

Determinación simultánea de carotenoides y fenoles en subproductos agroalimentarios: Microextracción Líquido-Sólido Asistida por Ultrasonido optimizada por metodologías de diseño experimental

Simultaneous determination of carotenoids and phenols of carotenoids and phenolic compounds in agrifood by-products: Ultrasound-Assisted Microextraction Liquid-Solid optimized by experimental design methodologies

Jofre, V. P.^{1,2}; Assof, M. V.^{1,2}; Vargas, E. V.³; Fanzone, M. L.^{1,2}

¹Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales. Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: jofre.viviana@inta.gob.ar

Dra. Viviana Jofre. Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, San Martín 3853, Luján de Cuyo, Mendoza, CP-5507, Argentina. Teléfono 0261-4963020 Ext. 261.

Palabras claves: residuos, agroalimentos, compuestos bioactivos, microextracción asistida por ultrasonido, diseño experimental

Keywords: waste, agri-food, bioactive compounds, ultrasound-assisted microextraction, experimental design

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un nuevo método de microextracción líquido-sólido asistido por ultrasonido para determinar biocompuestos en subproductos agroalimentarios. El método analítico propuesto para extraer y preconcentrar simultáneamente carotenoides y fenoles totales de residuos agroindustriales permite evaluar, de forma rápida y económica, el contenido de compuestos bioactivos. Este índice es útil para añadir valor a los desechos producidos durante el procesamiento industrial de frutas y verduras. Los parámetros que afectan el rendimiento del proceso analítico (índice de polaridad de disolventes, modo de extracción, volumen de agua) se estudiaron utilizando la metodología «un factor por vez». Las condiciones operacionales de la metodología analítica y la optimización simultánea de múltiples respuestas se efectuaron empleando un diseño central compuesto y la función deseabilidad. Los resultados experimentales óptimos se lograron utilizando 20 mg de muestra, 2500 µL de etanol 96% (V/V), 700 µL de hexano, 12 minutos de tiempo de cavitación y 250 µL de agua. Las recuperaciones de los analitos fueron próximas al 98%, lo que evidenciaría la elevada precisión del método propuesto. El procedimiento desarrollado se aplicó exitosamente en la determinación de carotenoides y fenoles totales en diferentes subproductos agroalimentarios (orujos de uvas tintas, flores comestibles y pieles de tomate).

Abstract

In the present work, a new method of liquid-solid microextraction assisted by ultrasound was developed to determine biocompounds in agrifood by-products. The analytical method proposed to simultaneously extract and pre-concentrate carotenoids and total phenols from agro-industrial residues enable us to evaluate, in a fast and economic way, the content of bioactive compounds. This index is useful for adding value to the waste produced during the industrial processing of fruits and vegetables. The parameters affecting the performance of the analytical process (solvent polarity index, extraction mode, water volume) were studied using the «one factor at time» methodology. The operational conditions of the analytical methodology and the simultaneous optimization of multiple responses were carried out using a composite central design and the desirability function. The optimal experimental results were achieved using 20 mg of sample, 2500 µL of ethanol 96% (V/V), 700 µL of hexane, 12 minutes of cavitation time, and 250 µL of water. The recoveries of the analytes were close to 98%, which would evidence the high precision of the proposed method. The developed procedure was successfully applied in the total carotenoids and total phenols determinations on different agrifood by-products (red grape pomaces, edible flowers, and tomato skins).

1. Introducción

Las actividades agrícolas y agroindustriales generan elevados volúmenes de residuos, descartes y subproductos (RDS), que son partes inevitables de la cadena de elaboración y suministro de alimentos (1). Estos RDS no sólo son un problema económico y medioambiental, sino que también están asociados a las grandes pérdidas de alimentos a nivel mundial (2). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura se desperdicia casi un tercio de los alimentos como consecuencia de los RDS generados (3); por ejemplo, en la cadena frutihortícola se producen casi un 30% de RDS previo al consumo (4). Sin embargo, los RDS pueden minimizarse y valorizarse mediante la aplicación de tecnologías adecuadas, para lo cual es necesario conocer su composición química (5). En los últimos años se han publicado diferentes trabajos científicos relacionados a la utilización de los RDS de las cadenas de cereales, oleaginosas, frutas, hortalizas, vitivinícolas, productos cárnicos, pesqueros y lácteos para la elaboración de nuevos alimentos para consumo humano o animal, la recuperación de compuestos y bioproductos, y la elaboración y uso de bioinsumos, entre otros (6-8).

Los subproductos agroindustriales son una gran fuente de compuestos activos de interés, como son los carotenoides (carotenos, xantofilas) y compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos, hidroxibenzoicos, flavanoles, flavonoles). Estos fitocompuestos exhiben propiedades beneficiosas para la salud como antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, cardioprotectores, vasodilatadores y previenen distintos tipos de cánceres (9-15).

Convencionalmente, los compuestos fenólicos y los carotenoides de subproductos frutihortícolas se recuperan mediante procesos extractivos laboriosos que requieren múltiples pasos operativos y que, además, emplean solventes tóxicos como cloroformo, diclorometano, acetona, etc. (9, 16). En los últimos años se han desarrollado tecnologías alternativas verdes sostenibles para la extracción de compuestos bioactivos empleando disolventes GRAS (*Generally Recognized As Safe*) como etanol, hexano, acetato de etilo, agua, etc. (17). Las tecnologías verdes, como las extracciones asistidas por ultrasonido, entre otras, han evidenciado ser excelentes herramientas para extraer los compuestos objetivo de los RDS, preservando sus propiedades funcionales (18).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y optimizar una metodología extractiva de un solo paso, simple y económica, empleando etanol y hexano (solventes GRAS) para extraer simultáneamente carotenoides y compuestos fenólicos de subproductos agroalimentarios.

2 Materiales y Métodos

2.1 Estándares, reactivos y muestras

Para este estudio se emplearon ácido gálico [149-21-7] (Aldrich, Darmstadt, Alemania), β -caroteno [7235-40-7] (Sigma, Steinheim, Alemania), etanol grado Lichrosolv (Merck, Darmstadt, Alemania), cloruro de sodio p.a. (Merck, Darmstadt, Alemania), hexano p.a. (Anedra, Buenos Aires, Argentina), etanol 96° (Innocenti, Mendoza, Argentina), carbonato de sodio p.a. (Anedra, Buenos Aires, Argentina), Reactivo Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania). El agua empleada fue agua ultrapura obtenida mediante el sistema RIO/Elix3-Sinergy185 purification system (Millipore, Sao Pablo, Brazil).

En la Bodega Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (EEAMza) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria se realizó la vinificación de uvas Malbec (cosecha 2019, Luján de Cuyo, Mendoza), siguiendo protocolos estándares para la variedad. Al terminar el proceso, con la finalidad de tener una muestra representativa, se extrajeron de forma aleatoria y a distintas alturas del depósito, 15 Kg de orujos. Esta muestra fue utilizada para realizar el desarrollo, optimización y validación de la metodología Microextracción Líquido-Sólido Asistida por Ultrasonido (USAMELS). La muestra fue dividida aleatoriamente en submuestras de 250 g (total 60 unidades) que se guardaron en bolsas plásticas, se rotularon y se mantuvieron en *freezer* (Ultrafreezer ScienTemp, Adrian, Miami, Estados Unidos) a -80°C hasta su posterior uso.

Para evaluar la robustez de la metodología USAMELS se emplearon orujos de Malbec, Cabernet Sauvignon y Syrah de EEAMza, flores comestibles (conejo amarillo, conejo violeta, tagete y pensamiento azulado) cedidas por la Cátedra de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, y pieles de tomates peritas adquiridos en mercados locales. Los orujos, los pétalos de las flores comestibles y las pieles de tomate peritas (extraídas manualmente) se guardaron individualmente en bolsas plásticas, se rotularon y se mantuvieron en *freezer* a -80°C hasta su posterior uso.

2.2 Procesamiento de las muestras, fase exploratoria y fase de optimización

Las muestras obtenidas en el apartado 2.1 se llevaron a temperatura ambiente, se pesaron y se deshidrataron en estufa de aire forzado (SanJor, Buenos Aires, Argentina) a 60°C durante 3 horas. Al finalizar el tratamiento de secado, cada una de las muestras fue pulverizada en un molino ultracentrífugo (Ultracentrifugal mil, ZM 200, Restch, Haan, Alemania) con tamiz de 1 mm. Los polvos obtenidos se guardaron en viales de 20 ml color caramelo con tapa a rosca, se rotularon y se conservaron en la oscuridad hasta su posterior uso.

Los estudios extractivos de la fase exploratoria se realizaron por la metodología «un factor por vez» (OFAT, *One Factor At Time*) por quintuplicado. Para esto 15 mg de polvo de orujos se extrajeron con 2 mL de solvente de una determinada polaridad. La homogenización de las muestras se efectuó empleando un vortex (CK-Tech, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, para separar las fases, el sistema fue centrifugado a 2038×g (Centrífuga CM 4080 ROLCO, Rolco, Buenos Aires, Argentina) durante 5 minutos. Los estudios de la fase de optimización se realizaron aplicando metodologías quimiométricas (superficies de respuesta y función deseabilidad global). Los factores considerados en esta fase del estudio fueron: masa de muestra, índice de polaridad de solventes, tiempo de extracción o tiempo de cavitación y volumen de agua.

2.3 Procedimiento Microextracción Líquido-Sólido Asistida por Ultrasonido (USAMELS) y análisis cuantitativo

En un tubo de centrifuga cónico de vidrio de 15 mL (Corning, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) se introdujeron 20 mg de polvo de muestra (apartado 2.2), 2500 µL de etanol 96% y 700 µL de hexano. El sistema fue homogeneizado en vortex durante 20 segundos y luego fue inmerso en el baño ultrasónico a 20°C±1 durante 12 minutos. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de agua y 0.1 g de ClNa (sólido), se vorteoó 20 segundos, y se centrifugó 5 minutos a 4500 rpm (2038×g). Las fases orgánica y acuosa se extrajeron con jeringa Hamilton de 500 µL, y se conservaron en viales ámbar de 1,5 mL y 4 mL con tapa a rosca (Supelco, Merck, Darmstadt, Alemania). Los viales rotulados se mantuvieron a -20°C (Freezer horizontal Bosch HC55B, Bosch, San Pablo, Brasil) hasta su posterior uso. La cuantificación de fenoles totales se realizó según el procedimiento descrito por Tournour y col. (19), y la concentración obtenida se expresó en equivalentes de ácido gálico (mg.L⁻¹). La cuantificación de carotenoides totales se determinó según la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$A_{450} = 0.0155256 + 0.17228 \times C_{car}$$

Siendo A_{450} la absorbancia de la muestra medida a 450 nm y C_{car} la concentración total de carotenoides expresada en equivalentes de β-caroteno (mg.L⁻¹).

2.4 Instrumentación y softwares

La determinación de peso de las muestras realizó en una balanza analítica (AND HR-200, A&D Engineering Inc., California, Estados Unidos). Para el proceso extractivo se utilizó un baño ultrasónico de 42 kHz y 100W con control de temperatura (Cole-Parmer, Vernon, IL, Estados Unidos). El volumen de la fase de extracción se midió con jeringas Hamilton de 100 µL y 500 µL (Reno, NV, Estados Unidos). Para eliminar el solvente empleado en los estudios de recuperación se utilizó un concentrador rotativo (Buchi, Estados Unidos), fijando la temperatura del baño a 30°C.

Los análisis espectrofotométricos fueron realizados en un Espectrofotómetro UV/Vis serie Lambda 25 (Perkin Elmer Instruments, Perkin Elmer Inc, Shelton, CT, Estados Unidos), usando cubetas de cuarzo (UV/VIS spectroscopy cells, Perkin Elmer Inc., Massachussets, Estados Unidos) y cubetas plásticas de volumen reducido (Deltalab, Buenos Aires, Argentina), ambas de 1cm de paso óptico. Los datos obtenidos fueron guardados en formato ASCII y transferidos a una computadora personal para los subsecuentes análisis en Design Expert version 7.1.0 (Stat-Ease Inc., MN, Estados Unidos) y Statgraphics Centurion xvi versión 6.1.11. (Stat Points, Techonologies Inc., Estados Unidos).

2.5 Métodos estadísticos

Para evaluar el efecto de las variables que afectan la eficiencia de la metodología USAMELS (masa de muestra, polaridad de solventes extractantes, tiempo de cavitación o tiempo de extracción y, volumen de agua) se empleó un diseño central compuesto que consistió en una matriz de diseño de 53 experimentos en 5 bloques. Este diseño se empleó para obtener los niveles óptimos de los factores para todas las señales de respuesta (carotenoides totales y fenoles totales) mediante la optimización de una función objetiva. Por último, para optimizar el análisis se emplearon criterios de respuesta múltiple utilizando la función de deseabilidad, según Jofré y col. (20). Además, en los estudios de recuperación, los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA), y para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tuckey HSD (con un nivel de confianza del 95%). La homogeneidad de las varianzas se evaluó mediante la prueba de Levene ($\alpha=0,05$).

3 Resultados

3.1 Elección del solvente y modo extractivo

Con la finalidad de seleccionar el solvente adecuado para extraer simultáneamente carotenoides y compuestos fenólicos de las muestras y seleccionar el modo de extracción (asistida por vortex o asistida por ultrasonido), en una fase exploratoria o de screening, se aplicó la metodología OFAT. Para esto, los solventes GRAS seleccionados fueron hexano, etanol 96% (V/V), de grado alimentario y farmacéutico, respectivamente, y agua. En la Tabla 1 se presentan los datos de las propiedades físicas

Artículo completo

Ciencias Ambientales, Agroindustrias y de la Tierra

de los solventes empleados en este estudio; y en la Tabla 2, los índices de polaridad (ϵ_e) determinados para las mezclas de solventes preparadas para desarrollar este estudio.

Tabla 1: Propiedades físicas de agua, etanol y hexano

Solvente	PF (°C)	PE (°C)	D_4^{20} (mg/mL)	ϵ	μ (Debye)	M
agua	0	100	0.998	80.10	1.82	0.1
etanol	-114	78	0.789	24.50	1.69	14
hexano	-95.15	68.85	0.654	1.89	0	29

PF, PE Puntos normales de fusión y de ebullición; D densidad; ϵ constante dieléctrica; μ momento dipolar; M índice de miscibilidad.

Tabla 2: Índices de polaridad de extractantes en función de su composición

Extractante	Composición del Extractante (mL)			ϵ_e
	hexano	etanol 96%	agua	
A	10	0	0	1.89
B	6	4	0	11.82
C	3	7	0	19.27
D	0	10	0	26.72
E	0	7	3	42.74
F	0	4	6	58.75

ϵ_e índice de polaridad del extractante.

$\epsilon_e = \sum_{i=1}^n x_i \times \epsilon_i$ donde, x_i fracción molar del solvente, ϵ_i constante dielectrica del solvente.

Con el objeto de seleccionar el modo de extracción (asistida por vortex, VE o asistida por ultrasonido, USAE) el proceso extractivo se realizó empleando 2 mL del extractante C (Tabla 2) y realizaron 2 experiencias: a) extracción VE durante 5 minutos; b) extracción USAE durante 5 minutos. Los resultados estadísticos mostraron que no hubo diferencias significativas entre ambos modos de extracción ($p > 0.05$, test de Student, $\alpha = 0.05$). La precisión, expresada como desviación estándar relativa porcentual (DER%), fue para carotenoides totales 5.14% USAE y 25.61% VE, y para fenoles totales 8.32% USAE y 14.35% VE.

3.2 Optimización y validación de la metodología USAMELS

Con el objeto de evaluar los factores que podrían afectar la eficiencia del proceso extractivo como masa de muestra (m_m , polvo de orujos Malbec), índice de polaridad de extractantes (ϵ_e), tiempo de extracción o tiempo de cavitación (t_c) y volumen de agua (V_a) se aplicó un diseño central compuesto (DCC, ortogonal y rotatable). Los intervalos de las variables fueron 10-20 mg para m_m , 10-22 para ϵ_e , 5-12 minutos para t_c y 200-600 μ L para V_a , mientras que la masa de ClNa (0.1 g) se mantuvo constante en todos los experimentos. Para alcanzar el intervalo de ϵ_e , los volúmenes de los solventes se incorporaron al diseño: 1100-2500 μ L para etanol 96% (V/V) y 700-2500 μ L para hexano. El DCC, constituido por 53 experimentos (Tabla Suplementaria 1), fue completamente aleatorizado para minimizar la variabilidad no explicada por factores no controlables, y se realizó en 5 bloques (5 días consecutivos) con el fin de eliminar las variaciones de algún factor externo no controlado durante el desarrollo del estudio. Las respuestas del diseño fueron las medidas espectrofotométricas de absorbancia a 320 nm (fenoles totales) y 450 nm (carotenoides totales).

A los datos experimentales obtenidos de la matriz del diseño central compuesto se les eliminaron los puntos extremos (*outliers*), mediante el análisis de la diferencia entre los valores de prueba ajustados (DFFITS). En este análisis se evaluó, mediante valores estandarizados, la influencia que cada punto experimental tuvo sobre el valor estimado, y puso en evidencia aquellos que ejercieron una influencia desproporcionada en el modelo. Una vez que los outliers fueron eliminados, los datos experimentales se ajustaron a través de modelos lineales. Los coeficientes del modelo se calcularon por regresión múltiple con eliminación por retroceso (*backward multiple regression*), aunque se mantuvieron los principales términos irrelevantes para ajustar los modelos jerárquicos. La validación se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia estadístico del 95% ($\alpha = 0.05$). En la Tabla 3 se presentan los resultados de ANOVA.

Artículo completo

Ciencias Ambientales, Agroindustrias y de la Tierra

Tabla 3: Análisis de varianza de los modelos de regresión y de los coeficientes de los modelos de regresión

Respuesta ^b	Modelo	p _v ^a		p _v ^a						
		modelo	LOF	A	B	C	D	E	AC	CE
A450	lineal	0.000	0.167	0.004	0.011	0.000	0.979	0.165		
A320	2FI	0.040	0.767	0.590	0.003	0.897	0.438	0.480	0.013	0.017

^a valor de probabilidad, significativo cuando p_v<0.05.

^b A450 absorbancia a 450 nm (carotenoides totales), A320 absorbancia a 320 nm (fenoles totales).

LOF falta de ajuste del modelo.

Coefficientes (factores): A masa de muestra, B volumen de etanol 96%, C volumen de hexano, D tiempo de cavitación, E volumen de agua, AC y CE interacción entre factores.

Una vez obtenidos los modelos y los coeficientes de regresión, y con la finalidad de optimizar la metodología USAMELS desarrollada para la extracción simultánea de carotenoides y compuestos fenólicos se aplicó la función deseabilidad global. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 1.

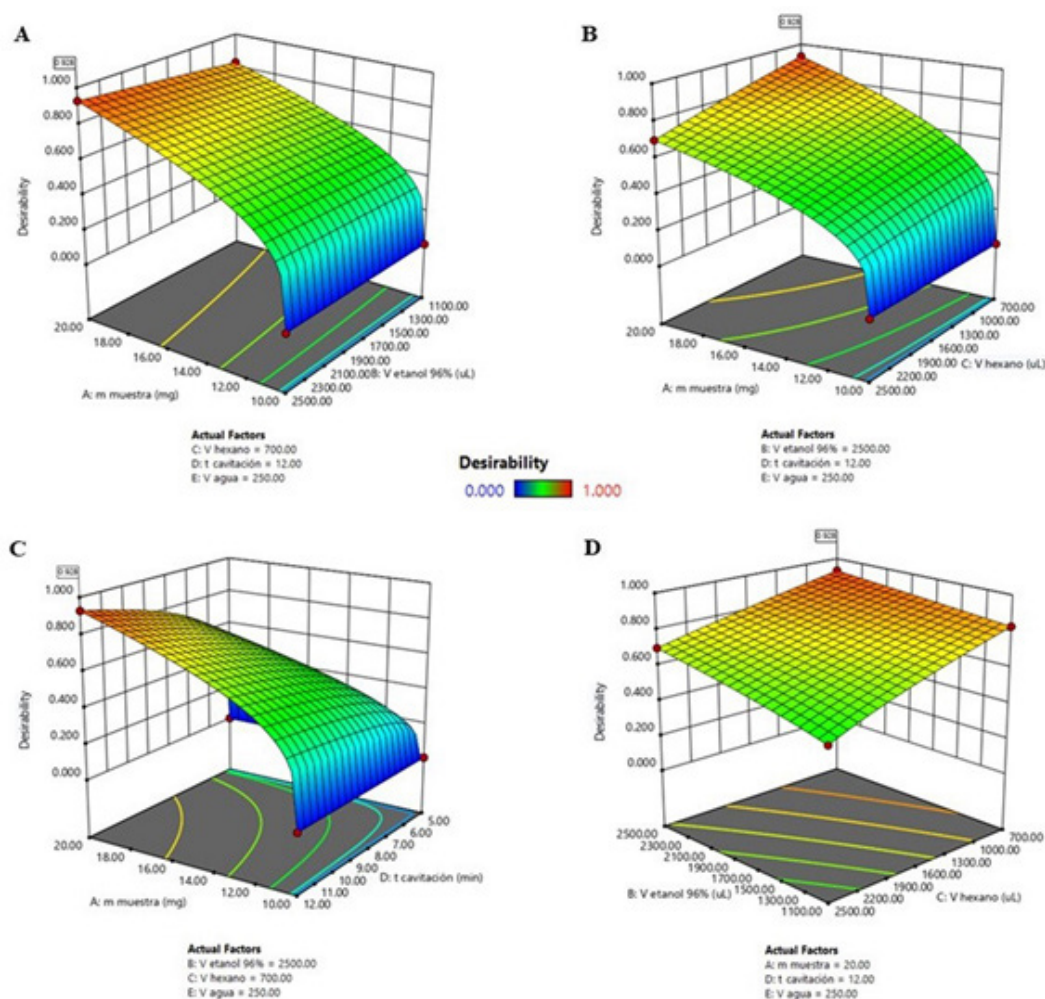


Figura 1: Superficies de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en la optimización de la metodología USAMELS. A masa de muestra- volumen de etanol 96%, B masa de muestra-volumen de hexano, C masa de muestra-tiempo de cavitación, D volumen de etanol 96%-volumen de hexano.

Artículo completo

Ciencias Ambientales, Agroindustrias y de la Tierra

Para evaluar el grado de recuperación de la metodología USAMELS se realizó un ensayo de recuperación estándar. Para esto, una muestra fue enriquecida con 3 niveles de β -caroteno (C1, 50 $\mu\text{g/g}$; C2, 100 $\mu\text{g/g}$; C3, 150 $\mu\text{g/g}$) y se aplicó el método extractivo desarrollado y optimizado. Estos estudios se realizaron en 5 réplicas diarias durante 5 días consecutivos. La repetibilidad (determinaciones intra-día) expresada como DER% para C1 fue 5.31%, 6.94%, 4.76%, 8.07% y 9.16%, en los días 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente; para C2, 3.26%, 2.81%, 3.85%, 2.91% y 2.61%, y para C3, 1.60%, 1.48%, 2.06%, 1.47% y 1.69%. La reproducibilidad (determinaciones inter-día) expresada como DER% fue 6.51%, 2.86% y 1.54% para C1, C2 y C3, respectivamente. La recuperación porcentual fue 97.22% para C1, 98.72% para C2 y 98.83% para C3.

3.3 Aplicación de la metodología USAMELS a diferentes subproductos agroalimentarios

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la metodología de extracción/ preconcentración desarrollada, optimizada y validada que fue aplicada a diferentes muestras de subproductos agroalimentarios.

Tabla 4: Contenidos de carotenoides totales y fenoles totales en subproductos agroalimentarios

Subproducto	Muestra	CT	FT
orujos	Malbec	45.29 (5.45)	15.73 (8.16)
	Cabernet Sauvignon	48.32 (2.65)	16.38 (4.92)
	Syrah	43.16 (12.26)	17.88 (14.64)
flores comestibles	conejo amarillo	nd	17.79 (11.86)
	conejo violeta	6.47 (12.72)	16.83 (2.84)
	tagete	896.44 (8.09)	11.25 (10.02)
	pensamiento azulado	165.96 (4.35)	32.16 (4.53)
tomates	perita 1	286.45 (6.04)	2.90 (12.51)
	perita 2	256.92 (11.89)	3.45 (9.74)

Los valores presentados representan el promedio de 5 réplicas de análisis, entre paréntesis desviación estándar relativa porcentual; nd no detectado.

CT carotenoides totales expresados en μg de β -caroteno/g de muestra.

FT fenoles totales expresados en mg de ácido gálico/g de muestra.

4 Discusión

4.1 Elección del solvente y modo extractivo

Los carotenoides y los fenoles son compuestos presentes en el reino vegetal y cumplen funciones básicas e indispensables en el metabolismo y sanidad de las plantas (21). Estos fitoquímicos presentan tienen distintas estructuras químicas y polaridades, y presentan diferentes grados de solubilidad en agua (21-23). En general, para la extracción de compuestos polares se utilizan mezclas acuosas de metanol y acetona, mientras que para los menos polares suelen emplearse acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, etc. (22, 23). Por otro lado, cuando se busca seleccionar un solvente para extraer analitos de una matriz dada, es necesario considerar los efectos estructurales (grupos hidrófilos y/o lipófilos) y eléctricos (momento dipolar, constante dieléctrica, fuerzas de Van Der Waals, de London, etc.). Esos efectos se encuentran interrelacionados y son los responsables de las interacciones soluto-solvente, por lo que deben ser considerados cuando se pretende desarrollar un método analítico extractivo (22-24). Así, con el objetivo de estimar el índice de polaridad (ϵ_e) de la mezcla de solventes (Tabla 2) para la extracción simultánea de los analitos se aplicó la metodología OFAT. Para evaluar la extracción de fenoles totales se efectuaron lecturas espectrofotométricas a 320 nm (25), y para carotenoides totales, a 450 nm (26). En esta fase de *screening*, se observó que el extractante A ($\epsilon_e = 1.89$) únicamente extrajo los carotenoides de las muestras, mientras que los extractantes D, E y F ($\epsilon_e = 26.72$, 42.74 y 58.75, respectivamente), sólo extrajeron los compuestos fenólicos. En tanto que la extracción simultánea de carotenoides y compuestos fenólicos se logró mediante el empleo de los extractantes B ($\epsilon_e = 11.82$) y C ($\epsilon_e = 19.27$). Esto podría deberse a que, en estas mezclas, se favorecerían simultáneamente las interacciones polares y no polares con los compuestos fenólicos y los carotenoides, facilitando la extracción conjunta de los analitos de interés (27). Por lo tanto, los extractantes con índices de polaridad comprendidos en el intervalo de 11.82 a 19.27 fueron seleccionados para los estudios de optimización de la metodología.

Asimismo, con el objeto de evaluar si la eficiencia extractiva de los solventes seleccionados era afectada por el modo de contacto entre la fase sólida y la fase líquida, se estudiaron 2 modos de asistencia (VE, extracción por vorteo y USAE, extracción por ondas ultrasónicas). Los resultados mostraron que ambas metodologías fueron eficaces, pero el modo de extracción USAE

Artículo completo

Ciencias Ambientales, Agroindustrias y de la Tierra

presentó mayor precisión que VE. Esto podría deberse a que la aplicación de ondas ultrasónicas favorece la penetración de los disolventes en la matriz sólida, mejorando la transferencia de masa en general y optimizando la reproducibilidad del proceso extractivo (28). Asimismo, los resultados obtenidos de este estudio fueron coincidentes con los presentados por diversos autores en sus trabajos relacionados a la extracción de biocompuestos de distintos subproductos (29-33). En consecuencia, el modo de extracción USAE fue seleccionado para los posteriores estudios de optimización.

Por otro lado, considerando el elevado grado de miscibilidad entre hexano y etanol 96% ($\Delta M=15$), y para lograr una adecuada separación de fases a fin de realizar los subsecuentes análisis cuantitativos, cuando el proceso extractivo fue completado se incorporó agua como tercer solvente. La adición de 200 μL de agua fue suficiente para que ΔM fuese superior a 17, límite mínimo necesario para que el sistema monofásico se transforme en un sistema bifásico (24). Por otro lado, también se añadió ClNa (s) con el objeto de modificar la fuerza iónica del medio y facilitar la separación de fases (20).

4.2 Optimización y aplicación de la metodología USAMELS

Con la finalidad de establecer los valores exactos de los factores que afectan el proceso de extracción/preconcentración que generan los máximos valores de absorbancia de los analitos de interés, se aplicó un procedimiento de optimización. Los procedimientos de optimización sistemática se llevan a cabo seleccionando una función objetivo, encontrando los factores más importantes e investigando la relación entre las respuestas y los factores mediante la metodología de la superficie de respuesta (20, 34). En el estudio de validación de la metodología desarrollada se demostró que la extracción de carotenoides es afectada principalmente por la cantidad de muestra y por el índice de polaridad de la mezcla de solventes; en tanto que la extracción de los compuestos fenólicos, por la interacción de los factores masa de muestra-volumen de hexano y volumen de hexano-volumen de agua (Tabla 3).

Posteriormente, para la optimización del proceso de extracción/preconcentración desarrollado, se aplicó la función deseabilidad global (D). En su aplicación se crea una función para cada respuesta individual y luego se obtiene la función deseabilidad global, la cual debe ser maximizada eligiendo las mejores condiciones de las variables diseñadas. Esta función varía entre el valor 0 (no se extraen los analitos) y el valor 1 (la extracción/preconcentración simultánea de los analitos es equivalente al 100%) (35). De esta forma, para la optimización de la metodología USAMELS, se seleccionaron las 2 variables respuestas (carotenoides totales y fenoles totales) y se propuso como criterios maximizar las absorbancias a 320 nm y 450 nm, y que los factores adquirieran valores óptimos en los intervalos propios de cada variable. Bajo dichos criterios de optimización, las condiciones experimentales que correspondieron al valor máximo de la función deseabilidad ($D = 0.928$) fueron: 20 mg de m_m , 21.29 de ϵ_e (700 μL hexano + 2500 μL etanol 96%), 12 min de t_c y 250 μL de agua (Figura 1).

La metodología USAMELS optimizada, que presentó adecuados valores de repetitividad, repetibilidad y recuperación fue aplicada a diferentes muestras de subproductos agroalimentarios (Tabla 4). Los contenidos de carotenoides totales y fenoles totales en flores comestibles y en pieles de tomates fueron similares a los reportados por otros autores (36-39). Asimismo, las concentraciones de carotenoides totales y fenoles totales en orujos fueron similares a los encontrados en diversos subproductos vitivinícolas de distintas variedades (40-42). Además, los valores de desviación estándar relativa porcentual fueron inferiores al 15% para los parámetros evaluados en las diferentes matrices. Esto evidenciaría que la metodología desarrollada es robusta y sería adecuada para aplicarla en la determinación de compuestos bioactivos en distintos subproductos agroalimentarios (43).

5 Conclusiones

La Microextracción Líquido-Sólido Asistida por Ultrasonido es una metodología simple, eficiente y selectiva para extraer, pre-concentrar y determinar carotenoides y compuestos fenólicos en muestras de subproductos agroalimentarios. Esta metodología se caracteriza por efectuarse en un solo paso operativo, por el empleo de volúmenes reducidos de solventes no tóxicos ni contaminantes del medio ambiente, por su corto tiempo de análisis y por su bajo costo. La estrategia de optimización multivariante empleada (metodología de respuesta de la superficie combinada con la función deseabilidad) permitió determinar las condiciones óptimas de USAMELS. Asimismo, la metodología USAMELS es precisa, reproducible y robusta.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen a UMaza (Proyecto I+D-2019, Valorización de subproductos vitivinícolas: caracterización de compuestos bioactivos y propiedades funcionales) y a INTA (Proyectos PE150, PDI152 y PDI153) por proveer los fondos para la realización de este estudio. También los autores agradecen a CONICET por la beca doctoral de Eliana Vargas, y a Patricia Occhiuto de la Cátedra de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo por proveer las flores comestibles empleadas en este trabajo.

Referencias

1. INTA. Pérdida y desperdicio. Estrategias para salvar el tercio de alimentos que se desaprovechan en el mundo. *Rev Investig Agropecu.* 2013;39.
2. Kumm M, de Moel H, Porkka M, Siebert S, Varis O, Ward PJ. Lost food, wasted resources: Global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. *Sci Total Environ* [Internet]. 2012;438(September):477-89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.092>
3. FAO. Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention, Rome: *Food and Agriculture Organisation of the United Nations* [Internet]. Vol. 365, Save Food. 2011. Available from: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2010.0126>
4. Kader AA. Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. *Acta Hort.* 2005;682:2169-76.
5. Cicatiello C, Franco S, Pancino B, Blasi E. The value of food waste: An exploratory study on retailing. *J Retail Consum Serv* [Internet]. 2016;30:96-104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jretconser.2016.01.004>
6. Galanakis CM. *Handbook of grape processing by-products : sustainable solutions*. Cap 9 Bioaccessibility and bioavailability [Internet]. 2017. 309 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780128098707>
7. Galanakis CM. Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques. *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. 2015. 1-392 p.
8. Roselló-Soto E, Galanakis CM, Brnčić M, Orlie V, Trujillo FJ, Mawson R, et al. Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends Food Sci Technol.* 2015;42(2):134-49.
9. Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG, et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag* [Internet]. 2017;68:581-94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
10. Singh A, Ahmad S, Ahmad A. Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. *RSC Adv* [Internet]. 2015;5(77):62358-93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA10243J>
11. Ky I, Crozier A, Cros G, Teissedre P. Polyphenols composition of wine and grape sub-products and potential effects on chronic diseases. *Nutr Aging.* 2014;2(December 2016):165-77.
12. Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre PL. Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules.* 2014;19(1):482-506.
13. Boussetta N, Vorobiev E, Le LH, Cordin-Falcimaigne A, Lanoisellé JL. Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Sci Technol.* 2012;46(1):127-34.
14. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int J Food Sci Technol.* 2012;47(10):2023-44.
15. Irwandi Jaswir. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J Med Plants Res* [Internet]. 2011;5(33). Available from: [http://www.academicjournals.org/JMPR/abstracts/abstracts/abstracts2011/December Special Review/Jaswir et al.htm](http://www.academicjournals.org/JMPR/abstracts/abstracts/abstracts2011/December%20Special%20Review/Jaswir%20et%20al.htm)
16. Schieber A. Side Streams of Plant Food Processing As a Source of Valuable Compounds: Selected Examples. *Annu Rev Food Sci Technol* [Internet]. 2017;8(1):97-112. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-030216-030135>
17. Aguda R, Chen C-C. Solubility of Nutraceutical Compounds in Generally Recognized as Safe Solvents at 298 K. *Int J Chem Eng Appl.* 2016;7(5):289-94.
18. Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant'Ana AS, Orlie V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2016;49:96-109. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>
19. Tournour HH, Segundo MA, Magalhães LM, Barreiros L, Queiroz J, Cunha LM. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015;74:397-406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>
20. Jofré VP, Assof M V., Fanzone ML, Goicoechea HC, Martínez LD, Silva MF. Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010;683(1):126-35.
21. Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O, Francis FJ. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Vol. 40, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000. 173-289 p.
22. White B, Rice L, Howard LR. The Procedure, Principle, and Instrumentation of Antioxidant Phytochemical Analysis. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. 2012. 25-68 p.
23. Kopec RE, Cooperstone JL, Cichon MJ, Schwartz SJ. Analysis Methods of Carotenoids. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. 2012. 105-148 p.
24. Y. Marcus. The Properties of Solvents. Fogg PGT, editor. *The Properties of Solvents*. VOL.4. John Wiley & Sons Ltd; 1998. 238 p.

Artículo completo

Ciencias Ambientales, Agroindustrias y de la Tierra

25. Somers TC, Ziemelis G. Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis vinifera*: Grapes and wines. *J Sci Food Agric*. 1985;36(12):1275-84.
26. Rodríguez D. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Life Sciences. ILSI Press; 2001. 64 p.
27. Stefanis E, Panayiotou C. Prediction of Hansen solubility parameters with a new group-contribution method. *Int J Thermophys*. 2008;29(2):568-85.
28. Priego-Capote F, De La Torre MDPD. Accelerated liquid extraction. In: Prado MAR and JM, editor. RSC Green Chemistry. *The Royal Society of Chemistry*; 2013. p. 157-95.
29. Minjares-Fuentes R, Femenia A, Garau MC, Candelas-Cadillo MG, Simal S, Rosselló C. Ultrasound-assisted extraction of hemicelluloses from grape pomace using response surface methodology. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2016;138:180-91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.013>
30. Pradal D, Vauchel P, Decossin S, Dhulster P, Dimitrov K. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2016;32:137-46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.001>
31. Alzate LM, González D, Londoño Londoño J. *Recovery of carotenoids from agroindustrial byproducts using clean extraction techniques: Supercritical fluid extraction and ultrasound assisted extraction*. Recover Carotenoids From Agroindustrial By-Prod Using Clean Extr Tech Supercrit Fluid Extr Ultrasound Assist Extr. 2013;1-7.
32. Naziri E, Mantzouridou F, Tsimidou MZ. Recovery of squalene from wine lees using ultrasound assisted extraction-A feasibility study. *J Agric Food Chem*. 2012;60(36):9195-201.
33. Vilkuh K, Mawson R, Simons L, Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2008;9(2):161-9.
34. Vera-Candioti L, Gil Garcia MD, Martinez Galera M, Goicoechea HC. Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography-diode array detection. *J Chromatogr A* [Internet]. 2008;1211(1-2):22-32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950779>
35. Lee DH, Jeong IJ, Kim KJ. A desirability function method for optimizing mean and variability of multiple responses using a posterior preference articulation approach. *Qual Reliab Eng Int*. 2018;34(3):360-76.
36. Lopez-Araujo C. *Evaluación de la extracción de carotenoides del tomate y pimiento morrón anaranjado utilizando surfactantes*. Tesis. Universidad Tecnológica del Mar y la Sierra. Mexico.; 2016.
37. Arellano-Corral CA. *Extracción de luteína a partir de flores de tagete (*Tagete erecta*) y estabilización por microencapsulación*. [Internet]. Universidad de Chile. Tesis; 2011. Available from: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2011/qf-arellano_ca/pdfAmont/qf-arellano_ca.pdf
38. Candelas M, Alanis M, Olague F. Lycopene measurement and other carotenoids in tomato and tomato powder. *Rev Mex Agro-negocios*. 2006;X(19):2-12.
39. Toor RK, Savage GP, Lister CE. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J Food Compos Anal*. 2006;19(1):1-10.
40. Ferreyra SG, Antonioli A, Bottini R, Fontana A. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cane residues from different grape varieties. *J Sci Food Agric*. 2020;100(1):376-83.
41. Derradji-Benmeziane F, Djamai R, Cadot Y. Antioxidant capacity, total phenolic, carotenoid, and Vitamin C contents of five table grape varieties from Algeria and their correlations. *J Int des Sci la Vigne du Vin*. 2014;48(2):153-62.
42. Zuñiga C. *Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva*. Universidad de Chile. Tesis. 2005.
43. Anderson R.; Bramley R; Clarke D. and Lillsunde P. *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito. [Internet]. ONU, Viena; 2010. 76 p. Available from: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf?fbclid=IwAR3IIYZJRWgHNgrmgWBzd63n1XQAio96gn2fXvqwB3K8t3h8ppBs3c3BNtU