

**Universidad Pública de Navarra**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE  
DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ORUJOS DE UVA**

presentado por

**ITXASO FILGUEIRA GARRO *k***

*aurkeztua*

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD  
EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**

Junio, 2017

# CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ORUJOS DE UVA

Itxaso Filgueira Garro

## **Abstract**

Wine production generates the grape pomace which is known for its high antioxidant activity. The aim of this field of research is to obtain a high content of phenols and the highest antioxidant activity. Nevertheless, some of the studied techniques have a limited application in food industry. This work studies the extraction at high temperatures in water as green extraction technique. The effect of drying, temperature and time on total phenols, flavonoids, anthocyanins, tannins and antioxidant activity is discussed. Drying increases total phenol content and decreases antioxidant activity, while increasing temperature or time increases both parameters. In conclusion, the extraction in water at high temperature is an easy technique to apply in food industry and it allows obtaining extracts with a similar antioxidant activity to other techniques which use solvents that are not Generally Recognized As Safe (GRAS) or equipment that raises the price of the process.

Key words: antioxidant; polyphenol; grape pomace; green extract; by-product

## **Resumen**

La producción de vino genera el orujo de la uva conocido por su elevada actividad antioxidante. El objetivo en este ámbito de investigación es obtener extractos con un alto contenido polifenólico y la mayor actividad antioxidante. Sin embargo, algunas de las técnicas estudiadas tienen una aplicación limitada en la industria. En el presente trabajo se estudia la extracción a altas temperaturas en medio acuoso como técnica de extracción sostenible. Se discute el efecto del secado, la temperatura y tiempo en el contenido de fenoles, flavonoides, antocianos, taninos y actividad antioxidante. El secado aumenta el contenido en fenoles y disminuye la actividad antioxidante, mientras que al aumentar la temperatura o el tiempo,

ambos parámetros aumentan. En conclusión, la extracción en medio acuoso a altas temperaturas es una técnica fácilmente aplicable y que permite obtener una actividad antioxidante comparable a la obtenida mediante otras técnicas que requieren el uso de disolventes no reconocidos como seguros (GRAS) o la utilización de equipos de elevado precio que encarecen el proceso.

Palabras clave: Antioxidante; polifenol; orujo de uva; extracto acuoso; subproducto

## **1. Introducción**

La elevada cantidad de residuos que se genera en la producción ha llevado a la industria alimentaria a buscar alternativas más sostenibles donde se busca otra utilidad a los subproductos dándoles un valor añadido. La industria vitivinícola, que centra el 45% de la producción mundial en Europa, genera 20-30% de subproductos o residuos [1]. Actualmente los subproductos generados en la vinificación (semillas, pieles y hollejos) se utilizan para la obtención de alcohol, ácido tartárico, colorantes alimentarios, aceite de las semillas, para alimentación animal o como compost. Sin embargo, se ha observado que cuentan con compuestos fenólicos conocidos por su capacidad antioxidante, lo que podría suponer un aumento de su valor [2].

Los compuestos fenólicos son los responsables del color y el sabor del vino, lo que tienen un papel muy importante en la producción. Estos compuestos tienen propiedades bactericidas, antioxidantes y vitamínicas por lo que se les ha atribuido un efecto preventivo sobre enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer así como un efecto beneficioso sobre la flora intestinal o la presión arterial [3]–[8]. Estas propiedades han llevado a la aplicación de estos subproductos en alimentos para crear nutraceúticos, evitar la oxidación lipídica, la proliferación microbiana o mejorar las propiedades físicas o sensoriales de

productos como pan, galletas, magdalenas, pasta, leche fermentada, yogurt, queso, productos cárnicos o aceites de pescado [2].

Existen dos grandes grupos de compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides. Los primeros, como los flavonoles, los flavanoles y antocianos, se encuentran en los hollejos, las semillas y los raspones de la uva mientras que los compuestos no flavonoides, como los ácidos fenólicos y estilbenos, se encuentran en la pulpa. Por lo que en el subproducto de la uva, predominarán los compuestos flavonoides a los no flavonoides. El orujo de vino tinto tiene un contenido total de fenoles de aproximadamente 271,1 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de extracto seco (ES), mientras que los flavonoles alcanzan los 39,29  $\mu\text{mol/g}$  ES, los antocianos 8,88 mg/g ES y 19,78  $\mu\text{mol/g}$  ES de 3-flavanoles. [9].

Estos compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante, es decir, tienen capacidad de captar radicales libres. La uva de la variedad cabernet sauvignon es conocida por su capacidad antioxidante. Xu *et al.* [10] determinaron que el contenido en fenoles de esta variedad de uva es de 236,26 mg GAE/L, el contenido en antocianos (TAC) de 131,87 mg malvidin-3-O-glucoside/L, una cantidad de flavanoles (TFC) de 1,12 mg quercitina/L y un contenido en 3-flavanoles (TTC) de 112,5 mg equivalentes catequina/L. Los resultados obtenidos para los diferentes grupos de compuestos fenólicos muestran una correlación positiva con el resultado de actividad antioxidante, es decir, el aumento de estos compuestos hace que la capacidad antioxidante de la muestra sea mayor.

Debido al interés por los subproductos de la vinificación, se están estudiando técnicas que permitan obtener extractos fenólicos con el mayor rendimiento y la mayor actividad antioxidante. La extracción sólido-líquido ha sido la más estudiada siendo los factores más importantes el tipo de solvente y la relación muestra/solvente. Los más utilizados son metanol, acetona, etanol y agua. El metanol es efectivo en la extracción de catequinas, epicatequinas y epigallocatequinas. Para la obtención de procianidinas a partir de las semillas de la uva el

solvente más eficaz es la acetona en medio acuoso. Aunque el uso único de acetona como solvente muestra resultados de fenoles y flavonoides totales menores que la extracción acuosa [11]. Por otro lado, en la combinación de etanol con agua se observan altos rendimientos de fenoles totales donde predominan las catequinas y antocianidinas [12]. El etanol como único solvente da lugar a extractos con valores de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante (DPPH) significativamente superiores a la extracción con agua utilizando temperaturas bajas (50 °C) [11], [13].

Sin embargo, la extracción en medio acuoso a altas temperaturas (100 °C) muestra un mayor contenido en polifenoles que el medio alcohólico mientras que no se observan diferencias con el medio hidroalcohólico [14]. Además, la actividad antioxidante de los extractos acuosos son comparables o ligeramente superiores a los alcohólicos o hidroalcohólicos [14], [15].

El aumento de la relación muestra/solvente y la temperatura de extracción consigue extractos con mayor rendimiento. Sin embargo, un aumento excesivo de la temperatura podría afectar a la estabilidad de los fenoles [16]. Por otro lado, al prolongar el tiempo de extracción el rendimiento también es mayor si el solvente utilizado es hidroalcohólico, en cambio, la influencia del tiempo de extracción en medio acuoso es menor [12], [17].

El tratamiento previo de las muestras también influye en la composición y la actividad antioxidante del producto final ya que al reducir el contenido de humedad la relación entre el peso seco y el solvente es mayor. Rajha *et al.* [18] compararon el orujo de uva sin y con tratamiento de secado a 40 °C durante 24 h utilizando posteriormente etanol /agua al 70% (v/v) como solvente. Estos autores concluyeron que el contenido total de fenoles es mayor en la muestra sin tratar, mientras que la muestra tratada tiene una mayor capacidad antioxidante. Drosou *et al.* [15] observaron que en las extracciones acuosas el efecto del tratamiento previo es el contrario, el contenido total de fenoles es superior en la muestra seca, pero esta tiene una menor capacidad antioxidante respecto a la húmeda.

La extracción sólido-líquido es una técnica fácilmente aplicable y accesible en la industria. Sin embargo, el tiempo y la cantidad de solvente necesaria para obtener un rendimiento adecuado son muy elevados, por lo que durante los últimos años se han aplicado otras técnicas, como los ultrasonidos, los fluidos supercríticos, las altas presiones, las microondas, los campos eléctricos pulsados o las descargas de alto voltaje.

Fontana & Antonioli [12] y Paini *et al.* [12], [19] observaron que la incorporación de ultrasonidos a la extracción sólido-líquido aumenta la cantidad de fenoles y de flavonoides de los extractos obtenidos, y además, la aplicación en medio acuoso da lugar a mejores resultados que el medio alcohólico. Según Fontana & Antonioli [12] y Pinelo *et al.* [13], el uso de fluidos supercríticos permite la extracción de algunos compuestos no polares y muestra un mayor rendimiento del contenido total de fenoles y de la capacidad antioxidante según el método DPPH. Barba & Brianceu [20] concluyeron que la incorporación de descargas de alto voltaje a la extracción sólido-líquido supone un aumento del rendimiento de extracción, mientras que los campos eléctricos pulsados y los ultrasonidos dan lugar a niveles de antocianinas mayores.

Aunque estas técnicas más avanzadas se traducen en un mayor rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos, la inversión inicial así como la necesidad de personal formado para su aplicación hace que estas técnicas no sean fácilmente accesibles para la industria. Por otro lado, la utilización de solventes como el metanol o la acetona, además de encarecer el proceso supone un problema para la posterior aplicación de estos extractos en la industria agroalimentaria al no estar reconocidos como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration).

La tendencia en esta línea de investigación es la reducción de los tiempos de extracción así como la simplificación de los procesos para dar lugar a técnicas aplicables en la industria agroalimentaria. Por otro lado, se buscan procesos sostenibles con solventes GRAS para facilitar la aplicación directa en alimentos consiguiendo una revalorización del subproducto. La

EFSA reconoce el etanol y agua como solventes GRAS, sin embargo, aunque la eliminación del agua presente en el extracto requiere de temperaturas más elevadas que la eliminación del etanol, el residuo que podría dejar el agua es preferible frente al que podría estar presente en un extracto alcohólico.

Atendiendo a los antecedentes y las tendencias que se han estudiado en este apartado, el objetivo principal de este trabajo es estudiar el producto obtenido a partir de una extracción sólido-líquido a altas temperaturas en medio acuoso como técnica de extracción sostenible, fácilmente aplicable en la industria y que facilitaría la posterior aplicación del extracto en la industria alimentaria. Se estudia el efecto del tiempo, la temperatura de extracción y el tratamiento previo de la muestra mediante la determinación del contenido total de flavonoides (TFC), el total de antocianos (TAC), el total de taninos (TTC), el total de fenoles (TPC), y la actividad antioxidante (DPPH).

## **2. Material y métodos**

### **2.1. Muestra**

Se utilizaron los orujos obtenidos en la elaboración del vino producido en la planta piloto del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de la Universidad Pública de Navarra (UPNA). El vino se elaboró a partir de la uva (*Vitis vinifera*) de la variedad cabernet sauvignon obtenidos de la finca de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de la Universidad Pública de Navarra (UPNA).

### **2.2. Determinación de la humedad**

La humedad de las muestras se determinó mediante una balanza con cámara de desecación GRAM ST-H50 en la que se trataron 2 g de muestra. La medida se realizó a 105 °C por

triplicado y los resultados se expresaron como el porcentaje de la pérdida de peso respecto al peso inicial.

### 2.3. Tratamiento de secado

El secado de la muestra se realizó en una estufa BINDER a 50 °C y bajo condiciones de vacío (200 mbar) durante 72 h hasta alcanzar una humedad aproximada del 8%. La muestra húmeda fue triturada en el vaso de una batidora convencional durante 10 s mientras que la muestra seca fue triturada hasta conseguir un polvo con un tamaño de partícula aproximado de 0,7-1 mm.

### 2.4. Extracción sólido-líquido

La extracción se llevó a cabo en un medio acuoso con una relación 1:8 (m/v) a tres temperaturas (50, 70 y 90 °C) durante tres tiempos (10, 20 y 30 min) en un baño P-SELECTA UNITRONIC OR con una agitación de 36 rpm. La extracción para cada tiempo y temperatura se realizó por triplicado y las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga SIGMA 3K30 con un rotor nº 12156. Las condiciones para las muestras sin secado fueron de 8000 rpm durante 15 min, mientras que las muestras secas se trataron a 12000 rpm durante 30 min, ambas a 4 °C. Tras este tratamiento se retiró el sobrenadante de las muestras y se almacenaron en refrigeración en una atmósfera de nitrógeno, para evitar la oxidación.

### 2.5. Determinación del contenido total de flavonoides (TFC)

Los flavonoides totales se determinaron mediante el método descrito por Bosso *et al.* [11]. Se mezclaron 0,1 mL del extracto diluido 1:10 (v/v) con 5 mL de etanol hidroalcohólico (etanol:H<sub>2</sub>O:HCl 70:30:1) y se midió la absorbancia a 280 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer HITACHI. Para expresar los resultados se realizó una recta de calibrado con (+)-catequina (50-800 mg/L). Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina por gramo de

extracto seco (ES). La determinación se realizó por duplicado y se hicieron tres medidas espectrofotométricas.

## 2.6. Determinación del contenido total de antocianos (TAC)

La determinación del contenido de antocianos se realizó según el método basado en la decoloración mediante bisulfito de sodio descrito por Ribéreau-Gayon & Stonestrest [21]. Se preparó una solución madre en la que se mezcló 1 mL de muestra, 1 mL de etanol y 20 mL de HCl al 2% (v/v). En un tubo "A" se vertieron 5 mL de la solución madre y 2 mL de agua destilada. En el tubo "B" se añadieron 5 mL de la solución madre y 2 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 16% (m/v). Pasados 15 min se midió la absorbancia de ambos tubos a 520 nm utilizando cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer HITACHI. El método se llevó a cabo por duplicado y se realizaron tres medidas espectrofotométricas. Los resultados fueron expresados como mg/g extracto seco (ES) según la ecuación 1.

$$\text{Contenido antocianos totales (mg/L)} = 875 \times (\text{Abs A} - \text{Abs B}) \quad (1)$$

## 2.7. Determinación del contenido total de taninos (TTC)

Para cuantificar el contenido en taninos condensados se utilizó el método descrito por Bate-Smith [22] que se basa en la hidrólisis de estas estructuras poliméricas en medio ácido y temperaturas elevadas, dando lugar a sus unidades monoméricas, las antocianidinas. En cada tubo "A" y "B" se mezclaron 1 mL de muestra, 0,5 mL de agua destilada y 3 mL de HCl 37%. El tubo "A" se llevó a 90 °C durante 30 min, mientras que el tubo B se guardó en oscuridad a temperatura ambiente. Después de atemperar el tubo "A" en oscuridad, se añadieron a ambos tubos 0,5 mL de etanol y se midió la absorbancia a 550 nm en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico utilizando un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer HITACHI. El método se realizó por duplicado y las medidas espectrofotométricas por triplicado.

Los resultados se expresaron como mg de taninos/g de extracto seco (ES) que se calculó a partir de la ecuación 2.

$$\text{Contenido taninos totales } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = 19,33 \times (\text{Abs A} - \text{Abs B}) / 5 \quad (2)$$

## 2.8. Determinación del contenido total de fenoles (TPC)

El contenido total de fenoles se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu ajustado al lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO desarrollado por Bobo-García *et al.* [23]. En los pocillos de las placas NUNC f-bottom se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto diluido y 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:4 (v/v). Se agitó durante 1 min y se incubó a 25  $^{\circ}\text{C}$  durante 4 min. Después, se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de carbonato sódico al 10% (m/v) y se agitó durante 1 min. Tras dos horas en oscuridad y a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 750 nm. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g de extracto seco (ES) utilizando una recta patrón de ácido gálico (10-200 mg/L). Las muestras se analizaron por duplicado y se realizaron ocho medidas espectrofotométricas de cada repetición.

## 2.9. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante el método de DPPH para el lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO desarrollado por Bobo-García *et al.* [23]. Se mezclaron en una placa NUNC F-bottom 20  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida con en 180  $\mu\text{L}$  del reactivo DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de 150  $\mu\text{M}$  que fue preparado en metanol al 80%. Se agitó durante 5 s y se midió la absorbancia a 515 nm después de 40 min de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/g de extracto seco (ES) a partir de una recta de calibrado de 50-500  $\mu\text{mol/L}$  de Trolox en etanol:agua 50:50 (v/v). Las muestras se analizaron por duplicado y se realizaron ocho medidas espectrofotométricas por cada repetición.

### 2.10. Análisis estadístico

El efecto de los factores (tratamiento, tiempo y temperatura) sobre los parámetros de contenido total de fenoles, flavonoides, antocianos, taninos y actividad antioxidante se estudió mediante el análisis de la varianza y el análisis de la regresión lineal múltiple. La relación entre los parámetros estudiados se estableció según sus correlaciones calculadas por el método Pearson. Todos los análisis se realizaron con la versión 22 del programa IBM SPSS Statistics.

## 3. Resultados y discusión

Según el análisis de la varianza multifactorial la interacción de los factores estudiados (tratamiento de secado, temperatura y tiempo) es significativa ( $p < 0,05$ ;  $\alpha = 95\%$ ), por lo que el efecto de cada uno de los factores en las determinaciones realizadas se ha estudiado por separado.

### 3.1. Contenido en humedad

El contenido en humedad de los orujos sin secar es de  $59,50 \pm 3,99\%$  mientras que la humedad de los orujos secos es de  $8,15 \pm 0,10\%$ . La humedad de los orujos utilizados es la habitual de este tipo de subproductos según otros autores [2], [13], [15], [18].

### 3.2. Efecto del tratamiento previo

Según el análisis de la varianza, el tratamiento previo de la muestra influye significativamente ( $p < 0,05$ ;  $\alpha = 95\%$ ) en todos los grupos de fenoles estudiados así como en la actividad antioxidante. El contenido en fenoles totales (figura 1) y flavonoides (tabla 1) es mayor en la muestra seca. El contenido de antocianos y taninos (tabla 1), en cambio, es mayor en la muestra sin secar, al igual que la actividad antioxidante (figura 1).

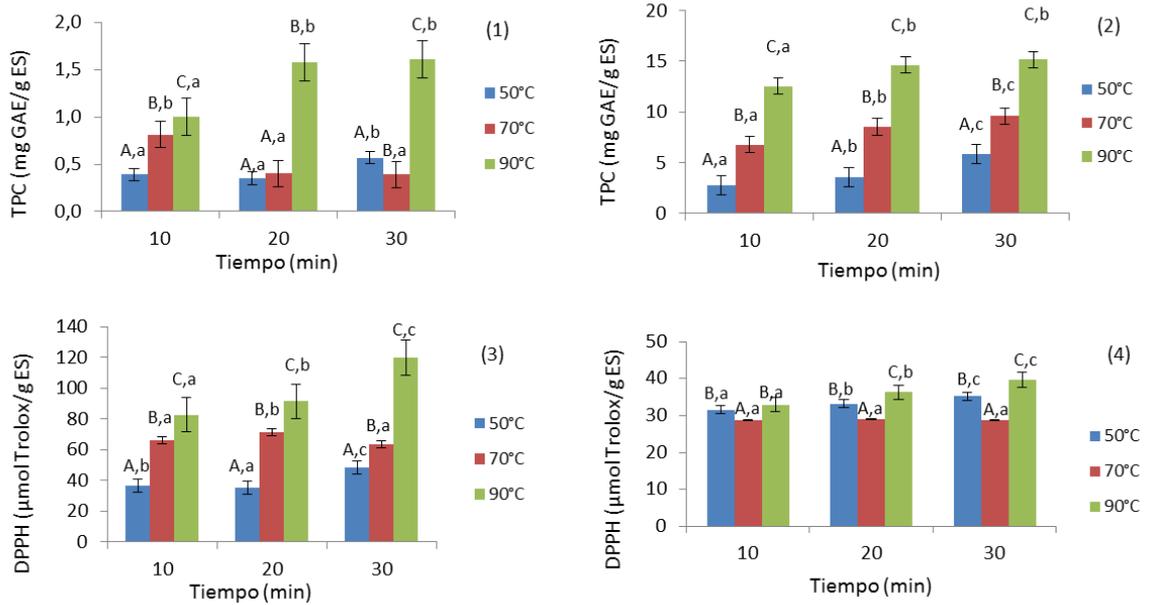


Figura 1. TPC muestra sin secar (1), TPC muestra seca (2), AA (DPPH) muestra sin secar (3), AA (DPPH) muestra seca (4) para diferentes temperaturas y tiempos.

A,B,C Diferencias significativas entre la temperatura ( $p < 0,05$ ; Test de Tukey)

a,b,c Diferencias significativas entre el tiempo ( $p < 0,05$ ; Test de Tukey)

Sólyom *et al.* [16] concluye que el 10% del contenido total de antocianos puede degradarse a 50 °C si el tiempo de exposición es superior a 100 min, lo que explicaría la pérdida de estos compuestos durante el tratamiento de secado que se ha realizado en el presente trabajo. Sin embargo, según estos mismos autores el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante no disminuye de manera significativa hasta alcanzar temperaturas de secado de 150 °C cuando el solvente utilizado para realizar la extracción es etanol/agua. Drosou *et al.* [15], que trabajaron con extracciones en medio acuoso, coinciden con Sólyom *et al.* [16] en el efecto positivo del secado sobre el contenido total de fenoles, por lo contrario, concluye que el tratamiento de secado tiene un efecto negativo sobre la actividad antioxidante, lo que coincide con los resultados de este trabajo.

Tabla 1. Contenido total de flavonoides (TFC), antocianos (TAC) y taninos (TTC) para los diferentes tratamientos, temperaturas y tiempos.

Determinación	Tratamiento	Tiempo (min)	Temperatura (°C)		
			50	70	90
TFC (mg CT/g ES)	Sin secar	10	8,01±3,63 <sup>A,a</sup>	10,26±3,94 <sup>A,a</sup>	20,19±6,28 <sup>B,a</sup>
		20	6,91±2,31 <sup>A,a</sup>	10,73±2,21 <sup>A,a</sup>	23,41±8,89 <sup>B,a</sup>
		30	6,30±3,97 <sup>A,a</sup>	16,14±2,23 <sup>B,b</sup>	22,63±12,10 <sup>C,a</sup>
	Seco	10	26,79±10,39 <sup>A,c</sup>	23,30±15,09 <sup>A,a</sup>	21,72±2,52 <sup>A,a</sup>
		20	17,64±1,86 <sup>A,b</sup>	17,99±3,94 <sup>A,a</sup>	20,73±2,96 <sup>B,a</sup>
		30	10,97±2,30 <sup>A,a</sup>	34,48±12,90 <sup>B,b</sup>	43,37±18,24 <sup>B,b</sup>
TAC (mg/g ES)	Sin secar	10	1,41±0,20 <sup>A,b</sup>	1,79±0,35 <sup>A,b</sup>	3,27±0,99 <sup>B,a</sup>
		20	1,05±0,29 <sup>A,a</sup>	1,31±0,35 <sup>A,a</sup>	3,32±0,39 <sup>B,a</sup>
		30	1,06±0,32 <sup>A,a</sup>	2,21±0,23 <sup>B,c</sup>	2,85±1,16 <sup>C,a</sup>
	Seco	10	0,57±0,05 <sup>A,a</sup>	0,64±0,14 <sup>A,a</sup>	1,00±0,12 <sup>B,a</sup>
		20	0,58±0,07 <sup>A,a</sup>	0,80±0,12 <sup>B,b</sup>	1,02±0,07 <sup>C,a</sup>
		30	0,65±0,12 <sup>A,b</sup>	0,84±0,08 <sup>B,b</sup>	0,95±0,10 <sup>C,a</sup>
TTC (mg/g ES)	Sin secar	10	4,44±0,34 <sup>A,b</sup>	4,86±0,21 <sup>A,a</sup>	7,34±1,49 <sup>B,a</sup>
		20	3,72±0,23 <sup>A,a</sup>	4,98±0,41 <sup>B,a</sup>	8,68±1,08 <sup>C,a</sup>
		30	4,27±0,39 <sup>A,b</sup>	5,34±0,24 <sup>A,b</sup>	8,33±2,77 <sup>B,a</sup>
	Seco	10	1,18±0,16 <sup>A,a</sup>	1,23±0,12 <sup>A,b</sup>	1,17±0,22 <sup>A,ab</sup>
		20	1,29±0,09 <sup>B,b</sup>	1,04±0,21 <sup>A,a</sup>	1,09±0,16 <sup>A,a</sup>
		30	1,31±0,11 <sup>A,b</sup>	1,20±0,12 <sup>A,b</sup>	1,32±0,19 <sup>A,b</sup>

<sup>A,B,C</sup> Diferencias significativas entre la temperatura ( $p < 0,05$ ; Test de Tukey)

<sup>a,b,c</sup> Diferencias significativas entre el tiempo ( $p < 0,05$ ; Test de Tukey)

El análisis de la regresión refuerza la conclusión obtenida mediante el análisis de la varianza. Tal y como se muestra en las ecuaciones (3-7) de la figura 2, los coeficientes del tratamiento previo para el contenido total de fenoles y flavonoides son positivos, por lo que al aplicar el tratamiento aumenta el resultado de estas determinaciones. Por el contrario, para el contenido total de antocianos y taninos, así como para la actividad antioxidante, los coeficientes son negativos, lo que indica que al aplicar el tratamiento los resultados de estos disminuyen.

$$TPC = -14,23 + 8,03 \text{ Tratamiento} + 2,75 \text{ Temperatura} + 0,74 \text{ Tiempo} \quad (R^2 = 0,822) \quad (3)$$

$$TFC = -12,94 + 10,27 \text{ Tratamiento} + 6,28 \text{ Temperatura} + 1,97 \text{ Tiempo} \quad (R^2 = 0,358) \quad (4)$$

$$TAC = 2,10 - 1,25 \text{ Tratamiento} + 0,59 \text{ Temperatura} \quad (R^2 = 0,658) \quad (5)$$

$$TTC = 8,40 - 4,57 \text{ Tratamiento} + 0,98 \text{ Temperatura} \quad (R^2 = 0,792) \quad (6)$$

$$DPPH = 63,57 - 35,36 \text{ Tratamiento} + 15,22 \text{ Temperatura} + 4,76 \text{ Tiempo} \quad (R^2 = 0,705) \quad (7)$$

Figura 2. Rectas de regresión para las determinaciones según tratamiento, temperatura y tiempo (3-7)

La extracción a partir de la muestra seca se realizó con la misma relación muestra/solvente que la muestra húmeda, por lo que la relación peso seco/solvente en el caso de la muestra seca fue mayor. Esto podría explicar los niveles más altos de fenoles y flavonoides totales. Sin embargo, la exposición de los orujos a altas temperaturas durante un tiempo prolongado, como es el caso del tratamiento de secado realizado, podría llevar a la degradación de algunos de los compuestos fenólicos, como los antocianos o los taninos, que darían lugar a una disminución de actividad antioxidante. El tratamiento de secado contribuye al aumento del contenido de fenoles totales aunque los compuestos extraídos muestran una menor actividad antioxidante.

### 3.3. Efecto de la temperatura

Después del tratamiento previo de la muestra la temperatura es el factor que más influye en el contenido de los diferentes grupos de fenoles, así como en la actividad antioxidante. El análisis de la varianza permite concluir que existen diferencias significativas entre las tres temperaturas estudiadas ( $p < 0,05$ ;  $\alpha = 95\%$ ). El aumento de la temperatura de extracción lleva a un aumento del contenido de todos los grupos de fenoles estudiados y de la actividad antioxidante de los extractos tal y como se puede observar en los coeficientes de las ecuaciones de regresión (figura 2).

De forma general, para todos los parámetros estudiados las diferencias entre 50 °C y 70 °C son cuantitativamente menores que las diferencias encontradas cuando la temperatura se aumenta de 70 °C a 90 °C. El contenido total de fenoles de los extractos acuosos estudiados por Drosou *et al.* [15] es mayor que el obtenido en el presente trabajo. Esto puede deberse a un mayor rendimiento de la extracción soxhlet o a las propias características de la variedad de uva (*argiorgitiko*) estudiada. Los resultados del contenido total de fenoles obtenido por Brahim *et al.* [17] en medio acuoso y altas temperaturas (100 °C), en cambio, son menores a los que se consiguen en este trabajo para los extractos de la muestra seca. Sin embargo, para la muestra seca, se obtienen niveles de polifenoles totales semejantes a los que estos autores consiguen al aplicar microondas.

La actividad antioxidante de los extractos también es significativamente superior cuando la extracción se hace a temperaturas mayores. Esta tendencia está más presente en la muestra sin tratamiento de secado teniendo en cuenta, además, que en la muestra seca los valores de actividad antioxidante son menores.

El contenido en flavonoides, antocianos y taninos aumenta significativamente cuando la extracción se realiza a altas temperaturas (tabla 1). Los resultados de flavonoides totales obtenidos en este trabajo, tanto para la muestra sin secar como para la seca, son superiores a los descritos por Bosso *et al.* [11] tanto para la extracción con agua, etanol o acetona. El contenido en antocianos del orujo de uva publicado por Brahim *et al.* [17] es comparable al obtenido en la muestra sin secar a 50 °C. Pero al aumentar la temperatura de extracción, los resultados obtenidos para la muestra húmeda son superiores a los del citado autor. El contenido en taninos de los extractos secos estudiados son comparables a los obtenidos por Brahim *et al.* [17]. Sin embargo, los extractos obtenidos a partir de la muestra sin tratamiento previo tienen un contenido en taninos superior que alcanza los niveles conseguidos por Bosso *et al.* [11] al utilizar etanol/agua 50%.

Por lo tanto, en este trabajo se ha podido observar que la aplicación de altas temperaturas (90 °C) en medio acuoso puede dar lugar a extractos con un contenido en fenoles comparable al obtenido con otro tipo de solventes o técnicas. Además, la extracción a 90 °C aumenta significativamente la actividad antioxidante de los extractos que se han obtenido a partir de la muestra húmeda.

### 3.4. Efecto del tiempo

La influencia del tiempo en la actividad antioxidante y el contenido en los diferentes grupos de polifenoles no tiene una tendencia tan clara como el tratamiento de secado o la temperatura. Existen diferencias significativas entre los tiempos de extracción pero no hay evidencias suficientes para establecer una relación clara. Se observa una tendencia al aumento del contenido de fenoles totales y de la actividad antioxidante cuando el tiempo de extracción es mayor. El contenido en antocianos y los taninos, en cambio, no muestra esta misma tendencia, de hecho, el análisis de la regresión (figura 2) muestra que el tiempo no influye de manera significativa en el contenido de estos grupos fenólicos.

El análisis de la varianza también permite concluir que el contenido de antocianos y taninos no aumenta cuando el tiempo de extracción es mayor (tabla 1). Además, aunque se observan diferencias significativas en el contenido de flavonoides, no se observa una relación clara entre el tiempo y el parámetro estudiado. El contenido total de fenoles (figura 1) muestra una tendencia al aumento cuando los tiempos de extracción son en la muestra seca, mientras que en la muestra húmeda este efecto tan sólo es claro al trabajar a 90 °C.

En el caso de la actividad antioxidante el efecto del tiempo está presente tanto en los extractos obtenidos de la muestra húmeda como de la muestra seca, aunque en los orujos húmedos las diferencias son mayores (figura 1). El efecto del tiempo es todavía más claro cuando se aplican altas temperaturas (90 °C), obteniéndose una actividad antioxidante mayor en estos extractos. Los resultados de este trabajo no coinciden con los obtenidos por Brahim *et al.* [17], ya que

según estos autores el tiempo de extracción no es un parámetro decisivo al utilizar agua como solvente, mientras que la influencia del tiempo en extracciones hidroalcohólicas ha sido demostrada [12], al igual que en el trabajo que se presenta.

La decisión del aumento del tiempo de extracción dependerá del objetivo que se quiera alcanzar. Es decir, si se busca la obtención de un extracto con la mayor actividad antioxidante el tiempo de extracción recomendable sería el mayor (30 min), ya que se ha observado que este parámetro aumenta de manera significativa, sobre todo al trabajar a altas temperaturas. En cambio, si el objetivo es la obtención de extractos con un alto contenido en taninos, antocianos o flavonoides, atendiendo a los resultados de este trabajo, el tiempo más corto (10 min) sería suficiente.

### 3.5. Relación entre los parámetros estudiados

Durante la discusión del efecto de los factores estudiados en este trabajo (secado, temperatura y tiempo) se ha hecho referencia a la relación entre los parámetros que se han determinado en los extractos. Estos resultados se refuerzan en este apartado mediante el análisis de las correlaciones entre los parámetros.

El contenido total de fenoles tiene una correlación positiva con el contenido de flavonoides ( $r = 0,512$ ). Esta correlación se muestra de forma más clara al comparar los resultados entre la muestra húmeda y la seca. El aumento del contenido en flavonoides al realizar las extracciones con la muestra seca, se ve reflejado en el correspondiente aumento del contenido en fenoles totales. El contenido en antocianos ( $r = -0,400$ ) y en taninos ( $r = -0,638$ ), en cambio, tienen una correlación negativa con el contenido total de fenoles. Esto parece indicar que cuando el contenido en polifenoles y flavonoides aumenta al secar la muestra los compuestos que se extraen no son antocianos o taninos. Por otro lado, los antocianos ( $r = 0,833$ ) y los taninos ( $r = 0,859$ ) contribuyen en mayor medida a la actividad antioxidante de los extractos ya que su correlación respecto a esta es positiva.

La correlación negativa entre el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante ( $r = -0,456$ ) observada en este trabajo permite concluir que los compuestos fenólicos que llevan al aumento del contenido total de fenoles al secar la muestra no contribuyen de manera importante a la actividad antioxidante. De esta manera, cuando el contenido total de fenoles aumenta la actividad antioxidante de los extractos disminuye, ya que se extrae una mayor cantidad de polifenoles pero su actividad antioxidante es menor. Generalmente la relación del contenido total de fenoles y la actividad antioxidante es directamente proporcional [10], pero otros autores ya han observado antes el efecto contrario entre estos parámetros que se obtiene también en este trabajo [15], [24].

## **6. Conclusiones**

La extracción de orujos de uva húmedos a altas temperaturas y durante tiempos cortos en medio acuoso permite obtener extractos fenólicos con una actividad antioxidante comparable a la obtenida mediante otros solventes y técnicas. El aumento del tiempo y la temperatura da lugar a extractos con mayor actividad antioxidante. El tratamiento de secado de la muestra se traduce en la obtención de extractos con un mayor contenido de fenoles, pero una menor actividad antioxidante. Por lo tanto, el secado de los orujos no sería interesante desde el punto de vista industrial, ya que además de encarecer el proceso, los extractos obtenidos tendrían una menor actividad antioxidante.

Aunque se requiere una caracterización más específica de los extractos obtenidos, los resultados de este trabajo ofrecen una alternativa fácilmente aplicable en la industria alimentaria que permitiría obtener extractos del orujo de uva con una alta actividad antioxidante y sin los residuos que podrían dejar otro tipo de solventes.

## Bibliografía

- [1] K. Waldron, *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [2] J. García-Lomillo and M. L. Gonzalez-SanJosé, “Applications of Wine Pomace in the Food Industry : Approaches and Functions,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 16, no. Kliewer 1977, pp. 3–22, 2017.
- [3] G. Murtaza *et al.*, “Resveratrol : An Active Natural Compound in Red Wines for Health,” vol. 21, no. 1, pp. 1–12, 2013.
- [4] G. M. Pasinetti, “Novel Role of Red Wine-Derived Polyphenols in the Prevention of Alzheimer ’ s Disease Dementia and Brain Pathology : Experimental Approaches and Clinical Implications,” pp. 1614–1620, 2012.
- [5] G. Giovinazzo and F. Grieco, “Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols,” *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 70, no. 4, pp. 454–462, 2015.
- [6] M. Dueñas *et al.*, “Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches,” *Antioxidants*, vol. 4, no. 1, pp. 1–21, 2015.
- [7] J. García-Lomillo, M. L. González-SanJosé, R. Del Pino-García, M. D. Rivero-Pérez, and P. Muñiz-Rodríguez, “Antioxidant and antimicrobial properties of wine byproducts and their potential uses in the food industry,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 52, pp. 12595–12602, 2014.
- [8] R. Draijer, Y. de Graaf, M. Slettenaar, E. de Groot, and C. I. Wright, “Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects,” *Nutrients*, vol. 7, no. 5, pp. 3138–3153, 2015.
- [9] S. Gómez-Alonso *et al.*, “Compuestos fenólicos bioactivos en subproductos vinícolas.

- Extracción y caracterización química y tecnológica," *IVICAM*, p. 12, 2013.
- [10] F. Xu *et al.*, "Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Young Wines Made from Yan73 (*Vitis vinifera* L.) and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) Grapes Treated by 24-Epibrassinolide," pp. 10189–10207, 2014.
- [11] A. Bosso, M. Guaita, and M. Petrozziello, "Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts," *FOOD Chem.*, vol. 207, pp. 162–169, 2016.
- [12] A. R. Fontana and A. Antonioli, "Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics," 2013.
- [13] M. Pinelo, A. Ruiz-Rodríguez, J. Sineiro, F. J. Señoráns, G. Reglero, and M. J. Nuñez, "Supercritical fluid and solid – liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace : a comparative study," pp. 199–205, 2007.
- [14] M. J. Otero-pareja, L. Casas, M. T. Fernández-ponce, C. Mantell, E. J. Martínez, and D. Ossa, "Green Extraction of Antioxidants from Different Varieties of Red Grape Pomace," pp. 9686–9702, 2015.
- [15] C. Drosou, K. Kyriakopoulou, A. Bimpilas, and M. Krokida, "A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts," *Ind. Crop. Prod.*, vol. 75, pp. 141–149, 2015.
- [16] K. Sólyom, R. Solá, M. J. Cocero, and R. B. Mato, "Thermal degradation of grape marc polyphenols," *Food Chem.*, vol. 159, pp. 361–366, 2014.
- [17] M. Brahim, F. Gambier, and N. Brosse, "Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium," *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 18–22, 2014.

- [18] H. N. Rajha, W. Ziegler, N. Louka, Z. Hobaika, and E. Vorobiev, "Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace Using Accelerated Solvent Extraction," pp. 18640–18658, 2014.
- [19] M. Paini, A. A. Casazza, B. Aliakbarian, P. Perego, A. Binello, and G. Cravotto, "Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 349–358, 2016.
- [20] F. J. Barba and S. Brianceau, "Effect of Alternative Physical Treatments ( Ultrasounds , Pulsed Electric Fields , and High-Voltage Electrical Discharges ) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace," pp. 1139–1148, 2015.
- [21] P. Ribéreau-Gayon and E. Stonestrest, "Determination of anthocyanins in red wine. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge," *Bull. la Société Chimique*, vol. 9, pp. 119–142, 1965.
- [22] E. Bate-Smith, "Astringent tannins of the leaves of Germaine species," *Phytochem*, vol. 20, no. 211–216, 1981.
- [23] G. Bobo-García, G. Davidov-Pardo, C. Arroqui, and M. R. Marín-Arroyo, "Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts , and comparison with conventional spectrophotometric methods," no. April, 2014.
- [24] Y. S. Suazo and I. Arozarena, "Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense," Universidad Pública de Navarra (UPNA), 2012.