

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**ESTUDIO DE METODOLOGÍAS LIMPIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES
EN ORUJOS DE UVA**

presentado por

CLAUDIA NAVAJAS ALCALDE *(e)k*

aurkeztua

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
*GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN INGENIARITZAN***

Junio, 2019 / *Urtea, hilabetea*

Resumen

La producción de vino genera cantidades de subproductos de alto valor, compuestos por una gran variedad de compuestos fenólicos de alto interés, ya que tienen propiedades antioxidantes.

Las investigaciones realizadas en los últimos años han estudiado diferentes métodos de extracción con el objetivo de obtener los compuestos fenólicos con un alto rendimiento y evitando su deterioro. Para esto también debe tenerse en cuenta el uso posterior del extracto de compuestos fenólicos obtenido. Para su uso en la industria alimentaria es necesario el uso de disolventes admitidos.

El trabajo tiene como objetivo estudiar la extracción de los compuestos fenólicos a partir de los orujos de uva mediante metodología limpia de extracción que pueda aplicarse fácilmente en la industria alimentaria. Se realizarán extracciones asistidas por ultrasonidos, usando agua como solvente.

El tiempo de aplicación de ultrasonidos y el tiempo de extracción en agua a altas temperaturas influyen significativamente en la actividad antioxidante y la composición polifenólica de los extractos. Además se observa un claro aumento de la actividad antioxidante al aumentar estos dos factores.

Palabras clave: antioxidante, polifenoles, orujos de uva, extracto acuoso, ultrasonidos.

Abstract

Vinification generates vast amounts of high value by-products, composed by a great variety of highly interesting phenolic compounds due to their antioxidant properties.

Investigations led over the recent years have analyzed different methodologies of extraction. Their aim was to obtain the phenolic compounds with higher performance while avoiding their deterioration. For this, the later use of said phenolic compounds must be taken into account. When used in the food and beverage industry the use of accepted dissolving agents is required.

This project aims to study the extraction of phenolic agents from grape marcs through a clean extraction methodology that can be easily assimilated into the food and beverage industry. Extractions are assisted by ultrasound and use water as the solvent.

The period of ultrasound application and the period of extraction in high temperature water significantly affect antioxidant activity and the phenolic composition of the extracts. Furthermore, the evident increase of antioxidant activity when increasing both factors is noted.

Key words: antioxidant, polyphenols, grape pomace, green extract, ultrasounds.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	Subproductos de vinificación.....	1
1.2.	Compuestos fenólicos.....	1
1.2.1.	Compuestos fenólicos flavonoides.....	2
1.2.2.	Compuestos fenólicos no flavonoides.....	5
1.3.	Capacidad antioxidante de los polifenoles.....	6
1.4.	Extracción sólido-líquido.....	7
1.4.1.	Ultrasonidos de potencia.....	8
1.4.2.	Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida por ultrasonidos...	12
2.	Objetivos.....	13
3.	Diseño experimental.....	13
4.	Material y métodos.....	14
4.1.	Determinación humedad.....	14
4.2.	Extracción sólido-líquido.....	14
4.3.	Determinación del contenido total de flavonoides (TFC).....	14
4.4.	Determinación del contenido total de taninos (TTC).....	15
4.5.	Determinación del contenido total de antocianos (TAC).....	15
4.6.	Determinación del contenido total de compuestos fenólicos (índice de Folin-Ciocalteu).....	15
4.7.	Determinación del contenido total de flavonoles y compuestos derivados del ácido hidroxicinámico.....	16
4.8.	Determinación del contenido total de catequinas.....	16
4.9.	Determinación de la actividad antioxidante.....	16
4.10.	Análisis estadístico.....	17
5.	Resultados y discusión.....	17
5.1.	Contenido en humedad.....	17
5.2.	Efecto del método de extracción sobre la actividad antioxidante y el contenido polifenólico.....	17
5.3.	Correlación entre la actividad antioxidante y la composición polifenólica de los extractos.....	21
5.4.	Efecto de la aplicación de ultrasonidos frente a extracciones en baño de agua a alta temperatura.....	23
5.5.	Estudio del efecto de la disminución de tiempo de extracción en agua a alta temperatura.....	24
6.	Conclusiones.....	31
7.	Bibliografía.....	32

Índice de tablas

Tabla 1. Esquema de trabajo.....	14
Tabla 2. Estudio de influencia de los dos factores (t_{US} y t_{agua}) sobre los parámetros estudiados e interacción entre ambos.	18
Tabla 3. Contenido de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante para las diferentes extracciones.....	19

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química general de compuestos fenólicos flavonoides (González-Centeno, 2013).....	2
Figura 2. Estructura química de los principales flavonoles de la uva (González-Centeno, 2013).	3
Figura 3. Estructura química de los principales flavanoles monoméricos de uva (González-Centeno, 2013).	3
Figura 4. Estructura química de los taninos condensados o proantocianidinas (González-Centeno, 2013).....	4
Figura 5. Estructura química de los principales antocianos de la uva (González-Centeno, 2013).	5
Figura 6. Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (González-Centeno, 2013).	5
Figura 7. Estructura química de los principales estilbenos de la uva (González-Centeno, 2013).	6
Figura 8. Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia.	9
Figura 9. Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido.....	10
Figura 10. Formación de microinyecciones en una interfaz sólido-líquido (González-Centeno, 2013).....	11
Figura 11. Actividad antioxidante (a) y contenido polifenólico (b).	24
Figura 12. Actividad antioxidante en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.....	25
Figura 13. Contenido de compuestos fenólicos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	26
Figura 14. Contenido total de flavonoides en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	27
Figura 15. Contenido total de taninos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	27
Figura 16. Contenido total de antocianos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	28
Figura 17. Contenido total de flavonoles en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	29
Figura 18. Contenido de compuestos hidroxicinámicos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	29
Figura 19. Contenido total de catequinas en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.	30

1. Introducción

1.1. Subproductos de vinificación

Tras los procesos de extracción del mosto en la elaboración del vino, se obtienen los orujos de uva, que es un subproducto de la industria vitivinícola. Este subproducto está formado por tallos, piel, pulpa, semillas y racimos que quedan después del prensado de la uva. De cada 100 kg de uva procesada se obtienen entre 15 y 20 kg de subproductos (Usaquén-Castro et al., 2006). A nivel mundial, la industria vitivinícola produce unos 10 millones de toneladas anuales de subproductos, de los cuales 1 millón aproximadamente se producen en España (Maier et al., 2009).

Estos subproductos son valiosos debido al alto contenido en nutrientes (nitrógeno y potasio) esenciales para el crecimiento de plantas y desarrollo de cultivos (Bertran et al., 2004) además de importantes cantidades de polifenoles.

Actualmente, los orujos de uva se utilizan principalmente como enmienda orgánica en los campos de cultivo, pero sin ningún tratamiento previo (Bustamante Muñoz, 2007; Cegarra et al., 2007). Esto produce la liberación de polifenoles en el suelo, los cuales pueden inhibir el crecimiento de las raíces (Inbar et al., 1991) y afectar al desarrollo de las plantas, pudiendo ser perjudicial.

Los polifenoles forman uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos en el reino vegetal. Son compuestos bioactivos naturales que se pueden considerar en la obtención de ingredientes para la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria, debido a su carácter antioxidante y demás propiedades asociadas (Martínez-Cordero et al., 2013).

1.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios de las plantas con diversas funciones fisiológicas. Este grupo de moléculas se caracteriza por su variedad de estructuras. Los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos pueden ser ingredientes utilizados para desarrollar nuevos productos en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, debido a la capacidad de los compuestos de captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno asociadas con el padecimiento de enfermedades. Para poder utilizarlos en la industria alimentaria es necesario asegurar su inocuidad a través de rigurosas pruebas de toxicidad. Los compuestos fenólicos (CF) son los antioxidantes más abundantes en frutas, verduras y bebidas derivadas de algunas plantas. Su ingesta es en promedio 1 g, lo que es 10 veces mayor que la de vitamina C y 100 veces mayor que la de vitamina E. Más allá de sus propiedades para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de importancia en la patogénesis de enfermedades, los CF pueden actuar en numerosas vías de señalización intracelulares como mediadores, lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos productos. Los CF presentan una estructura molecular similar, se caracterizan por tener uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo enlazado. Su estructura puede ser simple o compleja, dando gran diversidad a estos compuestos (Valencia-avilés et al., 2017).

La clasificación de los compuestos fenólicos más utilizada se lleva a cabo según su esqueleto carbonado, donde se pueden distinguir dos grandes grupos en función de su

estructura química básica: compuestos fenólicos no flavonoides y compuestos fenólicos flavonoides o flavonoides. Además, cabe destacar que estos compuestos comúnmente se presentan asociados a monosacáridos, ácidos orgánicos u otras sustancias que confieren estabilidad a la molécula (Nieto Fuentes, 2013).

1.2.1. Compuestos fenólicos flavonoides

Los flavonoides (F) son la clase más abundante de polifenoles, derivados de aminoácidos aromáticos. Son compuestos de bajo peso molecular, necesarios para el desarrollo de vegetales por su actividad como señaladores químicos y sus efectos sobre algunas enzimas ligadas a la fisiología y metabolismo vegetal. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en menor cantidad en hongos y algas. En seres humanos tienen propiedades asociadas a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares (Nieto Fuentes, 2013).

La estructura química de los flavonoides se basa en compuestos de 15 carbonos (C6-C3-C6) con numerosos sustituyentes que comparten un esqueleto de carbono con dos anillos enlazados (anillo A y C), ligados por un tercer anillo de pirano (anillo B) (figura 1) (González-Centeno, 2013).

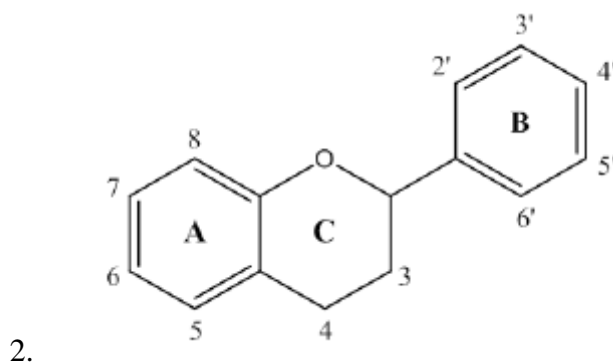


Figura 1. Estructura química general de compuestos fenólicos flavonoides (González-Centeno, 2013).

Dentro del grupo de los flavonoides, se encuentran diversos subgrupos con una gran variedad de compuestos, diferenciados por el número y posición de los grupos hidroxilos, así como por los grupos funcionales que presentan. Así, según su estructura podemos clasificarlos en siete grupos diferentes: los flavonoles, flavanoles, antocianos, flavonas, isoflavonas, flavanonas y flavanonoles. También se encuentran dentro del grupo de los flavonoides las auronas, chalconas y las dihidrochalconas. Estos compuestos comparten la estructura general C6-C3-C6, pero se diferencian de los anteriores en que no contienen el heterociclo de oxígeno y por tanto el anillo C se presenta de forma abierta.

Los **flavonoles (FN)** se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3, además de un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3, que podemos observar en la figura 2 (González-Centeno, 2013). Los flavonoles más comunes son el kaempferol, quercetina, isoramnetina y miricetina. Comúnmente, se presentan en forma glucosilada unidos a glucosa y/o ramnosa, destacando entre ellos la rutina (derivado glucoramnósido de la quercetina). Su contenido

en frutas, verduras y bebidas puede variar considerablemente debido a diversas condiciones como los cambios de estación y las condiciones de crecimiento de la especie vegetal donde se encuentran.

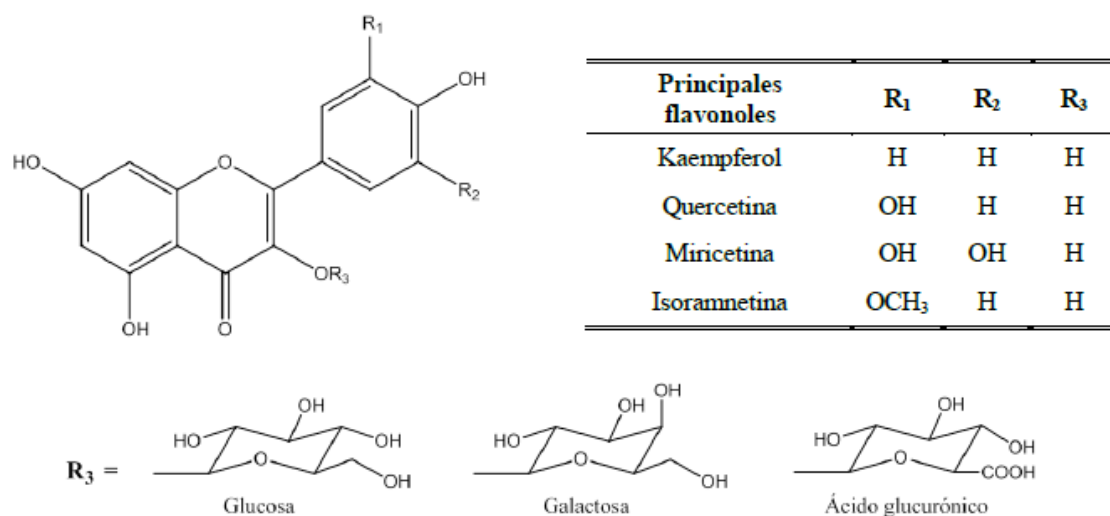


Figura 2. Estructura química de los principales flavonoles de la uva (González-Centeno, 2013).

El grupo de los **flavonoles** incluye las catequinas (flavan-3-ol), leucoantocianidinas (flavan-3,4-dioles) y los flavan-4-ol. Estos compuestos pueden presentarse como unidades polimerizadas de los mismos, por lo que las proantocianidinas y taninos condensados son polímeros de flavan-3-oles.

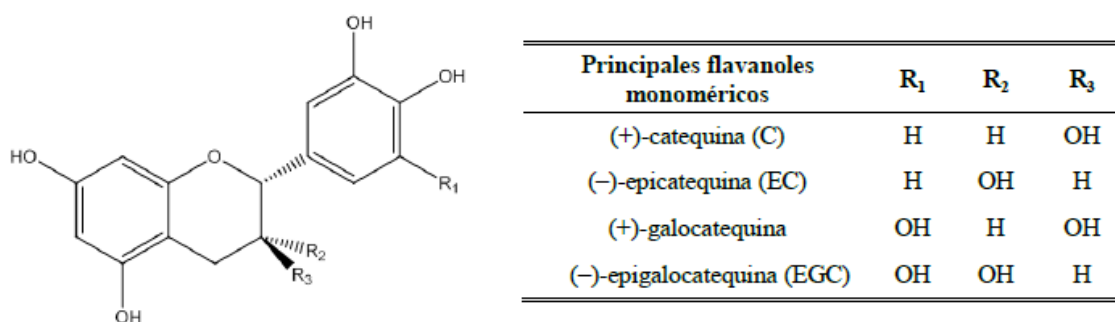


Figura 3. Estructura química de los principales flavanoles monoméricos de uva (González-Centeno, 2013).

Las catequinas se encuentran principalmente en frutas, vino y chocolate. Tienen un heterociclo totalmente saturado y un grupo hidroxilo en posición 3, lo que da lugar a dos carbonos asimétricos, determinando la existencia de cuatro isómeros ópticos. En la figura 3 podemos ver que según el grado de hidroxilación del anillo B, y la orientación del OH respecto al heterociclo, se da lugar a los distintos compuestos, que se designan como catequina, galocatequina, epicatequina y epigalocatequina (González-Centeno, 2013). La catequina y la epicatequina están ampliamente distribuidas (dímeros y trímeros) a diferencia de la poca distribución de la epigalocatequina. Su polimerización da lugar a la formación de proantocianidinas y en última instancia a taninos condensados.

Los **taninos condensados o proantocianidinas** son una subclase compleja de flavonoides, que pueden ser encontrados desde simples monómeros a proantocianidinas oligoméricas y poliméricas (figura 4). Son compuestos solubles en agua, con una amplia variedad de estructuras y cuyo peso molecular tiende a ser alto. Durante su degradación térmica en medio ácido, las proantocianidinas generan cianidinas y delfinidinas. De este modo, las proantocianidinas pueden caracterizarse como procianidinas, compuestas por unidades de catequina y epicatequina, y prodelfinidinas, compuestas por unidades de galocatequina y epigalocatequina. Se encuentran principalmente en las uvas. Se caracterizan por ser astringentes y amargos, además de su capacidad de precipitar proteínas (Nieto Fuentes, 2013).

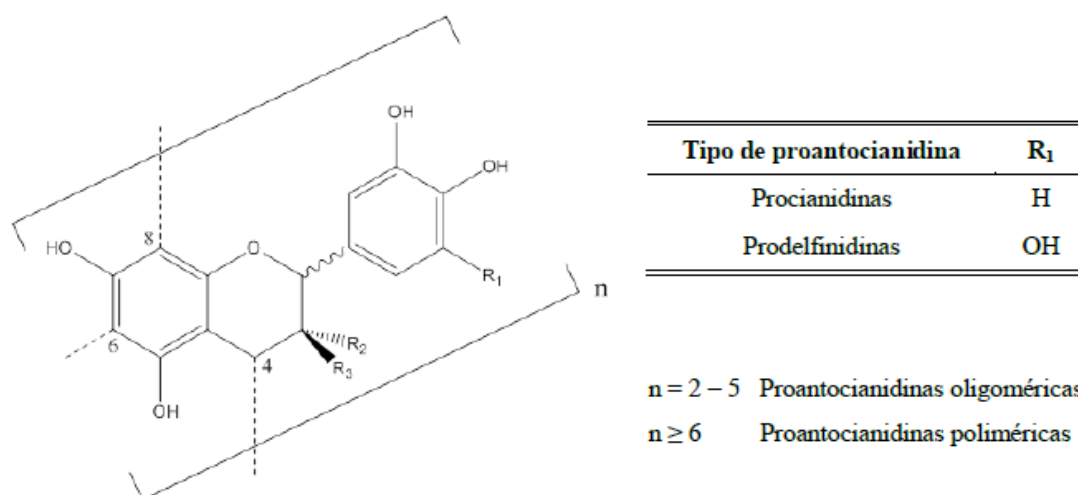


Figura 4. Estructura química de los taninos condensados o proantocianidinas (González-Centeno, 2013).

Los **antocianos** conforman un grupo importante de pigmentos vegetales, responsables de proporcionar tonalidades como rojos, rosas, azules o púrpuras. Son el único grupo de flavonoides constituidos por un radical de carácter catiónico. Se presenta en forma glucosilada y acilada, ya que esta unión confiere estabilidad frente a cambios de pH, luz y condiciones de oxidación, previniendo así su degradación. Existen una gran variedad de estructuras que se diferencian entre sí por las sustituciones hidroxilo y/o metoxilo del anillo bencénico, y por la naturaleza y número de ácidos que esterifican los azúcares a los que se encuentran unidos (ácido p-cumárico y ácido p-cafeico). Entre las antocianinas (agliconas de los antocianos) podemos distinguir varias estructuras: malvidina, cianidina, delfinidina, pelargonidina, petunidina y peonidina (figura 5). Su principal fuente son las frutas, aunque se les encuentra en cereales, vinos y algunos vegetales (González-Centeno, 2013).

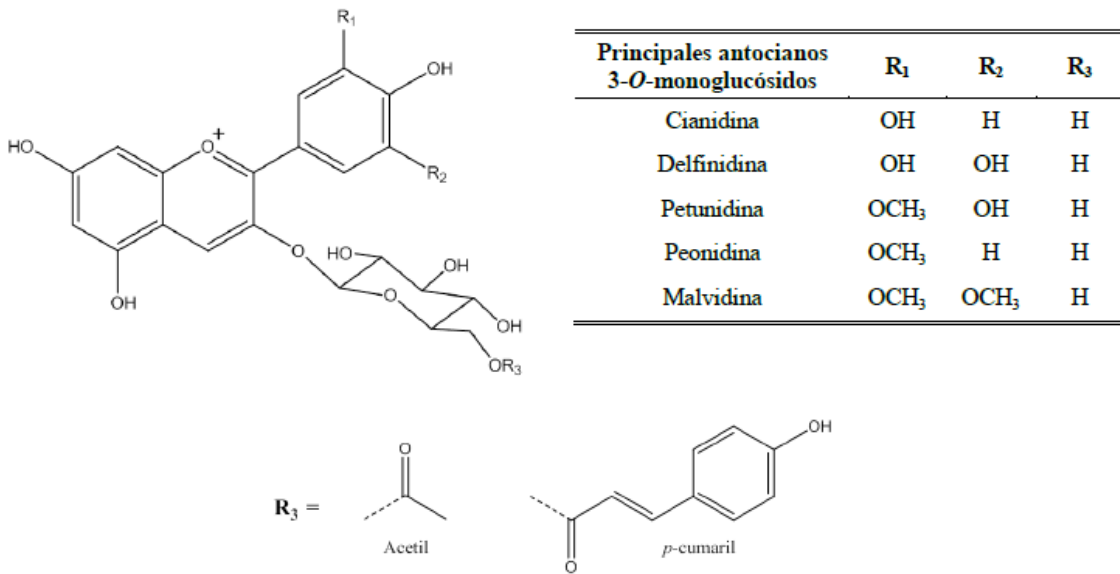


Figura 5. Estructura química de los principales antocianos de la uva (González-Centeno, 2013).

1.2.2. Compuestos fenólicos no flavonoides

Los compuestos no flavonoideos, se caracterizan por presentar un único grupo fenol, dando lugar a diferentes estructuras según los sustituyentes carbonados que presente dicho núcleo. Además, cada sustituyente se puede presentar en forma de ácido, alcohol, cetona o aldehído bencénico. Dentro de este grupo de compuestos se distinguen principalmente dos familias por su abundancia en plantas: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (Nieto Fuentes, 2013).

Los **ácidos hidroxibenzoicos** contienen un anillo fenólico y un grupo carboxílico asociado, formando una estructura de tipo C6-C1 (figura 6). Además se encuentran muy frecuentemente en las frutas en forma de ésteres. Los ácidos hidroxibenzoicos más importante son el ácido gálico, vinílico y p-hiroxibenzoico.

Los **ácidos hidroxicinámicos** tienen la estructura del ácido fenilpropenóico, diferenciándose entre sí por la posición de los sustituyentes metoxilo y/o hidroxilo en el anillo bencénico, dando lugar a una estructura C6-C3 (figura 6). Se encuentran presentes en alimentos como uvas y vinos procedentes de *Vitis vinífera*. Los más importantes son el ácido cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Nieto Fuentes, 2013).



Figura 6. Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (González-Centeno, 2013).

Los **taninos hidrolizables** están formados por esterificación de ácidos hidroxibenzoicos unidos entre sí o por medio de monosacáridos, siendo frecuentemente formados por ácido gálico. Este grupo se divide en dos tipos: los galotaninos cuya hidrólisis libera ácido gálico y sus derivados; los elagitaninos, cuya hidrólisis libera ácido gálico, elágico, hexahidroxidifénico, valónico y cuyos grupos galoil están conectados a través de enlaces C-C (Nieto Fuentes, 2013).

Existen compuestos fenólicos minoritarios como los estilbenos, que se caracterizan por presentar una estructura C6-C2-C6 en sus dos posibles formas isoméricas (cis y trans) (figura 7). Uno de los estilbenos más importantes es el trans-resveratrol, debido a su actividad biológica. Además también se pueden encontrar formas glucosiladas y oligómeros de este compuesto (González-Centeno, 2013).

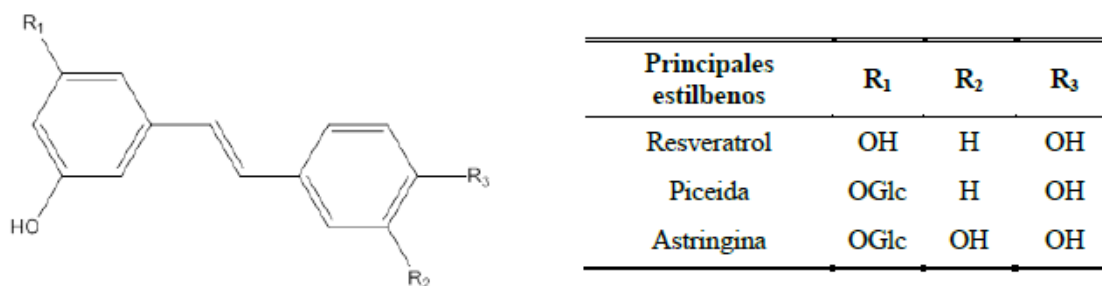


Figura 7. Estructura química de los principales estilbenos de la uva (González-Centeno, 2013).

1.3. Capacidad antioxidante de los polifenoles

Los alimentos vegetales aportan una gran variedad de metabolitos secundarios, compuestos biológicamente activos que poseen actividad antioxidante, antitumoral y propiedades inmuno-estimulantes. Los polifenoles son una clase específica de metabolitos secundarios, a la que se le ha prestado especial atención los últimos años, ya que están presentes en prácticamente todos los materiales vegetales, cereales y frutas, así como sus derivados como el vino o la sidra. Los polifenoles tienen propiedades antioxidantes de gran interés para la industria alimentaria, por ser útiles como preservantes, más aún si provienen de una fuente natural y económica. El proceso de vinificación genera gran cantidad de desechos, compuestos principalmente por semillas y piel de uvas, una gran fuente de polifenoles (Berradre et al., 2013).

Parte del deterioro de los productos alimenticios y de las células del organismo humano se debe a la peroxidación de lípidos, un proceso complejo que ocurre en células aerobias, reflejando la interacción entre radicales libres y ácidos grasos poliinsaturados. En los últimos años se han estudiado y comprobado los beneficios que proporcionan los polifenoles a la salud, actuando como limpiadores de radicales, inhibiendo la peroxidación de lípidos, y otros procesos que incluyen radicales libres, por lo que ellos pueden proteger el organismo contra varias enfermedades atribuidas a las reacciones de los radicales (Berradre et al., 2013).

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas con un electrón incompleto en su último orbital. La principal consecuencia de este desequilibrio es que la célula sea abrumada por radicales con gran capacidad oxidante. Estos radicales pueden ser resultado del metabolismo celular como las especies

reactivas de oxígeno y nitrógeno, que causan un grave daño celular dando lugar a enfermedades como el síndrome metabólico, cáncer, Alzheimer y problemas cardiovasculares. Se ha demostrado *in vitro* que los polifenoles son sustancias caracterizadas por su actividad antioxidante debido a su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los polifenoles disminuyen los niveles de estas especies mediante un mecanismo que atrapa y disipa los electrones libres de los radicales a través de la donación de un átomo de hidrógeno, generándose como consecuencia la formación de un radical fenoxilo, menos dañino para las células. Un alto contenido en polifenoles influye positivamente con la capacidad de ciertas plantas para eliminar los radicales libres e inhibir enzimas prooxidantes. Se ha descrito que extractos de polifenoles inhiben las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, estudios epidemiológicos han sugerido que la ingesta de polifenoles está asociada con la disminución de enfermedades como las cardiovasculares, las neurodegenerativas y el cáncer (Valencia-avilés et al., 2017).

Los orujos de uva se caracterizan por su capacidad antioxidante, ya que son fuente de compuestos fenólicos como el ácido gálico, la catequina, la galocatequina, además de oligómeros como las procianidinas y las antocianidinas. Estos compuestos representan entre el 0.09 - 0.35 % del peso del orujo seco. Además, entre 60 – 65 % de los compuestos fenólicos permanecen en el orujo de uva tinta una vez terminada la vinificación. Compuestos como los flavan-3-oles, los flavonoles (aglicona y glucosilados), el estilbeno *trans*-resveratrol, los antocianos y ácidos fenólicos como el gálico han demostrado una importante capacidad antioxidante (Berradre et al., 2013; Dueñas Zurita, 2017; Nieto Fuentes, 2013).

1.4. Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una de las más utilizadas en la industria alimentaria para la recuperación de compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales. En las últimas décadas, ha adquirido un papel importante en la extracción de compuestos fenólicos de origen vegetal para su posterior utilización en productos alimentarios. Sin embargo, no existe un método de extracción estándar, por lo que su desarrollo puede proporcionar información útil para la caracterización de muestras e incluso aumentar el valor económico de estos residuos (Dueñas Zurita, 2017; Pinelo et al., 2005).

La extracción sólido-líquido es un proceso de transferencia de materia en el que el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Este proceso consta de dos etapas: en la primera se produce una transferencia del compuesto desde la superficie del sólido al disolvente; en la segunda etapa se produce una transferencia mediante difusión desde el interior del sólido. Esta segunda etapa es el paso limitante del proceso debido a la resistencia que ofrece la fase sólida a la transferencia de materia o penetración de líquidos. A escala industrial su uso es menos interesante debido a que el proceso es más lento, menos eficiente, requiere mayor cantidad de energía y consume mayor cantidad de disolvente industrial. En este método convencional de extracción se utilizan solventes acuosos, orgánicos o la mezcla de algunos de ellos, lo que puede convertirse en un inconveniente por la alta cantidad requerida y su toxicidad (Dueñas Zurita, 2017).

Dado que los polifenoles son en general compuestos polares, se espera que su solubilidad sea más alta en etanol, en lugar de agua o acetona. En estudios previos, se observa una menor solubilidad en los disolventes orgánicos puros, debido al fortalecimiento de los enlaces de hidrógeno entre los polifenoles y las proteínas presentes en dichos disolventes. Por otro lado, aumentar el contenido de agua en dichos disolventes orgánicos se debilitan estos enlaces de hidrógeno, aumentando la solubilidad de los polifenoles y el rendimiento de extracción. Por eso muchos estudios han recomendado el uso de un 50% de agua y etanol como un mejor disolvente de extracción entre los disolventes alcohólicos acuosos. Al igual que para el etanol, la acetona pura obtiene peores resultados en la extracción de polifenoles en comparación con la utilización de acetona en agua al 50% como disolvente (Bosso et al., 2016; Nayak et al., 2018).

Por otro lado, trabajos previos (Filgueira Garro, 2017) han demostrado que la extracción de orujos de uva húmedos en medio acuoso a altas temperaturas durante tiempos cortos, permite obtener extractos fenólicos con una actividad antioxidante comparable a la obtenida mediante otros solventes y técnicas. El aumento de tiempo y temperatura da lugar a extractos con mayor actividad antioxidante.

Mediante la investigación e innovación tecnológica en la industria alimentaria, se han desarrollado una serie de técnicas de extracción más ecológicas que la extracción convencional, con el fin de mejorar la recuperación de compuestos bioactivos presentes en los tejidos de origen vegetal (Ghafoor et al., 2009). Entre estas técnicas destacan la extracción asistida por microondas, por ultrasonidos de potencia, la extracción con fluidos supercríticos o la extracción acelerada con disolventes presurizados. Estas metodologías se caracterizan por reducir el tiempo de extracción, el consumo de disolvente y energía, aumentar el rendimiento del proceso y mejorar la calidad de los extractos.

La técnica más ampliamente estudiada es la extracción asistida por ultrasonidos, debido a que el equipo instrumentar el relativamente barato y de fácil manejo. Además, los ultrasonidos permiten la extracción de compuestos termolábiles a bajas temperaturas y pueden utilizarse prácticamente con cualquier disolvente.

1.4.1. Ultrasonidos de potencia

Uno de los tipos fundamentales de energía que se encuentra en la naturaleza es la energía acústica. Las ondas que la componen son oscilaciones mecánicas en el tiempo y espacio que necesitan un medio material para su propagación.

Las ondas acústicas se pueden clasificar en función de su frecuencia (figura 8). Aquellas que se encuentran por debajo de los 20 Hz son las ondas subsónicas. Las ondas sónicas presentan frecuencias comprendidas entre 20 Hz y 20 KHz, rango que delimita el campo de audición humano. Por último, las ondas ultrasónicas o ultrasonidos son las que superan los 20 kHz de frecuencia.

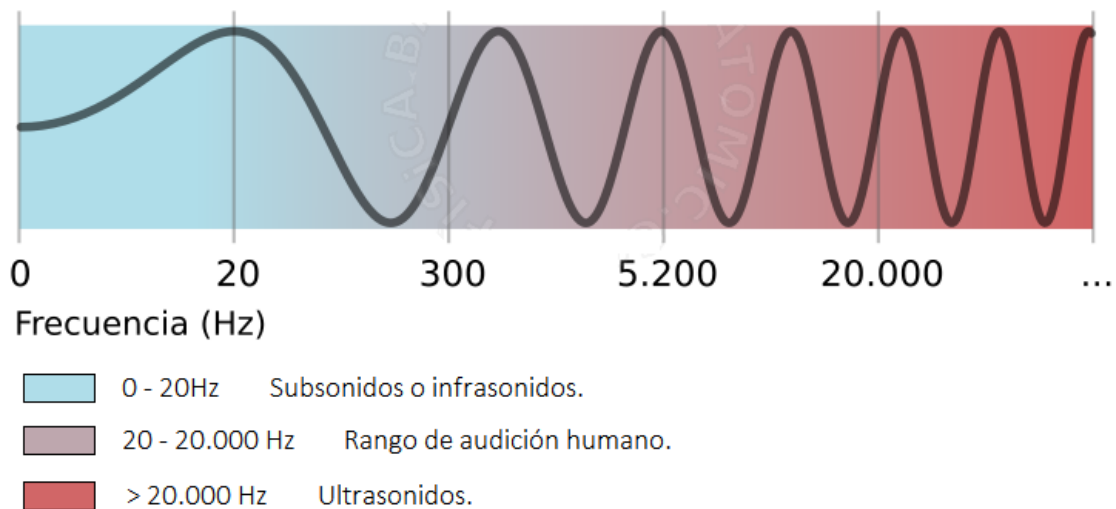


Figura 8. Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia.

Los ultrasonidos, como cualquier tipo de onda, se caracterizan por una serie de parámetros, entre los que destacan la frecuencia, la intensidad y potencia acústicas, y la atenuación. La frecuencia (Hz) se define como el número de vibraciones por unidad de tiempo. La intensidad de una onda acústica (W/m^2) es la energía media transmitida por unidad de tiempo a través de la unidad de área perpendicular a la dirección de propagación de la onda. La potencia acústica (W) se entiende como la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo, y se puede calcular a partir de la intensidad acústica y el área de la superficie radiante. Por últimos, la atenuación es la intensidad se define como la disminución de la intensidad de la onda durante su propagación por un medio.

Los ultrasonidos pueden clasificarse según sus aplicaciones industriales, en función de su frecuencia e intensidad. Se distinguen los ultrasonidos de señal, de baja potencia o de baja intensidad, que se caracterizan por presentar frecuencias comprendidas entre 500 kHz y 10 MHz, e intensidades inferiores a $1 W/cm^2$. Su aplicación no produce cambios en el sistema porque la energía transmitida al medio es débil, por lo que se utiliza en el control de procesos y en el análisis no invasivo de materiales. Por otra parte se definen los ultrasonidos de potencia o de alta intensidad, cuyas frecuencias oscilan entre los 20 y 10 kHz, y su intensidad es superior a $1 W/cm^2$. Los ultrasonidos de potencia son capaces de producir cambios en las propiedades físicas, mecánicas, químicas y bioquímicas del material o proceso en el que se aplican, por lo que dan lugar a una amplia gama de aplicaciones industriales.

En función del medio físico sobre el que se apliquen los ultrasonidos de potencia, sus efectos pueden ser muy diferentes. En los medios líquidos, la mayoría de los efectos de los ultrasonidos de potencia están asociados al fenómeno de cavitación, que consiste en la formación, crecimiento e implosión de microburbujas de gas en el seno del líquido como consecuencia de las fluctuaciones de presión generadas por el paso de las ondas ultrasónicas. Cuando se propagan a través de un fluido, las moléculas oscilan alrededor de su posición de equilibrio, haciendo que las distancias intermoleculares se modifiquen continuamente siguiendo ciclos alternos de compresión y descompresión. Durante los

ciclos de compresión, las moléculas tienden a aproximarse por la presión positiva que ejercen los ultrasonidos sobre el líquido. Mientras tanto, durante los ciclos de descompresión, se genera una presión negativa que tiende a separarlas. Alcanzado cierto umbral de intensidad ultrasónica, la disminución de presión durante el ciclo de descompresión puede vencer las fuerzas de atracción entre moléculas vecinas, pudiendo aparecer cavidades en el seno del líquido a partir de núcleos de gas preexistentes (Dueñas Zurita, 2017).

El intercambio de gas entre el líquido y las burbujas de cavitación es proporcional al área de transferencia. Durante los ciclos de descompresión o presión negativa, el flujo de gas se produce desde el líquido hacia la burbuja, haciendo que ésta se expanda. Sin embargo, durante el ciclo de compresión o presión positiva, el flujo de gas tiene lugar en dirección opuesta y la burbuja se contrae. Si el flujo de gas del sistema burbuja-líquido es similar en ambas direcciones, las oscilaciones de tamaño son regulares, apareciendo la denominada cavitación estable (figura 9). Ésta suele darse cuando la intensidad ultrasónica no es muy elevada o cuando las ondas acústicas son de frecuencia alta.

Por otro lado, bajo condiciones de elevada intensidad y baja frecuencia ultrasónicas, la cantidad de gas que gana la burbuja en el ciclo de expansión es mayor que la perdida durante el ciclo de compresión, dando lugar a la cavitación transitoria. En ella, la burbuja crece progresivamente en cada ciclo (figura 9) hasta que alcanzado el tamaño crítico en resonancia con la frecuencia ultrasónica aplicada, la burbuja implosiona. Ello genera un punto localizado de elevada energía, donde se estima que las condiciones de presión y temperatura alcanzan valores de 1000 atm y 5000 K, respectivamente.

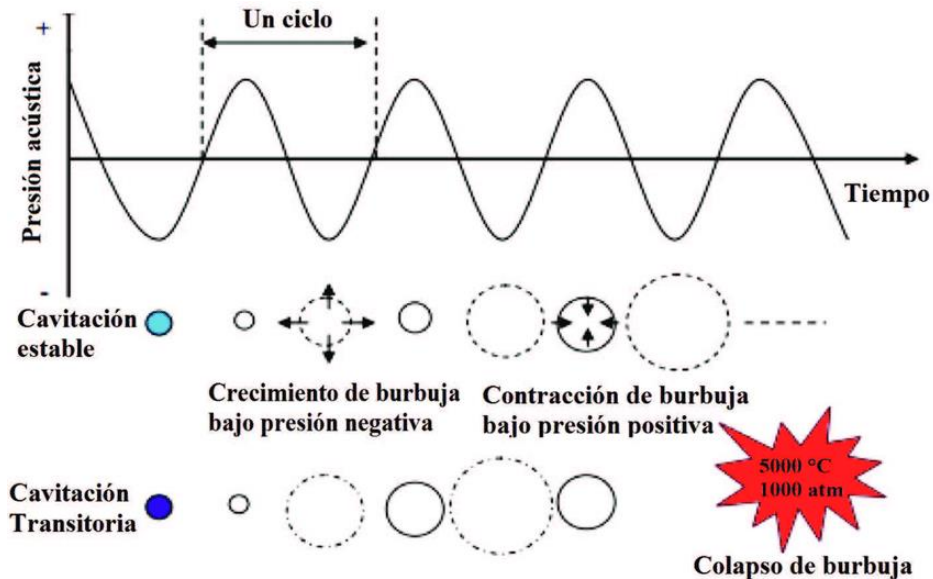


Figura 9. Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido.

Además, la implosión de las burbujas de cavitación provoca diversos efectos mecánicos en el sistema, como microcorrientes, turbulencia y colisiones intermoleculares a alta velocidad. En el caso de sistemas sólido-líquido, también tiene lugar la formación de microinyecciones (figura 10) debido a la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en posiciones cercanas a la interfase sólido-líquido. Las microinyecciones

pueden alterar las características y estructura del sólido, mediante el descamado y erosión de su superficie, así como la formación de microfracturas, dando lugar a la dispersión de partículas, el descubierta de nuevas superficies activas y el incremento de transferencia de materia entre las dos fases (Vilkhu et al., 2008).

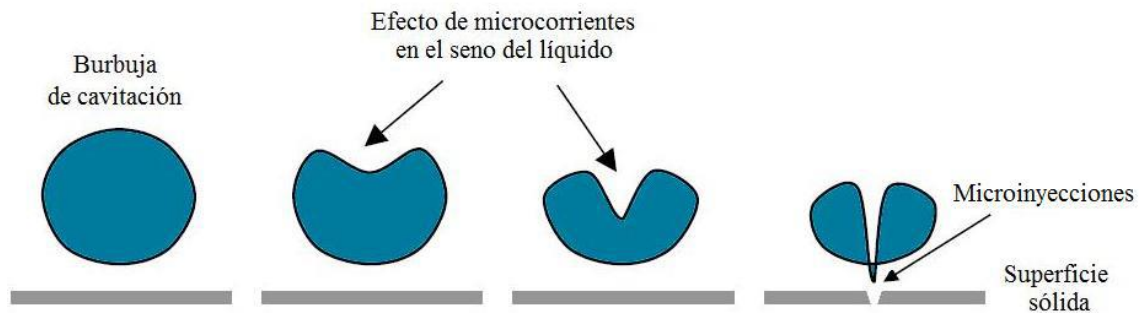


Figura 10. Formación de microinyecciones en una interfaz sólido-líquido (González-Centeno, 2013).

Tanto la intensidad de la cavitación como sus efectos dependen de las características del medio y de las variables del proceso (frecuencia e intensidad ultrasónicas y temperatura). El equipo de aplicación de ultrasonidos de potencia se compone de tres elementos fundamentales: un generador, un transductor y un emisor. El generador transforma la señal eléctrica a la frecuencia deseada. El transductor suele ser un cuerpo vibrante que genera los ultrasonidos a partir de la señal eléctrica de alta frecuencia que recibe del generador. Por último, el emisor transmite la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar.

Existen diferentes equipos de aplicación de ultrasonidos en medios acuosos, entre los que destacan los baños y los sistemas tipo sonda. Los más utilizados son los baños de ultrasonidos debido a que son equipos simples, compactos y económicos. En estos equipos los transductores se encuentran colocados en la base del recipiente y con el sistema de generación-emisión incluido en el mismo. Sus principales limitaciones son la poca potencia que suministran al medio, la dificultad de control de temperatura y la variación de la intensidad ultrasónica en función de la posición dentro del baño. Por otro lado, los equipos tipo sonda utilizan una sonda metálica como emisor del sistema para aplicar al medio líquido la vibración generada por el transductor. Debe utilizarse para su fabricación un material con alta resistencia a la fatiga y erosión que provoca el fenómeno de cavitación (Dueñas Zurita, 2017).

Al propagarse los ultrasonidos por un medio, se transmite energía acústica que puede ser disipada en forma de calor debido a los rozamientos producidos entre moléculas y al trabajo realizado al desplazarlas en un medio sujeto a fuerzas de cohesión contrarias al desplazamiento de las mismas. La absorción de los ultrasonidos y el calentamiento del medio depende de las características viscosas del mismo, así como de la frecuencia y potencia ultrasónicas aplicadas.

1.4.2. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida por ultrasonidos

Los ultrasonidos de potencia se caracterizan por su amplia y potencial aplicabilidad en la industria alimentaria, debido a los efectos mecánicos derivados del fenómeno de cavitación. Entre sus principales aplicaciones destaca su uso en procesos de emulsión, cristalización, congelación, descongelación, secado y filtración.

En trabajos de revisión recientemente publicados (Chemat et al., 2010) se incluyen estudios basados en la aplicación de ultrasonidos de potencia en los procesos de la industria alimentaria mencionados, así como en procesos de ablandamiento de carne, corte de piezas, fermentación, desgasificación, despolimerización, limpieza, pasteurización y esterilización, entre otros. Sin embargo, una de las aplicaciones más importantes de los ultrasonidos de potencia en la industria alimentaria, es la asistencia de procesos de extracción sólido-líquido para la obtención de componentes bioactivos de origen vegetal (Vilkhu et al., 2008).

Como se ha comentado anteriormente, la extracción convencional presenta algunas limitaciones en cuanto al tiempo, la temperatura, el consumo de energía y el volumen de disolvente utilizado. Sin embargo, gracias a los efectos derivados del fenómeno de cavitación, la asistencia con ultrasonidos permite mejorar el proceso, además de acelerarlo. Según otros autores, los ultrasonidos de potencia incrementan la eficacia del proceso de extracción mediante cuatro mecanismos interconectados. Rotura de las paredes celulares: Debido a la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en la zona próxima a la interfase sólido-líquido, se forman microinyecciones que dan lugar a la rotura de las paredes celulares. Esto aumenta la permeabilidad del tejido vegetal, libera el material intracelular y reduce el tamaño de partícula, incrementando así la superficie sólida en contacto con el disolvente de extracción. Por otro lado, el aumento de la temperatura en la zona de implosión de las burbujas de cavitación provoca el incremento de la solubilidad de los analitos. Las microinyecciones originan un aumento de presión, así como la rotura y erosión de la superficie celular, dando lugar a una mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto. Por último, se produce una mejora de la difusión, debido a las microcorrientes provocadas por los ultrasonidos, que favorecen la continua renovación de la capa de disolvente que se encuentra en contacto con la superficie del sólido. Todos estos mecanismos en conjunto dan lugar al incremento de la transferencia de materia desde la matriz del sólido vegetal hasta el seno del disolvente. Además, permite trabajar a temperaturas inferiores y reducir el tiempo de operación con respecto a la extracción convencional (Dueñas Zurita, 2017).

La influencia de variables tales como el tipo de disolvente, la temperatura de trabajo, el tamaño de partícula o el ratio sólido-líquido, han sido las variables más estudiadas en procesos de extracción asistidos por ultrasonidos de potencia. No obstante, cabe apuntar que son escasos los trabajos que evalúan cómo la frecuencia y potencia ultrasónicas afectan al proceso de extracción, pese a que la intensidad del efecto de cavitación depende directa y sustancialmente de estos parámetros.

Según estudios previos (González-Centeno, 2013) la frecuencia y potencia de ultrasonidos condicionan de forma significativa el proceso de extracción.

Otros autores como Nayak et al. (2018) observaron que la actividad antioxidante, así como la extracción de compuestos polifenólicos aumenta significativamente mediante la aplicación de ultrasonidos en la extracción.

Por otro lado, Poveda et al. (2018) obtuvieron mejores rendimientos de actividad antioxidante y contenido de compuestos polifenólicos mediante la extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonidos, en comparación con la extracción acuosa acelerada.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de alternativas limpias (extracción con agua a alta temperatura asistida por ultrasonidos) para la extracción de polifenoles en orujos de uva y su efecto en la actividad antioxidante de los extractos.

Para alcanzar el objetivo general, existen una serie de objetivos específicos:

- Determinar y comparar la actividad antioxidante de los extractos de orujos de uva para las diferentes condiciones de extracción.
- Determinar y comparar la concentración de compuestos polifenólicos totales (método Folin-Ciocalteu) así como la concentración de seis grupos de compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, antocianos, flavonoles, compuestos hidroxicinámicos y catequinas) para las diferentes condiciones de extracción.
- Establecer la correlación existente entre la actividad antioxidante respecto al contenido de compuestos polifenólicos totales, así como respecto a cada uno de los grupos de compuestos fenólicos de interés.
- Estudiar el efecto de la aplicación previa de ultrasonidos frente a una extracción en baño de agua a alta temperatura.
- Estudiar la posibilidad de disminuir el tiempo de extracción en baño de agua a alta temperatura mediante la aplicación previa de ultrasonidos.

3. Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos de este trabajo, se utilizaron orujos de vinificación correspondientes a uva (*Vitis vinífera*) de la variedad Cabernet Sauvignon, cultivada en la finca de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) de la Universidad Pública de Navarra (UPNA) (Octubre 2016).

Con el objetivo de determinar la influencia del tiempo de aplicación de ultrasonidos (t_{US}) y el tiempo de extracción en baño de agua a 90 °C (t_{agua}) en la extracción de compuestos fenólicos, se realizaron diferentes experimentos en medio acuoso a tres tiempos de ultrasonidos (0, 5 y 10 min) combinados con tres tiempos (0, 15 y 30 min) en un baño de agua, los cuales quedan reflejados en la tabla 1. También se realizó una extracción control (0US30) durante 30 minutos en un baño de agua a 90 °C, en base a los resultados obtenidos por estudios previos sobre la extracción de compuestos polifenólicos de orujos de uva (Filgueira Garro, 2017). Cada extracción se realizó por triplicado.

Tabla 1. Esquema de trabajo.

Código extracción	t _{us} (min)	t _{agua} (min)
0US30	0	30
5US0	5	0
5US15	5	15
5US30	5	30
10US0	10	0
10US15	10	15
10US30	10	30

4. Material y métodos

4.1. Determinación 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.

4.2. Extracción sólido-líquido

La extracción de los orujos se llevó a cabo en un medio acuoso con una relación 1:8 (m/v). Se utilizó un volumen total de disolvente de extracción de 50 ml. Primero se aplicó el tratamiento de ultrasonidos (0, 5 o 10 min) utilizando un equipo UP400S (Hielscher Ultrasonics GmbH) con sonda H7, frecuencia de 400 kHz y un 100% de intensidad, seguido de una extracción en un baño P-SELECTA UNITRONIC OR a 90 °C con una agitación de 36 rpm. Tras las dos etapas de extracción, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos, a una temperatura de 4 °C en una centrífuga P-SELECTA MEDIFRIGER BL-S. Tras este tratamiento se retiró el sobrenadante de las muestras, que se almacenaron en refrigeración en una atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su análisis.

4.3. Determinación del contenido total de flavonoides (TFC)

Los flavonoides totales se determinaron mediante el método descrito por Bosso et al. (2016). Se mezclaron 0,1 ml del extracto con 5 ml de etanol hidroalcohólico (etanol:H₂O:HCl ; 70:30:1) y se midió la absorbancia a 280 nm en cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. Para expresar los resultados se realizó una recta de calibrado con (+)-catequina (50-1000 µmoles/L). Los resultados se expresaron como

mg de catequina por gramo de extracto seco (ES). La determinación se realizó por triplicado.

4.4. Determinación del contenido total de taninos (TTC)

El método utilizado, descrito por Bate-Smith (1977), se basa en la hidrólisis de los taninos en medio ácido y temperaturas elevadas, dando lugar a sus unidades monoméricas, las antocianidinas. En dos tubos "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 desechables de poliestireno de 1 cm de paso óptico utilizando un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. El método se realizó por triplicado. El contenido en taninos totales se calculó a partir de la ecuación (1). Los resultados finales se expresaron como mg de taninos por gramo de extracto seco (ES).

$$(1) \textit{Contenido taninos totales (mg/L)} = 19,33 \times (\textit{Abs A} - \textit{Abs B}) / 5$$

4.5. Determinación del contenido total de antocianos (TAC)

La determinación del contenido de antocianos se realizó según el método descrito por Ribéreau-Gayon et al. (1965), basado en la decoloración mediante bisulfito de sodio. 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 Na₂SO₃ al 15% (v/v). Pasados 15 min se midió la absorbancia de ambos tubos a 520 nm utilizando cubetas desechables de poliestireno de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. El método se llevó a cabo por triplicado. El contenido total de antocianos se calcula mediante la ecuación (2). Los resultados fueron expresados como mg de antocianos por gramo de extracto seco (ES).

$$(2) \textit{Contenido antocianos totales (mg/L)} = 875 \times (\textit{Abs A} - \textit{Abs B})$$

4.6. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos (índice de Folin-Ciocalteu)

Para la obtención del índice de Folin, siguiendo el método OIV-MA-AS2-10, se introdujeron los siguientes compuestos en un matraz aforado, en el siguiente orden: 0,5 ml del extracto, 25 ml de agua destilada, 2,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, 10 ml de solución carbonato de sodio al 20% (p/v). Se enrasó con agua destilada hasta los 50 ml. Se agitó y esperó 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 750 nm en una cubeta desechable de poliestireno de 1 cm de paso de luz, en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. El método se llevó a cabo por triplicado. El contenido total de compuestos fenólicos se calculó a través de la realización

de una curva patrón de ácido gálico con concentraciones de 100 a 1000 mg/l. El resultado se expresó en mg de ácido gálico por gramo de extracto seco (ES).

4.7. Determinación del contenido total de flavonoles y compuestos derivados del ácido hidroxicinámico

La determinación de este grupo de compuestos fue llevada a cabo por el método de Mazza et al. (1999). Se mezclaron volúmenes de 0,5 ml de muestra con 0,5 ml de solución etanólica de HCl al 0,1% y 9,1 ml de solución etanólica de HCl al 2%. Tras una homogeneización y reposo de 15 minutos, se determinó la absorbancia a 280 y 360 nm para derivados de ácido hidroxicinámico y flavonoles, respectivamente, en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. El método se llevó a cabo por triplicado en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El proceso de cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración de solución al 10% de ácido cafeico en etanol para derivados del ácido hidroxicinámico y mediante una curva de calibración de solución al 12% de quercetina en etanol para flavonoles. Los resultados se expresaron en mg de ácido cafeico (en el caso de derivados del ácido hidroxicinámico) y mg de quercetina (en el caso de flavonoles) por gramo de extracto seco.

4.8. Determinación del contenido total de catequinas

El método utilizado se basó en la reacción entre catequinas y 4- (dimetilamino) cinamaldehído (DMACA) descrita por Vivas et al. (1994). Se añadió un volumen de 2,5 ml de solución de DMACA de concentración 5,7 mM en metanol a 0,5 ml de muestra. Tras 10 minutos de reposo se determinó la absorbancia a 640 nm en cubeta desechable de poliestireno de 1 cm de paso óptico, en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración de catequina (25 a 250 mg/l). El método se llevó a cabo por triplicado. Los resultados se expresaron en mg de catequina por gramo de extracto seco.

4.9. Determinación de la actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante se realizó atendiendo a la técnica de Rivero-Pérez et al. (2007), con algunas modificaciones. Se mezclaron 0,060 ml del extracto con 3 ml de solución metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH) con una concentración 60 μ M (0,0023 g/100 ml de CH₃OH) en una cubeta desechable de poliestireno de 1 cm y se midió la absorbancia a 515 nm a tiempo cero y después de 60 minutos, en un espectrofotómetro de doble haz UH5300 UV/VIS Spectrophotometer VWR HITACHI. El método se llevó a cabo por triplicado. La actividad antioxidante se expresó como mg de trolox por gramo de extracto seco, utilizando una curva de calibración con concentraciones de trolox de 50 μ M hasta 1000 μ M.

4.10. Análisis estadístico

El efecto de los factores (t_{US} y t_{agua}) sobre los parámetros estudiados, así como la interacción entre ambos factores, se determinó mediante la realización de un análisis ANOVA multifactorial. Para los parámetros en los que existe interacción entre los factores, se realizó un análisis por separado de cada factor mediante un ANOVA simple. Por otro lado, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los distintos grupos de compuestos polifenólicos estudiados y la actividad antioxidante.

También se utilizó el análisis de ANOVA simple para estudiar el efecto de la aplicación de ultrasonidos frente a extracciones llevadas a cabo únicamente en baño de agua.

Todos los análisis se realizaron con el programa Statgraphics 18.

5. Resultados y discusión

5.1. Contenido en humedad

El contenido en humedad de los orujos utilizados en el presente estudio fue de $65,01 \pm 2,85\%$. La humedad de los orujos utilizados se encuentra dentro de los rangos descritos por otros autores, como García et al. (2017), que obtuvieron resultados del contenido de agua de los orujos entre el 55% y el 75%, dependiendo del origen y el proceso de vinificación. Drosou et al. (2015) utilizaron orujos de la uva Agiorgitiko, obtenidos de una vinificación en tinto, cuyo contenido de humedad era de 59,5%. Además, González-Centeno (2013) analizó nueve variedades de uvas, obteniendo una humedad de $61,5 \pm 0,7\%$ para los orujos de la variedad Cabernet Sauvignon.

5.2. Efecto del método de extracción sobre la actividad antioxidante y el contenido polifenólico

Con el objetivo de determinar la influencia del tiempo de aplicación de ultrasonidos (t_{us}) y el tiempo de extracción en baño de agua a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (t_{agua}) en la extracción de compuestos fenólicos, así como la posible interacción entre ambos factores, se realizó un ANOVA multifactorial sobre los resultados de las variables analizadas: actividad antioxidante (DPPH), polifenoles totales (Folin), contenido total de flavonoides (CTF), taninos (CTT), antocianos (CTA), flavonoles (CTFl), derivados de compuestos del ácido hidroxicinámico (CTH) y catequinas (CTC) (tabla 2).

Tabla 2. Estudio de influencia de los dos factores (t_{US} y t_{agua}) sobre los parámetros estudiados e interacción entre ambos.

	t_{US}	t_{agua}	$t_{US} * t_{agua}$
<i>Folin</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>CTF</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>CTT</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>CTA</i>	0,0000	0,0000	0,0002
<i>CTFl</i>	0,0000	0,0000	0,0010
<i>CTH</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>CTC</i>	0,0000	0,0000	0,1826
<i>DPPH</i>	0,0000	0,0000	0,0000

Los valores se expresan como el valor p. Valores con $p < 0,05$ son estadísticamente significativos.

Tras realizar un análisis de la varianza multifactorial se observó que ambos factores influyen significativamente en el contenido de los extractos en todos los grupos de compuestos polifenólicos analizados así como en la actividad antioxidante. Además existe interacción entre los factores en todos los casos, excepto en el contenido total de catequinas. En los casos que existe interacción, se estudió por separado el efecto de cada factor.

Tabla 3. Contenido de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante para las diferentes extracciones.

	t _{agua} (min)	t _{US} (min)	
		5	10
Folin (mg ácido gálico/g ES)	0	4,42 ± 0,54 ^{C,b}	27,24 ± 2,13 ^{C,a}
	15	11,49 ± 0,25 ^{B,b}	46,97 ± 6,54 ^{B,a}
	30	51,15 ± 5,11 ^{A,b}	55,79 ± 4,63 ^{A,a}
CTF (mg catequina/g ES)	0	14,63 ± 2,11 ^{C,b}	33,84 ± 3,28 ^{C,a}
	15	33,36 ± 1,08 ^{B,b}	58,26 ± 8,84 ^{B,a}
	30	65,12 ± 9,54 ^{A,b}	73,60 ± 5,18 ^{A,a}
CTT (mg taninos/g ES)	0	0,06 ± 0,01 ^{C,b}	0,12 ± 0,01 ^{C,a}
	15	0,15 ± 0,01 ^{B,b}	0,19 ± 0,03 ^{B,a}
	30	0,24 ± 0,03 ^{A,a}	0,23 ± 0,03 ^{A,a}
CTA (mg antocianos/g ES)	0	2,66 ± 0,34 ^{B,b}	4,40 ± 0,31 ^{A,a}
	15	4,37 ± 0,34 ^{A,a}	4,64 ± 0,60 ^{A,a}
	30	4,20 ± 0,52 ^{A,b}	4,84 ± 0,67 ^{A,a}
CTFI (mg quercetina/g ES)	0	5,54 ± 0,60 ^{C,b}	12,52 ± 1,14 ^{C,a}
	15	10,21 ± 0,30 ^{B,b}	14,47 ± 1,60 ^{B,a}
	30	11,01 ± 1,11 ^{A,b}	16,27 ± 2,87 ^{A,a}
CTH (mg ácido cafeico/g ES)	0	2,32 ± 0,37 ^{C,b}	5,27 ± 0,46 ^{C,a}
	15	5,71 ± 0,14 ^{B,b}	6,70 ± 0,82 ^{B,a}
	30	6,59 ± 0,30 ^{A,b}	7,81 ± 0,98 ^{A,a}
CTC (mg catequina/g ES)	0	0,61 ± 0,14 ^{C,b}	1,65 ± 0,15 ^{C,a}
	15	2,78 ± 0,04 ^{B,b}	3,52 ± 0,62 ^{B,a}
	30	4,02 ± 0,49 ^{A,b}	4,76 ± 0,52 ^{A,a}
DPPH (mg trolox/g ES)	0	5,83 ± 0,95 ^{C,b}	17,86 ± 1,80 ^{C,a}
	15	23,41 ± 0,94 ^{B,b}	30,06 ± 5,76 ^{B,a}
	30	36,64 ± 4,87 ^{A,a}	39,43 ± 4,40 ^{A,a}

^{a,b}. Diferencias significativas entre el tiempo de US ($p < 0,05$; Test de Tukey)

^{A,B,C} Diferencias significativas entre el tiempo de Agua ($p < 0,05$; Test de Tukey)

En la tabla 3 se puede observar que el aumento del tiempo de aplicación de ultrasonidos lleva a un aumento de la actividad antioxidante y del contenido de todos los compuestos fenólicos, excepto en el caso de los taninos para un tratamiento posterior de 30 minutos en baño de agua. Además, también existe una tendencia clara al aumento de la actividad

antioxidante, así como del contenido de polifenoles, al aumentar el tiempo de extracción con agua.

La actividad antioxidante presenta diferencias significativas al aumentar el tiempo de extracción con agua y el tiempo de aplicación de ultrasonidos, excepto para la extracción en agua durante 30 minutos, en el cual no existen diferencias entre aplicar 5 o 10 minutos de ultrasonidos. Parece que el efecto de los ultrasonidos sobre la actividad antioxidante de los extractos es muy pequeño en comparación con el efecto que tiene sobre la extracción la aplicación posterior del baño de agua a 90 °C durante 30 minutos. Los resultados de actividad antioxidante obtenidos entran dentro del rango descrito por Pérez-Jimenez et al. (2008) para pulpa y semillas de uva utilizando medios de extracción con metanol y acetona. Por otro lado, los resultados descritos por Poveda et al. (2018) para semillas de uva mediante extracción hidroalcohólica asistida por ultrasonidos son menores que los obtenidos en este trabajo, lo que puede deberse a la temperatura de extracción (50 °C) aplicada por dichos autores. Drosou et al. (2015) presentan unos resultados de actividad antioxidante para extractos de orujos de uva, a los que aplica ultrasonidos durante la extracción con agua como solvente a 20 °C durante 60 minutos, similares a los obtenidos en este estudio.

El contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides, flavonoles, hidroxicinámicos y catequinas aumenta significativamente al aumentar el tiempo de aplicación de ultrasonidos de 5 a 10 minutos, así como el tiempo de extracción en agua. El contenido total de fenoles de los extractos acuosos estudiados por Drosou et al. (2015) fue mayor que el obtenido en el presente trabajo, para una extracción asistida por ultrasonidos durante 60 minutos a 20 °C. Este mayor contenido total de fenoles puede deberse a las propias características de la variedad de uva (Argiorgitiko) estudiada por dichos autor. Nayak et al. (2018) presentan resultados del contenido total de polifenoles menores a los obtenidos en este trabajo, para la extracción con aplicación de 10 minutos de ultrasonidos y 30 minutos en baño de agua. Aunque dicho autor realiza una extracción hidroalcohólica, la diferencia en los resultados puede deberse a la temperatura de extracción utilizada (25 °C). González-Centeno (2013) muestra resultados del contenido total de polifenoles similares a los de este trabajo, para una extracción en agua de orujos de la variedad Cabernet Sauvignon mediante la aplicación de ultrasonidos durante 25 minutos. Los resultados de flavonoides totales obtenidos son superiores a los descritos por Bosso et al. (2016) tanto para la extracción de semillas de uva de la variedad Nebbiolo cv. con agua, etanol o acetona, con aplicación de ultrasonidos durante 20 minutos. Los resultados obtenidos para el contenido de flavonoles son mayores que los presentados por Poveda et al. (2018), al contrario que los hidroxicinámicos, en los cuales dichos autores consiguen una cantidad mayor para una extracción hidroalcohólica asistida con ultrasonidos de semillas de uva Cabernet Sauvignon. Sin embargo, los resultados de flavonoles obtenidos por Mazza et al. (1999), que utilizaron metanol como solvente de la extracción, son similares a los de este trabajo. En el caso del contenido de catequinas, los resultados son mucho menores que los presentados por otros autores como González-Centeno (2013) mediante extracción acuosa asistida por ultrasonidos para el raspón de la variedad Cabernet Sauvignon.

En el contenido total de taninos se observan diferencias significativas al aumentar el tiempo de extracción en agua, pero al someter los orujos a 30 minutos en el baño de agua a 90 °C, no se observan diferencias significativas para los diferentes tiempos de aplicación de ultrasonidos. Los resultados obtenidos son mucho menores que los presentados por González-Centeno (2013) para el raspón de la variedad Cabernet Sauvignon, posiblemente debido al gran aporte de taninos del raspón (Pascual García, 2017). Bosso et al. (2016) también obtuvieron resultados mayores para el contenido de taninos para las semillas de uva de la variedad Nebbiolo cv., posiblemente debido a su mayor contenido en taninos que la variedad Cabernet Sauvignon (Bordiga et al., 2011).

Los antocianos son más termolábiles que otros componentes polifenólicos (Sólyom et al., 2014). Es posible que puesto que estamos trabajando a temperaturas elevadas sean los compuestos que más se degradan y por tanto a partir de un determinado tiempo de aplicación del baño de agua, la degradación de los compuestos sea lo suficientemente grande como para que no veamos diferencias en la extracción. Parece que la fase de extracción con baño de agua caliente tiene mayor efecto sobre la extracción de antocianos que los ultrasonidos. El contenido en antocianos del orujo de uva publicado por Brahim et al. (2014) es menor que el obtenido en las extracciones realizadas. Los resultados también son mayores que los descritos por Mazza et al. (1999), que utilizó metanol como solvente de extracción.

De forma general, en casi todos los casos, la cantidad de compuestos extraídos, así como la actividad antioxidante, aumenta considerablemente cuando aumentamos el tiempo de ultrasonidos (10 minutos) y el tiempo en el baño de agua (30 minutos).

Por tanto, según los resultados obtenidos, con las extracciones 5US30 y 10US30 se obtienen extractos de orujos de uva Cabernet Sauvignon con la mayor actividad antioxidante. Por otro lado, mediante la extracción 10US30 se obtienen extractos con el mayor contenido total de compuestos fenólicos totales, flavonoides, flavonoles, compuestos hidroxicinámicos y catequinas. Sin embargo, para el caso del contenido total de taninos, al no existir diferencias significativas entre las extracciones 5US30 y 10US30, con ambas se consigue la mayor extracción de dichos compuestos. Finalmente, el contenido total de antocianos es el caso menos claro, ya que no existen diferencias significativas entre cuatro de las extracciones (5US15, 10US0, 10US15 y 10US30), con las que obtenemos la mayor cantidad de este compuesto.

5.3. Correlación entre la actividad antioxidante y la composición polifenólica de los extractos

Con el objetivo de conocer la influencia de la concentración de los compuestos polifenólicos en la actividad antioxidante de los extractos acuosos de los orujos, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante (DPPH) y el contenido de los distintos grupos de compuestos polifenólicos analizados. Los resultados obtenidos del análisis de correlación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Estudio de correlación entre la actividad antioxidante y la composición polifenólica de los extractos.

	<i>DPPH</i>	
<i>Folin</i>	0,8974	(0,0000)
<i>CTF</i>	0,9445	(0,0000)
<i>CTT</i>	0,9824	(0,0000)
<i>CTA</i>	0,7467	(0,0000)
<i>CTFl</i>	0,7450	(0,0000)
<i>CTH</i>	0,9227	(0,0000)
<i>CTC</i>	0,9803	(0,0000)

Los valores se expresan como coeficiente de correlación de Pearson (r) con el valor p entre paréntesis. Valores con $p < 0,05$ son estadísticamente significativos.

Como era de esperar, los resultados obtenidos muestran que existe una correlación significativa entre la actividad antioxidante (DPPH) y todos los grupos de compuestos polifenólicos estudiados.

En general, los coeficientes de correlación son bastante altos, aunque los mayores se obtienen con el contenido total de taninos (0,9824) y de catequinas (0,9803). Por otro lado, los antocianos y flavonoles tienen un coeficiente de correlación menor.

Con el fin de estudiar qué grupo de compuestos presenta un mayor rendimiento de extracción y por tanto puede influir en mayor medida en la actividad antioxidante, se determina el porcentaje de aumento de concentración de los diferentes grupos de compuestos, calculado respecto a la extracción 5US0 que ofrece el menor rendimiento de en todos los casos.

El contenido total de compuestos fenólicos presenta el mayor aumento de concentraciones (1162 %) debido a que representa el aumento de todos los polifenoles extraídos.

Mediante la extracción 10US30, se ha conseguido un aumento considerable de catequinas (680 %) y taninos (300 %), lo que puede influir significativamente en el aumento de la actividad antioxidante (Tabla 4). Además también se ha conseguido un gran aumento del contenido de flavonoides (403 %), aunque viendo su coeficiente de correlación, no parece tener tanta influencia en la actividad antioxidante como los dos grupos de compuestos anteriores.

Por otro lado, los grupos de compuestos que menor correlación tienen con la actividad antioxidante son los antocianos y flavonoles. Esto parece ser corroborado por su menor rendimiento de extracción 10US30 (82 % y 194 % respectivamente).

5.4. Efecto de la aplicación de ultrasonidos frente a extracciones en baño de agua a alta temperatura

En trabajos previos (Filgueira Garro, 2017) se observó que la extracción con agua a 90 °C durante 30 minutos sobre orujos de uva de la variedad Cabernet Sauvignon producía un aumento considerable de la actividad antioxidante y de la extracción de compuestos polifenólicos frente a extracciones llevadas a cabo a temperaturas de 50 y 70 °C durante 10, 20 y 30 minutos.

Se plantea estudiar si la aplicación previa de ultrasonidos a la extracción con agua a 90 °C durante 30 minutos, mejora los resultados obtenidos aplicando únicamente baño de agua. El estudio se ha llevado a cabo mediante la realización de un ANOVA simple entre las tres extracciones realizadas durante 30 minutos en baño de agua a 90 °C, combinadas o no con ultrasonidos. Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los extractos y para los compuestos polifenólicos se muestran en la figura 11.

Como podemos observar en la figura 11a, existen diferencias significativas para la actividad antioxidante de los orujos al aplicar ultrasonidos previos, con respecto a la extracción en baño de agua a 90 °C durante 30 minutos.

En la figura 11b observamos que en el caso de los compuestos fenólicos totales (Folin) existen diferencias significativas entre las tres extracciones, obteniendo la mayor cantidad de dichos compuestos mediante la extracción 10US30 ($55,79 \pm 4,63$ mg ácido gálico/g ES). Mediante la aplicación previa de 5 minutos de ultrasonidos el contenido total de flavonoides ($65,12 \pm 9,54$ mg catequina/g ES), antocianos ($4,20 \pm 0,52$ mg/g ES) y flavonoles ($11,01 \pm 1,11$ mg quercetina/g ES) disminuye significativamente respecto a la extracción únicamente en baño de agua ($79,34 \pm 7,80$, $5,15 \pm 0,37$ y $15,48 \pm 3,55$ mg/g ES respectivamente). Sin embargo, para estos compuestos, no existen diferencias significativas entre la extracción únicamente en baño de agua y la aplicación previa de 10 minutos de ultrasonidos.

El resto de compuestos polifenólicos (taninos, compuestos hidoxicinámicos y catequinas) presentan resultados mayores para la extracción en baño de agua durante 30 minutos a 90 °C sin aplicación previa de ultrasonidos.

La actividad antioxidante es la determinación que mayor interés tiene en este trabajo, ya que se busca la extracción de compuestos antioxidantes de los orujos de la vinificación para su posterior utilización en la industria agroalimentaria. Por eso, la aplicación previa de ultrasonidos, tanto 5 como 10 minutos, mejora la extracción en agua descrita en otros trabajos (Filgueira Garro, 2017), para la cual se obtenía una mayor capacidad antioxidante de los orujos frente a extracciones con disolventes orgánicos.

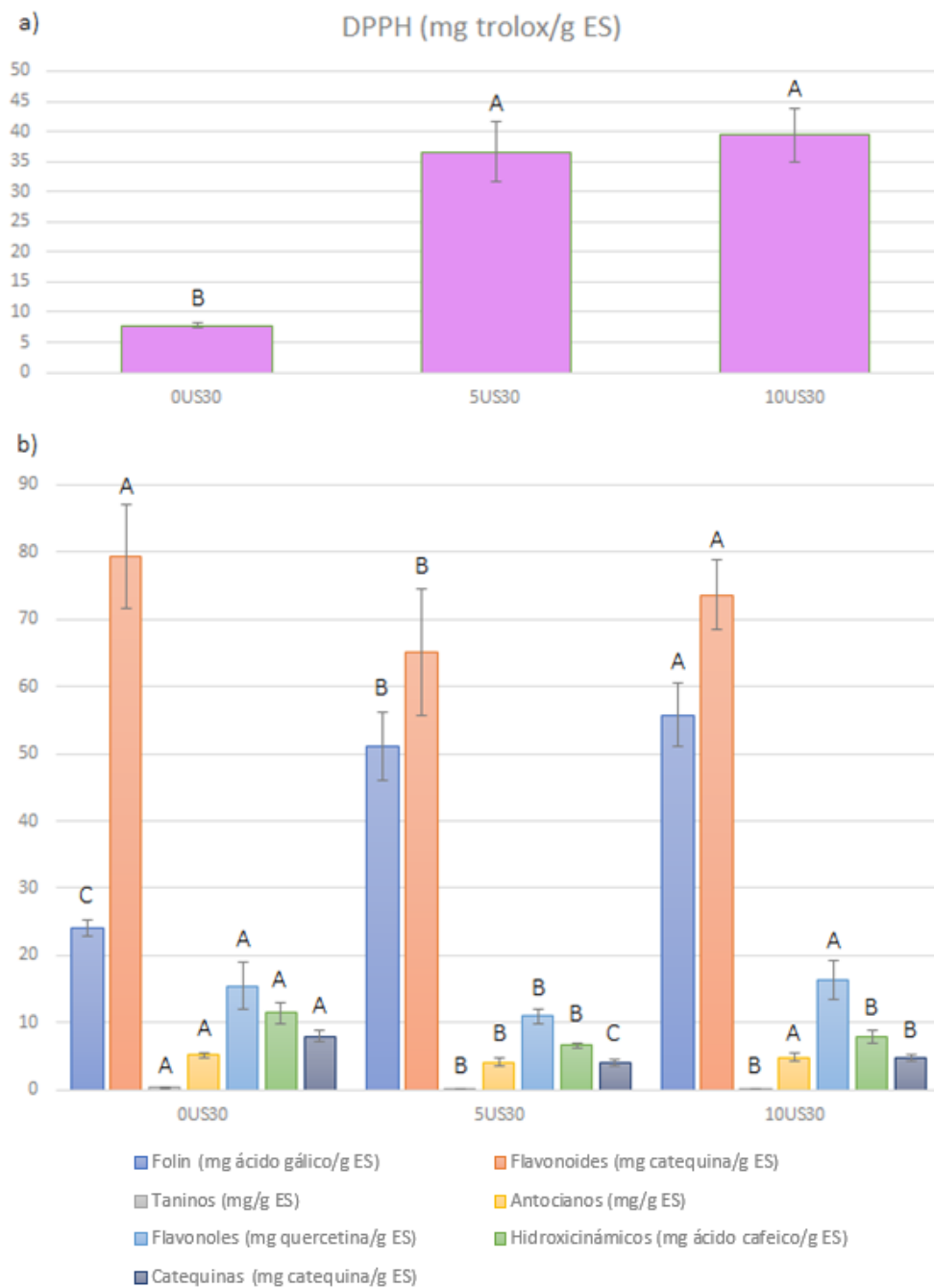


Figura 11. Actividad antioxidante (a) y contenido polifenólico (b).

A, B, C Diferencias significativas entre el mismo grupo de compuestos, para diferente extracción. ($p < 0,05$; Test de Tukey)

5.5. Estudio del efecto de la disminución de tiempo de extracción en agua a alta temperatura

En este apartado se plantea estudiar la posibilidad de disminuir el tiempo de extracción en baño de agua a 90 °C, al introducir la aplicación previa de ultrasonidos. Para ello se han realizado ANOVA simples comparando los resultados de la extracción en baño de agua con cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos.

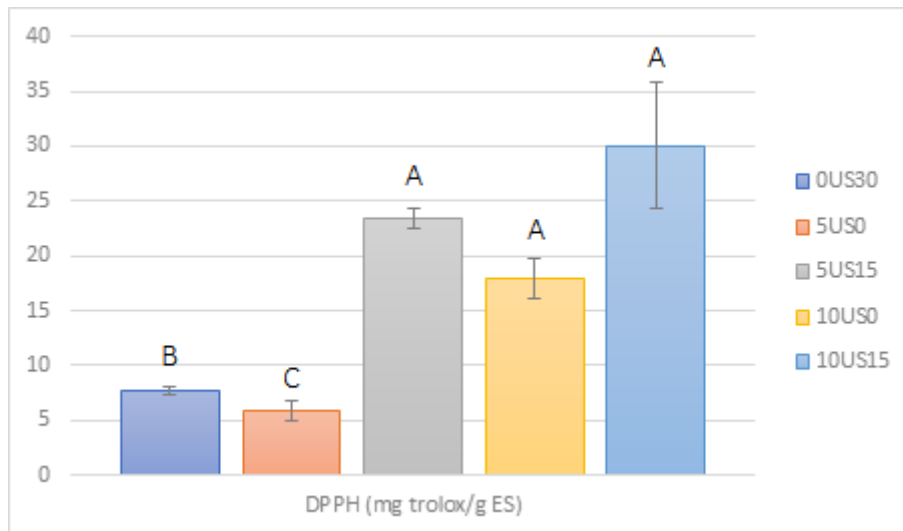


Figura 12. Actividad antioxidante en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

A, B, C Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

En la figura 12 se puede observar que para la actividad antioxidante de los extractos existen diferencias significativas entre el tratamiento control (0US30) y el resto de extracciones. Además, las extracciones 5US15, 10US0 y 10US15 muestran resultados mayores que la extracción control, por lo que al aplicar ultrasonidos previos, se podría reducir el tiempo de extracción en agua a 15 minutos, asegurándonos una actividad antioxidante de los extractos mayor que en la extracción en agua a 90 °C durante 30 minutos. Sin embargo, los resultados obtenidos en la figura 11 muestran que la actividad antioxidante para las extracciones asistidas con ultrasonidos y 30 minutos en baño de agua a 90 °C (5US30 y 10US30), es mayor que en los casos con menor tiempo de extracción en agua. Poveda et al. (2018) afirman que se consiguieron extractos con una mayor actividad antioxidante mediante la aplicación de ultrasonidos, en comparación con la extracción convencional.

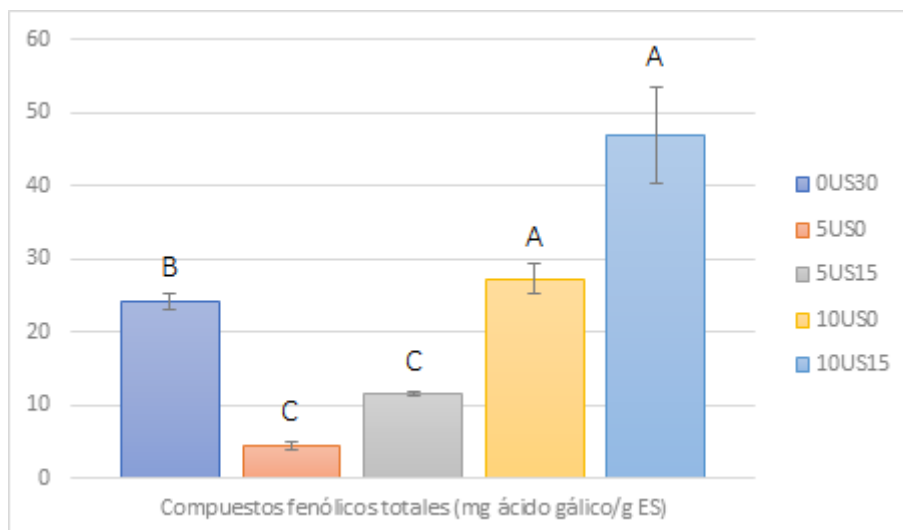


Figura 13. Contenido de compuestos fenólicos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

A, B, C Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

El contenido de compuestos fenólicos totales (figura 13) muestra diferencias significativas entre el control y el resto de extracciones. En este caso, solo las extracciones en las que se aplican 10 minutos de ultrasonidos (10US0 y 10US15) obtienen un resultado mayor. Por lo tanto, para extraer igual o mayor cantidad de compuestos fenólicos se puede reducir el tiempo de extracción en agua a 0 o 15 minutos, siempre que se apliquen 10 minutos de ultrasonidos previos, aunque el contenido de estos compuestos es mayor para las extracciones asistidas con ultrasonidos y 30 minutos en baño de agua a 90 °C (Figura 11). Drosou et al. (2015), obtienen de forma similar el mayor rendimiento de extracción de compuestos polifenólicos de orujos de uva mediante una extracción asistida por ultrasonidos, aunque utilizando como solvente una combinación de agua y etanol. Por otro lado, el perfil de los resultados obtenidos para el contenido de compuestos polifenólicos parece estar de acuerdo con la correlación entre este parámetro y la actividad antioxidante. Si bien ésta es significativa, se mostraba algo menor que la encontrada para otros de los grupos de polifenoles estudiados.

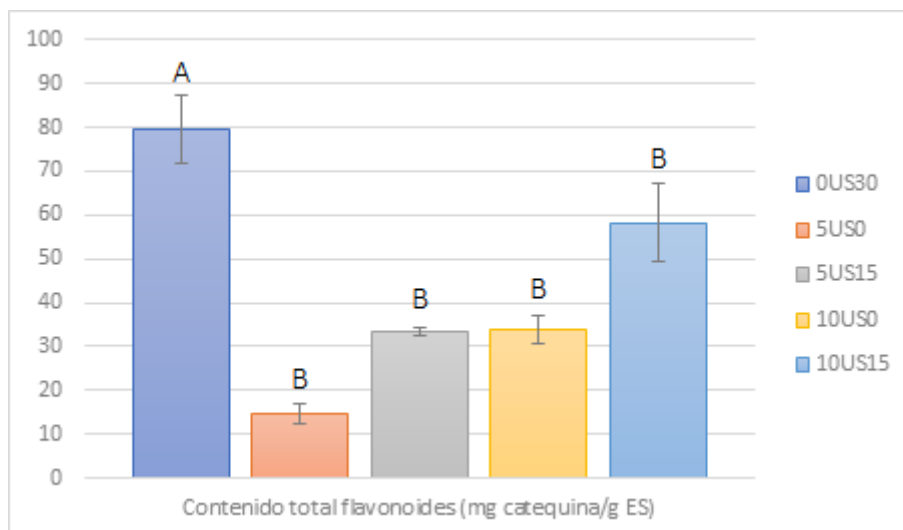


Figura 14. Contenido total de flavonoides en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

^{A, B} Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

Como se puede observar en la figura 14, existen diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y el resto de extracciones. Aunque en este caso, el contenido total de flavonoides es menor para todas las extracciones en las que se aplica ultrasonidos previos, tanto para tiempos de 0 y 15 minutos de extracción en agua, como para las extracciones en agua de 30 minutos (figura 11).

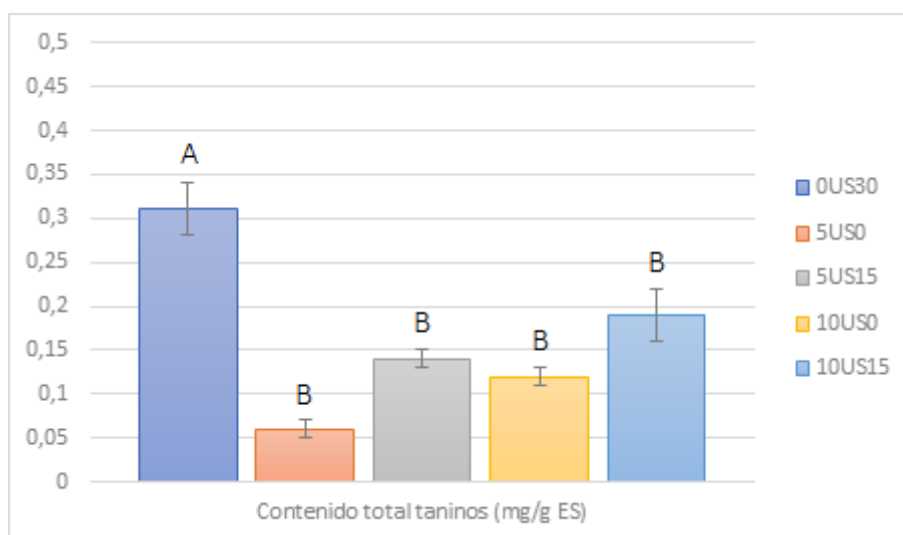


Figura 15. Contenido total de taninos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

^{A, B} Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

En la figura 15 se observa que existen diferencias significativas para el contenido total de taninos entre la extracción control (0US30) y el resto de extracciones. Igual que en el caso de los flavonoides, el contenido total de taninos disminuye significativamente al aplicar ultrasonidos. Además, las extracciones en agua durante 30 minutos combinadas con la aplicación de ultrasonidos (figura 11), también obtienen resultados menores que la extracción control.

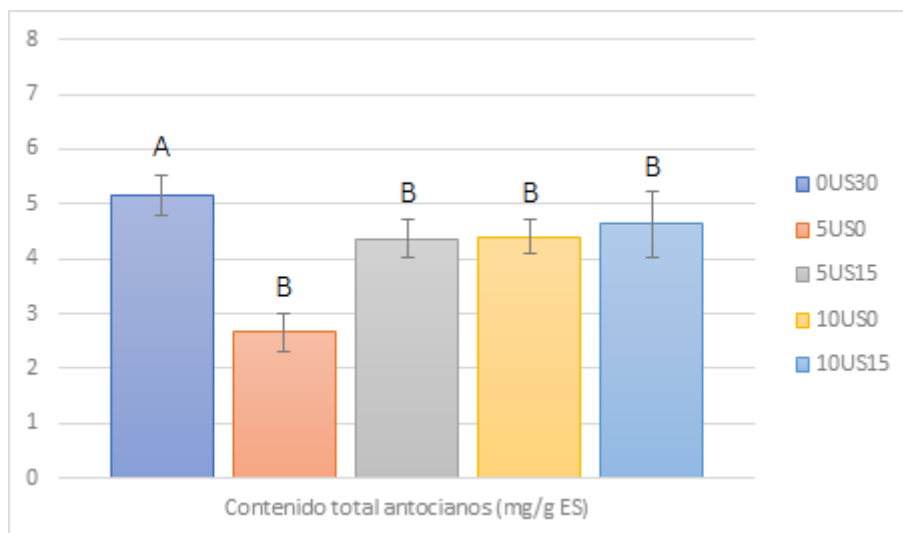


Figura 16. Contenido total de antocianos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

^{A, B} Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

El contenido total de antocianos (figura 16) existen diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y el resto de extracciones. En los casos en los que se aplica ultrasonidos previos a la extracción en agua durante 0 o 15 minutos, así como para 30 minutos (figura 11), el contenido de antocianos es menor que en la extracción control.

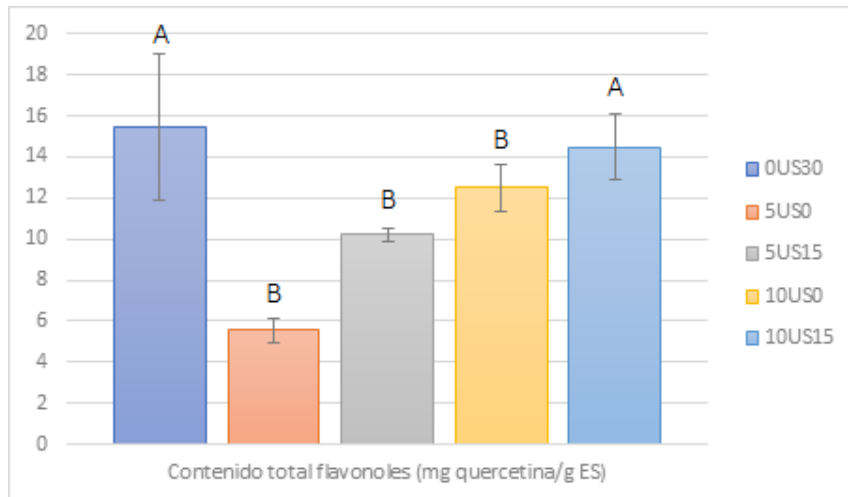


Figura 17. Contenido total de flavonoles en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

^{A, B} Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

En la figura 17 se observan los resultados del contenido total de flavonoles en las diferentes extracciones. Existen diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y el resto de extracciones, excepto con la extracción 10US15. Por lo tanto, mediante la aplicación de 10 minutos de ultrasonidos, se podría reducir el tiempo de extracción en agua a 15 minutos, obteniendo resultados similares del contenido de flavonoles que con la extracción control. Sin embargo para la aplicación de 10 minutos de ultrasonidos previos a la extracción en agua a 90 °C durante 30 minutos (figura 11), se obtienen resultados del contenido total de flavonoides mayores que en la extracción 10US15, aunque sin diferencias significativas con ésta.

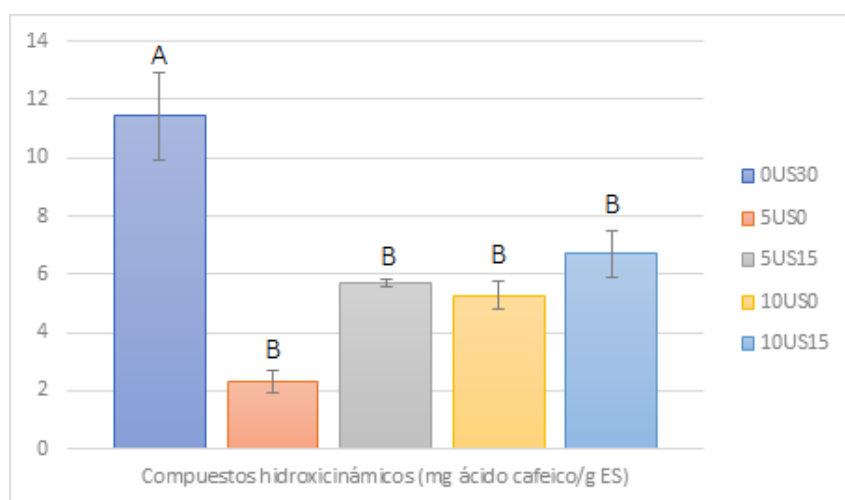


Figura 18. Contenido de compuestos hidroxicinámicos en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

^{A, B} Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

En el caso de los compuestos hidroxicinámicos (figura 18) existen diferencias significativas entre la extracción 0US30 y el resto de extracciones. Al aplicar ultrasonidos previos a la extracción en agua el contenido de estos compuestos es menor que en la extracción control. Como se puede observar en la figura 11, también disminuye su contenido al aplicar ultrasonidos previos a la extracción de agua a 90 °C durante 30 minutos.

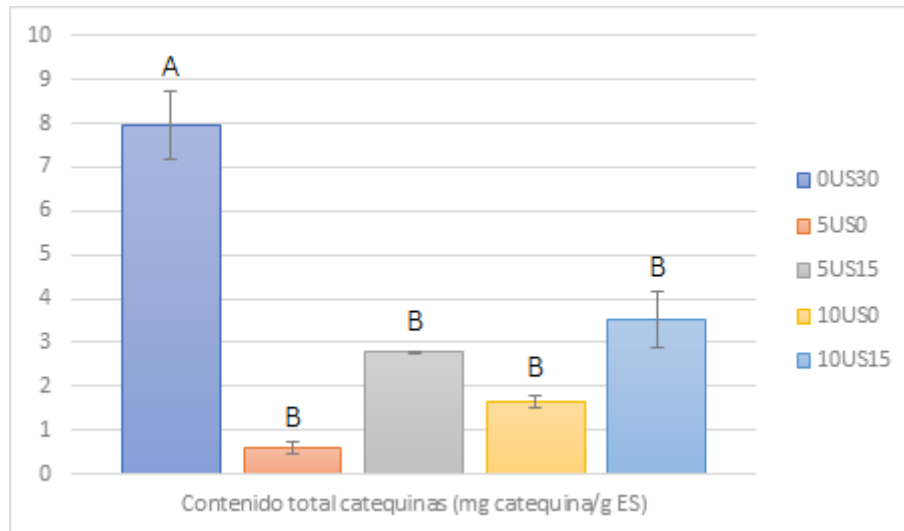


Figura 19. Contenido total de catequinas en la extracción control y en las extracciones en agua de 0 y 15 minutos.

^{A, B} Diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y cada una de las extracciones asistidas por ultrasonidos ($p < 0,05$; Test de Tukey)

Por último, en la figura 19 observamos los resultados del contenido total de catequinas, que presentan diferencias significativas entre la extracción control (0US30) y las extracciones con ultrasonidos. En este caso tampoco se aumenta el contenido de este compuesto al aplicar previamente ultrasonidos. Además con la extracción en agua a 90 °C durante 30 minutos asistida por ultrasonidos, el contenido de catequinas también disminuye significativamente (figura 11).

De forma general podemos observar que, aunque la aplicación de ultrasonidos supone un aumento de la actividad antioxidante de los extractos, los distintos grupos polifenólicos estudiados aparecen en mayor concentración en la extracción realizada únicamente en baño de agua. Este aumento de actividad antioxidante no puede atribuirse por tanto a un grupo o grupos específicos de compuestos, sino al contenido total de los mismos, como apoya el resultado obtenido para el contenido de polifenoles totales (figura 13). En nuestro caso nos interesa aumentar la actividad antioxidante de los extractos. Por lo tanto, aplicando 10 minutos de ultrasonidos previos, se puede reducir el tiempo de extracción en agua tanto a 0 minutos como a 15 minutos (10US0 y 10US15), obteniendo resultados similares o superiores a los de la extracción control (0US30). Además también se obtienen resultados superiores de actividad antioxidante aplicando 5 minutos de ultrasonidos y

reduciendo el tiempo de extracción en agua a 15 minutos (5US15). Sin embargo, para ambos tiempos de ultrasonidos, la posterior extracción en agua durante 30 minutos incrementa significativamente la actividad antioxidante de los extractos.

6. Conclusiones

- El tiempo de aplicación de ultrasonidos y el tiempo de extracción en agua influyen significativamente en la actividad antioxidante y la composición polifenólica de los extractos.
- Se han observado interacciones significativas entre el tiempo de aplicación de ultrasonidos y el tiempo de extracción en agua para todos los parámetros estudiados.
- La extracción de orujos de uva mediante la aplicación de ultrasonidos permite obtener extractos fenólicos con una actividad antioxidante comparable a la obtenida mediante otros solvente y técnicas.
- El aumento del tiempo de aplicación de ultrasonidos y el tiempo de extracción en agua da lugar a extractos con una mayor actividad antioxidante y mayor concentración de los diferentes compuestos fenólicos.
- La actividad antioxidante correlaciona significativamente con todos los grupos de compuestos estudiados, aunque en mayor medida con el contenido en taninos y catequinas.
- La aplicación previa de ultrasonidos a la extracción con agua a 90 °C durante 30 minutos, supone una mejora en los resultados de obtenidos únicamente en baño de agua, dando lugar a un aumento de la actividad antioxidante.
- Mediante la aplicación previa de ultrasonidos es posible disminuir el tiempo de extracción en agua a 90 °C durante 30 minutos.
- 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, así como la posibilidad de reducir el consumo energético y sin los residuos que pueden dejar otro tipo de solventes.

7. Bibliografía

- Berradre, M., González, C., & Fernández, B. S. V. (2013). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de semilla de uva (Vitis vinifera) variedad Malvasia y Tempranillo Polyphenols content and antioxidant activity of grape seed extract (Vitis vinifera) malvasia and tempranillo variety*. 619–631.
- Bertran, E., Sort, X., Soliva, M., & Trillas, I. (2004). Composting winery waste: sludges and grape stal. *Bioresource Technology*.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coïsson, J. D., & Arlorio, M. (2011). Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L . cv. *Food Chemistry*, 127(1), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.141>
- Bosso, A., Guaita, M., & Petrozziello, M. (2016). Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts. *Food Chemistry*, 207, 162–169. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.084>
- Bustamante Muñoz, M. Á. (2007). *Compostaje de los residuos generados en la industria vinícola y alcoholera. Valorización agronomica de los materiales obtenidos*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Cegarra, J., & Paredes, C. (2007). Residuos agroindustriales. *J. Moreno & R. Moral (Eds.). Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.*, 519–553.
- Chemat, F., Khan, M. K., Abert-vian, M., & Dangles, O. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L .) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Dueñas Zurita, J. (2017). *OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE CÁSCARA DE UVA VARIEDAD QUEBRANTA (ICA, PERÚ) EMPLEANDO TÉCNICAS CONVENCIONALES Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ.
- Filgueira Garro, I. (2017). *CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ORUJOS DE UVA*.
- Ghafoor, K., CHOI, Y. H., JEON, J. Y., & JO, I. H. (2009). *Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds , Antioxidants , and Anthocyanins from Grape (Vitis vinifera) Seeds*. 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- González-Centeno, M. (2013). *Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícola como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de los ultrasonidos de potencia para la extracción de la fracción fenólica*.
- Inbar, J., & Chet, I. (1991). Detection of chitinolytic activity in the rhizosphere using image analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 23, 239–242.

- Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). *Residues of grape (Vitis vinifera L .) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants*. 112, 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.005>
- Martínez-Cordero, H., Álvarez-Casas, M., Lores, M., & Domínguez, J. (2013). Vermicompostaje del bagazo de uva : fuente de enmienda orgánica de alta calidad agrícola y de polifenoles bioactivos. *Recursos Rurais*, 9, 55–63.
- Nayak, A., Bhushan, B., Rosales, A., Turienzo, L. R., & Cortina, J. L. (2018). Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics. *Food and Bioproducts Processing*. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.004>
- Nieto Fuentes, J. A. (2013). *Estudio integral de la uva (Vitis vinifera L.) como fuente de compuestos fenólicos biodisponibles con acción biológica*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pascual García, O. (2017). *Contribución de las semillas y del raspón sobre la composición , color y calidad del vino tinto ; influencia del sistema de vinificación y del tratamiento del racimo*.
- Pinelo, M., del Fabbro, P., Manzocco, L., Núñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of Phenol Continuous Extraction from Vitis vinifera Byproducts. *Food Chemistry*, 92, 109–117.
- Poveda, J. M., Loarce, L., Alarcón, M., Díaz-Maroto, M. C., & Alañón, M. E. (2018). Revalorization of winery by-products as source of natural preservatives obtained by means of green extraction techniques. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.063>
- Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2014). *Thermal degradation of grape marc polyphenols*. 159, 361–366.
- Usaquén-Castro, X., Martínez-Rubio, M., Aya-Baquero, H., & González-Martínez, G. (2006). *Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (Vitis vinifera) Residues*. (2003), 1315–1324. <https://doi.org/10.1051/IUFoST>
- Valencia-avilés, E., Ignacio-figueroa, I., Sosa-martínez, E., & Bartolomé-camacho, M. C. (2017). *Polifenoles : propiedades antioxidantes y toxicológicas Polyphenols : antioxidant and toxicological properties*. 15–29.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and Opportunities for Ultrasound Assisted Extraction in the Food Industry. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161–169.