

EXTRACCIÓN ÓPTIMA MULTI-RESPUESTA DE POLIFENOLES PRESENTES EN ORUJO DE UVA BAJO CONDICIONES SUBCRÍTICAS

Nilton César León Calvo^{a*}, Karol Cecilia Torres Ramírez^b, Erik Edwin Allica Alca^b, Nils Leander Huaman Castilla^b

RESUMEN

El orujo de uva es un residuo agroindustrial con importantes concentraciones de polifenoles, así como de azúcares reductores; los cuales limitan su uso en el desarrollo de alimentos nutraceuticos. Por ello, el objetivo fue evaluar el efecto de la composición del solvente (etanol: 20 – 60%) y temperatura (100 - 160°C) sobre la recuperación de polifenoles y contenido de azúcares a partir de orujo de uva mediante un proceso de extracción subcrítica. Para tal fin, la muestra fue acondicionada dentro de un sistema de extracción por líquidos presurizados. Luego, mediante un diseño central compuesto se establecieron las condiciones óptimas de extracción (temperatura y etanol) para maximizar el contenido de polifenoles con mínima presencia de azúcares reductores (glucosa). Los incrementos en la concentración de etanol (20 - 60%) y altas temperaturas mejoran la recuperación de polifenoles; mientras que la presencia de etanol reduce la extracción de azúcares reductores. Contrariamente, los incrementos de temperatura incrementan la presencia de compuestos no deseados (glucosa). El proceso de optimización permitió maximizar la recuperación de polifenoles con una mínimo contenido de glucosa, cuyos parámetros fueron fijados a 141.9°C con 60.3% de etanol. Por ello, el uso de etanol permite no solo mejorar la recuperación de polifenoles, sino también reduce la presencia de azúcares reductores. Asimismo, la optimización de respuesta múltiple es una técnica que permite maximizar la obtención de compuestos antioxidantes con mínima presencia de compuestos no deseados.

Palabras clave: Orujo de uva, extracción líquido presurizada, polifenoles, glucosa, optimización de respuesta múltiple.

OPTIMAL MULTI-RESPONSE EXTRACTION OF POLYPHENOLS PRESENT IN GRAPE POMACE UNDER SUBCRITICAL CONDITIONS

ABSTRACT

Grape pomace is an agroindustrial residue with significant concentrations of polyphenols and reducing sugars, which limit its use in developing nutraceuticals. Therefore, the objective was to evaluate the effect of solvent composition (ethanol: 20–60%) and temperature (100–160°C) on polyphenols and sugar content recovery from grape pomace using a subcritical extraction process. To this end, the sample was conditioned within a

^{a*}Doctorado en Ciencias Ambientales, Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Av. Miraflores S/N, Apartado Postal 316, Tacna, Perú. *niltoncesarleon@gmail.com

^b Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Moquegua

pressurized liquid extraction system. Optimal extraction conditions (temperature and ethanol) were then established using a central composite design to maximize polyphenol content with minimal reducing sugars (glucose). Increased ethanol concentration (20–60%) and high temperatures improve polyphenol recovery, while the presence of ethanol reduces the extraction of reducing sugars. Conversely, temperature increases increase the presence of undesirable compounds (glucose). The optimization process maximized polyphenol recovery with minimal glucose content, with parameters set at 141.9°C with 60.3% ethanol. Therefore, using ethanol not only improves polyphenol recovery but also reduces the presence of reducing sugars. Furthermore, multiple response optimization is a technique that maximizes the yield of antioxidant compounds with minimal presence of undesirable compounds.

Keywords: Grape pomace, pressurized liquid extraction, polyphenols, glucose, multiple-response optimization.

INTRODUCCIÓN

La industria vitivinícola genera residuos orgánicos tales como bagazos, semillas, cascara, raspones y hojas, los cuales son derivados del procesamiento del vino (1). Estos residuos representan un problema de gestión ambiental debido a la generación de gases de efecto invernadero, así como la contaminación del agua y suelos de las zonas donde se acumulan (2). En particular, el orujo de uva es un residuo compuesto de cascara y semillas obtenidos después de la fermentación del vino (3) y es considerado una fuente natural rica en compuestos polifenólicos (4).

Los polifenoles son un grupo diverso de compuestos presentes en diversas matrices vegetales, cuya estructura química presenta múltiples grupos hidroxilo unidos a estructuras aromáticas (5). Estos compuestos presentan propiedades bioactivas que ayudan en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas (6). Sin embargo, los métodos de extracción que permitan obtener extractos ricos en polifenoles para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas aún son objeto de investigación (7).

Si bien existen diversas técnicas de extracción bajo condiciones atmosféricas que permiten recuperar compuestos fenólicos; estos métodos requieren prolongados tiempos de proceso, grandes cantidades de solvente, así como el uso de solventes tóxicos (metanol, hexano) con bajos rendimientos de recuperación en los compuestos de interés (8). Esto limita el uso de los extractos en futuras aplicaciones alimentarias, así como su escalamiento a nivel industrial (9). Contrariamente, la extracción por líquidos presurizados (ELP) es una técnica emergente amigable con el medio ambiente que trabaja bajo condiciones subcríticas (10). Esta técnica reduce ampliamente los tiempos de proceso y superan los rendimientos de compuestos de interés en comparación con las técnicas de extracción atmosféricas (11).

Existen trabajos en ELP que reportan parámetros óptimos de proceso como temperatura y concentración de etanol sobre la recuperación de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y algunos compuestos interferentes como hidroximetilfurfural (HMF) y metales pesados a partir de frutas y hortalizas (12,13).

Si bien existe mucha información sobre parámetros óptimos de extracción, estos no consideran el análisis de respuesta múltiples que permitan determinar condiciones óptimas que maximicen el contenido de compuestos antioxidantes y minimicen la

presencia de compuestos interferentes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar bajo condiciones subcríticas, el efecto del uso de mezclas agua-etanol y temperatura sobre el contenido de polifenoles y azúcares reductores a partir de semilla de orujo de uva. Además, mediante un diseño central compuesto se determinó las condiciones óptimas de extracción considerando respuestas múltiples.

PARTE EXPERIMENTAL

Materia prima

~20 kg de orujo de uva de la variedad negra criolla fueron recolectados de la bodega Antonio Biondi e Hijos, Moquegua, Perú. El orujo fue transportado al Laboratorio de Extracción de Compuestos de Alto Valor (LECAV) de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua. Luego, las muestras fueron congeladas inmediatamente a -20 °C. Posteriormente, las muestras fueron molidas hasta obtener un tamaño de partícula de 2 mm utilizando un molino de pulso Bosch TSM6A013B (Alemania).

Extracción de polifenoles

5 g de semilla de orujo y 40 g de tierra diatomea fueron mezcladas y colocadas en una celda de extracción de 100 mL dentro del Sistema de Extracción de Líquidos Presurizados (ASE Dionex, Thermofisher, San José, California, USA). Las condiciones de proceso fueron fijadas de 100 a 160°C combinadas con concentraciones de etanol de 20 a 60%. Estos parámetros fueron fijados con 10 atm de presión, con un tiempo de extracción de 5 minutos y 250 segundos de purga de nitrógeno. Los extractos obtenidos fueron almacenados a -20°C en envases ámbar para futuros análisis.

Para encontrar las condiciones óptimas del proceso de extracción, se utilizó un diseño Central Compuesto (DCC), el cual fue establecido en las condiciones óptimas del proceso (posible zona de curvatura), donde las variables independientes fueron la temperatura (x1) y concentración de etanol (x2). La matriz del diseño incluyó un total de 11 tratamientos, de los cuales 4 fueron en condiciones axiales, 4 en condiciones factoriales y 3 fueron en el punto central (Tabla 1).

El procesamiento y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el programa Statgraphics Plus 4.0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Esto permitió encontrar superficies tridimensionales para cada respuesta en particular (contenido de polifenoles y azúcares). Se evaluaron los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes, y se establecieron regresiones lineales de primer orden o segundo orden según el ajuste de mínimos cuadrados, según el siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \mathcal{E}$$

Donde: Y es la respuesta (cantidad de polifenoles o azúcares extraídos); X_1 es la temperatura codificada; X_2 es la concentración de etanol codificada; β son los coeficientes del modelo y $\mathcal{E}$ es el error experimental.

Finalmente, Para encontrar un óptimo de las condiciones de extracción que permitieran la mayor recuperación de polifenoles con concentraciones mínimas de azúcares, se aplicó el enfoque de superficie de respuesta utilizando la función de deseabilidad. La deseabilidad (d) se calculó usando la Ecuación 1, donde se buscaba una respuesta máxima prevista para el contenido de polifenoles. La Ecuación 2 se utilizó para la respuesta prevista en el contenido de azúcares donde se deseaba un valor mínimo (U).

$$d = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y} < L \\ \left(\frac{\hat{y}-L}{T-L}\right), & \text{si } L \leq \hat{y} \leq T \\ 1 & \text{si } \hat{y} > T \end{cases} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$d = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{y} < T \\ \left(\frac{U-\hat{y}}{U-T}\right), & \text{si } T \leq \hat{y} \leq U \\ 0 & \text{si } \hat{y} > U \end{cases} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde T y L representan los valores objetivo para la respuesta prevista más alta y más baja dentro del espacio temperatura y concentración de etanol, dependiendo de si se había establecido un valor mínimo o máximo deseado. $\hat{y}$ representa las respuestas previstas que se derivaran de las regresiones múltiples calculadas anteriormente para cada superficie de respuesta individual.

Tabla 1. Matriz para el diseño compuesto central (DCC)

Niveles del diseño		Niveles experimentales		Variables respuesta	
x_1	x_2	T °C	Etanol %	y_1	y_2
-1	-1	100	20		
-1	1	100	60		
1	-1	160	20		
1	1	160	60		
-1.414	0	87.57	40		
1.414	0	172.43	40		
0	-1.414	130	11.72		
0	1.414	130	68.28		
0	0	130	40		
0	0	130	40		
0	0	130	40		

Donde: y_1 es el contenido total de polifenoles; y_2 es el contenido de azúcares

Determinación de Polifenoles Totales

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó con el reactivo Folin Ciocalteu, siguiendo el método de Singleton et al. (14). En resumen, un volumen de 3.75 mL de agua destilada, 0.5 mL de muestra y 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) se mezclaron con 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (10% p / v). Luego, la absorbancia se medirá a 765 nm (Espectrómetro UV-Vis Genesys 150, Thermofisher, San José, CA, USA) después un tiempo de reacción de 1 h a temperatura ambiente. Los resultados se expresarán en mg EAG (equivalente de ácido gálico) por gramo de sólido seco.

Determinación de azúcares reductores

Se cuantificó glucosa siguiendo el procedimiento propuesto por Wilson et al. (15). Primeramente, se realizó la filtración de los extractos de algas pardas con una jeringa acoplada con un filtro de nylon de 0,22 μm , insertando las muestras en viales ámbar de 1,5 mL. El análisis se ejecutó utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado con un detector de índice de refracción (IR) a 35 °C. El equipo inyectó 1 μL de muestra pretratada a un flujo de 0,75 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de Acetonitrilo/agua (75/25%), se trabajó en modalidad isocrática. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Luna® 5 μm NH2 100 Å. Las concentraciones se hallaron de acuerdo con las curvas de calibración (10 mg/mL – 50 mg/mL) de glucosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de polifenoles.

Los extractos obtenidos mediante condiciones subcríticas presentaron concentraciones de polifenoles que varían de 0.23 a 1.89 mg EAG/ gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura y etanol presentaron un efecto positivo en la recuperación de polifenoles totales (Tabla 2). Por ejemplo, el uso de 20% de etanol con un incremento de 100 a 160 °C permitió recuperar 3 veces mas contenido de polifenoles; mientras que el uso de 60% de etanol con incrementos de 100 a 160°C recupero 2.8 veces más contenido de estos compuestos bioactivos (Tabla 2). Además, el análisis de varianza mostro que la los efectos principales (temperatura y etanol) tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles ($P < 0.0001$), así como la interacción de ambos factores (temperatura x etanol) tuvieron efecto significativo sobre la variable respuesta ($P < 0.001$).

Comportamientos similares fueron reportados por Huaman et. al. (16) quienes encontraron que los incrementos de temperatura de 90 a 150°C con agua pura y 30% de etanol mejora en 14 y 37% la recuperación de polifenoles. Mariotti et. al. (13) observaron que los incrementos de temperatura de 60 a 90°C mejora en 16 y 28% la recuperación de polifenoles con agua pura y 15% de etanol. Bajo condiciones subcríticas, las altas temperaturas aceleran la energía cinética del solvente, favoreciendo la ruptura de la matriz vegetal (17); consecuentemente los polifenoles son liberados. Además, el uso de etanol permita una mayor solubilidad de los polifenoles debido a la presencia de dos fracciones

polar y no polar en su estructura química, los cuales interactúan con los grupos hidroxilo y aromáticos de los polifenoles, respectivamente (18).

Tabla 2. Caracterización química de los extractos obtenidos bajo condiciones subcríticas (ELP).

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Contenido de polifenoles (mg EAG/g ss)	Contenido de glucosa (mg/g ss)
130	40	0.685	3.11
100	20	0.36	4.68
160	20	1.36	8.16
100	60	0.78	2.16
160	60	0.91	5.46
130	40	0.71	3.26
87.5736	40	0.21	1.26
172.426	40	1.84	11.04
130	11.7157	0.53	3.18
130	68.2843	0.81	4.86
130	40	0.74	3.21
130	40	0.65	3.09
100	20	0.42	4.92
160	20	1.515	11.34
100	60	0.82	2.52
160	60	1.89	9.09
130	40	1.04	3.12
87.5736	40	0.23	1.38
172.426	40	1.78	10.68
130	11.7157	0.54	3.24
130	68.2843	0.85	5.1
130	40	0.68	3.11

Los valores de contenido de polifenoles y contenido de glucosa son el promedio de 3 repeticiones (n= 3). Las desviaciones estándar varían entre 0.02 y 0.09 para polifenoles totales y entre 0.085 y 0.254 para el contenido de glucosa.

Para explicar el efecto de la temperatura y etanol sobre el contenido de polifenoles, un modelo predictivo de superficie de respuesta fue establecido, el cual cuantifica la relación entre una variable dependiente (CPT) y dos variables independientes (T y E) mediante una ecuación cuadrática (Tabla 3). La inclusión de términos lineales, cuadráticos y de interacción permite modelar efectos no lineales y sinérgicos entre la temperatura y la concentración de etanol sobre la respuesta. Los coeficientes asociados a cada término indican la dirección y magnitud de esta influencia. Por ejemplo, los coeficientes negativos de los términos lineales sugieren una disminución de la respuesta al aumentar individualmente la temperatura o la concentración de etanol, mientras que los términos cuadráticos positivos señalan una posible curvatura en la superficie de respuesta para ambas variables (T y E). La presencia en el modelo de la interacción (TxEx) implica que

el efecto de la temperatura sobre la respuesta está condicionado por la concentración de etanol (Tabla 3).

Tabla 3. Modelos predictivos del comportamiento del efecto de la temperatura y composición del solvente sobre las respuestas (contenido de polifenoles y azúcares reductores) de los extractos obtenidos.

Respuesta	Modelo	R ²
Contenido de polifenoles (CPT)	$Y_1 = 4.5224 - 0.0765 \times T - 0.0105 \times E + 0.0003 \times T^2 + 0.0001 \times T \times E + 0.0008 \times E^2$	0.9876
Contenido de azúcares reductores	$Y_2 = 3.4325 + 0.3034 \times T - 0.0798 \times E - 0.0011 \times T^2 - 0.001 \times T \times E + 0.0012 \times E^2$	0.9745

La superficie de respuesta muestra el efecto de la interacción sinérgica entre la temperatura (100 - 160°C) y la concentración de etanol (20 - 60%) sobre la extracción de polifenoles (Figura 1). La respuesta no sigue una tendencia lineal con respecto a las variables independientes, cuyo rendimiento de polifenoles mejora con el incremento de temperatura y concentraciones de etanol (>30%). Interesantemente, las bajas concentraciones de etanol no favorecen una mayor extracción de compuestos fenólicos (Figura 1). Si bien las condiciones óptimas fueron establecidas con 160°C y 60% de etanol, es necesario analizar los datos con la presencia de compuestos no deseados como los azúcares reductores (glucosa) con la finalidad de establecer condiciones de proceso que garanticen una máxima recuperación de polifenoles con una menor presencia de azúcares reductores.

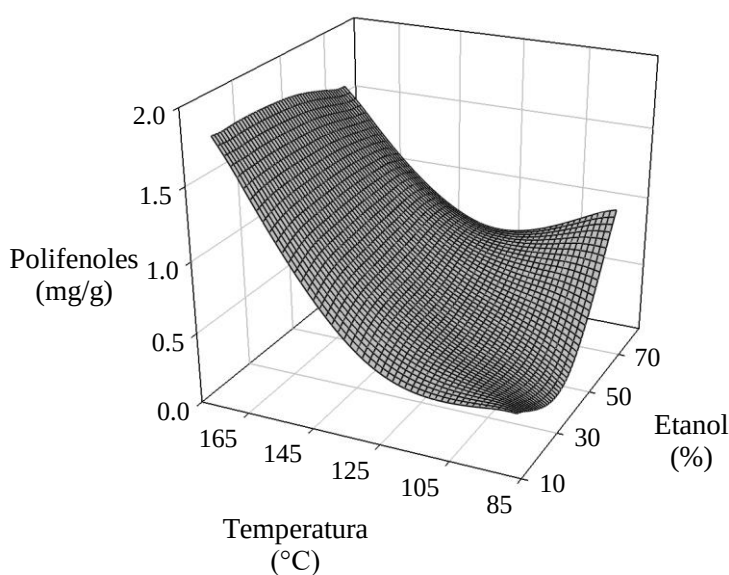


Figura 1. Superficie de respuesta del efecto de la composición de solvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles.

Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de compuestos no deseados (azúcares reductores).

Bajo condiciones subcríticas, el contenido de azúcares reductores presentes en los extractos varía de 1.26 a 11.34 mg/gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura mejoran la recuperación de azúcares; contrariamente, la presencia de etanol tiene un efecto negativo sobre estos compuestos (Tabla 2). Por ejemplo, los cambios incremento de 100 a 160 °C permite incrementar en 75 y 35% la recuperación de azúcares con 20 y 60% de etanol, respectivamente (Tabla 2). El análisis de varianza mostro que el efecto positivo de la temperatura ($P < 0.0005$) y efecto negativo del contenido de etanol ($P < 0.002$); mientras la interacción de ambos factores presento un efecto significativo sobre la variable respuesta (contenido de azúcares) ($P < 0.0012$). Mariotti et. al. (13) demostró que los incrementos de etanol en la composición del solvente de extracción de 0 a 15% a 90°C reducen la presencia en el contenido de glucosa en 18%. Mamani-Parí et. al. (18) demostraron que la presencia de etanol a altas temperaturas reduce la presencia de azúcares reductores en los extractos obtenidos. Bajo condiciones subcríticas, la polaridad del solvente es reducida drásticamente, limitando la formación de puentes hidrogeno (19,20); consecuentemente es probable que las interacciones de los azúcares con las moléculas de agua se reduzca limitando su solubilidad y extracción.

El modelo predictivo de superficie de respuesta muestra la relación entre el contenido de azúcares y dos variables independientes temperatura (T) y etanol (E) mediante una ecuación cuadrática (Tabla 3). Los términos lineales, cuadráticos y de interacción permite modelar efectos no lineales y sinérgicos entre la temperatura y la concentración de etanol sobre la respuesta. Los coeficientes positivos indican que los incrementos de temperatura favorecen la recuperación de azúcares, mientras que los términos negativos lineales sugieren que la presencia de etanol disminuye la presencia de azúcares (Tabla 3).

La superficie de respuesta (Figura 2) muestra la influencia significativa de la temperatura (100 - 160 °C) y la concentración de etanol (20 - 60%) sobre la obtención de glucosa (1.23 – 11.34 mg/g). Existe una tendencia general a la disminución en la recuperación de glucosa a medida que la concentración de etanol incrementa. En contraste, Las altas temperaturas favorecen una mayor extracción de glucosa. La superficie muestra una pendiente descendente desde la región de baja temperatura y baja concentración de etanol hacia la región de alta temperatura y alta concentración de etanol. Esto sugiere que para optimizar el rendimiento de glucosa se deben considerar temperaturas intermedias (125°C) con altas concentraciones de etanol (30%).

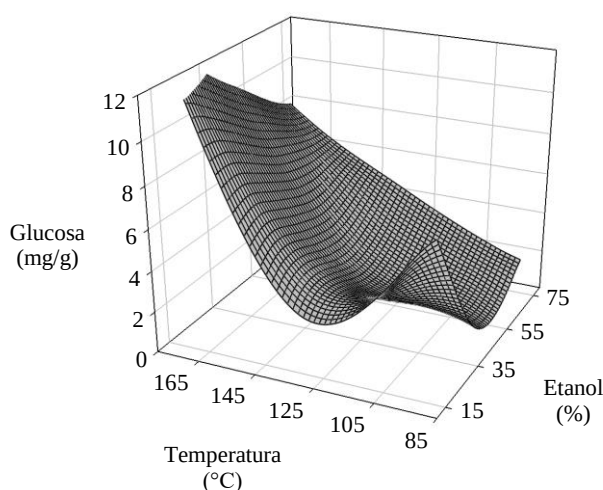


Figura 2. Superficie de respuesta del efecto de la composición de solvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles.

Optimización de respuestas múltiples

Como se describió previamente, la recuperación de polifenoles mejora a temperaturas más altas. Sin embargo, la extracción de azúcares reductores como la glucosa también se acelera a temperaturas más altas; mientras la presencia de etanol reduce la presencia de estos compuestos no deseados. Entonces, si consideramos ambas respuestas (polifenoles y azúcares) de manera individual no existe una condición de extracción óptima que satisfaga los criterios de obtener un extracto con un elevado contenido de polifenoles y mínima presencia de azúcares reductores. Por ello, la función deseabilidad permitió determinar la condición óptima de extracción, cuyo mayor contenido de polifenoles y menor presencia de azúcares se alcanzó a 141.9 °C con 60.33% de etanol (Figura 3). No obstante, es importante recordar que las altas temperaturas no solo favorecen la recuperación de azúcares, sino también podrían inducir la formación de compuestos tóxicos como el hidroximetil furfural y acrilamida, los cuales también deberían ser materia de análisis en futuras investigaciones.

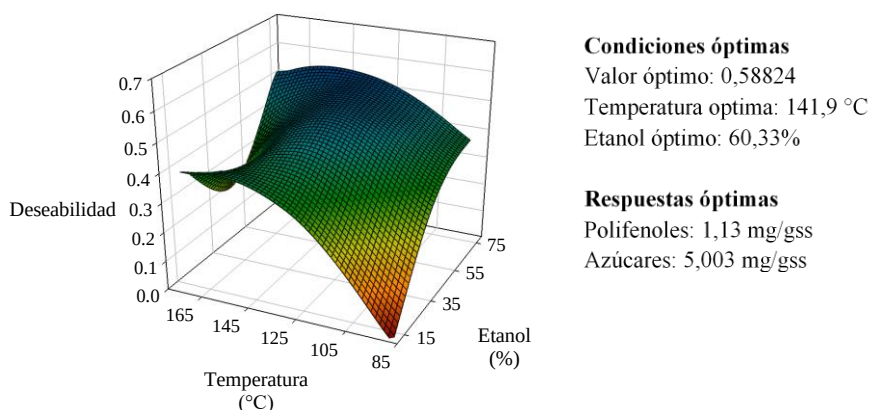


Figura 3. Superficie de respuesta de la función deseabilidad que indica las condiciones óptimas de extracción.

CONCLUSIONES

Si bien las altas temperaturas favorecen la recuperación de polifenoles, también favorecen la extracción de azúcares. No obstante, el uso de etanol como cosolvente de extracción reduce la presencia de azúcares en los extractos obtenidos. Además, las condiciones subcríticas reducen la polaridad del solvente reduciendo las interacciones de los azúcares con las moléculas de agua. Por ello, el proceso de optimización establecido las condiciones óptimas de extracción que permitirán obtener extractos con elevado contenido de polifenoles y menor presencia de azúcares reductores. Estos resultados muestran que la composición de solvente en un proceso de extracción no solo mejora la recuperación de metabolitos secundarios, sino también reduce la presencia de compuestos polares no deseados.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Moquegua-Perú por financiar este proyecto (Resolución de Comisión Organizadora N° 059-2021-UNAM).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaya-Chantaca D, Flores-Gallegos AC, Iliná A, Aguilar C, Sepúlveda-Torre L, Ascacio-Vadlès J, et al. La industria vinícola como fuente de valiosos residuos agroindustriales The wine industry as a source of valuable agro-industrial wastes. *CienciaAcierta*. 2021;(67):123–45.
2. Chowdhary P, Gupta A, Gnansounou E, Pandey A, Chaturvedi P. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environ Pollut*. 2021;278:116796. doi:10.1016/j.envpol.2021.116796.
3. Garcia-Lomillo J, González-San José M. Applications of Wine Pomace in the Food Industry Approaches and Functions. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017 Jan;16(1):3-22. doi: 10.1111/1541-4337.12238.
4. Huaman-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Perez-Correa JR. Polyphenols of Carménère Grapes. *Mini Rev Org Chem*. 2017;14(3):176–86.
5. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313–52.
6. Adebooye OC, Alashi AM, Aluko RE. A brief review on emerging trends in global polyphenol research. *J Food Biochem*. 2018;42(4): e12519. doi: 10.1111/jfbc.12519.
7. Cheng Y, Xue F, Yu S, Du S, Yang Y. Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*. 2021 Jun 30;26(13):4004. doi: 10.3390/molecules26134004.
8. Souilem S, Fki I, Kobayashi I, Khalid N, Neves MA, Isoda H, et al. Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries. *Food Bioprocess Technol*. 2017;10(2):229–48.
9. Al-Suod H, Ratiu IA, Górecki R, Buszewski B. Pressurized liquid extraction of cyclitols and sugars: optimization of extraction parameters and selective separation. *J Sep Sci*. 2019;42(6):1265–72.

10. Huamán-Castilla NL, Díaz Huamaní KS, Palomino Villegas YC, Allcca-Alca EE, León-Calvo NC, Colque Ayma EJ, et al. Exploring a Sustainable Process for Polyphenol Extraction from Olive Leaves. *Foods*. 2024 Jan 15;13(2):265. doi: 10.3390/foods13020265.
11. Huamán-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Pérez-Correa JR. Glycerol as Alternative Co-Solvent for Water Extraction of Polyphenols from Carménère Pomace : Hot Pressurized Liquid Extraction and Computational Chemistry Calculations. *Biomolecules*. 2020 Mar 20;10(3):474. doi: 10.3390/biom10030474.
12. Vergara-Salinas JR, Bulnes P, Zúñiga MC, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Mateos-Martín ML, et al. Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *J Agric Food Chem*. 2013;61(28):6929–36.
13. Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Huamán-Castilla N, Pedreschi F, Iglesias-Rebolledo N, Pérez-Correa JR. Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Carménère’ pomace extracts. *Int J Food Sci Technol*. 2018;53(4): 1072-1078.
14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965 Jan;16(3):144 LP – 158.
15. Wilson AM, Work TM, Bushway AA, Bushway RJ. HPLC determination of fructose, glucose, and sucrose in potatoes. *J Food Sci*. 1981;46(1):300–10.
16. Huamán-Castilla NL. The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLE/RP process on Carménère pomace extracts. *Molecules*. 2019 Aug 29;24(17):3145. doi: 10.3390/molecules24173145.
17. Huamán-Castilla NL, Gajardo-Parra N, Pérez-Correa JR, Canales RI, Martínez-Cifuentes M, Contreras-Contreras G, et al. Enhanced Polyphenols Recovery from Grape Pomace: A Comparison of Pressurized and Atmospheric Extractions with Deep Eutectic Solvent Aqueous Mixtures. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Jul 18;12(7):1446. doi: 10.3390/antiox12071446.
18. Parí SM, Juárez MLM, Vilca FZ, Vilca OML, Alca EEA, Escobedo-Pacheco E, et al. Alternative green extraction techniques to enhance recovery of antioxidant compounds from red peel prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *Discov Food [Internet]*. 2024;4:58. doi:10.1007/s44187-024-00140-5.
19. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol*. 2012;26(2):68–87.
20. Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int J Food Prop*. 2013;16(2):382–96.