aumento del índice de refracción y densidad (Yousefi *et al.*, 2013).

4.6 Caracterización química del aceite de las semillas de uva Quebranta

Los resultados de la caracterización química (índice de peróxidos, índice de anisidina, % de ácidos grasos libres e índice de yodo) del aceite de semillas de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano y con CO₂ supercrítico se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Características químicas del aceite de semilla de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano (Soxhlet) y con CO₂ supercrítico

Aceite de semillas de uva Quebranta	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Índice de anisidina (s/u)	Ácidos grasos libres (%)	Índice de yodo (g/100g)
Extracción convencional (soxhlet)	38,44 ± 0,44	3,06 ± 0,15	0,82 ± 0,04	130,48 ± 0,06
Extracción con CO₂ supercrítico	2,40 ± 0,07	2,30 ± 0,20	1,55 ± 0,40	126,9 ± 0,73

Fuente: Elaboración propia

Según el CODEX STAIN (1999) el límite del índice de peróxidos para aceites prensados en frío y vírgenes es hasta 15 miliequivalentes de oxígeno activo/ kg de aceite, encontrándose dentro de este límite el valor del aceite de semillas de uva extraído con CO₂ supercrítico, y fuera del rango superior para la extracción convencional. Franco-Mora, Salomon-Castaño, Morales, Castañeda-Vildózola y Rubí-Arriaga (2015) obtuvo 30 ± 1,57 miliequivalentes de oxígeno activo/ kg de aceite, y 4,0 ± 0,41 miliequivalentes de oxígeno activo/ kg de aceite para la vid comercial.

El valor del índice de peróxidos para la extracción convencional por soxhlet (38,44 ± 0,44) es elevado, en comparación con la extracción supercrítica con CO₂ (2,40 ± 0,07), debido a la exposición del aceite a altas temperatura en el sistema soxhlet, ya que el aceite tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados y al ser expuestos a condiciones desfavorables tiene la tendencia a formar radicales libres; estos radicales reaccionan con el oxígeno y forman

gran cantidad de peróxidos lipídicos. Estos peróxidos se fraccionan en varias etapas formando una amplia variedad de productos de descomposición, por ejemplo los aldehídos, las cetonas, furanos y ácidos carboxílicos; dichos productos son los responsables de la formación de los peróxidos en los aceites y grasas tal como lo mencionan Mieres, Andrade, García y Londoño (2012).

No se encontraron valores de índice de anisidina en aceite de semilla de uva, solo para aceites de pescado, aceites de hígado de pescado, aceites de pescado concentrados, y ésteres etílicos de pescado concentrados donde reportan que debe ser ≤ 20 según la norma de la Comisión del Codex Alimentarius (2017) sobre grasas y aceites. Donde los valores de índice de anisidina del aceite de semillas de uva Quebranta, extraído por el método convencional (soxhlet) y con CO₂ supercrítico, se encontró por debajo de este límite para ambos métodos de extracción.

Yousefi, Nateghi y Gholamian (2013) encontraron en el aceite de semillas de uva, una acidez (expresada en ácido oleico) de 0,61 – 0,67 % e índice de yodo desde 123,55 hasta 126,13 g/100 g, y Franco-Mora, Salomon-Castaño, Morales, Castañeda-Vildózola y Rubí-Arriaga (2015) obtuvieron $0,4 \pm 0,03$ % (vid silvestre) y $0,07 \pm 0,01$ % ácidos grasos libres (vid comercial), estando estos últimos por debajo de los encontrados en este estudio, y un índice de yodo de 57,9-130,2 g/100 g. A diferencia de este, el índice de yodo se encontró dentro de este rango determinado por las dos extracciones. Por otro lado, el CODEX STAIN (1999) indica que el aceite de semillas de uva debe contener un índice de yodo entre 128 y 150 g/100 g como límite aceptable, cumpliendo con este rango la extracción convencional ($130,48 \pm 0,06$ g/100 g) y no con CO₂ supercrítico ($126,9 \pm 0,73$ g/100 g).

4.7 Análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta por cromatografía de gases

Por medio de la técnica de cromatografía de gases se ha determinado el perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de uva Quebranta, tal como se muestra en la Tabla 12 y los cromatogramas en el Anexo 5 y 6.

Tabla 12

Composición de ácidos grasos (%) del aceite de semilla de uva Quebranta extraído por el método convencional con hexano (Soxhlet) y con CO₂ supercrítico

Ácido graso	Extracción convencional (soxhlet)	Extracción con CO₂ supercrítico
C 16:0 (Palmítico)	7,11 ± 0,06	7,07 ± 0,29
C 18:0 (Esteárico)	5,16 ± 0,03	4,87 ± 0,37
C 18:1 ω9 (Oleico)	20,20 ± 0,04	20,05 ± 0,31
C 18:2 ω6 (Linoleico)	65,95 ± 0,02	66,45 ± 0,55
C 18:3 ω3 (α Linolénico)	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,01
C 20:0 (Araquídico)	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,16
C 20:1 ω9 (Eicosanoico)	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,02

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos de ácidos grasos oleico y linoleico se encuentran dentro del rango establecido por la norma CODEX STAIN (1999) para el aceite de semillas de uva, extraído tanto convencionalmente como con CO₂ supercrítico.

Los valores obtenidos de la composición en ácidos grasos libres fue palmítico (9,31%), esteárico (5,98%), oleico (15,32%) y linoleico (67,04%). El aceite obtenido posee un elevado contenido de ácido linoleico (omega 6), un ácido graso esencial en la dieta humana, ya que no es sintetizado por las células y debe ser ingerido a través de la alimentación (Mieres *et al.*, 2012).

Franco-Mora, Salomon-Castaño, Morales, Castañeda-Vildózola y Rubí-Arriaga (2015) encontraron que la semilla de uva silvestre extraído con hexano por el método convencional contienen desde 71,1 - 73 % de ácido linoleico, 16,6 – 17,4 % de ácido oleico, 6,9 -7,9 %, de ácido palmítico y 3,5 – 3,6 % de ácido esteárico. Yousefi, Nateghi y Gholamian (2013) encontraron valores similares de ácido oleico 23,19 – 25,10 % y ácido linoleico 63,17 – 65,39%.

4.8 Evaluación de la capacidad antioxidante del aceite de semillas de uva Quebranta

Actividad antioxidante mediante el método DPPH

En la Figura 25 se muestra la curva de calibración, obteniéndose un coeficiente de correlación de R^2 de 0,9925.

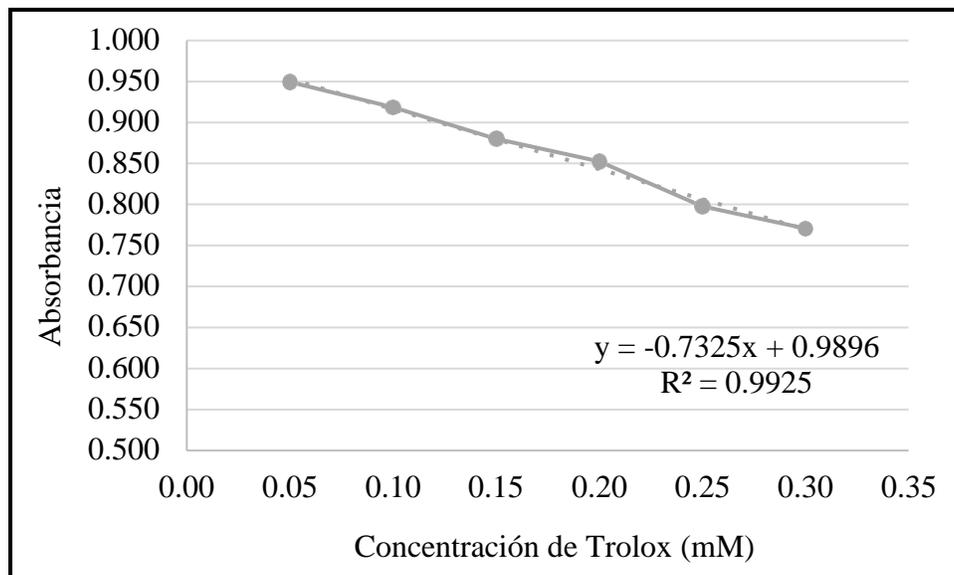


Figura 25. Curva de calibración de Trolox

Fuente: Elaboración propia

Mediante el método DPPH se obtuvo como actividad antioxidante del aceite de semillas de uva Quebranta para la extracción convencional con soxhlet y extracción con CO₂ supercrítico valores de 7,26 mM y 7,80 mM equivalente a trolox respectivamente. Gomez y Huacayo (2014) encontraron que la capacidad antioxidante del aceite de semillas de uva *Vitis vinifera L.* extraído por la técnica de prensado en frío, fue evaluado por el mismo método, dando como resultado 9,50 mM equivalente a trolox.

Capítulo 5

Conclusiones

- La extracción con CO₂ supercrítico es una alternativa prometedora para lograr rendimientos de aceite con mejor calidad, comparables con la extracción convencional que por el contrario degrada los compuestos térmicamente lábiles. En consecuencia las condiciones óptimas de presión, temperatura y flujo para la extracción de mayor rendimiento con CO₂ supercrítico durante dos horas, según el software minitab, fueron a 188 bar, 33,5 °C y 57 g/min respectivamente, obteniéndose un rendimiento de $13,48 \pm 0,40$ % de aceite de semillas de uva Quebranta. Cabe decir que se obtendrá mejores rendimientos de extracción a mayores presiones, menores temperaturas y mayores flujos de CO₂, y si se utilizara mayores temperaturas los rendimientos serán bajos.
- La caracterización física del aceite de semillas de uva Quebranta por el método convencional fue 1,4710 de índice de refracción y 0,9386 g/ml de densidad, y por el método con CO₂ supercrítico 1,4725 de índice de refracción y 0,9200 g/ml de densidad.
- La caracterización química para la extracción convencional (soxhlet) y con CO₂ supercrítico respecto al índice de peróxidos, índice de anisidina, ácidos grasos libres e índice de yodo fueron $38,44 \pm 0,44$ mEq/ kg y $2,40 \pm 0,07$ mEq/ kg, $3,06 \pm 0,15$ y $2,51 \pm 0,39$, $0,82 \pm 0,04$ % expresado en ácido oleico y $1,55 \pm 0,40$ % expresado en ácido oleico, $130,48 \pm 0,06$ g/ 100 g y $126,9 \pm 0,73$ g/ 100g, respectivamente.

- Respecto a los ácidos grasos, los predominantes fueron el oleico y linoleico, obteniéndose para la extracción convencional $20,20 \pm 0,04\%$ y $65,95 \pm 0,02\%$, y para la extracción con CO₂ supercrítico $20,05 \pm 0,31\%$ y $66,45 \pm 0,55\%$ respectivamente.
- La evaluación de la capacidad antioxidante en el aceite extraído con soxhlet fue 7,26 mM y 7,80 mM equivalente a Trolox para la extracción con CO₂ supercrítico, no habiendo diferencia significativa.

Recomendaciones

- Hacer estudios sobre la composición del orujo de uva y su contenido polifenólico.
- Evaluar cómo influye otros tamaños de partícula de las semillas de uva y evaluar los mejores rendimientos de extracción respecto a estos.
- Realizar la extracción del aceite de semillas de uva con CO₂ supercrítico utilizando otros rangos de presión, temperatura y flujo.
- Realizar un análisis de fitoesteroles empleando estándares que permitan su identificación y cuantificación.
- Realizar la determinación de la actividad antioxidante del aceite de semillas de uva por otros métodos.
- Se sugiere continuar con la investigación de la semilla *Vitis vinífera* (Uva), ya que presenta propiedades farmacológicas muy beneficiosas para el tratamiento de diversas enfermedades.

Referencias bibliográficas

- Aizpurua-Olaizola, O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N. & Usobiaga, A. (2014) Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *Vitis vinífera* grape Wastes. *Journal of Food Science*, 80(1), 101-107.
- AOAC Official Method 920.158 (2005) *Iodine value (Hanus solution) Method*. Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., EUA.
- AOAC Official Method 920.212 (1920) Specific gravity (apparent) of oils, pycnometer method. Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., EUA.
- AOAC Official Method 921.08 (2000) Index of refraction of oils and fats. Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., EUA.
- AOAC Official Method 940.28 (2005) *Fatty acids (free) in crude and refined oils Method*. Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., EUA.
- AOAC Official Method 950.48 (2005) Protein (crude) in Nuts and Nut Products Method. Association of Official Analytical Chemistry; Washington D.C., EUA.
- AOAC Official Method 965.33 (2005) Peroxide Value of Oils and Fats Method. Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., EUA.
- AOAC. Official Method 925.40 (2005) Moisture in Nuts and Nut Products Method. Association of Official Analytical Chemistry; Washington D.C., EUA
- AOAC. Official Method 948.22 (2005) Fat (Crude) in Nuts and Nut Products Method. Association of Official Analytical Chemistry; Washington D.C., EUA.

- AOAC. Official Method 950.49 (2005) Ash of Nuts and Nut Products Method.
Association of Official Analytical Chemistry; Washington D.C., EUA.
- Arce, A. Y. (2015) Diseño de una prensa tipo expeller para el proceso de extracción de aceite a partir de semillas oleaginosas, mediante la metodología de ingeniería inversa. Trabajo de grado. Medellín: Universidad EAFIT.
- Avello, M & Suwalsky, M. (2006) Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494,161-172.
- Ayala, M. (2011) Evaluación de la calidad del aceite de mezclas vegetales utilizado en doce frituras sucesivas empleado para freír plátano hartón verde. Tesis. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Beveridge, T., Girard, B., Kopp T. & Drover, J. (2005) Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: varietal effects. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53, 1799-1804.
- Bombardelli, E; Morazzoni P; Carini, M. 1997. Biological activity of procyanidins from *Vitis vinífera* L. Biofactore, Instituto Chimico Farmaceutico Tossicologico. Milan, Italy, Universite di Milan. p. 429-431.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u-Technol*, 28, 25-30.
- Brunner, G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33.
- CEDEP Centro de Estudios para el Desarrollo y la Participación (2007) Manual de la vida Quebranta. "Proyecto: Competitividad y desarrollo de liderazgo con equidad de

género de los pequeños (as) productores (as) agrícolas del distrito de Ocucaje en la Región de Ica”. En convenio con la Unión Europea y APROLAB. Ica, Perú.

- CEDEP Centro de Estudios para el Desarrollo y la Participación (2011) Manual del cultivo de la vid. Proyecto: “Desarrollo de capacidades de producción y comercialización para la mejora de los ingresos económicos de los pequeños productores agropecuarios de los distritos de San Clemente, Independencia, San Andrés y Humay de la provincia de Pisco - Ica”. Perú.
- CEDEP Centro de Estudios para el Desarrollo y la Participación (2012) Manejo del cultivo de la vid. Proyecto: “Desarrollo Competitivo de las Unidades Agropecuarias Productivas en el Distrito de Caravelí - Arequipa”. Ica, Perú.
- Ciani, G. Chancalay, G, Girotti, A. Glusman, A. & Pacheco, M. L. (2002) Extracción de aceites con fluido supercrítico. Redalyc: Invenio, 5, 125-130.
- CITE agroindustrial Centro de Innovación Tecnológica (2000) Descriptores de las variedades pisqueras. Callao, Perú.
- CODEX STAN (1999) Norma del codex para aceites vegetales especificados, CODEX STAN 210.
- Comisión del Codex Alimentarius (2017) Programa conjunto FAO/OMS de normas alimentarias, Informe de la 25° sesión del comité del codex sobre grasas y aceites. Suiza.
- Conde, L. A. & Guerrero, J. A. (2009) Extracción supercrítica de antioxidantes naturales a partir de hierbas y especias. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas.

- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vásquez, M. & Radilla, C. (2015) Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42, 206-212.
- Da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A. & Duarte, A. C. (2015) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. Disponible en: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.trac.2015.11.013>.
- Davidov-Pardo, G. & McClements, D. J. (2015) Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry*, 165, 205-212.
- De Melo, M. M., Silvestre, A. J. & Silva, C. M. (2014) Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. Disponible es: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>
- Delgado, L., Betanzos, G. & Sumaya, T. (2010) Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Redalyc: Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 50, 10-15.
- Duba, K. & Fiori L. (2015) Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 33-43.
- Duba, K. & Fiori L. (2016) Solubility of grape seed oil in supercritical CO₂: Experiments and modeling. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 100, 44-52.
- Esquivel, M. & Bernardo-Gil, M. G. (1993) El uso de fluidos supercríticos en la industria de aceites alimentarios. *Revistas CSIC: Grasas y Aceites*, Vol. 44.

- Farías, Á. M. & Matos, A. (2009) Influencia de la temperatura y tamaño de partícula en el proceso de extracción de aceite de semilla de uva (*Vitis vinífera*). *Revista de Investigación Universitaria*, 1, 31-37.
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Sri Harsha, P. S. C., Mohamed, H. B. & Guella, G. (2014) Supercritical CO₂ extraction of oil seeds of sin grape cultivars: modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 71-80.
- Franco-Mora, O., Salomon-Castaño, J., Morales, A. A., Castañeda-Vildózola, A. & Rubí-Arriaga, M. (2015) Ácidos grasos y parámetros de calidad del aceite de semilla de uva silvestre (*Vitis spp.*). *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 271-278.
- Galgani, E. (2004) Evaluación de la situación de ácidos grasos esenciales y derivados de cadena larga en la dieta de lactantes menores de un año en Chile. Chile: *Revista Chilena de Nutrición*, 21, 154-160.
- García, L., García, L. V., Rojo, D. & Sánchez, E. (2001) Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20 (3), 231-5.
- Göktürk, N. & Akkurt, M. (2001) Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turk Journal of Agriculture and Forestry*, 25, 163-168.
- Göktürk, N., Özkan, G. & Sema, E. (2007) Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y aceites: ISSN*, 58 (1), 29-33.
- Gomez, A. & Huacayo, L. M. (2014) Efecto del aceite de semilla de *Vitis vinífera* L. (Uva) sobre la hipertensión arterial experimentalmente inducida en ratas. Trabajo de grado. Arequipa: Universidad Católica de Santa María.

- Gonzáles, A. D., Kafarov, V. & Guzmán, A. (2009) Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect.*, 7, 53-60.
- González-Álvarez, D., Hincapié, S., Patiño, S., Alzate, L. & Benavides, Y. (2015) Desarrollo de un licor de piña a partir de subproductos de la empresa Picados San Juan. *The Journal of Engineering and Technology*, 4, 2256-3903.
- Grompone, M. A. (1991) El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. *International Journal of Fats and Oils*, 42, 8-13.
- Guerra, E. G. & Zuñiga, M. E. (2003) Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinífera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceite*, 54, 53-57.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J. & Zarzosa-Norabuena, E. (2015) Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15(1), 57.60.
- Gutiérrez, H. & De la Vara R. (2008) *Análisis y diseño de experimentos*. 2da edición. México, Interamericana Editores, S.A.
- Hanganu, A., Todasca, M., Chira, N., Maganu, M. & Rosca, S. (2012) The compositional characterisation of Romanian grape seed oils using spectroscopic methods. *Food Chemistry*, 134, 2453-2458.
- Hatta, B. (2004) *Influencia de la fermentación con orujos en los componentes volátiles del pisco de uva Italia (Vitis vinífera L. variedad Italia)*. Tesis de grado. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Hatta, B., Domenech, A. & Palma, J. C. (Junio de 2009) *Influencia de la fermentación con orujos en los componentes volátiles mayoritarios del pisco de uva Italia (Vitis vinífera*

- L. var. Italia). Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras llevado a cabo en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Acapulco, Mexico.
- Hidalgo, R., Gómez, M., Rojas, P., Soliz, M., Soliz, R., Quiroga, D., Saravia, G. & Saavedra, D. (2016) Propiedades medicinales de la semilla de uva. *Revista de Investigación e Información en Salud*, 11, 2075-6194.
 - INEI Instituto Nacional de Estadística e Informática (2015) Series Nacionales. Lima, Perú. Disponible en: <http://webinei.inei.gob.pe:8080/sirtod-series/>
 - Luque-Rodriguez, J. M., Luque de Castro, M. D. & Pérez-Juan, P. (2005) Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta*, 68, 126-130.
 - Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E. & Yu, L. (2011) Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, 128, 391-399.
 - Mieres, A., Andrade, A., García, L. & Londoño, P. (2012) Extracción del aceite de la semilla de uva variedad “Criolla negra” y su caracterización. *Revista Anales de la Universidad Metropolitana*, 12 (1), 193-206.
 - MINAG Ministerio de Agricultura (2015) Boletín estadístico de producción
 - Molero, A., Pereyra, C. & Martínez, E. (1996) Recovery of grape seed oil liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal*, 61, 227-231.
 - Montgomery, D. (2004) *Diseño y análisis de experimentos*. 2da edición. México: Limusa Wiley.

- Moya, C. R. (2017) Extracción y caracterización de aceite vegetal de las semillas de uva Borgoña (*Vitis vinífera*) utilizando enzimas. Tesis. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Naudé, Y., De Beer, W.H., Jooste, S., Van Der Merwe, L. & Van Rensburg, S. J. (1998) Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of DDT, DDD and DDE in sediment. ISSN 0378-4738, 24 (3), 205-214.
- Navas, P. B. (2009) Composición química del aceite virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades de uva (*Vitis vinífera* L.) con énfasis en los componentes minoritarios. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 59 (2), 214-219.
- Navas, P. B. (2010) Caracterización físico-química del aceite de semillas de uva extraído con solvente en frío. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, 27, 270-288.
- Nazir, N., Ramli, N., Mangunwidjaja, D., Hambali, E., Setyaningsih, D., Yuliani, S., Ambar, M. & Salimon, J. (2009) Extraction, transesterification and process control in biodiesel production from *Jatropha curcas*. European Journal of Lipid Science and Technology, 111, 1185-1200.
- NTP Norma Técnica Peruana 209.217 (1983) Método de determinación del índice de anisidina. Aceites y Grasas comestibles.
- NTP Norma Técnica Peruana 211.001 (1983) Bebidas alcohólicas, Pisco, Requisitos. 7° Edición.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (2017) Balance 2017 de la OIV sobre la situación vitivinícola mundial. España. Disponible en:

<http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/balance-2017-de-la-oiv-sobre-la-situacion-vitivinicola-mundial>.

- Özcan, M., Ünver, A., Gümüş, T. & Akın, A. (2012) Characteristics of grape seed and oil from nine Turkish cultivars. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 26, 2024-2029.
- Padley, F; Gunstone, F; Harwood, J. 1994. Occurrence and Characteristics of oils and fats. In: *The Lipid Handbook*. 2 ed. Chapman & Hall, London p.88-113.
- Paladino, S. C. & Zuritz, C. A. (2012) Extracto de semillas de vid (*Vitis vinífera* L.) con actividad antioxidante: concentración, deshidratación y comparación con antioxidantes de uso comercial. *Rev. FCA UNCUYO*, 44(2), 131-143.
- Parada, E. J. (2005) Caracterización del aceite y la fibra dietética obtenidos a partir de semilla de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) Tesis para optar el grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia: Universidad Austral de Chile.
- Passos ., Silva, R. Da Silva, F. Coimbra, M. & Silva, C. (2009) Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. *Journal of Supercritical Fluids*, 48, 225-229.
- PNUD Programa de las Naciones Unidas (2004) La uva y el pisco: potencialidades productivas. Centro de Innovación Tecnológica vitivinícola (CITEvid).
- Prevot, G. & Mordret, M. (1976) Utilisation des colonnes capillaires de verre pour l'analyse des corps gras par chromatographie en phase gazeuse. *Rev. F. Corps. Gras.*, 23, 7-8.

- Ramos, E., Castañeda, B. & Ibáñez, L. A. (2008) Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Perú Salud*, 15(1).
- Ramos, R. J. (2015) Estudio de pre factibilidad para el desarrollo industrial de productos alternativos en base a subproductos derivados de la industria vitivinícola en la región de Ica. Tesis para optar el título de ingeniero industrial. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Rengifo, P. G. (2014) Caracterización del aceite de la semilla de palta *Persea Americana* Mill. Var. Hass fuerte y medición de su actividad antioxidante. Tesis de doctorado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Rouquié, C., Dahdouh, L., Delalonde M. & Wisniewski, C. (2017) An innovative lab-scale strategy for the evaluation of grape processing residues (GPR) filterability: application to GPR valorization by ultrafiltration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- Ruiz, P. (1996) Aplicación del dióxido de carbono supercrítico al proceso de alimentos: nata, subproductos del refinado de aceites vegetales y zumo de naranja. Trabajo titulado. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Sahena, F., Zaidul, I. S., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. & Omar, A. K. (2009) Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. *Journal of Food Engineering*, 95, 240-253.
- Shinagawa, F. B., Santana, F. C., Torres, L. R. & Mancini-Filho (2015) Grape seed oil: a potential functional food. *Food Science and Technology*, 35(3), 399-406.

- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2008) Principios de análisis instrumental. México: Cengage Learning Editores.
- Software estadístico Minitab versión 17.
- Toledo, V. H. J. (2012) Evolución de los componentes volátiles del pisco puro Quebranta (*Vitis vinífera* L. var. Quebranta) obtenido de la destilación en falca y alambique a diferentes condiciones de aireación durante la etapa de reposo. Tesis. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Tomás-Barberán, F. A. (2003) Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, Nutrición y Salud, 10(2), 41-53.
- Toro, N. & Suárez, L. (2012) Obtención y caracterización del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (Uva Isabella) y evaluación de su actividad antioxidante. Trabajo de grado. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Turrens, J. F. (2003) Topical review mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. 552(2), 335-344.
- Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- Vásquez, L. (2008) Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Velasco, R. J., Villada, H. S. y Carrera, J. E. (2007) Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-65.

- Velásquez, Á. M. (2008) La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial. Disponible en: <http://www.lasallista.edu.co/fxcu/media/pdf/RevistaLimpia/vol3n2/88-97.pdf>
- Vivanco, M. & Moreno, J. J. (2008) Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition*, 99, 1199-1207.
- Vivar, J. J. (2013) Diseño de una planta piloto de extracción de oleoresina de paprika usando CO2 como fluido supercrítico. Tesis. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Wong, J. (Setiembre de 2013) Las uvas de la vida. Entrevista a José Moquillaza. *Revista Velarde*. Lima.
- Yousefi, M., Nateghi, L. & Gholamian, M. (2013) Physicochemical properties of two type of shahrodi grape seed oil (Lal and Khalili). *European Journal of Experimental Biology*, 3(5), 115-118.
- Zuñiga, M. C. (2005) Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Tesis. Santiago: Universidad de Chile.

Anexos

Anexo 1. Composición de minerales (mg/100g muestra) de uva fresca, orujo fresco, orujo seco y semillas secas de uva

Componente (mg/100 g)	Uva fresca	Orujo fresco	Orujo seco	Semillas secas
Zinc	0,32 ± 0,38	0,61 ± 0,25	2,52 ± 2,30	1,72 ± 0,43
Hierro	0,39 ± 0,33	17,52 ± 10,65	43,58 ± 20,42	4,00 ± 0,94
Sodio	5,93 ± 0,73	26,67 ± 26,61	71,96 ± 82,19	7,21 ± 2,68
Potasio	143,80 ± 3,70	288,58 ± 33,30	1442,21 ± 194,74	328,80 ± 54,46
Calcio	88,67 ± 0,35	114,88 ± 17,12	243,37 ± 33,09	445,20 ± 50,56
Magnesio	59,64 ± 0,35	23,68 ± 18,42	78,15 ± 10,48	108,98 ± 26,31
Cobre	0,10 ± 0,02	0,46 ± 0,20	1,26 ± 0,46	0,64 ± 0,19

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2. Composición de metales pesados (ppm) de uva fresca, orujo fresco, orujo seco y semillas secas de uva

Componente (ppm)	Uva fresca	Orujo fresco	Orujo seco	Semillas secas
Plomo	0,04 ± 0,01	0,20 ± 0,08	0,47 ± 0,07	0,07 ± 0,03
Cadmio	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,01

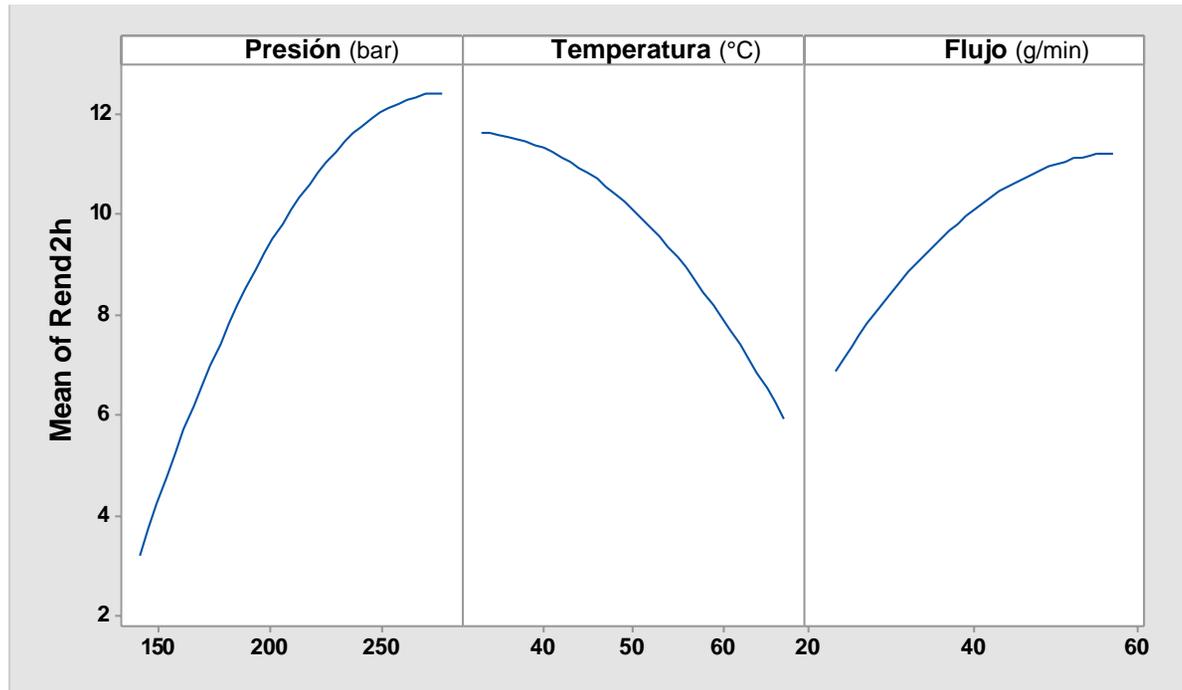
Fuente: Elaboración propia

Anexo 3. Rendimientos del aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO2 supercrítico de los dieciséis experimentos sugeridos por el software Minitab (g de aceite/100g de semillas secas)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Tiempo (min)	170	250	170	250	170	250	170	250	142.7	277.3	210	210	210	210	210	210
	Bar,															
	40	40	60	60	40	40	60	60	50	50	33.2	66,8	50	50	50	50
	°C,															
	30	30	30	30	50	50	50	50	40	40	40	40	23,2	56,8	40	40
	<u>g/min</u>															
15	0,93	2,00	0,42	0,92	1,74	3,23	0,36	2,53	0,46	2,00	2,58	1,55	1,28	1,76	0,63	1,08
30	1,44	3,91	0,94	2,01	3,19	5,64	0,65	4,19	0,89	4,97	5,26	2,31	1,65	3,56	2,39	2,32
45	2,11	6,16	1,18	3,33	4,98	8,16	1,12	5,71	1,13	7,57	7,40	2,97	2,54	5,88	3,89	3,90
60	2,83	7,80	1,53	4,82	7,02	10,34	1,77	6,90	1,43	9,63	9,12	3,53	3,16	7,78	5,72	5,22
75	3,57	9,56	1,75	6,48	8,68	11,78	2,22	7,65	1,85	11,30	10,21	4,36	4,21	9,71	7,09	6,50
90	4,50	10,80	1,92	8,54	10,45	12,20	2,65	8,57	2,26	12,03	10,72	4,84	4,99	11,04	8,48	7,95
105	5,29	11,04	1,97	9,59	11,55	12,39	3,16	9,52	2,74	12,23	10,89	5,45	5,70	11,34	9,32	9,12
120	6,05	11,31	2,00	10,90	11,95	12,44	3,66	10,36	3,11	12,43	11,11	6,30	6,20	11,75	9,86	10,42

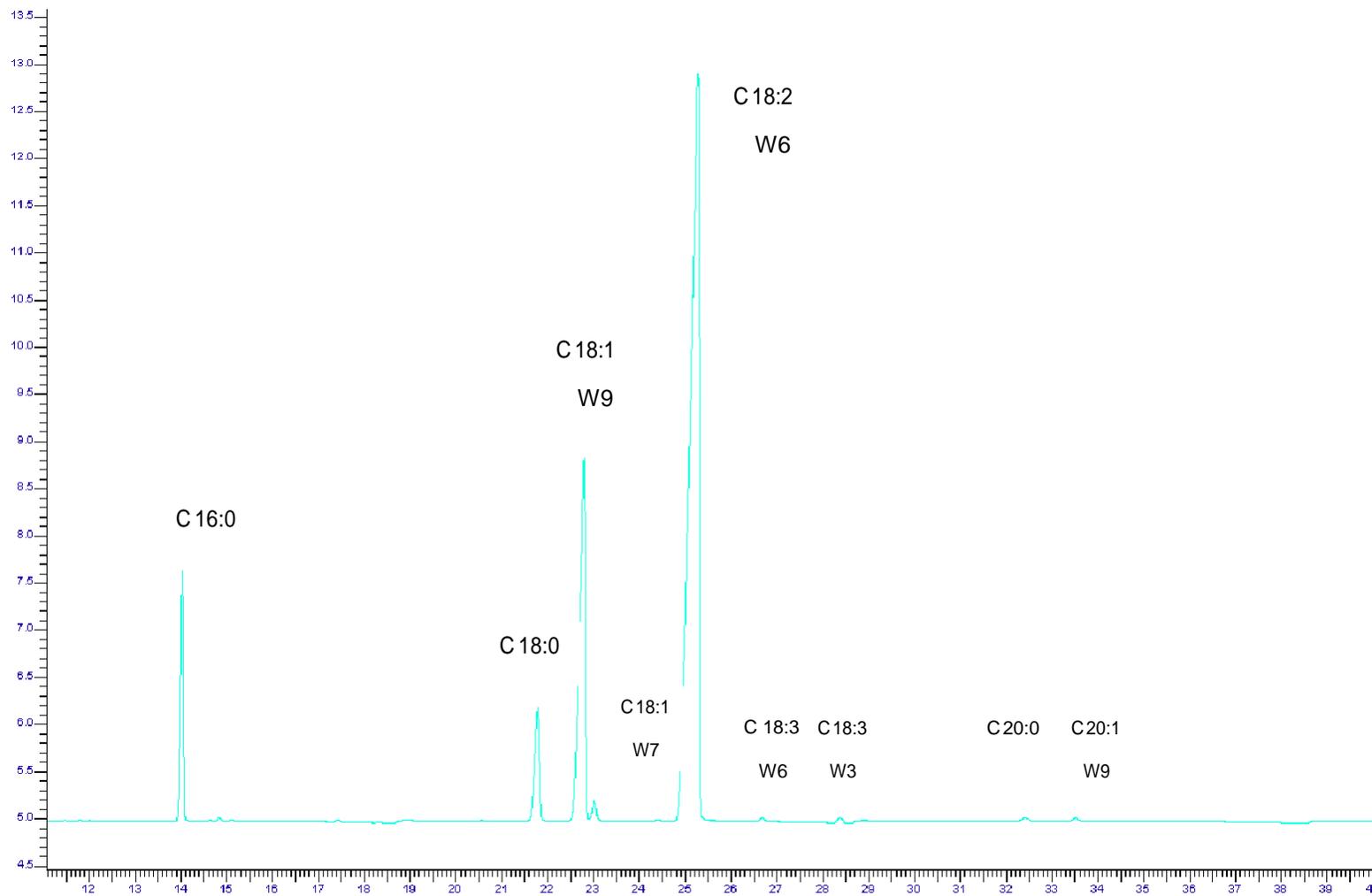
Fuente: Elaboración propia

Anexo 4. Gráficos de la cinética de extracción del aceite de semillas de uva con CO2 supercrítico para los parámetros de presión, temperatura y flujo

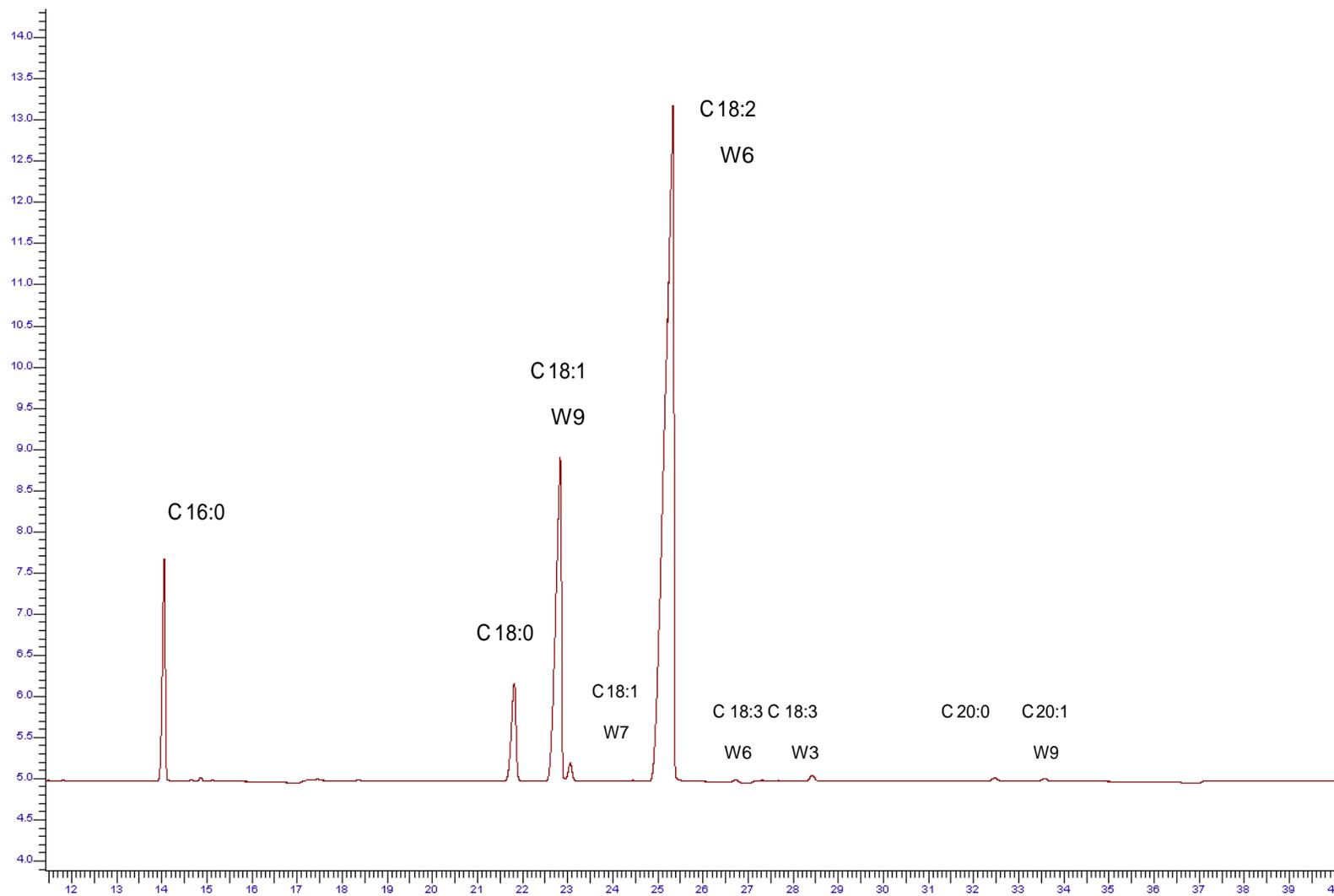


Fuente: Software Minitab versión 17

Anexo 5. Cromatograma del aceite de semillas de uva Quebranta extraído por el método convencional (hexano)



Fuente: Cromatógrafo de gases Perkin Elmer del ITP

Anexo 6. Cromatograma del aceite de semillas de uva Quebranta extraído con CO₂ supercrítico

Fuente: Cromatógrafo de gases Perkin Elmer del ITP

