



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

Trabajo Fin de Grado

Grado en Químicas

**“Extracción de compuestos bioactivos mediante pre-
tratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas.
Valorización del raspón de la uva”**

Autor: Joana Rubio García

Tutor/es: Soraya Rodríguez Rojo

Rut Romero Díez

INDICE

1.- RESUMEN / ABSTRACT	4
2.- ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	6
2.1.- SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA VITÍINICOLA: ORIGEN Y CARACTERISTICAS.....	7
2.2.- COMPUESTOS FENÓLICOS: ORIGEN, CLASIFICACIÓN, PROPIEDADES E INTERÉS INDUSTRIAL	12
2.3.- TECNOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	15
2.3.1.- PROCESOS DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.....	15
2.3.2.- TECNOLOGÍAS NO CONVENCIONALES	17
2.3.2.1.- TECNOLOGÍA MICROONDAS: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES.....	20
3.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	23
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1.- MATERIA PRIMA.....	26
4.2.- REACTIVOS	27
4.3.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	28
4.3.1.- EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO CONVENCIONAL (E_{S-L}).....	28
4.3.2.- PRE-TRATAMIENTO CON MICROONDAS.....	29
4.4.- ANÁLISIS	33
4.4.1.- CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES (TPC)	33
4.4.2.- CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES (TFC).....	33
4.4.3.- TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS	34
4.4.4.- HPLC-DAD-UV y MS/MS	35
4.4.5.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC).....	36
4.4.6.- ESTUDIO IN VITRO DE INHIBICIÓN FÚNGICA FRENTE A BOTRYTIS CINEREA	37
4.4.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1.- EXTRACCIONES SÓLIDO-LÍQUIDO.....	38
5.2.- PRE-TRATAMIENTO CON MW	45
5.2.1.- DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y RESULTADOS	45
5.2.2.- COMPARACIÓN DEL PRE-TRATAMIENTO MW Y LA EXTRACCIÓN CONVENCIONAL	50

5.2.2.1.- IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS HPLC-DAD-UV y MS/MS.....	52
5.2.2.2.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC)	54
5.3.- ENSAYOS IN-VITRO DE INHIBICIÓN ANTIFÚNGICA	56
5.3.1.- TANINOS	58
6.- CONCLUSIONES	59
7.- BIBLIOGRAFIA	61
8.- ABREVIATURAS.....	62
9.- ANEXOS	75

1. RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

Existe un creciente interés hacia la recuperación de compuestos bioactivos (especialmente compuestos fenólicos) a partir de subproductos de vinificación ya que poseen un alto poder antioxidante y su consumo ofrece grandes beneficios para la salud, entre otros. El raspón de uva representa una rica fuente de este tipo de compuestos, particularmente estilbenos y flavonoides. En este trabajo, se ha estudiado la cinética de extracción de compuestos fenólicos totales (TPC) y flavonoides totales (TFC) del raspón de la uva a través de la extracción convencional sólido-líquido. Se ha analizado la influencia de los parámetros que rigen el proceso de extracción, tales como temperatura, relación sólido-líquido (R_{S-L}) y tipo de disolvente (% EtOH en mezclas hidroalcohólicas). Además, se ha empleado la tecnología microondas (MW) como pre-tratamiento para aumentar el rendimiento de la extracción convencional de los compuestos polifenólicos, determinando las condiciones del proceso que optimizan la extracción de los compuestos de interés (TPC y TFC), para lo que se ha estudiado la relación sólido-líquido (R_{S-L}), el tipo de disolvente (% EtOH en mezclas hidroalcohólicas) y el tiempo de irradiación.

El rendimiento máximo de la extracción sólido-líquido ($38.2 \pm 1.0 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DS}}$ y $37.6 \pm 1.5 \text{ mg}_{\text{CATE}}/\text{g}_{\text{DS}}$ para polifenoles y flavonoides respectivamente) se logró después de 60 minutos a 75°C , con una R_{S-L} 0.10 g/mL empleando como solvente una mezcla 50:50 (v/v) de EtOH:H₂O. El rendimiento aumenta al emplear pre-tratamiento con MW con respecto a la extracción convencional en un 16% en TPC ($44.1 \pm 1.2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DS}}$) y un 34% para TFC ($47.6 \pm 0.3 \text{ mg}_{\text{CATE}}/\text{g}_{\text{DS}}$). El tiempo requerido para lograr un rendimiento máximo también se redujo significativamente de 60 a 10 minutos.

La identificación de los compuestos fenólicos de interés se realizó a través de HPLC-DAD-UV y MS/MS y los principales compuestos identificados y cuantificados en los extractos de raspón fueron estilbenoides como la ϵ -viniferin y el trans-resveratrol y flavonoides como la procianidina B2, la catequina y la epicatequina. Así también, se

ha demostrado la actividad antifúngica de los extractos contra *Botrytis cinérea*, gracias a su alto contenido tanto en estilbenos como flavonoides.

ABSTRACT

There is a growing interest in the recovery of bioactive compounds (especially phenolic compounds) from wine byproducts due to their antioxidant properties and the numerous health benefits derived from its consumption, among others. Grape stems are a rich source of this type of compounds, particularly stilbenes and flavonoids. The work presented here is a study of the extraction kinetics of total phenolic compounds (TPC) and total flavonoids (TFC) from grape stems by conventional solid-liquid extraction. Parameters such as solid-liquid ratio (g/mL), type of solvent (hydro-alcoholic mixtures) and temperature were also studied in conventional solid-liquid extractions. Once all the parameters were studied, the best operating conditions were selected. Furthermore, MW pre-treatments followed by solid-liquid extraction at selected conditions were also studied for intensifying polyphenolic compounds extraction. Process parameters for pre-treatment were also investigated and optimized related to TPC and TFC, such as irradiation time, type of solvent (hydro-alcoholic mixtures) and solid-liquid ratio.

Maximum extraction yield ($38.2 \pm 1.0 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}_{\text{DS}}$ and $37.6 \pm 1.5 \text{ mg}_{\text{CATE}} / \text{g}_{\text{DS}}$ for polyphenols and flavonoids respectively) was achieved after 60 minutes at 75°C , with a $R_{\text{S-L}} 0.10 \text{ g/mL}$ and with a 50%vol. ethanol mixture. When MW was used as a pre-treatment (a prior step to the conventional extraction), the yield increases 16% for TPC ($44.1 \pm 1.2 \text{ mg}_{\text{GAE}} / \text{g}_{\text{DS}}$) and 34% for TFC ($47.6 \pm 0.3 \text{ mg}_{\text{CATE}} / \text{g}_{\text{DS}}$). The required time to achieve a constant yield was reduced substantially (from 60 to 10 minutes). Putative identification of main extract compounds was performed by HPLC-DAD-UV y MS/MS. Main phenolic compounds identified and quantified in the extracts from grape stems were stilbenoides such as ϵ -viniferin and trans-resveratrol and flavonoids such as procyanidin B2, catechin and the epicatechin. Furthermore, the antifungal activity of the extracts against *Botrytis cinerea* has been demonstrated, thanks to its high content in both stilbenes and flavonoids.

KEY WORDS

Grapevine stems, Extraction, Microwave pretreatment, Valorization, Polyphenols.

2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

La producción de vino representa una de las principales actividades agrícolas a nivel mundial, en la cual se generan grandes cantidades de desechos y subproductos ricos en compuestos bioactivos (especialmente compuestos fenólicos). La recuperación de estos compuestos constituye un punto clave para la revalorización de los subproductos del proceso de elaboración del vino ya que poseen un alto poder antioxidante y su consumo ofrece grandes beneficios para la salud, entre otros.

Desde hace décadas se han estudiado diferentes alternativas de extracción de compuestos de alto valor añadido a partir de residuos y/o subproductos del vino. Para ello, se han empleado tanto tecnologías convencionales como no convencionales. Las tecnologías emergentes no convencionales representan una herramienta prometedora para mejorar el rendimiento de la recuperación de los polifenoles presentes en estos residuos, así como para convertirlos en más seguros, eficientes y sostenibles. El empleo de estas nuevas tecnologías, en muchos de los casos, conlleva ventajas relacionadas con la reducción del tiempo de extracción, la energía consumida, el uso de solventes orgánicos y el aumento de los rendimientos de extracción, en plena correspondencia con el concepto de *extracción verde*. En este sentido, la aplicación de la tecnología con microondas (MW) se presenta como una de las técnicas más eficaces y prometedoras para la recuperación de compuestos bioactivos a partir de residuos y/o subproductos de la uva.

Por ello se ha considerado oportuno el estudio del empleo de la tecnología de MW como pre-tratamiento, o lo que es lo mismo, un paso previo a un proceso de extracción sólido-líquido convencional para la recuperación de compuestos fenólicos a partir del raspón de la uva. El microondas es una tecnología no

convencional que ya se ha empleado anteriormente en la recuperación de este tipo de compuestos a partir de subproductos vitivinícolas (hollejo, lías, materia vegetal, etc); pero hasta la fecha, no se había estudiado como etapa previa de pre-tratamiento a la extracción sólido-líquido convencional específicamente en el raspón de la uva .

2.1. Subproductos de la industria vitivinícola y valorización: origen y características

La producción de vino es actualmente una de las actividades agrícolas más importantes del mundo. No hay duda de que la viticultura constituye uno de los cultivos frutales más extendidos, siendo la especie de vid *Vitis vinífera* la más comúnmente cultivada para la producción de vino [1]. Las regiones productoras de vino más competitivas se encuentran principalmente en Europa (Italia, España, Francia, Alemania y Portugal) y América (EE. UU., Argentina y Chile), aunque también es un sector importante en Australia y Sudáfrica[2].

Por su importancia en términos económicos, sociales y medioambientales, así como por ser una de las señas de identidad de la Marca Española en el terreno agroalimentario, el sector del vino es extraordinariamente importante para nuestro país. Según datos de la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) del año 2017, España ocupa una posición relevante en la economía internacional del vino, ya que es el país con mayor superficie de viñedo (con casi un millón de hectáreas, el 14% de la superficie total cultivada), con una producción de vino estimada en 33.5 Mill. hL y el mayor exportador de vino a nivel mundial, en términos de volumen[3].

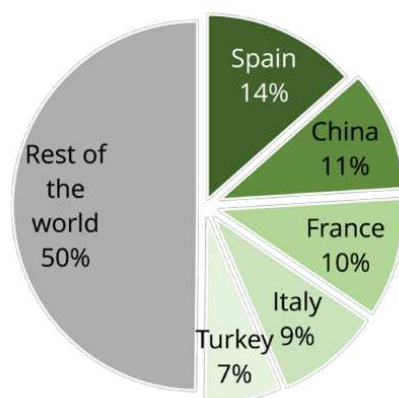


Figura 1. - Producción mundial uva – OIV, 2017.

El sector de producción de vino ha sido tradicionalmente visto como un proceso respetuoso con el medio ambiente; sin embargo, este sector requiere de una cantidad considerable de recursos tales como agua, fertilizantes y enmiendas orgánicas, combustible, etc. Por otro lado, produce una gran cantidad de efluentes residuales y desechos orgánicos entre otros los cuales deben ser tratados correctamente para que no representen un problema para el medio ambiente[4].

Se estima que la industria española del vino genera entre 2 y 3 millones de toneladas al año de residuos y subproductos, principalmente producidos durante el período de vendimia[5], lo que se traduce en que, para la producción de 100 L de vino blanco se generan aproximadamente 31,2 Kg de subproductos (semillas, hollejos, raspón y lías de vinificación mayoritariamente) y unos 25 kg de subproductos surgen de la producción de 100 L de vino tinto[6].

En la Figura 2 se presenta el origen y el diagrama de flujo de los diferentes residuos y/o subproductos generados en cada una de las etapas del ciclo productivo del vino, desde el viñedo hasta su comercialización.

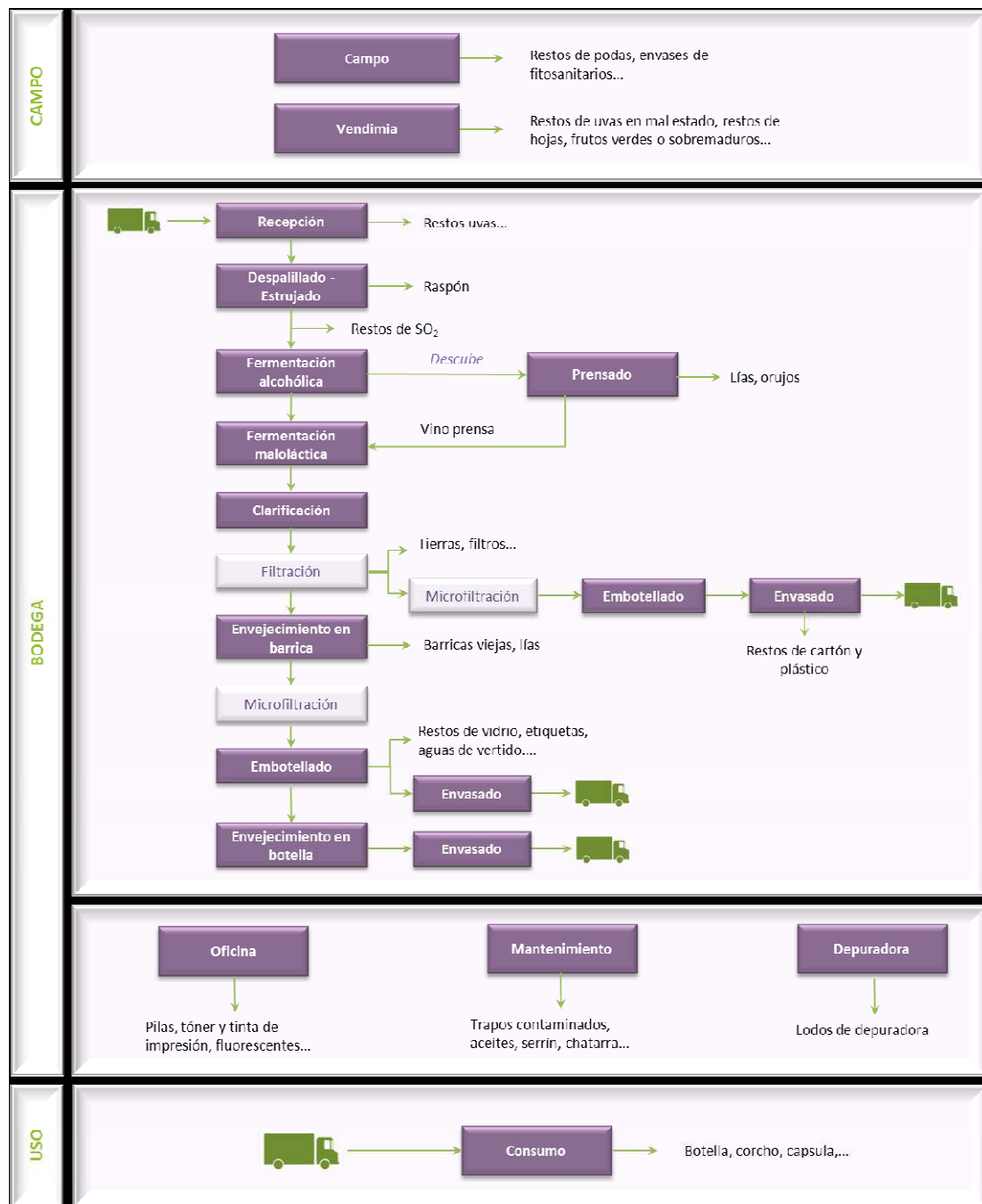


Figura 2. Diagrama de flujo de producción del vino[7]

La mayoría de los residuos generados en una bodega (80-85%) son residuos orgánicos (Figura 3).

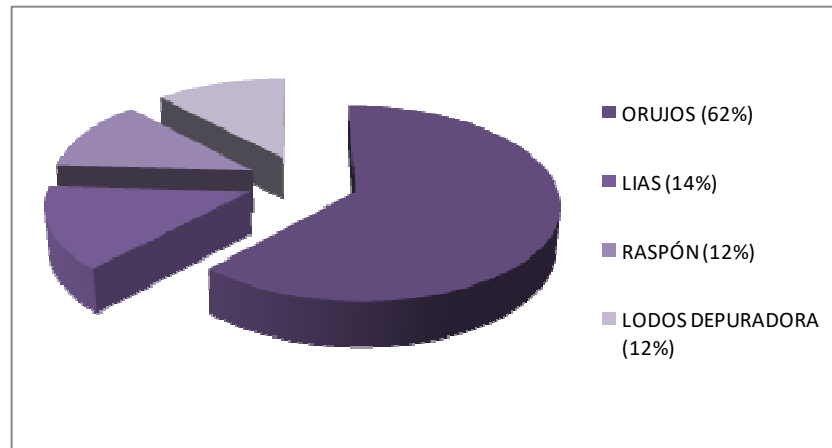


Figura 3. Distribución de los residuos orgánicos generados [7]

La cantidad y composición de los residuos derivados del proceso de vinificación dependen de la variedad de uva considerada y de las prácticas enológicas aplicadas [8]. Los principales subproductos sólidos, raspón y orujo, se generan, respectivamente, en las etapas de despalillado y prensado [9]. De forma adicional, en todos los casos, se obtiene toda una serie de lías y/o fangos ligados a las operaciones de trasiego, fermentación y clarificación; así como un volumen importante de aguas residuales a raíz de la limpieza y desinfección de los equipos [10]. El orujo está constituido por piel, pepitas y restos de pulpa de uva. El orujo representa entre el 10 y 20%, en unidades de peso fresco, de la uva procesada en la elaboración del vino, oscilando su contenido en pepitas entre un 20- 30% en función de la variedad [11]. Por su parte, el raspón es el elemento leñoso del racimo de uva que sirve de soporte para las bayas. En unidades de peso fresco, este subproducto representa entre el 8 y el 12% del racimo [12]. Ambos residuos vitivinícolas son muy heterogéneos, presentando cada uno de ellos una composición propia que, a su vez, depende de la variedad de uva considerada[13].

Los residuos generados a lo largo del proceso de producción vitivinícola son mayoritariamente *no peligrosos*, a excepción de los envases de productos químicos y/o fitosanitarios y aquellos procesos en los que se emplea SO_2 en cualquiera de sus formas.

Los orujos, las lías y el raspón de la uva son considerados residuos no peligrosos, pero debido al carácter estacional de su producción y a la gran demanda química y

biológica de oxígeno que presentan estos residuos, el almacenamiento, transformación y/o eliminación de tal cantidad de subproductos constituye un serio problema en términos ecológicos y económicos [14][15][16]. Por otro lado, éstos contienen una variedad de compuestos naturales de alto valor añadido y comercialmente atractivos, como son los taninos, el ácido tartárico o los polifenoles, susceptibles de ser valorizados[17].

Los orujos y las lías se utilizan como subproductos y se han recuperado tradicionalmente al utilizarlos como materia prima en otros sectores industriales [18][19]. Los orujos se usan parcialmente en alimentos para animales y, a nivel industrial, para la extracción de compuestos bioactivos/polifenoles. Otros, sin embargo, no se suelen valorizar debido a su bajo valor económico, por lo que el raspón y los lodos de aguas residuales son generalmente incinerados o llevados a un vertedero y/o gestor de residuos. De hecho, las aplicaciones actuales de tallos y raspones de la uva, mucho menos estudiado, se limitan esencialmente a su uso como fertilizantes [20][21]o para producir compost o para alimentar a los rumiantes [22].

Aunque es necesario profundizar más en la viabilidad y rentabilidad de su valorización, estudios preliminares sobre la química del raspón de la uva indican que puede ser una potencial fuente natural de principios bioactivos (compuestos polifenólicos)[13][16][23]. Además el perfil y contenido polifenólico original del raspón se preservan prácticamente intactos debido a que dicho subproducto se descarta directamente[24]. Por lo que su revalorización constituye una gran oportunidad para aumentar el valor añadido de este residuo, reducir su impacto en el medio ambiente y establecer nuevos procesos que proporcionen fuentes adicionales de ingresos [9]. Esta búsqueda cobra mayor sentido cuando dichos residuos poseen un impacto directo que reduce la sostenibilidad y la viabilidad de las actividades socio-económicas agroalimentarias [25], al mismo tiempo que hace frente a la creciente presión legislativa sobre la mitigación del impacto medioambiental de sus actividades [26].

2.2. Compuestos fenólicos: origen, clasificación, propiedades e interés industrial

En el reino vegetal, los compuestos fenólicos constituyen el segundo grupo de sustancias químicas en abundancia tras el de los carbohidratos[27]. Su biosíntesis ocurre durante el metabolismo de la planta y/o como respuesta a condiciones de estrés tales como infección, heridas e irradiación UV a través de la vía del ácido siquímico y/o del metabolismo fenilpropanoide)[28][29][30].

Desde un punto de vista químico, los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen una gran familia de moléculas orgánicas de muy diversa y heterogénea estructura y reactividad. No obstante, tal y como su nombre indica, todos ellos incluyen como mínimo un núcleo aromático sustituido con uno o varios grupos hidroxilo.

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse en función del número y distribución de los átomos de carbono que lo componen o la longitud de la cadena alifática unida al núcleo aromático [31]. No obstante, el criterio de clasificación más utilizado para describir la fracción fenólica es el basado en la naturaleza y estructura de su esqueleto carbonado, dividiendo los polifenoles en compuestos no-flavonoides y flavonoides (Figura 4). Ambos grupos se dividen a su vez en diferentes subfamilias químicas, cuyas características estructurales determinan su función fisiológica en el metabolismo secundario de la vid, así como su papel en la posterior configuración de la calidad organoléptica del vino [32].

NO- FLAVONOIDES	Ácidos fenoles	Ácidos hidroxibenzoicos
		Ácidos hidroxicinámicos
	Estilbenos	
FLAVONOIDES	Flavonoles	
	Flavanoles y flavonas	
	Antocianos	
	Flavanoles	Catequinas
		Taninos condensados
		Prodelphinidinas

Figura 4. Clasificación de los compuestos fenólicos [33].

La composición fenólica de la uva y de sus subproductos, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, depende de un gran número de factores que incluyen desde el entorno agroclimático involucrado en su desarrollo hasta la variedad en estudio, el tejido considerado (piel, pepitas, orujo o raspón) y las prácticas vitivinícolas efectuadas [34][35][36]. Las uvas son particularmente ricas en polifenoles bioactivos, especialmente flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavanoles), estilbenos y ácidos fenólicos [37]. En particular y con respecto a la familia de estilbenos, la fitoalexina trans-resveratrol se sintetiza como respuesta a diversas formas de estrés biótico y abiótico, tales como infección fúngica (*Botrytis cinerea*, *Plasmopara vitícola*, etc.), daño a los tejidos vegetales, heladas, iones de metales pesados, etc. El trans-resveratrol y su glucósido trans-piceido constituyen los precursores biosintéticos de diversos polifenoles bioactivos, tales como los pterostilbenos [38], α - y ϵ -viniferin [39].

Los polifenoles exhiben una amplia gama de efectos biológicos y fisiológicos tales como antialérgicos, antiarterogénicos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antioxidantes, antimicrobianos (antiviral, antibacteriano, antifúngico), y moduladores de diversos sistemas enzimáticos. Con respecto a los efectos saludables sobre el organismo derivado de la ingesta de compuestos fenólicos de origen vínico destacar su actividad como anticancerígeno, cardioprotector, dermatoprotector, hepatoprotector y neuroprotector [40].

La capacidad antioxidante que presentan estos compuestos les permite prevenir y/o inhibir los procesos oxidativos y bloquear la incidencia-ataque de radicales libres, tanto en los alimentos como en el cuerpo humano [41]. Los efectos beneficiosos para la salud humana se han demostrado en estudios experimentales sobre la oxidación del colesterol LDL, agregación de plaquetas, y sobre las enfermedades cardiovasculares [42][43][44]. Así, existen distintos estudios sobre resveratrol y otros polifenoles del vino que intervienen en la prevención de enfermedades cardiovasculares, gracias al hallazgo epidemiológico conocido como “la paradoja francesa”, que ha demostrado la correlación inversa entre el consumo de vino tinto y las incidencias de enfermedades cardiovasculares [45][46]. Además,

el trans-resveratrol presenta propiedades anticancerígenas significativas [47], antiinflamatorias, antibacterianas [48] y fitoestrógenas [49].

El interés de los compuestos fenólicos, no sólo viene determinado por los efectos fisiológicos saludables vinculados a su consumo, sino que también se relaciona con su influencia directa en las características organolépticas del producto. En el campo de la alimentación, la incorporación de compuestos fenólicos como ingredientes funcionales contribuye al color, sabor, aroma y estabilidad oxidativa del producto [28]. Concretamente, los antocianos se utilizan como colorantes alimentarios naturales dada su elevada solubilidad en agua y la amplia gama de colores que pueden proporcionar en función del pH del alimento [50][51][52]. Así mismo y con el fin de reducir el posible riesgo de toxicidad, son numerosos los estudios que promueven la sustitución de compuestos de síntesis por compuestos fenólicos de residuos de origen vegetal como antioxidantes naturales[36][41]y también como compuestos antimicrobianos [53][54][55][56].

Con respecto a las propiedades antifúngicas y antibacterianas de los compuestos polifenólicos, se sabe que su toxicidad en microorganismos se atribuye a la inhibición enzimática por oxidación de compuestos. Existen en la naturaleza microorganismos fúngicos que resultan patógenos contra los cultivos y que generan enormes daños a las cosechas. La investigación y desarrollo de productos biológicos de origen natural es de gran interés para restar los efectos negativos generados por los sistemas tradicionales de producción agrícola contra los patógenos que afectan a los cultivos. El uso y la aplicación de fitoquímicos bioactivos con propiedades antifúngicas representan una alternativa atractiva y eficiente para inhibir el crecimiento de varios patógenos fúngicos. Estos compuestos bioactivos se producen naturalmente en las plantas como metabolitos secundarios, los principales grupos con actividad antifúngica son los terpenos, taninos, flavonoides, aceites esenciales, alcaloides, lecitina y polipéptidos [57]. Los compuestos bioactivos de origen natural son biodegradables y seguros para su uso como una alternativa para el control de la enfermedad en una sistema de producción tradicional [58][59]. Y en relación con los compuestos bioactivos de origen vínico, dentro de la gran familia que son los polifenoles, podemos destacar como compuestos con evidenciada actividad

antifúngica los estilbenos como el resveratrol y flavonoides como los taninos (condensados o proantocianidinas e hidrolizables). Varios autores han demostrado la actividad biológica de algunos estilbenos como el resveratrol contra la *Botrytis cinerea* [60][61]. Así también, algunos autores han evidenciado la eficacia del resveratrol encapsulado en distintas matrices como antifúngico [62]. Así mismo, existen diversos estudios donde se ha investigado la actividad antifúngicas de taninos de origen vegetal[63].

Hasta ahora, las investigaciones de la evaluación de la composición fitoquímica y la actividad biológica de los residuos de vinificación se ha centrado principalmente en las semillas de uva, en los hollejos y la pulpa. Sin embargo, la información disponible sobre la composición y actividad biológica del raspón de uva sigue siendo escasa pese a que también albergan un importante contenido y amplia gama de polifenoles [64]. Esto es debido, en parte, a que este material no se consideró un residuo directo del proceso industrial (vinificación) sino como residuo indirecto de la actividad vinícola [65]. Los datos disponibles sobre la composición fitoquímica del raspón (*Vitis vinifera* L.) han evidenciado su contenido en flavan-3-ols [55], principalmente flavonoides y estilbenos, lo que pone de manifiesto propiedades antioxidantes significativas [22][66][67][68][24]. Algunas investigaciones relacionadas con lo anteriormente expuesto se han centrado en las propiedades antimicrobianas del raspón de la uva contra patógenos alimentarios [69]. Además, el raspón de uva representa una fuente rica en fibra dietética cuya ingesta tiene numerosos beneficios para la salud [70]. Algunos de estos beneficios están asociados con la protección frente al cáncer a nivel del sistema gastrointestinal, regulación del tránsito intestinal, la prevención de la obesidad, la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y el control / prevención de la diabetes.

2.3. Tecnologías de extracción de compuestos bioactivos

2.3.1. Procesos de extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y, entre otros fines, se aplica en la

recuperación de ciertos compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales [71]. En las últimas décadas, ha adquirido un papel determinante en el aislamiento de compuestos fenólicos de origen vegetal para su posterior utilización en la preparación de suplementos dietéticos o nutracéuticos, ingredientes funcionales y/o aditivos para productos alimentarios, farmacéuticos o cosméticos [72].

Los disolventes más utilizados para recuperar polifenoles son metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y mezclas [73]. Otros estudios evidencian que el agua es un buen disolvente para estos compuestos en relación a los solventes orgánicos. En los diferentes casos descritos en la bibliografía las proporciones de solvente - agua son muy variables pero tienen tendencia a estar en torno al 50% de solvente y 50% de agua [74]. Se está tendiendo al desarrollo de metodologías que utilizan disolventes biodegradables y/o no tóxicos tales como el agua y el etanol, en consonancia con el concepto "Green Chemistry"[75]. Así, Pérez-Serradilla et al., 2011[76]recuperaron compuestos bioactivos de residuos vínicos usando mezclas de etanol y agua. La acetona y el metanol también se usaron para la recuperación de polifenoles a partir de este mismo tipo de subproductos[77].

Un amplio espectro de la extracción convencional sólido-líquido (SLE) se ocupa del aislamiento/obtención de productos naturales procedentes de plantas y microorganismos. Los métodos tradicionales incluyen extracción Soxhlet, maceración, percolación, etc. Estas técnicas requieren mucho tiempo y emplear grandes cantidades de solventes.

La extracción sólido-líquido es un proceso de transferencia de materia mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Dicho mecanismo tiene lugar en dos etapas: una primera de lavado, en la que se produce una rápida transferencia del compuesto/s objetivo desde la superficie del sólido al disolvente; y una segunda etapa de transferencia de materia desde el interior del sólido mediante difusión [78]. En la mayoría de sistemas de extracción de la industria alimentaria, se asume que la segunda etapa es el paso limitante del proceso [72], debido a la resistencia natural que ofrece la fase sólida (a menudo tejidos de origen vegetal) a la transferencia de materia y/o penetración de

líquidos [79]. Como consecuencia el proceso es más lento, menos eficiente y requiere una mayor demanda energética y un mayor consumo de disolvente, haciendo ello menos interesante su uso a escala industrial [80][81]. Además, el proceso de extracción sólido-líquido es una operación heterogénea y multicomponente, para la que no existe una metodología universal capaz de recuperar todos los compuestos bioactivos de interés [28] y cuyo rendimiento es función de las condiciones experimentales y del material de partida [82].

2.3.2. Tecnologías no convencionales

Las tecnologías no convencionales basadas en la intensificación están atrayendo el interés de las industrias alimentarias debido a su gran potencial para recuperar de manera eficiente, sostenible y económica compuestos bioactivos presentes en los tejidos de origen vegetal empleando menos energía y reemplazando así los métodos convencionales de procesamiento [83][84]. Como ya se ha descrito, la extracción con disolventes convencionales es la técnica aplicada más extendida a escala industrial para extraer compuestos bioactivos de matrices de plantas entre diferentes fases. Sin embargo, estos métodos tradicionales se basan principalmente en procesos de calentamiento que, aunque facilitan la transferencia de materia entre las diferentes fases del sistema y la solubilidad de los compuestos, consumen mucha energía y pueden provocar la degradación de los compuestos termolábiles [85], conllevan mucho tiempo, de gran importancia a nivel industrial y consumen grandes cantidades de solventes orgánicos, lo que supone también unos costes mayores en las etapas de separación y purificación de los extractos. Entre las técnicas empleadas para la extracción de polifenoles de matrices naturales de forma rápida y eficiente cabe mencionar la extracción asistida por microondas (MAE)[86]o con ultrasonidos de potencia (UAE)[87], la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción acelerada con disolventes presurizados (PSE), entre otras [88]. Estas metodologías se caracterizan por acortar el tiempo de extracción, reducir el consumo de disolvente y energía, mejorar la calidad de los extractos e incrementar el rendimiento, produciendo una intensificación del proceso de extracción [89][90][91].

Tanto la MAE como la UAE han sido utilizados principalmente a escala de laboratorio, sin embargo, para ambos ya se han encontrado aplicaciones a escala industrial[92]. Un ejemplo de ello es la extracción de aceites de origen vegetal, germen de soja y una microalga marina cultivada rica en ácido docosahexaenoico (DHA) y, en comparación con los métodos convencionales, se han conseguido tiempos de extracción hasta 10 veces menores y los rendimientos que aumentaron entre un 50-500%. La mayoría de las técnicas antes mencionadas se ha empleado específicamente en la recuperación de polifenoles a partir de desechos y/o subproductos de la industria vitivinícola (Tabla 1).

Tabla 1.- Comparativa métodos no convencionales de extracción de compuestos bioactivos

[85]

Main results published on the application of non-conventional technologies to improve the extraction processes of valuable compounds from winery wastes and by-products.				
Matrix	Extracted compounds	Treatment conditions	Extraction improvement	Reference
Pulsed Electric Fields (PEF)				
Wine grape	Polyphenols	1) 0.5 kV/cm, 50 pulses, 0.1 kJ/kg 2) 2.4 kV/cm, 50 pulses 2.3 kJ/kg	1) 13% 2) 28%	(Balasa et al., 2006)
Wine grape	Anthocyanins	3 kV/cm, 50 pulses	3-fold increase	(Tedjo et al., 2002)
Cabernet Franc grapes	Anthocyanins and tannins	0.8–5 kV/cm, 1–100 ms, 42–53 kJ/kg	51–62% (PEF) versus 20% (conventional)	(El Darra, Grimi, Maroun, et al., 2013)
Cabernet Franc (CF) and Cabernet Sauvignon (CS) grapes	Anthocyanins and total polyphenols	5 kV/cm, 1 ms, 48 kJ/kg	Increased anthocyanin content (from 87 to 172 mg/L for CF and from 168 to 269 mg/L for CS grapes)	(El Darra, Grimi, Vorobiev, Maroun, et al., 2013)
Grape pomace	Polyphenols	1.2 kV/cm, 18 kJ/kg	Increased extraction yields depending on the temperature used	(Brianceau et al., 2015)
Cabernet Sauvignon grape	Polyphenols	1) 0.7 kV/cm, 200 ms, 31 Wh/kg 2) 4 kV/cm, 1 ms, 4 Wh/kg	1) 34% more tannins 2) 19% more anthocyanin	(Delsart et al., 2013)
Merlot grape	Polyphenols	500–700 V/cm, and 40–100 ms	Increased extraction yields	(Delsart et al., 2012)
Grape pomace	Anthocyanins	13.3 kV/cm, 0–564 kJ/kg	22% and 55% more than USN and HVED, respectively	(Barba, Brianceau, et al., 2015)
Vine shoots	Polyphenols and proteins	13.3 kV/cm, 0–1500 pulses, 50 °C, 50–762 kJ/kg/3 h diffusion	Up to 2-fold increase in total polyphenols compared to untreated. Kaempferol (0.156 mg/g), epicatechin (1.747 mg/g), resveratrol (0.032 mg/g).	(Rajha, Boussetta, et al., 2014)
High Voltage Electrical Discharges (HVED)				
Grape pomace	Polyphenols	40 kV	7-fold increase	(Boussetta et al., 2012)
	Polyphenols and anthocyanins	40 kV	HVED more energy efficient to recover polyphenols compared to PEF and USN	(Barba, Brianceau, et al., 2015)
Grape seeds	Polyphenols	40 kV	HVED + supplementary ethanol extraction yielded to 9 g GAE/100 g DM	(Boussetta et al., 2013)
Vine shoots	Polyphenols	40 kV/50 °C/10–240 kJ/kg/3 h diffusion	Up to 3-fold increase in total polyphenols compared to untreated. Kaempferol (0.213 mg/g), epicatechin (2.459 mg/g), resveratrol (0.414 mg/g). More energy efficient extraction compared to USN and PEF.	(Rajha, Boussetta, et al., 2014)

Ultrasounds (USN)					
Grapes (Campbell and Gerbong varieties)	Resveratrol	47 kHz, 14 W/l, 60 °C, 30 min	24–28% compared to conventional solvent extraction	(Cho et al., 2006)	
Cabernet Franc (CF) grapes	Polyphenols (anthocyanins and tannins)	24 kHz, 5–15 min, 121–363 kJ/kg	7%	(El Darra, Grimi, Maroun, et al., 2013)	
Grape by-products	Polyphenols	35 kHz, 70 °C, 1 min	50%	(Corrales, Butz, & Tauscher, 2008; Corrales, Toepfl, et al., 2008)	
Red grape marc	Polyphenols	24 kHz, 20–75 W/ml	11–35%	(Vilkhu et al., 2008)	
Grape seeds	Polyphenols	20 kHz, 50–150 W, 30 °C, 30 min	Similar extraction (14 g/100 g) compared to solvent Soxhlet extraction but reduced time	(Da Porto et al., 2013)	
Vine shoots	Polyphenols and proteins	24 kHz, 400 W, 50 °C, 3 h diffusion (1010–3428 kJ/kg)	Up to 45% yield increase in total polyphenols. Kaempferol (0.097 mg/g), epicatechin (0.671 mg/g), resveratrol (0.024 mg/g).	(Rajha, Boussetta, et al., 2014)	
Microwave Assisted Extraction (MAE)					
Grape skins	Anthocyanins	100–500 W, 50–100 °C, 5–20 min solvent (50–80% methanol in water)	Reduced extraction time from 5 h to 5 min under the optimum conditions (2 g of sample, 500 W, 100 °C, 40% methanol in water as extraction solvent) compared to conventional extraction. And extraction of three additional acyl derivatives	(Liazid et al., 2011)	
Grape peel	Polyphenols	100–540 W, 3–10 min, 0–50, solvent (0–50% Ethanol in water)	Optimum extraction of polyphenols after MW (540 W, 3 min), 50% ethanol and 1 g grape skin	(Yu et al., 2014)	
Grape juice	Polyphenols	2.45 GHz, 900 W, 20 min	Improvement in the extraction of polyphenols in the extracted juice.	(Bittar et al., 2013)	
Subcritical Fluid Extraction (SbFE)					
Grape skins	Anthocyanins	100–130 bar, 30–40 °C, pH of 2–4, 25–30% ethanol, 25–50 ml/min CO ₂ flow, and 3–10% extract flow ratio	85%	(Bleve et al., 2008)	
White grape seeds	Polyphenols	1 ml/min CO ₂ flow rate, 20 min extraction, 35–55 °C, organic modifier density (0.85–0.95 g/ml), modifier (ethanol-methanol: 10–40).	Improved recovery of gallic acid, catechin, and epicatechin	(Palma and Taylor, 1999)	
Supercritical Fluid Extraction (SFE)					
Grape skin <i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol	80–110 bar, 40 °C, ethanol concentration (5–15%), and extraction time (5–25 min)	Resveratrol completely recovered (100%) under optimum extraction conditions 110 bar, 40 °C, 7.5% ethanol, and extraction time of 15 min	(Pascual-Marti et al., 2001)	
High Pressure Processing (HP)					
Grape seeds, stems, skin and pomace from Palomino fino variety	Resveratrol	100–400 bar/35–55 °C, and the addition of modifier (5% (v/v) of ethanol	Recovery of 49.1 mg/100 g dry sample after 400 bar/35 °C and 5% (v/v) of ethanol as co-solvent	(Casas et al., 2010)	
Grape seeds	Polyphenols	Pure carbon dioxide or modified with 2, 5, 10, and 15% volume of co-solvent	Increased extraction yield depending on the CO ₂ pressure and the % of ethanol.	(Murga et al., 2000)	
Grape by-products	Anthocyanin	600 MPa, 70 °C, 60 min/solvent (50–50% ethanol in water)	41%	(Corrales, Toepfl, et al., 2008)	
	Anthocyanin	200–600 MPa, 20–70 °C, 30–90 min, solvent (20–80%; 100–0% ethanol in water)	22–83%	(Corrales et al., 2009)	
Grape seeds and skins	Polyphenols		Yields of total polyphenols, o-diphenols and flavonoids, for both seeds (108.3, 47 mg GAE/g dry weight (DW), 47.2 mg CE/g DW) and skins (34.2, 10.1 mg GAE/g DW, 21.6 mg CE/g DW), respectively	(Casazza, Aliakbarian, Mantegna, et al., 2010; Casazza et al., 2012)	
Grape skins	Polyphenols	30–150 °C, 15–330 min	Highest total phenolic compound (60.7 mg GAE) and total flavonoid (15.1 mg CE) yields were obtained at 150 °C during 270 min and 15 min, respectively. Gallic acid (163.2 mg/100 g), protocatechuic acid (69.9 mg/100 g), catechin (420 mg/100 g), vanillic acid (20.6 mg/100 g), syringic acid (603 mg/100 g), coumaric acid (20.1 mg/100 g), trans-resveratrol (42.4 mg/100 g), and quercetin (117.1 mg/100 g) were the predominant polyphenols present in the extracts.	(Casazza et al., 2012)	
Accelerated Solvent Extraction (ASE)					
Grape skins (St. Laurent and Alibernet varieties)	Polyphenols, anthocyanins	150 bar, 40–120 °C	Improved recovery	(Stavikova et al., 2011)	
Grape pomace	Polyphenols, anthocyanins, and tannins	103 bar, 50–200 °C, 5–30 min	Polyphenol extraction yield was significantly decreased when temperatures higher than 100 °C were used at longer extraction times.	(Vergara-Salinas et al., 2013)	
Grape pomace	Polyphenols	60–140 °C, % Ethanol/water (30:70; 70:30, v/v)	A significant increase in polyphenol recovery yield for both wet (16.2 g GAE/100 g DM) and dry (7.28 g GAE/100 g DM) grape pomace extracts when a mixture of ethanol/water at 70% was used at 140 °C.	(Rajha, Ziegler, et al., 2014)	
Extraction assisted by hydrotropic solvents					
Vine shoots	Polyphenols	β-cyclodextrin (β-CD) concentration (13.82–40 mg/ml), 33.18–66.82 °C, 0.30–6.19 h	Polyphenol recovery yield of 5.8 mg of GAE/g of dry matter under the optimal β-CD-assisted extraction conditions (37.7 mg/ml β-CD, at 66.6 °C during 4.8 h)	(Rajha, Chacar, et al., 2015)	

Concretamente, para el raspón de la uva algunos estudios han puesto a punto un protocolo de extracción óptimo, rápido y seguro para estilbenos utilizando la extracción asistida por microondas (MAE). Este nuevo método permitió extraer

estilbenos en solo 5 minutos, a 125°C y con un 80% de etanol en el solvente de extracción, lo que permitió un incremento del rendimiento del 34 y 32% para trans-resveratrol y ϵ -viniferin respectivamente con respecto a la extracción convencional (a 75°C, con un 80% etanol y 15 minutos) [93]. Con la tecnología ultrasonidos (UAE), se ha optimizado un nuevo método para la extracción de estilbenoides del raspón, donde la mayor recuperación se alcanzó en 15 min, a 75 °C y un 80% etanol como solvente para la extracción, lo que permitió un incremento en la recuperación de trans-resveratrol en un 23% con respecto a la convencional (solvente etanol-agua 80:20 v/v, durante 5 minutos) [94]. Así también, la aplicación de descargas eléctricas de alta intensidad (HVED) permitió mejorar significativamente la extracción de flavan-3-oles y flavonoles del raspón. El procedimiento propuesto, 4 ms en medio pH = 2.5 con 50% etanol, permitió la liberación de casi un 35% de compuestos fenólicos (21% flavan-3-oles y 12% flavonoles) en comparación con la extracción hidroalcohólicas convencional (20°C con 50% etanol como solvente durante 120 minutos)[95].

2.3.2.1. Tecnología microondas: fundamentos y aplicaciones

Entre todas estas técnicas no convencionales anteriormente descritas (Tabla 1), se ha encontrado que la extracción asistida por microondas (MAE) proporciona buenos resultados y se presenta como una de las técnicas más eficaces para la recuperación de antioxidantes de la uva [96].

Las microondas (MW) son una forma no ionizante de energía electromagnética con frecuencias que van desde 300MHz a 300 GHz (Figura 5). Esta energía se transmite en forma de ondas que penetran en la materia e interactúa con las moléculas polares para generar calor. La energía de microondas actúa directamente sobre las moléculas por conducción iónica y rotación de dipolos y, por lo tanto, solo los materiales polares se pueden calentar en función de su constante dieléctrica.

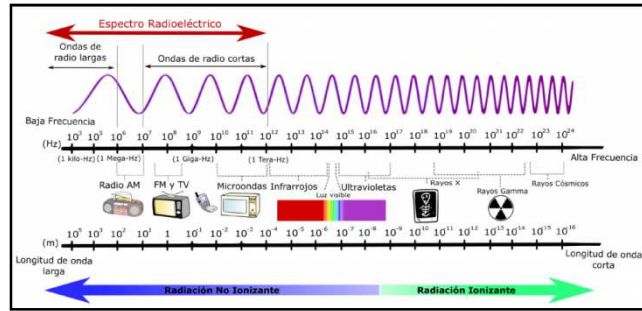


Figura 5.- Espectro electromagnético de la radiación

El calentamiento con microondas es causado por la interacción del campo eléctrico de radiación con la materia de manera que va a influir en el comportamiento molecular de la materia, como la rotación de dipolos o la migración de iones.

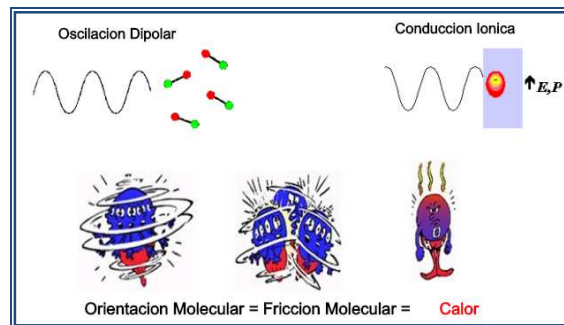


Figura 6.- Comportamiento molecular con MW (rotación de dipolos y conducción iónica)

Las principales variables que rigen un proceso MAE son el tiempo, la temperatura y la composición sólido-líquido además del tipo y la naturaleza del disolvente utilizado[97]. En este contexto, la extracción asistida por microondas se ha utilizado ampliamente para mejorar la extracción de compuestos activos de muchas matrices vegetales [98][99]. Sus principales ventajas frente a los métodos convencionales, son velocidades de calentamiento rápidas, tiempos cortos de extracción, proceso limpio de calentamiento que no genera desechos secundarios y la reducción del uso de disolventes orgánicos [93]. El mayor rendimiento de extracción de compuestos orgánicos obtenidos al utilizar microondas se atribuye a la rotación dipolar de las moléculas y al calentamiento generado en el solvente causado por esta radiación electromagnética [100].

Esto es debido a que la radiación MW sobre una muestra provoca que sus moléculas vibren y ocurra fricción entre ellas generando calor desde el interior. El calentamiento por MW es un proceso in situ de transferencia de energía electromagnética a energía térmica, con una velocidad de calentamiento rápida si la energía electromagnética es absorbida de manera eficiente por la materia. Como el mecanismo no depende de la conductividad térmica de los materiales de los recipientes, el resultado es el calentamiento instantáneo y localizado de cualquier sustancia que reaccione ante la polarización dipolar y/o la conductividad térmica, los dos mecanismos fundamentales de la transferencia energética por microondas a las sustancias que están siendo calentadas[101]. Se puede decir que las microondas calientan toda la muestra de forma simultánea (Figura 7).

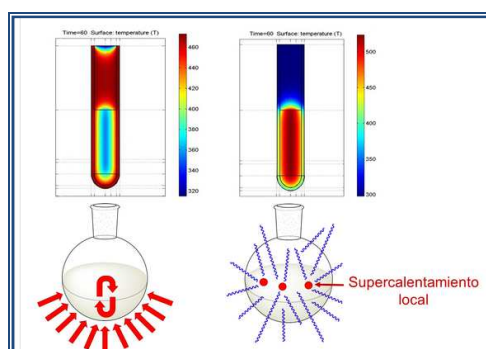


Figura 7.- Diferencia entre la calefacción convencional y por microondas

La ventaja del calentamiento con microondas es la ruptura de los enlaces débiles de hidrógeno que se liberan al medio reduciéndolo, este mecanismo afecta a la rotación molecular. La migración de los iones disueltos aumenta la penetración de disolventes en la matriz y por lo tanto la liberación de analito [87].

Se ha demostrado cómo la radiación de microondas, reduce las limitaciones de transferencia de materia interna mejorando el rendimiento logrado con MAE [102][62]. Esto es debido al doble efecto de la energía MW; por un lado, la irradiación mejora la lisis celular de materiales con grandes cantidades de agua debido al rápido calentamiento y evaporación del agua intracelular; y por otro, un efecto no térmico aparece como resultado de la alteración de los campos dieléctricos que podría proporcionar una ruptura de los enlaces de hidrógeno de las macromoléculas, rompiendo su estructura [86]. En cuanto a la extracción de

polifenoles de uva, la MAE permite obtener en tan solo 10min el doble de la cantidad de polifenoles que se extrae en 3h mediante una extracción convencional sólido-líquido [103]. Además, el aumento de la antocianina es notable: el 17.6% más de estos compuestos activos se obtienen por extracción de microondas [97].

A pesar de todo ello, esta técnica presenta serias limitaciones de escalabilidad. La principal desventaja de MAE es su baja profundidad de penetración (no es posible irradiar uniformemente un recipiente grande); por ejemplo para una frecuencia de 2.45 GHz y la mezcla de orujo de uva y disolvente, la penetración es de aproximadamente 2 cm [104][105]. La alternativa para aumentar la profundidad de penetración es usar una frecuencia mayor, lo que implicará la contraproducente degradación de los compuestos derivado del efecto térmico.

Por ello, una solución eficaz es utilizar las MW durante un tiempo de tratamiento eficaz y corto que permita que la irradiación de la materia sea homogénea (bajo tiempo de residencia) y que la cantidad de energía absorbida sea suficiente pero en condiciones más suaves que para la MAE evitando así la degradación de los compuestos activos [106]. Así lo han demostrado estudios recientes donde se empleó el pre-tratamiento con MW en uvas como un paso previo a la extracción convencional alcanzando tiempos de residencia bajos (por debajo de 120s) con un rendimiento en la extracción fue del 32% y del 85% para polifenoles y antocianinas con respecto a las técnicas convencionales [104]. Así mismo se usaron las (MW) como pre-tratamiento previo a la extracción convencional para aumentar el rendimiento de la extracción de antocianinas en lías, logrando un incremento del rendimiento del 50% con respecto a la extracción convencional, y logrando disminuir el tiempo de tratamiento de 15 a 5 minutos [107].

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La revalorización de uno de los subproductos generados por la industria vitivinícola menos estudiados y valorados, el raspón de la uva, constituye una necesidad desde el punto de vista económico y ambiental así como una gran oportunidad de recuperar compuestos bioactivos de interés presentes en esta matriz (antioxidantes

naturales, particularmente estilbenos y flavonoides) con buenas propiedades como antioxidantes y agentes antimicrobianos naturales, cuya existencia ya ha sido probada en diferentes investigaciones. Así, tecnologías no convencionales como el MW ofrece importantes ventajas frente a las tecnologías convencionales que permite mejorar el rendimiento de extracción de estos compuestos. Por ello, se ha demostrado que la aplicación de un MW eficaz y con un corto tiempo de tratamiento permite el reemplazo de las técnicas de extracción convencional o bien puede establecerse como método de pre-tratamiento a éste, facilitando la recuperación de los compuestos de interés.

El objetivo general del presente trabajo se ha centrado en evaluar el efecto del pre-tratamiento con microondas como etapa previa a la extracción sólido-líquido convencional, con el fin de mejorar el rendimiento de extracción de compuestos polifenólicos (estilbenos y flavonoides principalmente) presentes en el raspón de la uva para su aplicación potencial como antioxidantes y antifúngicos de origen natural. Así mismo se optimizarán las variables de extracción (tiempo de tratamiento, temperatura, composición del solvente, etc) permitiendo incrementar la recuperación de los mismos con respecto a las técnicas de extracción convencional.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de la composición y perfil fenólico de los extractos obtenidos del raspón de uva (*Vitis vinífera* L.) de variedad tempranillo.
- Estudio y optimización de las variables que rigen los procesos de extracción convencional de compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides) presentes en el raspón de la uva (relación sólido-líquido, composición del solvente y temperatura)
- Estudio del efecto de la tecnología microondas en la extracción de compuestos fenólicos del raspón de la uva (contenido en polifenoles totales (TPC) y contenido en flavonoides totales (TFC).

- Optimización del protocolo de extracción sólido-líquido convencional con pre-tratamiento con MW.
- Estudio de la capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos obtenidos y ensayos in vitro para el estudio de la capacidad antifúngica sobre hongos fitopatógenos (*Botrytis cinérea*) y su comparación frente a un tanino ya comercializado con actividad antioxidante y antioxidásica.

Para la consecución de los diferentes objetivos establecidos se definió el siguiente plan de trabajo:

1.- Revisión bibliográfica y estado del arte de la técnica.

Se ha realizado una amplia revisión bibliográfica con el fin de conocer las características y el potencial de la recuperación de los compuestos bioactivos de interés presentes en el raspón de la uva. Así mismo se han evaluado las distintas técnicas de extracción disponibles así como la viabilidad del empleo de las mismas para la recuperación de compuestos bioactivos presentes en el raspón de la uva para su posterior aplicación en el campo de la alimentación, la cosmética y la parafarmacia.

2.- Puesta a punto de un protocolo de extracción de compuestos bioactivos de interés del raspón.

En primer lugar, se han realizado distintas experiencias enfocadas a estudiar y seleccionar las variables más favorables que rigen la cinética del proceso de extracción de los compuestos fenólicos a través de técnicas convencionales sólido-líquido. Las variables de operación estudiadas son la relación sólido-líquido (g soluto/mL solvente), la composición del solvente (%) y la temperatura (°C)

Por otro lado, se ha realizado un diseño de experimentos enfocado a la evaluación de la tecnología MW como pre-tratamiento al proceso de extracción sólido-líquido con el fin de mejorar la eficiencia, rentabilidad y sostenibilidad del proceso, con respecto a los métodos de extracción convencionales. Así, se han determinado las condiciones óptimas de operación a emplear en el pre-tratamiento MW para la

extracción de compuestos fenólicos a partir del raspón. Y, en base a las condiciones óptimas ya establecidas tanto para el pre-tratamiento con MW como para el proceso de extracción sólido-líquido, se ha evaluado el rendimiento de ambos procesos en base al TPC y TFC.

3.- Caracterización de extractos

Los extractos obtenidos en las diferentes experiencias se han caracterizado para evaluar el rendimiento de la extracción alcanzada en cada uno de los casos en base a los valores de TPC y TFC. Así también, se han identificado y cuantificado por HPLC los compuestos polifenólicos presentes en los extractos obtenidos en los experimentos de extracción convencional S-L y con pre-tratamiento con MW.

4.- Estudio de la capacidad antioxidante (ORAC) y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos a partir del raspón de la uva.

Se ha llevado a cabo la evaluación del poder antioxidantes de los extractos obtenidos en los distintos ensayos a través de la medida de la capacidad antioxidante (ORAC).

Así mismo se ha realizado un estudio in vitro para estudiar las propiedades antifúngicas de los extractos del raspón con el fin de probar sus posibles aplicaciones como agente protector frente a la aparición y desarrollo de la Botrytis cinérea, enfermedad de gran importancia para el sector vitivinícola. Además se ha comparado con un producto comercial con actividad antibotrytica comercialmente desarrollado para los problemas de la uva.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materia prima

Los raspones de la uva, variedad tempranillo, fueron proporcionados por Bodega Matarromera (Valbuena de Duero, Valladolid) durante la campaña 2017 tras la etapa de despalillado-estrujado de los racimos.

Los raspones se secaron al aire/sol y posteriormente, para asegurar que el secado fuera completo, se metió en el horno a una temperatura de 65°C durante 24 horas (Figura 7). Posteriormente se trituraron con ayuda de un picador manual (A320R1, Moulinex) y se obtuvo una fracción de materia de fragmentos de entre 3-6 mm aproximadamente (Figura 8) y se almacenó a temperatura ambiente y protegidos de la luz (Figura 8)



Figura 7.- Detalle del raspón fresco y seco

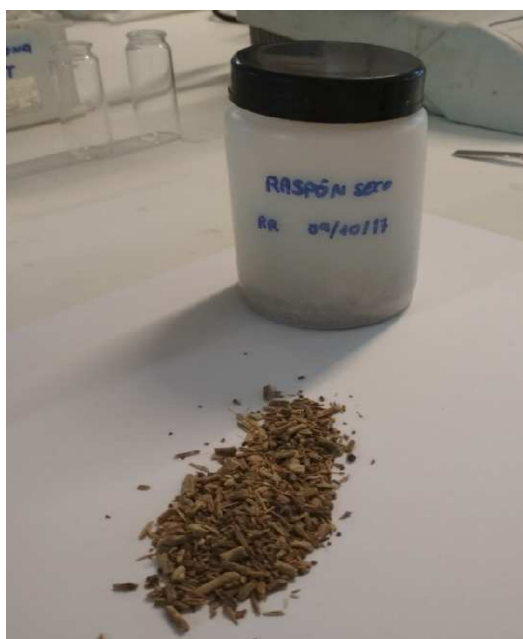


Figura 8.- Detalle de la materia prima: raspón triturado

4.2. Reactivos

Para llevar a cabo las distintas extracciones (S-L convencional y MW) se han empleado son mezclas hidroalcohólicas (etanol absoluto parcialmente

desnaturalizado (Sigma-Aldrich) y agua acidificada (pH=3) con ácido sulfúrico (96% v/v, Sigma-Aldrich).

Para la determinación del contenido en polifenoles totales (TPC) se utilizó: reactivo de Folin-Ciocalteu (Fluka), carbonato sódico anhidro (purificado, 99%; de Sigma-Aldrich), ácido gálico ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich) y agua (Milli-Q®Integral).

Para la determinación del contenido en flavonoles totales (TFC) se utilizó: nitrato de sodio (Sigma-Aldrich), cloruro de aluminio (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich) y agua (Milli-Q®Integral).

Para la determinación de taninos condensados se empleó: ácido clorhídrico (37% Sigma-Aldrich).

Para la caracterización por HPLC de azúcares totales: Agua Milli-Q®Integral), ácido sulfúrico 0.01 N (Sigma-Aldrich).

Para la caracterización por HPLC se ha empleado ácido fórmico 98% PA-ACS, Panreac® (Barcelona, Spain), Acetonitrilo uso HPLC Plus Gradient-ACS+Reag. Ph. Eur.-Reac. . USP. Carlo Erba (Val de Reuil, France) y agua Milli-Q® water (Milli-Q® Integral).

Los reactivos empleados para determinar la capacidad antioxidante son: 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico [Trolox] (Sigma-Aldrich), 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride [AAPH] (Sigma-Aldrich), Fluoresceína sódica (Sigma-Aldrich) y Fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich).

Para el estudio de inhibición fúngica se empleó agar de extracto de malta (Panreac), agua destilada y el tanino comercial Tan Antibotrytis (Enartis).

4.3. Métodos de extracción

A continuación se describen las distintas técnicas de extracción que se han empleado en el presente proyecto de investigación:

4.3.1. Extracción sólido-líquido convencional (E_{S-L})

Las extracciones convencionales S-L se realizaron poniendo en contacto el disolvente deseado con 7 gramos de raspón seco (Figura 9). Parámetros como la relación sólido-líquido R_{S-L} (0.1, 0.07 y 0.04 g/mL), tipo de solvente (etanol y mezclas

hidroalcohólicas que varían el % de etanol en 20, 50 y 80%) y temperatura (25, 50 y 75°C) se estudiaron para seleccionar las mejores condiciones para la extracción de los compuestos de interés. Se han mantuvieron constantes algunos parámetros como la velocidad de agitación (300 rpm), el pH (3) y el tiempo de extracción (60 minutos). Se recogieron alícuotas cada 5 minutos. Se midieron las concentraciones de polifenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC) de cada muestra para construir la curva de extracción cinética en diferentes condiciones. Las extracciones convencionales de S-L se realizaron por duplicado expresando los resultados como valor medio +/- desviación estándar (SD) y los datos se analizaron mediante la prueba de t-Student para ver las diferencias entre las distintas condiciones (muestras no pareadas, varianzas desiguales) con un valor de p de significación de 0.05.



Figura 9.- Detalle extracción S-L en placas calefactoras con termómetro y agitación (Fisherbrand)

4.3.2. Pre-tratamiento con MW

Los pre-tratamientos se han llevado a cabo en un microondas de laboratorio (CEM Discovery One Microwave (CEM Corp.) con software integrado Discovery (Figura 10), con una eficacia del 70% en la conversión de la potencia eléctrica a potencia

del microondas (potencia máxima 300W). La potencia se fijó en 300 W ya que se ha encontrado que los niveles de energía no tienen un efecto significativo en la extracción de los compuestos de interés [108].



Figura 10.- Detalle microondas CEM

En el matraz del equipo se introduce la muestra (7.5 g raspón) y una cantidad específica de disolvente para alcanzar el R_{S-L} deseado. La mezcla se homogeneizó antes de la irradiación con MW. Se estudiaron los tres parámetros principales que rigen en los pre-tratamientos: R_{S-L} (0.5, 0.3 y 0.1 g / ml), mezcla de solventes (mezclas hidroalcohólicas que varían el porcentaje de agua en 80, 50 y 20%) y tiempo de aplicación de microondas (30, 60 y 90 s).

La temperatura de cada experimento ha sido estimada a partir de la ecuación de estado de Peng-Robinson (Ec. 1), a partir de la presión alcanzada en el interior del matraz.

$$P = \frac{RT}{V - b} - \frac{a(T)}{V(V + b) + b(V - B)}$$

(Ecuación 1)

Cuando se completó el pre-tratamiento MW, el recipiente se enfrió en un baño de agua y hielo y posteriormente se llevó a cabo la extracción S-L convencional en las condiciones favorables experimentalmente determinadas. El tiempo de extracción será de 30 minutos, durante los cuales se recogerá una alícuota cada 5 minutos. Las

alícuotas recogidas son centrifugadas y almacenadas en el congelador para su posterior caracterización.

Se realizó un diseño estadístico de superficie de respuesta utilizando el software Statgraphics® Centurion XVII para obtener las condiciones óptimas para maximizar la eficiencia del proceso de extracción y el contenido en compuestos de interés de los extractos obtenidos. Se aplicó un diseño estadístico de superficie de respuesta tipo **Box-Behnken** (CCD). El diseño de Box-Behnken tiene combinaciones de tratamiento que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental y requieren al menos tres factores continuos. La Figura 11 muestra un diseño de Box-Behnken de tres factores. Los puntos del diagrama representan las corridas experimentales que se realizan:

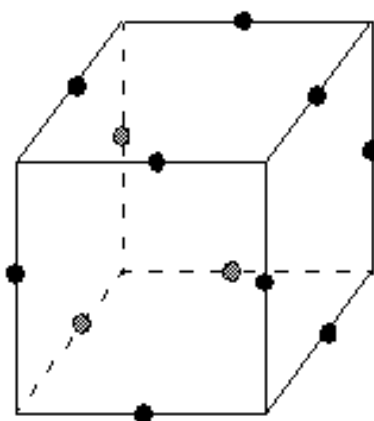


Figura 11.- Diagrama diseño Box-Behnken

Para verificar la reproducibilidad, se hizo un triplicado del punto central. Se emplearon tres variables con tres niveles de respuesta (-1, 0, 1) y un triplicado del punto central. Estos tres niveles corresponden a los valores mínimo (-1), medio (0) y máximo (+1) de cada variable. Se obtuvieron un total de 15 experiencias tal y como se muestra en la figura adjunta (Tabla 2):

Tabla 2.- Diseño de Box-Behnken para el análisis de superficie de respuesta.

EXPERIMENTO	R _{s-L}	Solvente	Tiempo
	(g/mL)	%EtOH	(s)
1	0.5	50	30
2	0.3	20	30
3	0.1	20	60
4	0.5	20	60
5	0.1	80	60
6	0.5	80	60
7	0.5	50	90
8	0.3	50	60
9	0.3	20	90
10	0.1	50	90
11	0.3	50	60
12	0.3	80	90
13	0.3	80	30
14	0.1	50	30
15	0.3	50	60

FACTORES	NIVELES		
	-	0	+
R _{s-L} (g/mL)	0.1	0.3	0.5
%EtOH	20	50	80
tiempo (s)	30	60	90

Las respuestas obtenidas del análisis estadístico se ajustaron a un modelo de segundo grado (Ec.2) que tuvo en cuenta, no solo las interacciones individuales, sino también las relaciones cuadráticas entre las variables:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde Y corresponde a la variable de respuesta, β_0 , β_j , β_{jj} y β_{ij} son coeficientes de regresión; X representa cada variable operativa. La evaluación estadística se realizó por análisis de varianza (ANOVA) con el fin de identificar qué factores contribuyen más a la respuesta. Los efectos con un valor $P < 0.10$ son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 90%. En este estudio, se hizo el análisis estadístico para dos variables de respuesta TPC y TFC.

4.4. Métodos de análisis

A continuación se describen los métodos analíticos empleados para la caracterización de los extractos obtenidos en los distintos ensayos realizados.

4.4.1. Contenido en polifenoles totales (TPC)

Los polifenoles totales fueron cuantificados mediante el método Folin-Ciocalteu que se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

Brevemente, el protocolo consiste en tomar un volumen de 40 μ L de muestra diluida en una proporción adecuada en agua destilada se mezcla con 3000 μ L de agua miliQ y 200 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Tras 5 minutos, se añade 500 μ L de Na_2CO_3 (saturado al 20%) a la disolución, y la mezcla se incuba a 40 $^{\circ}C$ durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 765nm en un espectrofotómetro UV-Vis (UV 2550 Shimadzu UV/VIS spectrometer, con software integrado UV-Probe).

Los resultados de TPC fueron calculados usando una recta de calibrado para el ácido gálico (rango entre 50-800 ppm de ácido gálico) (Ec. 3):

$$y=0.0009x-0.0133; R^2= 0.997 \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde 'y' es la absorbancia a 765 nm y 'x' la concentración de ácido gálico en mg/L. Los valores de TPC se han expresado en mg de equivalentes ácido gálico (GAE) por gramo seco de materia seca (raspón) (mg_{GAE}/g_{MS}) \pm SD.

4.4.2. Contenido en flavonoides totales (TFC)

Los flavonoides han sido caracterizados por un método colorimétrico basado en la formación de complejos de aluminio, según el método de Pekal [109]. Para ello, 100 μ L de muestra se mezclan con 1000 μ L de agua mili-Q y 300 μ L de $NaNO_2$ (5% p/v).

Tras 5 minutos, se adicionan 500µL de AlCl₃ (2% p/v). La mezcla reacciona durante 6 minutos, y luego se añaden 500 µL de NaOH 1M. Por último y tras 10 minutos, se diluye con 10 mL de agua mili-Q y se mide la absorbancia a 510 nm frente al blanco el espectrofotómetro UV-Vis.

Los resultados de TFC fueron calculados usando una recta de calibrado para la catequina (rango entre 0-1000 ppm de catequina) (Ec.4):

$$y=2.0421x-0.0229; R^2= 0.999 \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde 'y' es la absorbancia a 510 nm y 'x' la concentración de catequina en mg/L. TFC se han expresado en mg de equivalentes de catequina (CATE) por gramo de materia seca (raspón) ($\text{mg}_{\text{CATE}}/\text{g}_{\text{MS}}$) \pm SD.

4.4.3. Taninos condensados o proantocianidinas

Llamamos taninos a diversos compuestos fenólicos que tienen como característica común que precipitan con las proteínas en solución, y que ralentizan o inhiben las acciones enzimáticas por combinación directa con su fracción proteica. El método para la determinación de los taninos se basa en la propiedad que presentan los taninos condensados de liberar en medio ácido y caliente (hidrólisis ácida - reacción de Bate-Smith, 1954), por rotura de los enlaces intermonoméricos, un carbocatión muy reactivo que por oxidación da lugar a antocianinas (principalmente cianidina y delphinidina)[110]. Por esta razón la reacción de determinación se lleva a cabo a 90 °C y en contacto con el aire.

De forma abreviada el método consiste en la preparación de 2 tubos a los que denominaremos A y B. En cada uno dispondremos lo siguiente:

Tubo A: 2 ml de muestra diluida 1:50, 1 ml de agua destilada y 6 ml de HCl 12 N

Tubo B: 2 ml de muestra diluida 1:50, 1 ml de agua destilada y 6 ml de HCl 12 N

El tubo A se tapa y se pone al baño María a 90 °C durante 30 minutos protegido de la luz. El tubo B se deja a temperatura ambiente también protegido de la luz. Al cabo de 30 minutos de ebullición se saca el tubo A del baño y se deja enfriar en oscuridad. Posteriormente se añade 1 ml de etanol a ambos tubos A y B y se miden las absorbancias a 550 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

Los resultados se expresan como mg equivalentes de cianidina/g MS ($\text{mg}_{\text{EC}}/\text{g}_{\text{DS}}$) \pm SD según la siguiente ecuación (E.5):

$$C \text{ (g/L)} = 19.33 \times (A_A - A_B) \text{ (Ecuación 5)}$$

4.4.4. HPLC-DAD-UV y MS/MS (High Performance Liquid chromatography)

La identificación y cuantificación de los extractos se realizó a través de una colaboración con el IBET (Instituto de Biología Experimental y Tecnológica) en Oeiras, Portugal. Brevemente, la metodología utilizada se describe a continuación.

Las muestras se analizaron por HPLC-DAD-UV y MS/MS, usando un sistema Waters Alliance 2695 Separation Module (Waters, Irlanda) equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un automuestreador y un horno de columna. El sistema de cromatografía líquida se acopló a un detector de matriz de fotodiodos 996 PDA (Waters, Irlanda), y a un espectrómetro de masas MicroMass Quattromicro[®] API (Waters, Irlanda). Todos los datos fueron adquiridos y procesados por el software MassLynx[®] 4.1. La separación cromatográfica de los compuestos se llevó a cabo en una columna LiChrospher[®] 100 RP-18 de 5 μm LiChroCART[®] 250-4 de fase inversa dentro de un horno termostaticado a 35°C. La fase móvil consistió en ácido fórmico (0,5% v/v en agua ultrapura) (eluyente A) y ácido fórmico al 0,5% v/v en acetonitrilo (eluyente B). El programa de gradiente utilizado fue 99:1 A:B durante 5 minutos, de 99:1 A:B a 40:60 A:B en 40 minutos, de 40:60 A: B a 10:90 minutos: B en 45 minutos, se mantiene isocráticamente (90% B) durante 10 min, desde 10:90 A:B hasta 99:1 A:B en 10 min, y finalmente se mantiene isocráticamente (99:1 A:B) durante 10 min, a un caudal de 0.3 mL/min, con un volumen de inyección de 20 μL . El tiempo total de ejecución fue 120 min. Los espectros de absorción se adquirieron de 210 a 700 nm mediante un detector de fotodiodo array.

La detección de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se realizó en un cuadrupolo triple Micromass[®] Quattro Micro (Waters[®], Irlanda) utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI) que funcionaba a 120°C y aplicaba un voltaje capilar de 2,5 kV y una fuente de tensión de 30 V. Los compuestos se ionizaron en modo de ión positivo o negativo, y los espectros eluidos de la columna

se registraron en el intervalo m/z 60 - 1500. Se usó nitrógeno de alta pureza (N₂) como gas de secado y como gas de nebulización. Argón de ultra alta pureza (Ar) se usó como gas de colisión. Las energías de colisión se optimizaron para cada compuesto. El análisis se realizó en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) para lograr una mayor selectividad y sensibilidad. Siempre que fue posible, se usaron dos transiciones para identificar y cuantificar los compuestos en las muestras, con una desviación máxima del 15% entre la relación MRM1 / MRM2.

Los flavonoles se localizaron con una longitud de onda de 360 nm, ácidos fenólicos a 320 nm, y compuestos fenólicos en general a 280 nm.

4.4.5. Actividad antioxidante -ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La capacidad antioxidante se determina a través de ensayos de capacidad de absorbancia del radical oxígeno [111]. Se midió la capacidad de la muestra para atrapar los radicales peróxido del AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro) inhibiendo la oxidación de la fluoresceína sódica. Se usó tampón de fosfato (10 mM, pH = 7,4) como disolvente para todas las soluciones empleadas. Se emplearon estándares de Trolox para cuantificar la capacidad antioxidante. Se llenó una placa de 96 pocillos con una muestra de 25 µl (estándar trolox o extracto diluido en agua) y 150 µl de sal sódica de fluoresceína (100 nM). La placa se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se inició mediante la adición de 25 µl de AAPH 240 mM. La fluorescencia se registró a través de un detector fluorescente BMG LABTECH Fluostar OPTIMA a la longitud de onda de emisión de 530 ± 25 nm y a la longitud de onda de excitación de 485 ± 20 nm, durante 90 min. Cada muestra se midió al menos seis veces.

La capacidad antioxidante se calculó mediante ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el área bajo la curva de oxidación (AUC) de acuerdo a la curva de calibración de Trolox (rango entre 5-40 µmol/L_{TROLOX}) (Ec. 6):

$$y=0.4328x-0.7811; R^2= 0.9931 \text{ (Ecuación 6)}$$

donde 'y' es el área bajo la curva y 'x' la concentración de Trolox en $\mu\text{mol/L}$. Los resultados se han expresado como μmol equivalentes de Trolox (TE) por gramo de materia seca (raspón) ($\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{MS}} \pm \text{SD}$).

4.4.6. Estudio in vitro de inhibición fúngica frente a Botrytis Cinerea

Para el estudio de la capacidad de inhibición fúngica de los extractos, se realizaron ensayos in vitro de crecimiento fúngico para la B. cinérea según la metodología descrita por otros autores [62]. El hongo fue aislado de vides en el Campus de la Yutera de la Universidad de Valladolid. Tras la esterilización de todo el material en el autoclave se vierte en las placas Petri el agar con la concentración de los extractos y/o controles a estudiar, colocando en cada placa 25 ml de agar/agar (20 ml) + solución (5 ml). Para ello se emplearon los extractos TPC y TFC óptimos a los que previamente se les eliminó el etanol en un rotavapor se centrifugaron 10 minutos a 7800 rpm, un control con agua, un control de agua con 5% etanol y un tanino antibotrytis comercial (TAN ANTIBOTRYTIS de la casa comercial ENARTIS) en una dosis 4 veces superior a la dosis recomendada por el fabricante (20 g/hl). Cuando se solidificó el agar en las placas el hongo se colocó en el centro de la superficie de la placa. La concentración de los extractos empleados fue de 44,4 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DS}}$ y 47,6 $\text{mg}_{\text{CAE}}/\text{g}_{\text{DS}}$ para los óptimos de TPC y TFC respectivamente que, según la bibliografía, se encuentra de los rangos de inhibición del crecimiento para B. cinerea [112]. Todos los ensayos, incluidos los controles, se realizaron por quintuplicado y el área de crecimiento se calculó midiendo el diámetro en dos direcciones perpendiculares después de la incubación a 22° C durante una semana. Una vez medido, se evaluaron el valor promedio y la desviación estándar, y la prueba t de Student (muestras no pareadas, varianzas desiguales) con un valor p significativo de 0.05 para verificar si había diferencias significativas entre cada muestra

4.4.7. Análisis estadístico

Las medidas realizadas para la determinación analíticas se realizaron por duplicado expresando los resultados como valor medio +/- desviación estándar (SD) y los

datos se analizaron mediante la prueba de t-Student para ver las diferencias entre las distintas condiciones (muestras no pareadas, varianzas desiguales) con un valor de p de significación de 0.05 ó 0.10 según el caso.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha llevado a cabo el estudio de la influencia de los principales parámetros que rigen una extracción sólido-líquido para poder estudiar las cinéticas de extracción para los compuesto de interés: polifenoles y flavonoides.

Además y con el fin de mejorar la extracción de los compuestos polifenólicos del raspón de la uva, se propuso la irradiación con MW como una etapa previa a la extracción con S-L convencional, es decir como un pre-tratamiento previo. Los parámetros principales tales como R_{S-L} , la composición del solvente (variando el % de etanol) y el tiempo de irradiación se variaron y se analizaron a través de un estudio estadístico de superficie de respuesta.

5.1. Extracciones sólido-líquido

Se han realizado distintas experiencias enfocadas a estudiar y seleccionar las variables que rigen la cinética de una extracción sólido-líquido de los compuestos fenólicos del raspón de la uva. Los parámetros estudiados fueron la relación sólido-líquido (R_{S-L}), la composición del solvente (% etanol-agua) y la temperatura. Se han construido las curvas de la cinética de extracción para TPC y TFC y se han seleccionado las mejores condiciones para la extracción de los compuestos polifenólicos presentes en el raspón de la uva.

En primer lugar se estudió la influencia de variación del R_{S-L} en la extracción de polifenoles y flavonoides manteniendo el resto de parámetros constantes (25°C y 20:80 (%vol.) H₂O:EtOH). Se obtuvieron las cinéticas de extracción con respecto al TPC y TFC en estas condiciones para valores del R_{S-L} de 0.1, 0.07 y 0.04 g/mL según se muestra a continuación (Figuras 12 y 13).

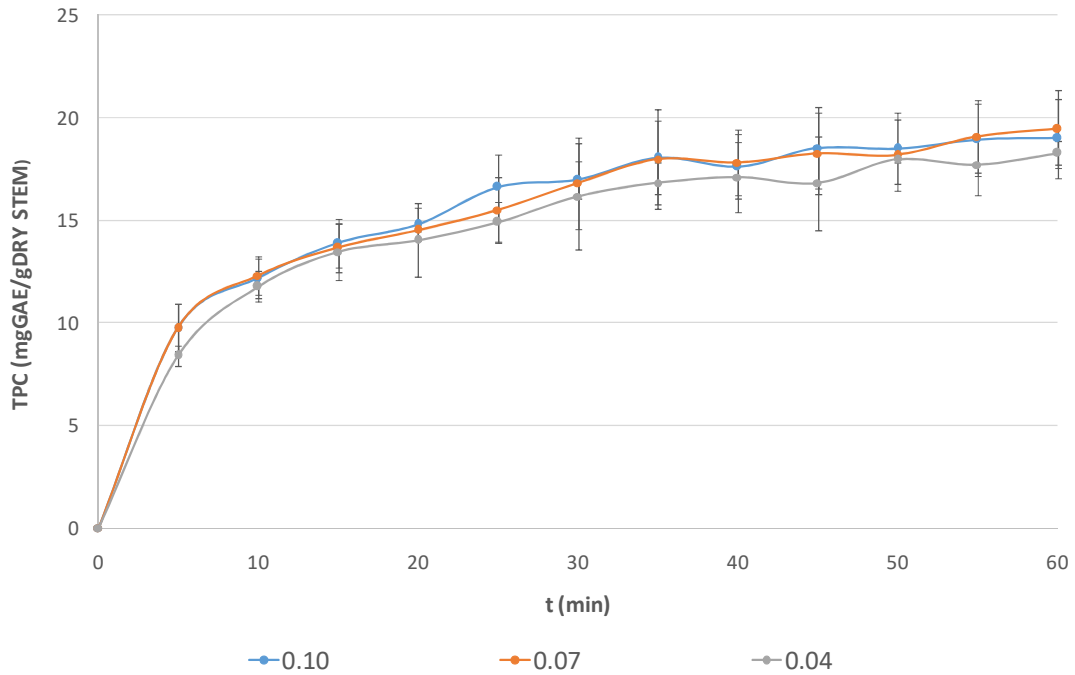


Figura 12.- Curva cinética de extracción TPC. Estudio del R_{S-L} (a 25°C, 20:80 (%vol.) H₂O:EtOH)

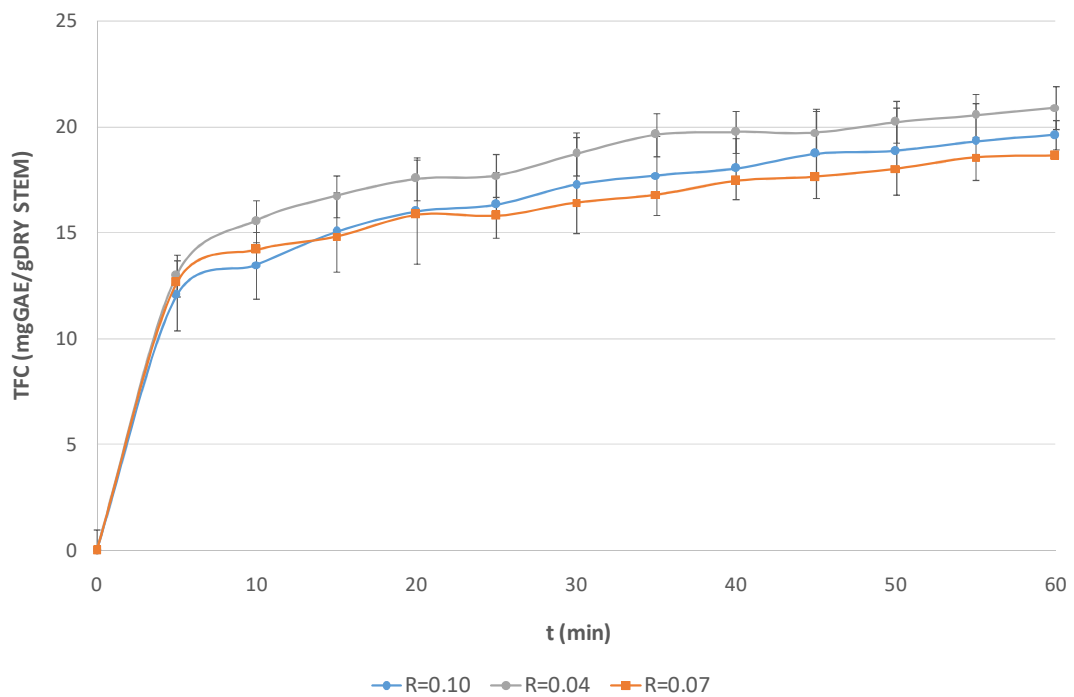


Figura 13.- Curva cinética de extracción TFC. Estudio del R_{S-L} (a 25°C, 20:80 (%vol.) H₂O:EtOH)

En las condiciones de estudio, el mayor rendimiento alcanzado en la extracción de polifenoles se alcanza para un R_{S-L} de 0.07 g/mL con un contenido de

19.5±0.6mg_{GAE}/g_{DS}; mientras que para los flavonoides ocurre cuando el R_{S-L} es de 0.04 g/mL, obteniéndose 20.9±1.8mg_{CATE}/g_{DS}. A través del estudio estadístico no se han encontrado diferencias significativas en las concentraciones finales de polifenoles y flavonoides entre los distintos valores del R_{S-L} (el estudio estadístico de los datos se muestra en la Tabla 8 dentro del apartado de Anexos), por lo que se ha seleccionado como mejor opción la relación que implique un menor consumo de etanol, es decir, el R_{S-L} =0.10 g/ml, evitando así los problemas económicos y ambientales que implica el empleo de mayores cantidades de este tipo de solventes [113]. Esta relación S-L entra dentro de los rangos utilizados por otros autores en la bibliografía consultada: ratios de 1:8 [114][115] y ratios de 1:15 [95] para la recuperación de compuestos polifenólicos del raspón de la uva.

En segundo lugar se estudió la influencia de la composición del solvente empleado. El resto de parámetros constantes (25°C, R_{S-L} = 0.10 g/mL). Se obtuvieron las cinéticas de extracción con respecto al TPC y TFC en estas condiciones para valores de % de etanol en el solvente del 20, 50 y 80% como se muestra a continuación (Figuras 14 y 15).

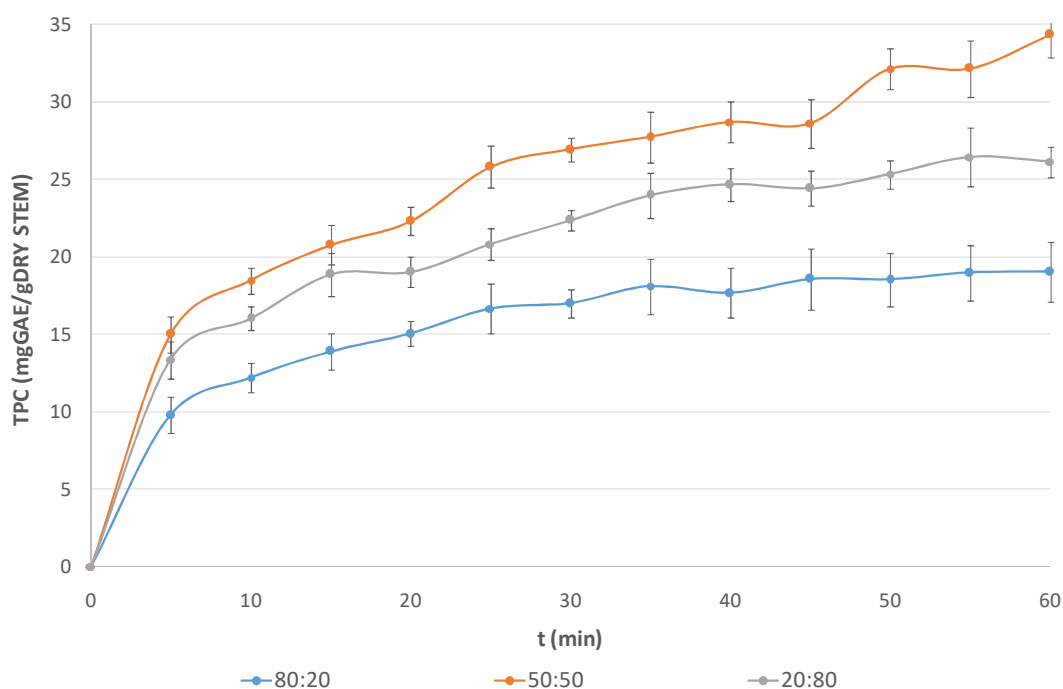


Figura 14.- Curva cinética de extracción TPC. Estudio de la composición del solvente (a 25°C, R_{S-L} = 0.10 g/mL)

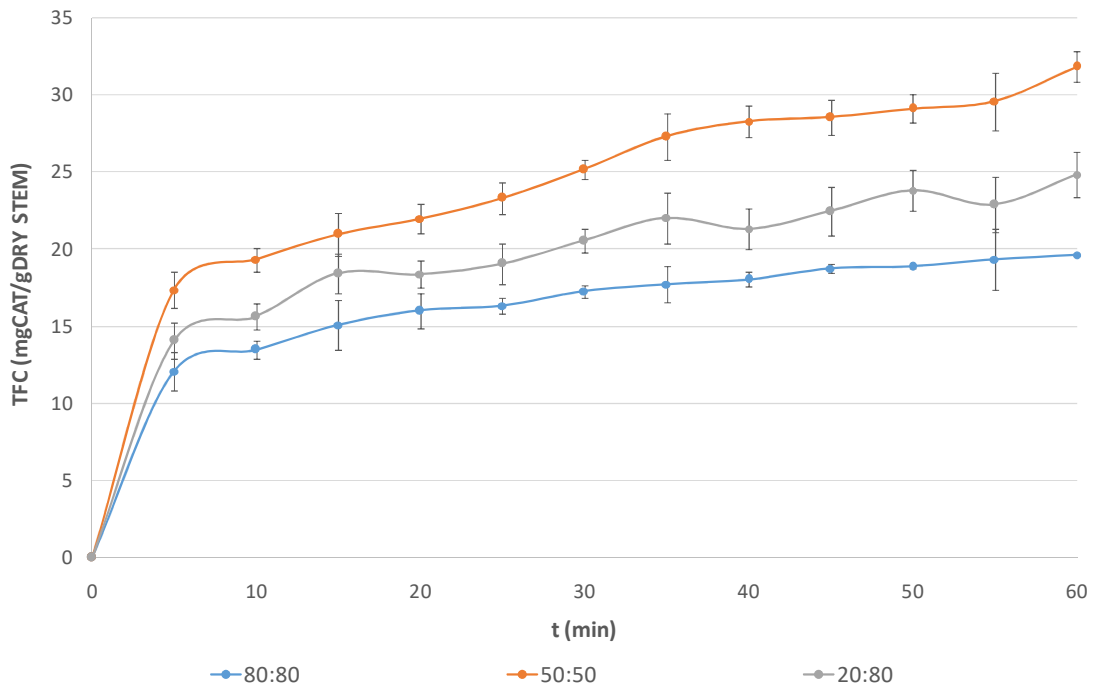


Figura 15.- Curva cinética de extracción TFC. Estudio de la composición del solvente (a 25°C, $R_{S-L} = 0.10$ g/mL)

El rendimiento de la extracción de polifenoles y flavonoides muestra un aumento significativo al incrementar la cantidad de etanol de 20 al 50% en la mezcla (34.3 ± 1.9 mg_{GAE}/g_{DS} y 31.8 ± 0.1 mg_{CATE}/g_{DS}, para TPC y TFC respectivamente), como era de esperar[116]. Sin embargo, el incremento en la mezcla hidroalcohólica de un 50% a un 80% de etanol (19.0 ± 1.9 mg_{GAE}/g_{DS} y 19.6 ± 0.7 mg_{CATE}/g_{DS} provoca una disminución en el rendimiento de la extracción. A la vista de los resultados existe un valor óptimo por encima del cual aumentar la concentración de etanol no mejoraría los rendimientos de extracción. Por ello, se tomó la mezcla EtOH:H₂O al 50% (v:v) como la mejor opción para la recuperación de estos compuestos bioactivos. Esta mezcla está en concordancia con otros estudios realizados por varios autores que emplean mezclas hidroalcohólicas como solventes[95][117]. Otros autores, aunque mantienen la composición del solvente, han obtenido mejores resultados con porcentajes de etanol del 80% [118][115].

Según la bibliografía consultada, se sabe que los compuestos fenólicos son normalmente solubles en disolventes orgánicos polares. Las mezclas de alcohol y agua se usan comúnmente para fines de extracción [119]. Además, el etanol altera

las membranas celulares al actuar principalmente dentro de la bicapa de fosfolípidos de las membranas biológicas [120] y disminuye los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas entre las procianidinas y el material de la pared celular [121][122][123], lo que ayudaría a la liberación de estos compuestos fenólicos unidos a la pared celular. Por otro lado, se sabe que los estilbenos, y particularmente el resveratrol, son muy poco solubles en agua debido a que solo hay unos pocos grupos hidroxilo en su cadena de carbonos [124]. La capacidad del grupo hidroxilo para formar enlaces de hidrógeno imparte solubilidad en agua [119]. Esto explicaría el aumento del rendimiento de la extracción al incrementar el % de etanol en el solvente. Sin embargo, tal y como se comprobó, un incremento elevado del % de etanol no mejora el rendimiento; lo que puede ser debido a diferencias de la estructura química entre las distintas familias de compuestos. También puede darse una deshidratación de la materia, lo que resultaría en una alteración de su estructura dificultando la extracción de estos compuestos.

Por último se estudió la influencia de la temperatura empleada en la extracción de polifenoles y flavonoides manteniendo el resto de parámetros constantes ($R_{S-L} = 0.10 \text{ g/mL}$ y 50:50 (%vol.) EtOH:H₂O). Se obtuvieron las cinéticas de extracción con respecto al TPC y TFC en estas condiciones para unas temperaturas de 25, 50 y 75°C como se muestra a continuación (Figuras 16 y 17).

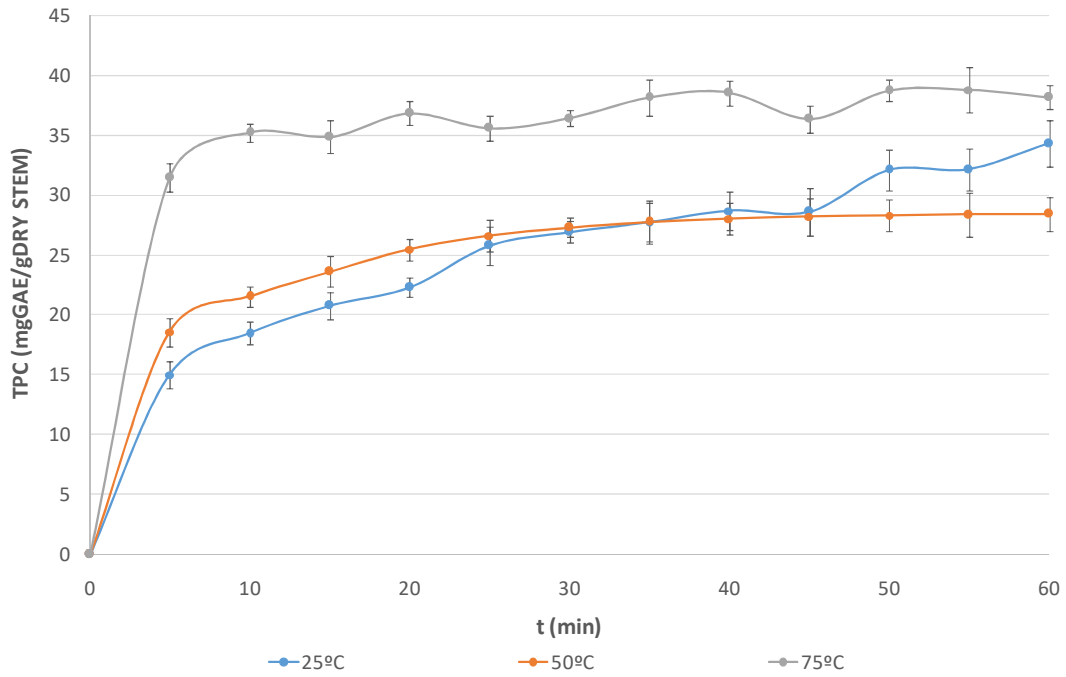


Figura 16.- Curva cinética de extracción TPC. Estudio de la temperatura (a $R_{S-L} = 0.10$ g/mL y 50:50 (%vol.) EtOH:H₂O)

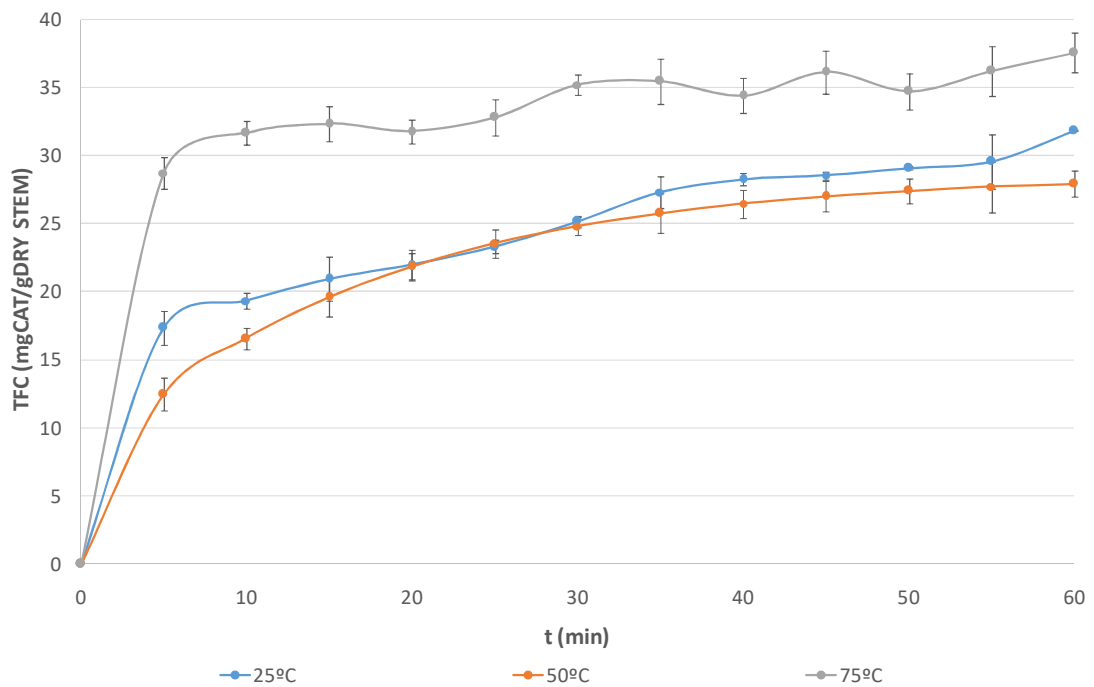


Figura 17.- Curva cinética de extracción TFC. Estudio de la temperatura (a $R_{S-L} = 0.10$ g/mL y 50:50 (%vol.) EtOH:H₂O)

La recuperación de polifenoles (TPC) como el de flavonoides (TFC) se ve incrementado con el aumento de la temperatura debido a su influencia con la

solubilidad de los compuestos y al aumento del coeficiente de extracción, mejorando la transferencia de materia y las interacciones materia-solvente [82]. Según los datos representados en las Figuras 16 y 17, las diferencias entre usar 25 ó 50°C no son significativas (el estudio estadístico de los resultados se presenta en la Tabla 8 dentro del apartado de Anexos). Sin embargo, si se observa un incremento del rendimiento de extracción al elevar la temperatura a 75°C, obteniendo $38.1 \pm 1.0 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DS}}$ y $37.6 \pm 1.5 \text{ mg}_{\text{CATE}}/\text{g}_{\text{DS}}$ para TPC y TFC, respectivamente. Por lo tanto, la temperatura seleccionada para optimizar la extracción ha sido 75°C, en concordancia con las condiciones empleadas por otros estudios realizados [115][93]. Otros autores emplean temperaturas inferiores; lo que les supone un aumento del tiempo de extracción [125]. Se sabe que este tipo de compuestos se degradan a altas temperaturas; así por ejemplo, las antocianidinas se degradan a temperaturas superiores a 100°C durante tiempos de exposición de 5-10 minutos [106]. Aunque en el perfil polifenólico de los extractos obtenidos no se han encontrado antocianidinas, que son los compuestos más lábiles, por lo que se ha considerado oportuno no realizar experimentos a mayor temperatura ya que no se dispone de equipamiento a presión que permita trabajar por debajo de la temperatura de ebullición.

Del estudio de la influencia de cada uno de los parámetros, en la Tabla 3 se muestran las mejores condiciones seleccionadas para la extracción de polifenoles y flavonoides.

Tabla 3.- Condiciones óptimas Extracción s-l convencional

CONDICIONES ÓPTIMAS EXTRACCIÓN S-L	
Ratio solido-líquido	0.1 g/mL
Composición solvente	EtOH-H₂O (pH=3), 50:50 (v,v)
Temperatura extracción	75°C

5.2. Pre-tratamiento con MW

5.2.1. Diseño de experimentos y resultados

Se ha llevado a cabo el estudio del efecto de la variación de los parámetros que influyen sobre el rendimiento de la extracción con MW: la relación sólido líquido (R_{S-L}), la composición del solvente (%EtOH) y el tiempo.

Para determinar los valores óptimos de las variables y maximizar la eficiencia del proceso de extracción de compuestos polifenólicos, se realizó un diseño estadístico de superficie de respuesta (tipo Box-Behnken) para tres factores (R_{S-L} , %EtOH y tiempo) y 3 niveles (-1, 0, +1), obteniéndose un total de 15 experimentos con un triplicado del punto central.

Tabla 4. Condiciones y resultados para el diseño experimental de superficie de respuesta (Box-Behnken)

	CONDICIONES EXPERIMENTALES			RESULTADOS EXPERIMENTALES - PRE-TRATAMIENTO MW		P (barg)	T (°C)
	Rs-l (g/mL)	EtOH (%)	time (s)	TPC (mg _{GAE} /g _{DRY STEM})	TFC (mg _{CAT} /g _{DRY STEM})		
1	0.75	50	30	51.3	35.1	2.2	93
2	0.50	20	30	9.8	8.80	1.3	61
3	0.25	20	60	42.4	35.7	2.5	83
4	0.75	20	60	29.9	29.9	3.2	93
5	0.25	80	60	27.6	20.4	1.8	90
6	0.75	80	60	30.4	29.9	3.4	109
7	0.75	50	90	28.5	27.9	4.5	117
8	0.50	50	60	45.8	31.7	3.6	109
9	0.50	20	90	8.80	8.00	4.5	106
10	0.25	50	90	38.4	51.7	3.0	103
11	0.50	50	60	47.1	35.9	3.5	108
12	0.50	80	90	27.0	20.7	4.5	118
13	0.50	80	30	17.8	13.9	1.7	88
14	0.25	50	30	25.1	24.6	3.0	103
15	0.50	50	60	42.8	31.00	3.6	109

De acuerdo al diseño estadístico propuesto, en la Tabla 4 se recogen los resultados experimentales obtenidos del cálculo de TPC y TFC tras el pre-tratamiento con MW, así como la presión y temperatura alcanzada en cada experimento. Para optimizar el pre-tratamiento con MW y determinar los valores óptimos de cada una de las variables que influyen en el proceso, las concentraciones polifenoles y flavonoides

totales se midieron inmediatamente después del pre-tratamiento con MW realizado para cada uno de los experimentos. Con los valores de TPC y TFC y la herramienta de ayuda estadística se pudo obtener toda la información necesaria para maximizar dicho pre-tratamiento. Para empezar, se muestra a continuación el diagrama de efectos principales (Figura 18) para el caso de TPC.

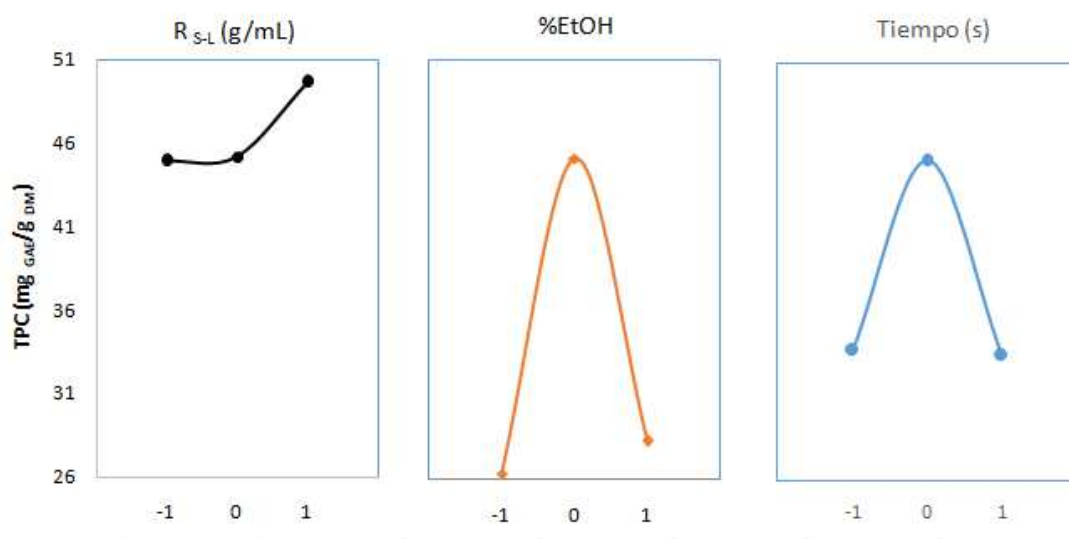


Figura 18.- Diagrama de efectos principales TPC

El diagrama de efectos principales para el TPC muestra que existen valores que maximizan la extracción total de polifenoles tanto para el RS-L, el % EtOH y el tiempo de irradiación. Sin embargo, las variables que son significativas ($p < 0.10$) para el pre-tratamiento sólo son el % de etanol y el tiempo, como se muestra en la tabla ANOVA (Tabla 5).

Tabla 5.- Análisis de varianza TPC ($p < 0.10$)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Rs-l	45.125	1	45.125	0.23	0.4974
B: %EtOH	0.03125	1	0.03125	0.00	0.9854
C: time	0.21125	1	0.21125	0.00	0.962
AA	16.4126	1	16.4126	0.00	0.6776
AB	191.822	1	191.822	0.19	0.1919
AC	325.802	1	325.802	2.27	0.1066
BB	1178.65	1	1178.65	3.86	0.0135
BC	26.01	1	26.01	13.97	0.6026
CC	489.724	1	489.724	0.31	0.0609
Error total	421.809	5	84.3618	5.81	
Total (corr.)	2637.62	14			

En la Tabla ANOVA se observa que aunque es no significativa para un nivel de significación del 90%, la interacción entre el R_{S-L} y el tiempo de irradiación tiene un p-valor muy próximo de 0.1066. Además, la interacción entre estas dos variables es clara como puede observarse en el diagrama de interacciones (Figura 19) entre ambas.

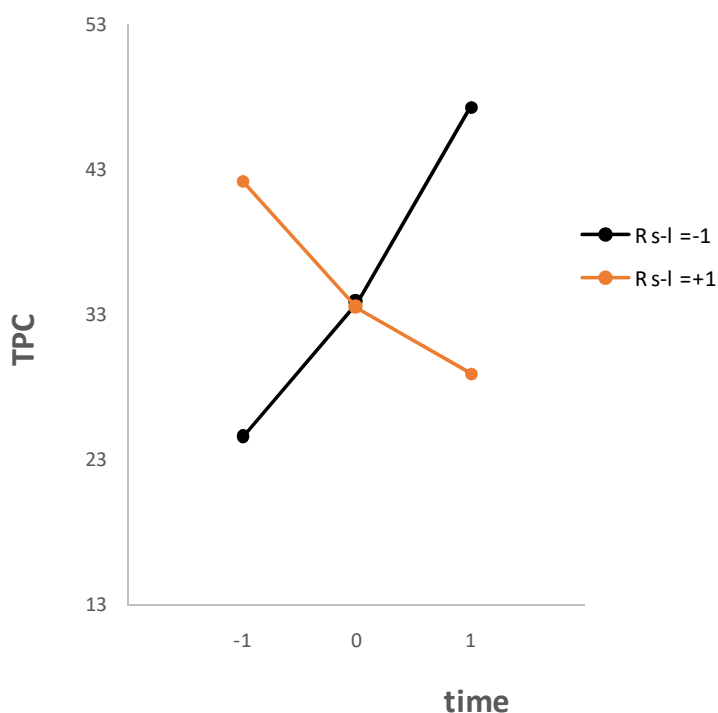


Figura 19.- Diagrama interacciones entre variables para TPC

En base al efecto cruzado observado entre el R_{S-L} y el tiempo de irradiación, se puede concluir que para R_{S-L} pequeños el rendimiento de la extracción se maximiza para tiempos de irradiación largos; y para R_{S-L} altos el rendimiento se maximiza para tiempos de irradiación cortos. Esto es debido a que si el contenido de solvente es alto, hay que calentar más fluido y la radiación afecta en menor medida a la materia prima. Al contrario, al trabajar con cantidades de solvente pequeñas, sólo es necesaria una pequeña cantidad de radiación para calentar el líquido de manera que la materia prima se ve más afectada y puede degradarse.

Para el caso del TFC según muestra el diagrama de efectos principales (Figura 20), también es posible ver que existen valores específicos de cada variable que maximizan la extracción de flavonoides.

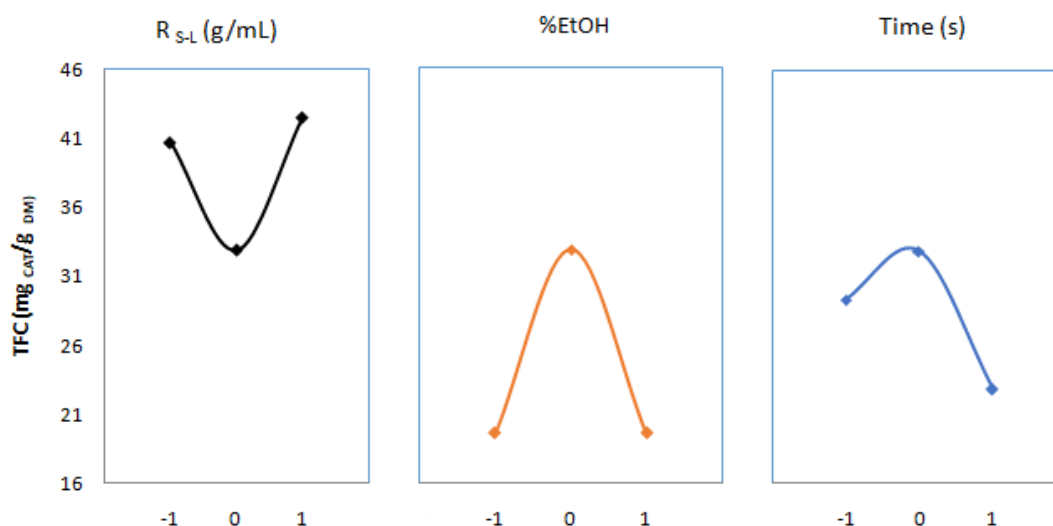


Figura 20.- Diagrama de efectos principales TFC

En este caso, el % de EtOH y el R_{S-L} son las variables que maximizan la extracción, tal y como se puede comprobar en el estudio estadístico según el p-valor de la tabla ANOVA ($p < 0.10$) (Tabla 6).

Tabla 6.- Análisis de varianza TFC ($p < 0.10$)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: R_{S-L}	6.66125	1	6.66125	0.14	0.7255
B: %EtOH	0.005	1	0.005	0.00	0.9923
C: time	83.8512	1	83.8512	1.74	0.2447
AA	282.962	1	282.962	5.86	0.0601
AB	77.44	1	77.44	1.6	0.2611
AC	294.123	1	294.123	6.09	0.0567
BB	645.38	1	645.38	13.37	0.0147
BC	14.44	1	14.44	0.3	0.608
CC	170.523	1	170.523	3.53	0.119
Error total	241.404	5	48.2808		
Total (corr.)	1874.54	14			

En este caso también es claramente significativa ($p < 0.10$) la interacción entre el R_{S-L} y el tiempo de irradiación, con un p-valor de 0.0567. La interacción entre ambas variables sobre la extracción de flavonoides es equivalente al efecto sobre la extracción de polifenoles, como puede observarse en la Figura 21; para R_{S-L} pequeños se maximiza el rendimiento de la extracción con tiempos de irradiación

largos; y para R_{S-L} altos el rendimiento se ve favorecido por tiempos de irradiación cortos.

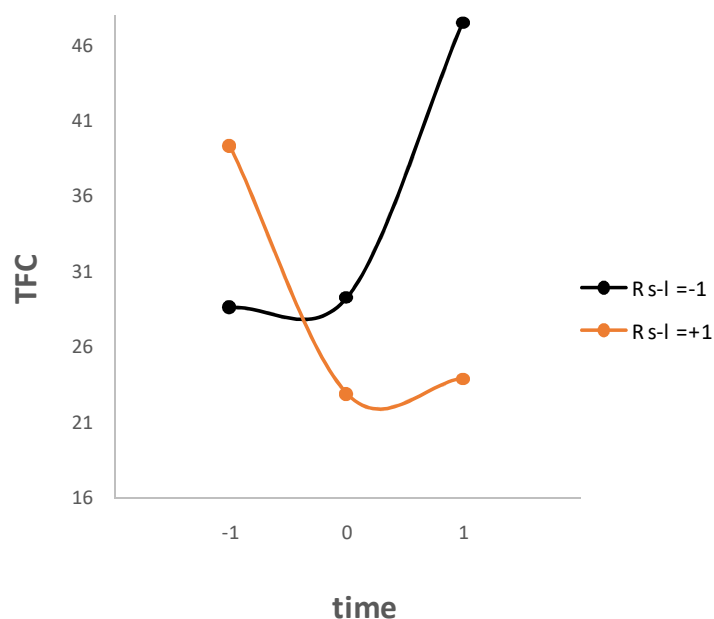


Figura 21.- Diagrama interacciones entre variables para TFC

La herramienta estadística también proporcionó los coeficientes de regresión de las ecuaciones polinómicas de segundo orden que reproducen la cinética de la extracción para polifenoles y flavonoides (Ec. 4 y 5, respectivamente) mediante el ajuste de los resultados experimentales y las variables de extracción. El coeficiente de regresión de obtenido para cada ecuación fue del 84% para el TPC y del 87% para el TFC. Las expresiones finales para las ecuaciones obtenidas se muestran a continuación.

$$\mathbf{TPC} = 45.2333 + 2.375 \cdot R_{(S-L)} - 0.0625 \cdot \%EtOH - 0.1625 \cdot time + 2.10822 \cdot R_{(S-L)}^2 + 6.925 \cdot R_{(S-L)} \cdot \%EtOH - 9.025 \cdot R_{(S-L)} \cdot time - 17.8667 \cdot \%EtOH^2 + 2.55 \cdot \%EtOH \cdot time - 1.5167 \cdot time^2$$

(Ecuación 4)

$$\mathbf{TFC} = 32.8667 + 0.9125 \cdot R_{(S-L)} - 0.025 \cdot \%EtOH - 3.2375 \cdot time + 8.75417 \cdot R_{(S-L)}^2 + 4 \cdot R_{(S-L)} \cdot \%EtOH - 8.575 \cdot R_{(S-L)} \cdot time - 13.2208 \cdot \%EtOH^2 + 1.9 \cdot \%EtOH \cdot time - 6.79583 \cdot time^2$$

(Ecuación 5)

De la optimización de estas ecuaciones se obtuvieron las condiciones óptimas que maximizan la extracción de polifenoles y flavonoides totales mediante el empleo del pre-tratamiento con MW. Los valores de TPC y TFC estimados para dichas condiciones se recogen en la Tabla 7:

Tabla 7.- Condiciones óptimas de operación MW para TPC y TFC

TPC ÓPTIMO mg _{GAE} /g _{DS}	52.0	TFC ÓPTIMO mg _{CATE} /g _{DS}	47.8
R _{S-L} (g/mL)	0.50	R _{S-L} (g/mL)	0.10
%EtOH	55	%EtOH	47
time (s)	36	time (s)	86
DS	9.18	DS	6.95

Con las condiciones óptimas calculadas que maximizan la extracción de polifenoles y flavonoides, se llevaron a cabo los pre-tratamientos con MW. Una vez hechos los pre-tratamientos, la materia se sometió a extracción sólido-líquido en las condiciones seleccionadas como favorables descritas en la tabla 4. De esta forma se obtuvieron las concentraciones de 44.4 ± 0.8 mg_{GAE}/g_{DS} para TPC y 47.6 ± 2.9 mg_{CATE}/g_{DS} para TFC.

5.2.2. Comparación del pre-tratamiento MW y la extracción convencional S-L

Se realizó un estudio de la cinética de la extracción para hacer una comparativa entre la convencional S-L a las condiciones más favorables seleccionadas y la previamente modificada con el pre-tratamiento de MW en condiciones optimizadas.

Y en base a los resultados experimentales obtenidos se elaboraron las curvas de la cinética de las extracciones en las condiciones optimizadas para la extracción S-L y el MW en condiciones óptimas tanto para TPC como TFC, como se muestra en la Figura 22.

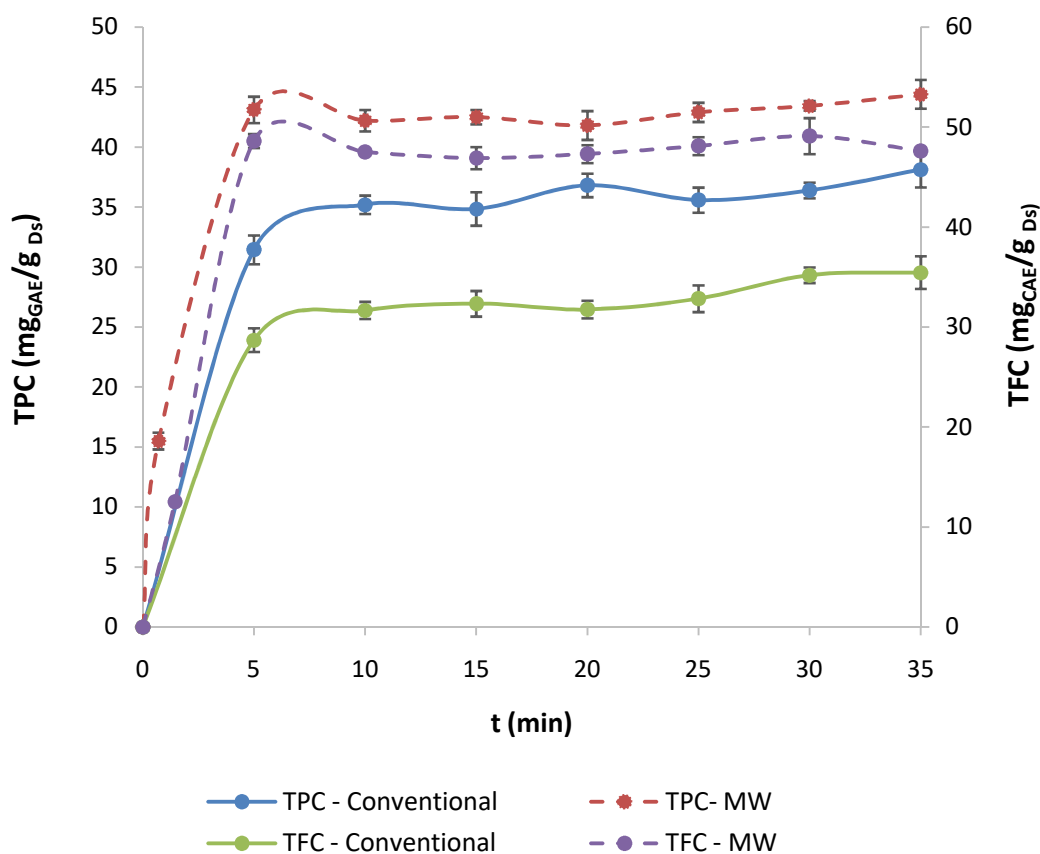


Figura 22.- Efecto sobre el TPC y TFC de la extracción S-L convencional en las condiciones más favorables ya determinadas en la Tabla 3 y el pre-tratamiento con MW en condiciones óptimas.

Según los resultados obtenidos, el efecto del pre-tratamiento con MW mejoró en ambos casos el rendimiento de la extracción de los compuestos de interés. Cuando se emplearon las condiciones óptimas en el MW para la extracción de polifenoles (TPC), se logró un incremento del 16% en el rendimiento total de extracción de polifenoles con respecto a la extracción convencional en las condiciones más favorables. Así mismo, cuando se emplearon las condiciones óptimas en el MW para la extracción de flavonoides (TFC), se logró un incremento del 34% con respecto al empleo de la extracción convencional en las condiciones más favorables. Además, se puede ver que a partir de los 10 minutos puede considerarse completa la extracción, lo que supone una importante reducción del tiempo de operación (de 60 a 10 minutos).

La metodología propuesta en este trabajo, con la utilización de las MW sólo como una etapa previa, aumenta la extracción de compuestos polifenólicos en proporciones similares a las consultadas en la bibliografía. Otras tecnologías, como los pulsos eléctricos de alto voltaje (HVED), muestran mejoras en el rendimiento del proceso de extracción en un 35% para TPC y un 12% para flavonoides con respecto a la convencional [95]. Los resultados obtenidos para autores que emplean la extracción asistida con MW (MAE), muestran un incremento rendimiento del 34 y 32% para trans-resveratrol y ϵ -viniferin respectivamente [93] con respecto a lo obtenido a través de la extracción convencional S-L [125]. Así mismo, con la extracción asistida con ultrasonidos (UAE) se incrementó la recuperación de trans-resveratrol en un 23% [115] comparado con las referencias descritas para la extracción convencional S-L [114].

En material adicional del apartado 9 Anexos, se ha incluido el análisis estadístico de los datos para las tres variables de estudio (Tabla 9).

5.2.2.1. Identificación y cuantificación de compuestos HPLC-DAD-UV y MS/MS

La figura 23 muestra el perfil polifenólico obtenido por HPLC-DAD-UV y MS/MS para los extractos obtenidos mediante extracción S-L a diferentes temperaturas (25, 50 y 75°C) y con pre-tratamiento MW optimizado para TPC. La identificación de los compuestos se ha realizado por comparación con el respectivo tiempo de retención y el espectro a 280 nm de los patrones puros. En todos los casos se han identificado los mismos compuestos porque se han obtenido siempre los mismos picos en el espectro, sin embargo, se observa que en la cuantificación de los mismos que la concentración sí ha variado.

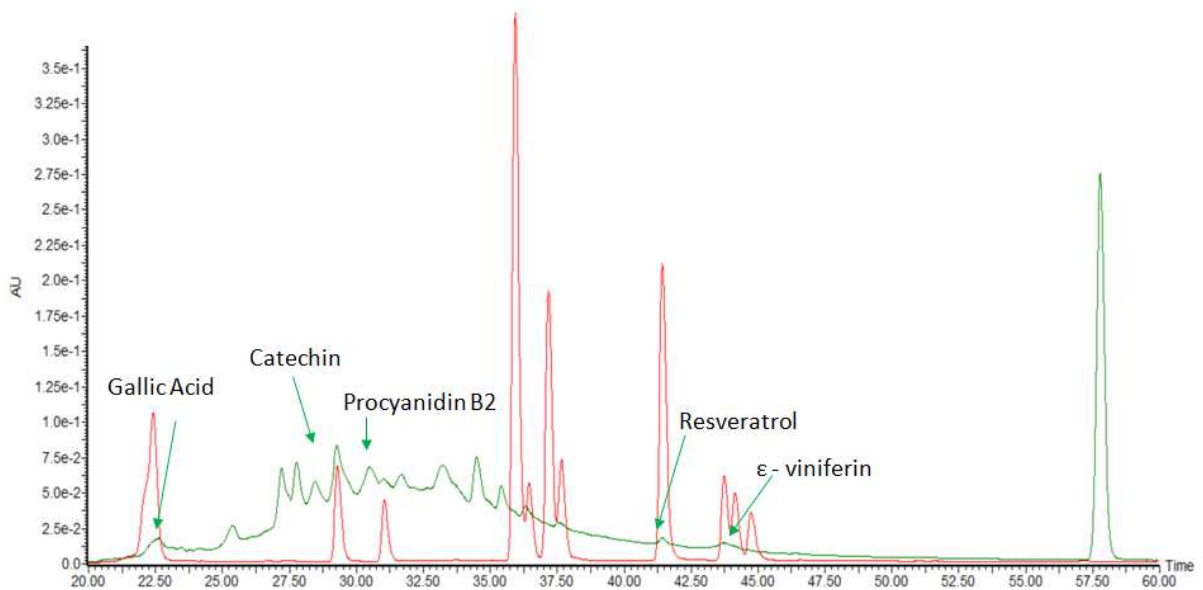


Figura 23.- Cromatograma 280 nm de extractos del raspón

En una primera aproximación, la Figura 24 muestra la cuantificación de los compuestos de interés detectados (trans-resveratrol y ε-viniferin, catequina y epicatequina) con una dilución para un valor de TPC de 510 ppm.

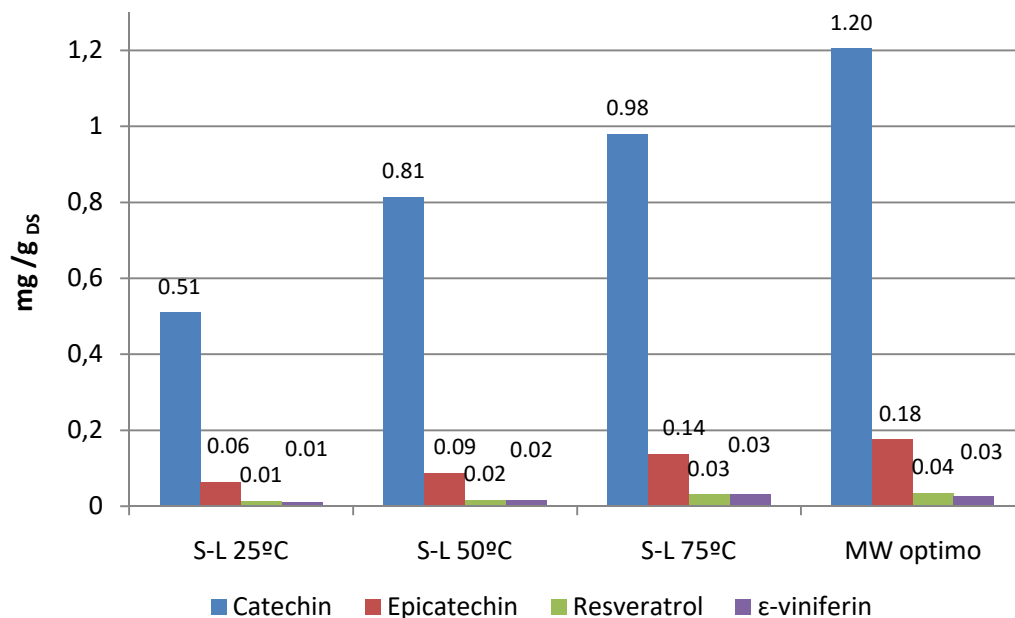


Figura 24.- Cuantificación de los compuestos identificados por HPLC-DAD-UV y MS/MS

Tal y como muestran los datos, se observa un incremento en el rendimiento de la extracción con el MW para la catequina, la epicatequina y para el resveratrol. En cambio, el rendimiento para el ϵ -viniferin se maximiza con la extracción convencional a 75°C, observándose una tendencia positiva al aumentar la temperatura. Con respecto a la cuantificación de la procianidina B2 no se muestra en la figura ya que co-eluye con otro compuesto y los picos se superponen, pero no se aprecian diferencias en el área de los picos obtenidos para este compuesto en los extractos analizados en las diferentes condiciones.

Los compuestos que se han identificado en el análisis previo realizado están en concordancia con la información disponible en la bibliografía sobre la composición de polifenoles que otros autores han obtenido en el raspón de la uva: 149 mg/kg y 314 mg/kg para resveratrol y ϵ -viniferin respectivamente y un TPC entre 438-584 mg/g según la variedad y la añada [22], epicatequina en el rango entre 22.6 - 302 mg/g para variedades blancas y tintas respectivamente y entre 0.23-0.30 mg/g de ϵ -viniferin [66], 94,7mg/kg y 167-499 mg/kg para resveratrol y ϵ -viniferin respectivamente [93] y 87 mg/kg y 1006,8 mg/kg para resveratrol y ϵ -viniferin respectivamente [94]. Así también se ha evidenciado en varios estudios que los estilbenos predominantes que se encuentran en el raspón son el trans-resveratrol (441-7532 mg/kg) y el ϵ -viniferin (1218-5341 mg/kg) dependiendo de la variedad, vendimia y tiempo de almacenamiento [126].

Aunque los compuestos principales han sido identificados, se continúa trabajando en la identificación de pormenorizada de otros compuestos que se observan en otros picos interesantes.

5.2.2.2. Actividad antioxidante (ORAC)

Tras realizar los análisis de ORAC, los resultados confirman la eficacia del pre-tratamiento con MW en cuanto a la extracción de compuestos bioactivos presentes en el raspón de la uva. Se observa un incremento de la capacidad antioxidante en los extractos obtenidos en los casos en los que se empleó pre-tratamiento con MW

en condiciones óptimas para TPC y TFC con respecto a la obtenida en la extracción convencional en las condiciones más favorables, tal y como muestra la Figura 25.

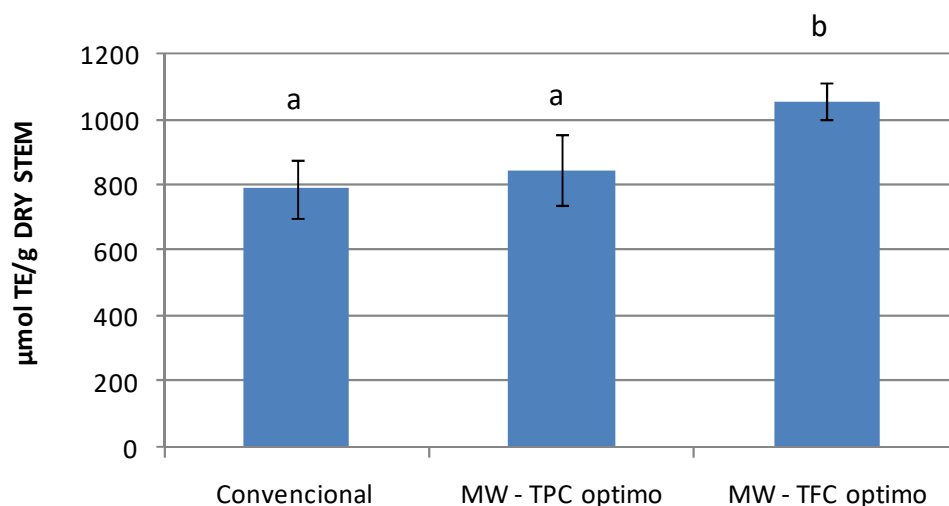


Figura 25.-Capacidad Antioxidante Extracción convencional y con pre-tratamiento con MW en condiciones óptimas para TPC y TFC (Valores con letras diferentes son significativamente diferentes a un nivel de significancia $p < 0.10$)

El valor de la capacidad antioxidante (ORAC) para el extracto de TPC óptimo obtenido con MW ($1056 \pm 96 \mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{DS}}$) es significativamente mayor referido al p-valor obtenido del estudio estadístico realizado.

Según las investigaciones en las que se determina la capacidad antioxidante de extractos obtenidos del raspón, los valores variaron de 40.26 a 150.79 mM Trolox $100 \text{ g}^{-1} \text{ DS}$ para las variedades tintas estudiadas [127]. Aún así, la comparación de los datos obtenidos sobre la capacidad de eliminación de radicales con los disponibles en la bibliografía mostró diferencias significativas; hecho que podría deberse a la distinta composición fenólica de las variedades estudiadas como consecuencia de la carga genética y factores agroclimáticos [22].

5.3. Ensayos in vitro de inhibición anti-fúngica

Se realizó un estudio con técnicas de cultivo “in vitro” para evaluar el efecto anti-fúngico de los extractos obtenidos en los experimentos con el MW en condiciones óptimas. Se seleccionó el extracto derivado del tratamiento MW optimizado para TFC ya que es el que mayor concentración en flavonoides presenta, y por tanto, con un mayor poder de inhibición antifúngica.

Además, se han utilizado han utilizado 2 blancos, uno formado por agar + agua, otro de agar + agua con 5% EtOH y un tanino comercial de la casa Enartis. Según la ficha técnica del tanino comercial (Tan Antibotrytis), se trata de un compuesto de origen natural con una composición formada por una mezcla de tanino gálico, di-gálico y elágico (taninos de la familia de los flavonoides) y presenta propiedades antioxidantes y antioxidásicas, limitando la actividad de las enzimas oxidativas (Lacasa) producidas por hongos como la Botrytis.

En la Figura 26 se muestra los resultados obtenidos al comparar la actividad del extracto MW óptimo (E), el blanco (B), el blanco con 5% etanol (BE) y el control comercial (C). Aunque para realizar el ensayo in vitro los extractos se evaporaron en el rotavapor para eliminar el etanol empleado como solvente en la extracción, hay que tener en cuenta un pequeño % residual de etanol que pudiera estar presente en los extractos (alrededor del 5%) y evaluar el efecto inhibitorio asociado a la presencia de etanol.

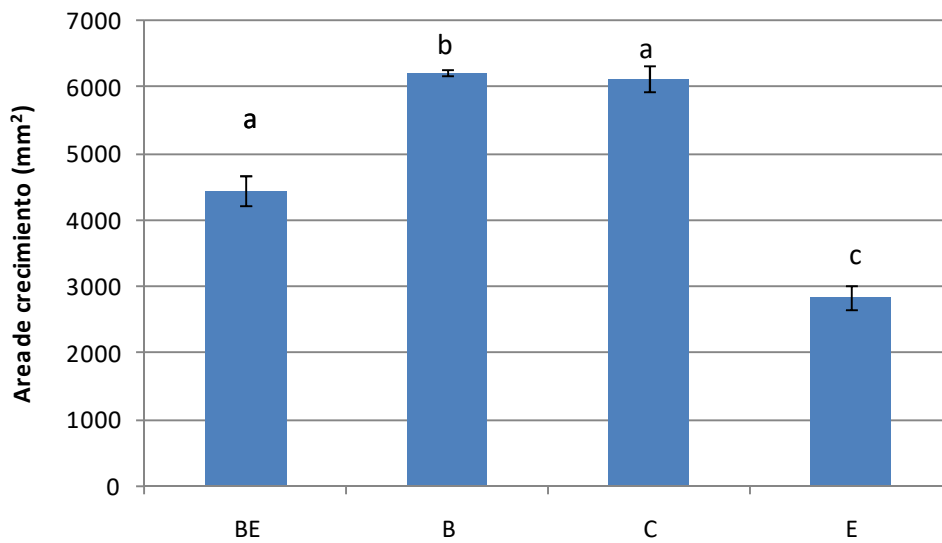
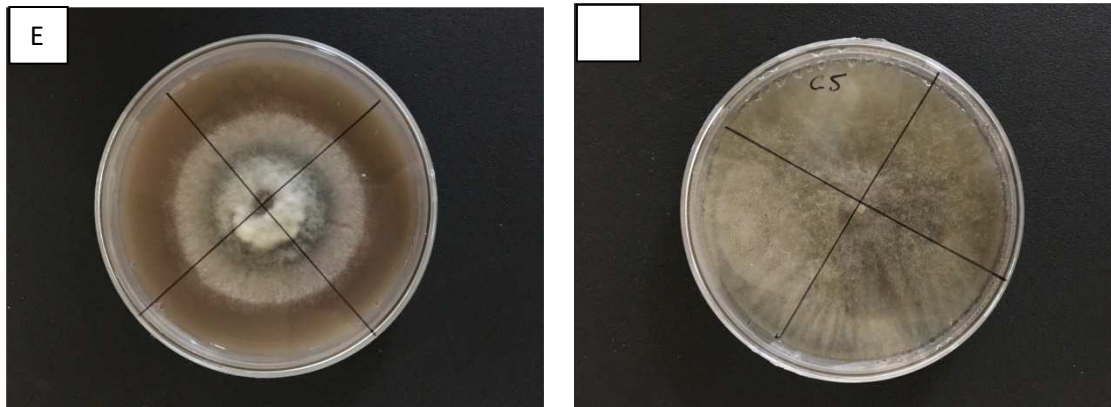


Figura 26. – Área de crecimiento de *B. cinerea*. (Valores con letras diferentes son significativamente diferentes a un nivel de significancia $p < 0.05$). B: blanco, BE: blanco+ 5%etanol, C: tanino comercial Tan Antibotrytis y E: extracto óptimo TFC

En la siguiente figura (Figura 27) pueden apreciarse el efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo con el extracto obtenido de los ensayos optimizados con MW (E) con respecto al tanino comercial (C).



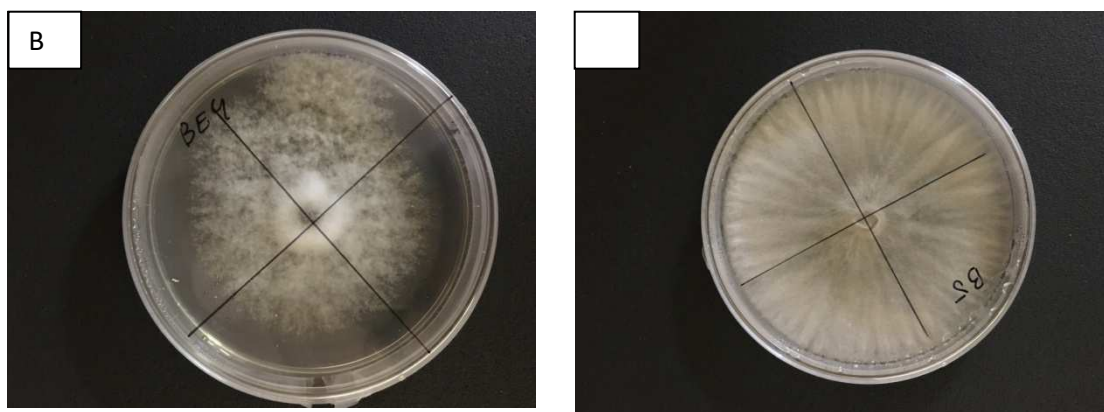


Figura 27.- Imagen ensayos inhibición del crecimiento del hongo *B. cinérea*: MW_{opt} TFC (E), control comercial (C), blanco + 5% EtOH (BE) y blanco (B).

Se observan también diferencias en el crecimiento del hongo entre las placas del blanco agua-etanol 5% (BE) y las del blanco (B), por lo que se puede deducir un ligero efecto del etanol residual que puedan contener los extractos. Así, también se puede observar que pese a haber empleado la concentración máxima del tanino comercial recomendada por el fabricante (20 g/hl) (C), los crecimientos de las placas no presentaron efecto inhibitorio alguno contra el hongo; por lo que para futuros ensayos se incrementará la concentración del mismo para poder evaluar su actividad.

Sin embargo y tal y como se ha reportado en la bibliografía, está demostrado en diferentes investigaciones el efecto inhibitorio contra *Botrytis cinérea* de estilbenos y flavonoides (taninos, tanto condensados como hidrolizables).

5.3.1. Taninos

Con respecto a la concentración de taninos extraídos del raspón, se han encontrado diferencias significativas con respecto al empleo del pre-tratamiento con MW en las condiciones óptimas para TFC, según muestra la Figura 28. Por lo que es posible afirmar que el pre-tratamiento con MW maximiza la extracción de flavonoides frente a la extracción convencional en un 21.6%.

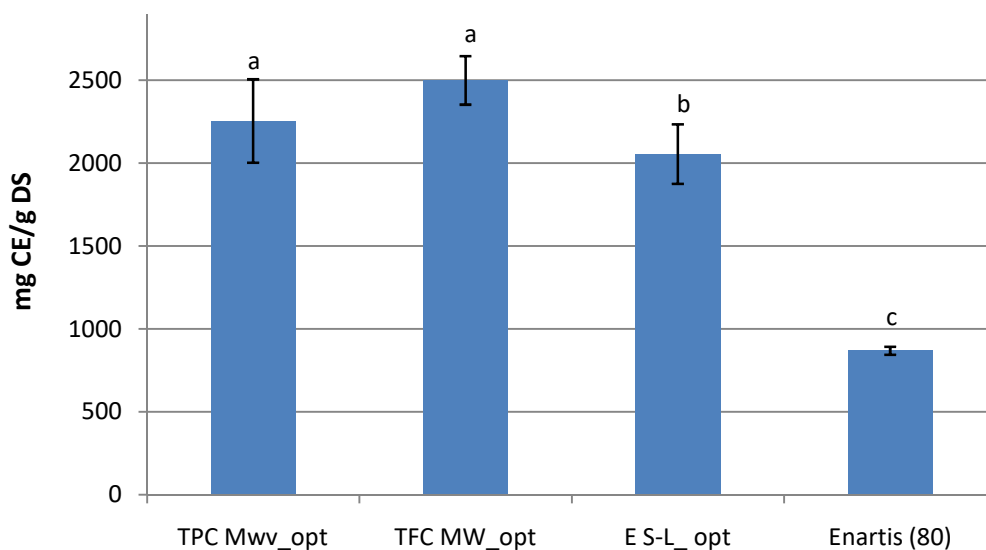


Figura 28.- Concentración taninos en los extractos MW óptimos, E_{S-L} y el tanino comercial Enartis. (Valores con letras diferentes son significativamente diferentes a un nivel de significancia $p < 0.05$)

Tal y como ya se ha justificado anteriormente, la existencia en los extractos obtenidos del raspón de estilbenos y flavonoides están en concordancia con los resultados de la actividad de inhibición fúngica observada en los ensayos in vitro realizados así como con los compuestos detectados en el análisis cromatográfico.

6. CONCLUSIONES

Por lo tanto, en base a todo lo anteriormente expuesto, como resultado del desarrollo de la presente investigación se puede concluir que el raspón de la uva es una fuente de polifenoles $38.2 \pm 1.0 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DRY STEM}}$ y de flavonoides $37.6 \pm 1.5 \text{ mg}_{\text{CATE}}/\text{g}_{\text{DRY STEM}}$. Se ha estudiado la cinética de extracción de polifenoles y flavonoides del raspón de la uva. Los parámetros seleccionados como los más favorables para la recuperación de polifenoles y flavonoides en las extracciones de S-L fueron: R_{S-L} de 0.10 mg/L, una mezcla hidroalcohólica con 50% de EtOH (% vol.) y 75°C. Además, se ha estudiado el uso de pre-tratamiento MW como etapa previa a

la extracción S-L, lo que supuso una mejora en la transferencia de masa interna, el incremento en el rendimiento de extracción de polifenoles ($44.4 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DS}}$) y flavonoides ($47.6 \text{ mg}_{\text{CATE}}/\text{g}_{\text{DS}}$) en un 16 y 34% respectivamente y reduciendo el tiempo de procesamiento de $\sim 60 \text{ min}$ a 10 min .

Además, se han identificado compuestos de interés que han confirmado que el raspón es una fuente de compuestos bioactivos, donde predominan los estilbenos, trans-resveratrol ($0.0352 \text{ mg}/\text{g}_{\text{DS}}$) y ϵ -viniferin ($0.0304 \text{ mg}/\text{g}_{\text{DS}}$) y, de la familia de los flavonoides, la catequina ($1.2056 \text{ mg}/\text{g}_{\text{DS}}$) y epicatequina ($0.176 \text{ mg}/\text{g}_{\text{DS}}$).

Finalmente se ha demostrado el efecto inhibitorio contra Botrytis cinérea de los extractos. Principalmente el extracto óptimo de flavonoides, el cual presentó mayor actividad antifúngica en los ensayos realizados, gracias a su alto contenido tanto en estilbenos como flavonoides.

Agradecimientos

En primer lugar quería agradecer el tiempo, apoyo y conocimientos prestados por las dos personas que me han dirigido en el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que las investigaciones realizadas dieran sus frutos, Soraya Rodríguez y Rut Romero.

Así también, se agradece la colaboración ofrecida por el Dr. Fernando M. Alves Santos, investigador y profesor del Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales (ETSIIAA de Palencia) para el aislamiento del hongo (Botrytis cinérea) para llevar a cabo el ensayo in-vitro de inhibición. De igual modo, se agradece la colaboración de Melanie Matos, investigadora del Instituto de Biología experimental y Tecnológica (IBET), Oeiras, (Portugal) por su apoyo con la parte de identificación y cuantificación del perfil polifenólico de los extractos.

7. ABREVIATURAS

MW: microondas

TPC: Contenido total en polifenoles

TFC: Contenido total en flavonoides

GAE: Equivalentes de ácido gálico

CAE: Equivalentes de catequina

TE: Equivalentes de Trolox

CE: Equivalentes de cianidina

EtOH: Etanol

MAE: Extracción asistida por microondas

UAE: Extracción asistida por ultrasonidos

HVED: Extracción asistida por descargas de alto voltaje

R_{s-L}: Relación sólido-líquido (g/mL)

S-L: Solido-líquido

DS: Raspón seco (dried stem)

DAD: Detección diodo array

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

MS/MS: Espectrometría de masas (Tanden mass spectrometry)

ORAC: Capacidad antioxidante

SD: Desviación estándar

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Grimplet, L. G. Deluc, G. R. Cramer, and J. C. Cushman, “Integrating Functional Genomics With Salinity and Water Deficit Stress Responses in Wine Grape - *Vitis Vinifera*,” in *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 643–668.
- [2] J. J. Mateo and S. Maicas, “Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies,” *Food Res. Int.*, vol. 73, pp. 13–25, Jul. 2015.
- [3] “© OIV Statistical Report on World Vitiviniculture OIV Statistical Report on World Vitiviniculture ©.”
- [4] T. V. Sort X, Baraza X, “No Title,” in *Environmental impact evaluation in viticultural activities. In: Third international specialized conference on sustainable viticulture and winery wastes management, Barcelona, 2004.*
- [5] L. Ruggieri *et al.*, “Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process,” *J. Clean. Prod.*, vol. 17, no. 9, pp. 830–838, Jun. 2009.
- [6] J. M. Costa, “Aproveitamento de subprodutos da vinificac, ão. O bagac, o como matéria-prima da indústria de óleos e grainha e de fabrico de rac, ões para gado.,” in *Aproveitamento de subprodutos da vinificac, ão. O bagac, o como matéria-prima da indústria de óleos e grainha e de fabrico de rac, ões para gado. In: 1º Congresso Nacional das Indústrias Agro-alimentares, Ministério da Agricultura Comércio e Pescas, Lisboa, 1993.*
- [7] “Life HAproWINE Generación y Gestión de Residuos del Sector,” 2011.
- [8] A. Schieber, F. . Stintzing, and R. Carle, “By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 12, no. 11, pp. 401–413, Nov. 2001.
- [9] R. Devesa-Rey, X. Vecino, J. L. Varela-Alende, M. T. Barral, J. M. Cruz, and A. B. Moldes, “Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling,” *Waste Manag.*, vol. 31, no. 11, pp. 2327–2335, Nov. 2011.
- [10] C. Flanzy, *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. A. Madrid

- Vicente, 2000.
- [11] M. García-Marino, J. C. Rivas-Gonzalo, E. Ibáñez, and C. García-Moreno, "Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction," *Anal. Chim. Acta*, vol. 563, no. 1–2, pp. 44–50, Mar. 2006.
- [12] K. Waldron, "Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing: v. 1."
- [13] José Manuel Cruz, * and Herminia Domínguez, and J. C. Parajó, "Assessment of the Production of Antioxidants from Winemaking Waste Solids," 2004.
- [14] C. Negro, L. Tommasi, and A. Miceli, "Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts.," *Bioresour. Technol.*, vol. 87, no. 1, pp. 41–4, Mar. 2003.
- [15] A. M. González-Paramás, S. Esteban-Ruano, C. Santos-Buelga, S. de Pascual-Teresa, and J. C. Rivas-Gonzalo, "Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 2, pp. 234–238, Jan. 2004.
- [16] G. Spigno, T. Pizzorno, and D. M. De Faveri, "Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks.," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 10, pp. 4329–37, Jul. 2008.
- [17] C. Drosou, K. Kyriakopoulou, A. Bimpilas, D. Tsimogiannis, and M. Krokida, "A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 75, pp. 141–149, Nov. 2015.
- [18] D. Federation of European Chemical Societies. Food Chemistry Division., J. G. Kljusuric, R. Carle, and A. Schieber, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A, European food research and technology*. Springer-Verlag Heidelberg, 2005.
- [19] I. S. Arvanitoyannis, D. Ladas, and A. Mavromatis, "Potential uses and applications of treated wine waste: a review," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 5, pp. 475–487, May 2006.
- [20] E. BERTRAN, X. Sort, M. Soliva, and I. Trillas, "Composting winery waste:

- sludges and grape stalks*1," *Bioresour. Technol.*, vol. 95, no. 2, pp. 203–208, Nov. 2004.
- [21] M. A. Bustamante, M. D. Pérez-Murcia, C. Paredes, R. Moral, A. Pérez-Espinosa, and J. Moreno-Caselles, "Short-term carbon and nitrogen mineralisation in soil amended with winery and distillery organic wastes," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 17, pp. 3269–77, Dec. 2007.
- [22] M. Anastasiadi, H. Pratsinis, D. Kletsas, A.-L. Skaltsounis, and S. A. Haroutounian, "Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 2, pp. 316–322, Oct. 2012.
- [23] P. Lan, N. Brosse, P. Sannigrahi, and A. Ragauskas, *Industrial crops and products.*, vol. 33, no. 1. Elsevier Science, 2011.
- [24] D. P. Makris, G. Boskou, N. K. Andrikopoulos, and P. Kefalas, "Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 226, no. 5, pp. 1075–1079, Mar. 2008.
- [25] P. Rondeau, F. Gambier, F. Jolibert, and N. Brosse, "Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard," *Ind. Crops Prod.*, vol. 43, pp. 251–254, May 2013.
- [26] "EUR-Lex - I28117 - EN - EUR-Lex." [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=LEGISSUM:I28117>. [Accessed: 19-Jun-2018].
- [27] J. B. Pridham, "Low Molecular Weight Phenols in Higher Plants," *Annu. Rev. Plant Physiol.*, vol. 16, no. 1, pp. 13–36, Jun. 1965.
- [28] M. Naczki and F. Shahidi, "Extraction and analysis of phenolics in food," *J. Chromatogr. A*, vol. 1054, no. 1–2, pp. 95–111, Oct. 2004.
- [29] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards, "Methods for testing antioxidant activity," *Analyst*, vol. 127, no. 1, pp. 183–198, Jan. 2002.
- [30] C. H. Beckman, "Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence

- responses in plants?," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 57, no. 3, pp. 101–110, Sep. 2000.
- [31] M. Cheynier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., "Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification.," *Analisis 25*, vol. M14–M21., 1997.
- [32] P. Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, "Los compuestos fenólicos. In: Mundi-Prensa," in *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos, Madrid (España)*, 2000, pp. 114–136.
- [33] F. Zamora Marín, *ELABORACIÓN Y CRIANZA DEL VINO TINTO. ASPECTOS CIENTÍFICOS Y PRÁCTICOS*. 2003.
- [34] R. Rodríguez Montealegre, R. Romero Peces, J. L. Chacón Vozmediano, J. Martínez Gascueña, and E. García Romero, "Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 6–7, pp. 687–693, Sep. 2006.
- [35] D. P. Makris, G. Boskou, and N. K. Andrikopoulos, "Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 20, no. 2, pp. 125–132, Mar. 2007.
- [36] M. S. Tounsi *et al.*, *Industrial crops and products.*, vol. 30, no. 2. Elsevier Science, 2009.
- [37] M. MONAGAS, B. BARTOLOMÉ, and C. GÓMEZ-CORDOVÉS, "Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 45, no. 2, pp. 85–118, Mar. 2005.
- [38] P. Langcake, C. A. Cornford, and R. J. Pryce, "Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves," *Phytochemistry*, vol. 18, no. 6, pp. 1025–1027, Jan. 1979.
- [39] A. C. Douillet-Breuil, P. Jeandet, M. Adrian, and R. Bessis, "Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 10, pp. 4456–61, Oct. 1999.
- [40] R. R. (Ronald R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi, *Polyphenols in human health and disease*. .

- [41] N. Babbar, H. S. Oberoi, D. S. Uppal, and R. T. Patil, "Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 1, pp. 391–396, Jan. 2011.
- [42] W. R. Leifert and M. Y. Abeywardena, "Cardioprotective actions of grape polyphenols," *Nutr. Res.*, vol. 28, no. 11, pp. 729–737, Nov. 2008.
- [43] M. Anastasiadi, H. Pratsinis, D. Kletsas, A.-L. Skaltsounis, and S. A. Haroutounian, "Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts," *Food Res. Int.*, vol. 43, pp. 805–813.
- [44] R. R. (Ronald R. Watson and V. R. Preedy, *Bioactive foods in promoting health : fruits and vegetables*. Academic, 2010.
- [45] S. Renaud and M. de Lorgeril, "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.," *Lancet (London, England)*, vol. 339, no. 8808, pp. 1523–6, Jun. 1992.
- [46] S. C. Renaud, R. Guéguen, P. Conard, D. Lanzmann-Petithory, J.-M. Orgogozo, and O. Henry, "Moderate wine drinkers have lower hypertension-related mortality: a prospective cohort study in French men," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 3, pp. 621–625, Sep. 2004.
- [47] M. Jang *et al.*, "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.," *Science*, vol. 275, no. 5297, pp. 218–20, Jan. 1997.
- [48] M. M.-Y. Chan, "Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 63, no. 2, pp. 99–104, Jan. 2002.
- [49] B. D. Gehm, J. M. McAndrews, P. Y. Chien, and J. L. Jameson, "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 25, pp. 14138–43, Dec. 1997.
- [50] Z. Ju and L. R. Howard, "Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin," *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 4, pp. S270–S276, May 2006.

- [51] B. Lapornik, M. Prošek, and A. Golc Wondra, "Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time," *J. Food Eng.*, vol. 71, no. 2, pp. 214–222, Nov. 2005.
- [52] M. T. Bordignon-Luiz, C. Gauche, E. F. Gris, and L. D. Falcão, "Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 40, no. 4, pp. 594–599, May 2007.
- [53] S. R. Ahmad, P. Gokulakrishnan, R. Giriprasad, and M. A. Yattoo, "Fruit-based Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 55, no. 11, pp. 1503–1513, Sep. 2015.
- [54] V. J. Cheng, A. E.-D. A. Bekhit, M. McConnell, S. Mros, and J. Zhao, "Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate," *Food Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 474–482, Sep. 2012.
- [55] G. K. Jayaprakasha, T. Selvi, and K. K. Sakariah, "Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts."
- [56] D. A. Oliveira, A. A. Salvador, A. Smânia, E. F. A. Smânia, M. Maraschin, and S. R. S. Ferreira, "Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids," *J. Biotechnol.*, vol. 164, no. 3, pp. 423–432, Apr. 2013.
- [57] F. Castillo, D. Hernandez, G. Gallegos, R. Rodriguez, and C. N., "Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants," in *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, InTech, 2012.
- [58] A. N. H. Sociedad Mexicana de Fitogenética., S. B. Baños, and M. G. V. del Valle, *Revista fitotecnica mexicana.*, vol. 30, no. 2. Sociedad Mexicana de Fitogenética, 2007.
- [59] M. Wink, Ed., *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010.
- [60] P. Langcake and R. J. Pryce, "A new class of phytoalexins from grapevines," 1976.
- [61] C. Zheng *et al.*, "LongSAGE gene-expression profiling of *Botrytis cinerea* germination suppressed by resveratrol, the major grapevine phytoalexin,"

- Fungal Biol.*, vol. 115, no. 9, pp. 815–832, Sep. 2011.
- [62] M. Salgado, S. Rodríguez-Rojo, and M. J. Cocero, “Barley and yeast β -glucans as new emulsifier agents for the development of aqueous natural antifungal formulations,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 174, pp. 1114–1120, Oct. 2017.
- [63] E. Haslam, “Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action,” 1996.
- [64] D. P. Makris, G. Boskou, and N. K. Andrikopoulos, “Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures,” *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 15, pp. 2963–2967, Nov. 2007.
- [65] A. Teixeira *et al.*, “Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 9, pp. 15638–15678, Sep. 2014.
- [66] A. Barros *et al.*, “Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study,” *Food Res. Int.*, vol. 65, pp. 375–384, Nov. 2014.
- [67] Jean-Marc Souquet, Benoît Labarbe, Christine Le Guernevé, and Véronique Cheynier, and M. Moutounet, “Phenolic Composition of Grape Stems,” 2000.
- [68] N. Vivas, M.-F. Nonier, N. V. de Gaulejac, C. Absalon, A. Bertrand, and M. Mirabel, “Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 513, no. 1, pp. 247–256, Jun. 2004.
- [69] F. J. Vázquez-Armenta *et al.*, “Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 10, pp. 3192–3200, Sep. 2017.
- [70] M. R. González-Centeno, C. Rosselló, S. Simal, M. C. Garau, F. López, and A. Femenia, “Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 10, pp. 1580–1586, Dec. 2010.

- [71] M. Pinelo, A. Arnous, and A. S. Meyer, "Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 17, no. 11, pp. 579–590, Nov. 2006.
- [72] J. E. Cacace and G. Mazza, "Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries," *J. Food Eng.*, vol. 59, no. 4, pp. 379–389, Oct. 2003.
- [73] R. A. Muhlack, R. Potumarthi, and D. W. Jeffery, "Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products," *Waste Manag.*, vol. 72, pp. 99–118, Feb. 2018.
- [74] S. C. Paladino and C. A. Zuritz, "Extracto de semillas de vid: eficiencia de diferentes solventes," 2010.
- [75] M. Dhobi, V. Mandal, and S. Hemalatha, "Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan -silybinin," *J. Chem. Metrl*, vol. 3, no. 1, pp. 13–23, 2009.
- [76] J. A. ScienceDirect (Online service) and M. D. Luque de Castro, *Food chemistry*. Applied Science Publishers, 2011.
- [77] C. Dimou *et al.*, "Wine lees valorization: Biorefinery development including production of a generic fermentation feedstock employed for poly(3-hydroxybutyrate) synthesis," *Food Res. Int.*, vol. 73, pp. 81–87, Jul. 2015.
- [78] A. Sturzoiu and M. Stroescu, "Empirical Models Applied for Kinetics Extraction of β β β β β -carotene from *Rosa canina*," *REV. CHIM.* \square , vol. 62, no. 3, 2011.
- [79] M. Cissé, P. Bohuon, F. Sambe, C. Kane, M. Sakho, and M. Dornier, "Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling," *J. Food Eng.*, vol. 109, no. 1, pp. 16–21, Mar. 2012.
- [80] M. Virot, V. Tomao, C. Le Bourvellec, C. M. C. G. Renard, and F. Chemat, "Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 17, no. 6, pp. 1066–1074, Aug. 2010.
- [81] S. R. Shirsath, S. H. Sonawane, and P. R. Gogate, "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status,"

- Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 53, pp. 10–23, Mar. 2012.
- [82] M. PINELO, P. FABBRO, L. MANZOCCO, M. NUNEZ, and M. NICOLI, "Optimization of continuous phenol extraction from byproducts," *Food Chem.*, vol. 92, no. 1, pp. 109–117, Aug. 2005.
- [83] K. Ghafoor, Y. H. Choi, J. Y. Jeon, and I. H. Jo, "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 11, pp. 4988–4994, Jun. 2009.
- [84] C. M. Galanakis, "Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges," *Food Bioprod. Process.*, vol. 91, no. 4, pp. 575–579, Oct. 2013.
- [85] F. J. Barba, Z. Zhu, M. Koubaa, A. S. Sant'Ana, and V. Orlien, "Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 49, pp. 96–109, Mar. 2016.
- [86] K. Ganzler, A. Salgó, and K. Valkó, "Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography," *J. Chromatogr.*, vol. 371, pp. 299–306, Dec. 1986.
- [87] B. Kaufmann and P. Christen, "Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction," *Phytochem. Anal.*, vol. 13, no. 2, pp. 105–113, Mar. 2002.
- [88] E. Puértolas, M. Koubaa, and F. J. Barba, "An overview of the impact of electrotechnologies for the recovery of oil and high-value compounds from vegetable oil industry: Energy and economic cost implications," *Food Res. Int.*, vol. 80, pp. 19–26, Feb. 2016.
- [89] L. Wang and C. L. Weller, "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 17, no. 6, pp. 300–312, Jun. 2006.
- [90] F. Chemat, A. S. Fabiano-Tixier, M. A. Vian, T. Allaf, and E. Vorobiev, "Solvent-free extraction of food and natural products," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 157–168, Sep. 2015.
- [91] F. Chemat, M. A. Vian, and G. Cravotto, "Green Extraction of Natural

- Products: Concept and Principles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 7, pp. 8615–8627, Jul. 2012.
- [92] G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro, and P. Cintas, “Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 15, no. 5, pp. 898–902, Jul. 2008.
- [93] Z. Piñeiro, A. Marrufo-Curtido, C. Vela, and M. Palma, “Microwave-assisted extraction of stilbenes from woody vine material,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 103, pp. 18–26, May 2017.
- [94] Z. Piñeiro, R. F. Guerrero, M. I. Fernández-Marin, E. Cantos-Villar, and M. Palma, “Ultrasound-Assisted Extraction of Stilbenoids from Grape Stems,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 51, pp. 12549–12556, Dec. 2013.
- [95] S. Brianceau, M. Turk, X. Vitrac, and E. Vorobiev, “High voltage electric discharges assisted extraction of phenolic compounds from grape stems: Effect of processing parameters on flavan-3-ols, flavonols and stilbenes recovery,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 35, pp. 67–74, Jun. 2016.
- [96] A. A. Casazza, B. Aliakbarian, S. Mantegna, G. Cravotto, and P. Perego, “Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques,” *J. Food Eng.*, vol. 100, no. 1, pp. 50–55, Sep. 2010.
- [97] A. Liazid, R. F. Guerrero, E. Cantos, M. Palma, and C. G. Barroso, “Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins,” *Food Chem.*, vol. 124, no. 3, pp. 1238–1243, Feb. 2011.
- [98] S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, and M. J. Cocero, “Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents,” *J. Food Eng.*, vol. 109, no. 1, pp. 98–103, Mar. 2012.
- [99] G. Spigno and D. M. De Faveri, “Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study,” *J. Food Eng.*, vol. 93, no. 2, pp. 210–217, Jul. 2009.
- [100] C. Proestos and M. Komaitis, “Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds Effect of heavy metals (Cr & Ni) on the secondary metabolism of potatoes and carrots View project

- Routine food analysis techniques View project Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds," *LWT*, vol. 41, pp. 652–659, 2008.
- [101] M. R. Carballido Reboredo, "Síntesis asistida por microondas de compuestos de interés biológico e industrial, haloarenos, fulvenos, tricloropirrolidonas, azoles y flavonoides: modelado de espectros de absorción electrónica de flavonoides," p. 1, 2008.
- [102] R. Yedhu Krishnan and K. S. Rajan, "Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 157, pp. 169–178, Jan. 2016.
- [103] 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, Jan. 2014.
- [104] A. Álvarez, J. Poejo, A. A. Matias, C. M. M. Duarte, M. J. Cocero, and R. B. Mato, "Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity," *Food Bioprod. Process.*, vol. 106, pp. 162–170, Nov. 2017.
- [105] E. T. Thostenson and T.-W. Chou, "Microwave processing: fundamentals and applications," *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 30, no. 9, pp. 1055–1071, Sep. 1999.
- [106] K. Sólyom, R. Solá, M. J. Cocero, and R. B. Mato, "Thermal degradation of grape marc polyphenols," *Food Chem.*, vol. 159, pp. 361–366, Sep. 2014.
- [107] R. Romero-Díez, S. Rodríguez-Rojo, M. J. Cocero, C. M. M. Duarte, A. A. Matias, and M. R. Bronze, "Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities," *Food Chem.*, vol. 259, pp. 188–195, Sep. 2018.
- [108] K. Sólyom, R. B. Mato, S. I. Pérez-Elvira, and M. J. Cocero, "The influence of the energy absorbed from microwave pretreatment on biogas production from secondary wastewater sludge," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 23, pp. 10849–10854, Dec. 2011.
- [109] A. Pękal and K. Pyrzynska, "Evaluation of Aluminium Complexation Reaction

- for Flavonoid Content Assay,” *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, pp. 1776–1782, Oct. 2014.
- [110] P. Ribéreau-Gayon and E. Stonestreet, “[Determination of anthocyanins in red wine].,” *Bull. Soc. Chim. Fr.*, vol. 9, pp. 2649–52, Sep. 1965.
- [111] *,† Boxin Ou, † and Maureen Hampsch-Woodill, and R. L. Prior‡, “Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe,” 2001.
- [112] M. Adrian, P. Jeandet, J. Veneau, L. A. Weston, and R. Bessis, “Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1689–1702, Jul. 1997.
- [113] C. Drosou, K. Kyriakopoulou, A. Bimpilas, D. Tsimogiannis, and M. Krokida, “A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 75, pp. 141–149, Nov. 2015.
- [114] C. Vergara *et al.*, “Stilbene Levels in Grape Cane of Different Cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS Method,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 4, pp. 929–933, Feb. 2012.
- [115] Z. Piñeiro, A. Marrufo-Curtido, M. Serrano, and M. Palma, “Ultrasound-Assisted Extraction of Stilbenes from Grape Canes,” *Molecules*, vol. 21, no. 6, p. 784, Jun. 2013.
- [116] C. Dimou, A. Vlysidis, N. Kopsahelis, S. Papanikolaou, A. A. Koutinas, and I. K. Kookos, “Techno-economic evaluation of wine lees refining for the production of value-added products,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 116, pp. 157–165, Dec. 2016.
- [117] Y.-J. Cho, J.-Y. Hong, H. S. Chun, S. K. Lee, and H.-Y. Min, “Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes,” *J. Food Eng.*, vol. 77, no. 3, pp. 725–730, Dec. 2006.
- [118] M. Ji, Q. Li, H. Ji, and H. Lou, “Investigation of the distribution and season regularity of resveratrol in *Vitis amurensis* via HPLC-DAD-MS/MS,” *Food Chem.*, vol. 142, pp. 61–65, Jan. 2014.

- [119] V. Lattanzio, V. M. T. Lattanzio, and A. Cardinali, "Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects," *Res. Signpost*, vol. 37661, no. 2, pp. 23–67, 2006.
- [120] D. Goldstein, J. C.-F. proceedings, and undefined 1981, "Interaction of ethanol with biological membranes.," *europemc.org*.
- [121] C. Le Bourvellec, S. Guyot, and C. M. G. . Renard, "Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1672, no. 3, pp. 192–202, Jun. 2004.
- [122] C. Le Bourvellec and C. M. G. C. Renard, "Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, no. 3, pp. 213–248, Mar. 2012.
- [123] C. M. Renard, A. Baron, S. Guyot, and J. F. Drilleau, "Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 29, no. 2, pp. 115–25, Aug. 2001.
- [124] V. Filip, P. M., J. Šmidrkal, Š. Z., K. Melzoch, and Š. Schmidt, "Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness," *Food Chem.*, vol. 83, no. 4, pp. 585–593, Dec. 2003.
- [125] C. Lambert *et al.*, "Comparative Analyses of Stilbenoids in Canes of Major *Vitis vinifera* L. Cultivars," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 47, pp. 11392–11399, Nov. 2013.
- [126] P. Ewald, U. Delker, and P. Winterhalter, "Quantification of stilbenoids in grapevine canes and grape cluster stems with a focus on long-term storage effects on stilbenoid concentration in grapevine canes," *Food Res. Int.*, vol. 100, pp. 326–331, Oct. 2017.
- [127] A. Barros *et al.*, "New grape stems-based liqueur: Physicochemical and phytochemical evaluation," *Food Chem.*, vol. 190, pp. 896–903, Jan. 2016.

9. ANEXOS

Tabla 8.- Análisis estadístico de datos E_{S-L} convencional. Valores con distintas letras son significativamente diferentes al nivel de significancia $p < 0.05$

		TPC $mg_{GAE}/g_{DRY\ STEM}$	SD	TFC $mg_{CAE}/g_{DRY\ STEM}$	SD
R_{S-L} (g/mL)	0.10	19.00 ^a	1.92	19.59 ^a	0.69
	0.07	19.45 ^a	0.62	18.62 ^a	2.45
	0.04	18.28 ^a	0.58	20.89 ^a	1.84
% EtOH	20	26.10 ^a	1.92	24.80 ^a	0.69
	50	34.29 ^b	1.92	31.81 ^b	0.06
	80	19.00 ^a	1.92	19.59 ^c	1.23
T (°C)	25	34.29 ^a	1.92	31.81 ^a	0.06
	50	28.39 ^b	1.46	27.92 ^b	0.99
	75	38.15 ^c	0.99	37.56 ^c	1.46

Tabla 9.- Análisis estadístico de datos comparación MW con E_{S-L} convencional. Valores con distintas letras son significativamente diferentes al nivel de significancia $p < 0.05$

	TPC $mg_{GAE}/g_{DRY\ STEM}$	SD	TFC $mg_{CAE}/g_{DRY\ STEM}$	SD
$E_{S-L\ opt}$	38.10 ^a	1.0	35.50 ^a	1.50
MW _{opt}	44.40 ^b	1.2	47.60 ^b	0.30