



TESIS DE DOCTORADO

**OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES  
NATURALES A PARTIR DE RESIDUOS  
LIGNOCELULÓSICOS**

Adela Fernández Agulló

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



## DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

D<sup>a</sup>. **Adela Fernández Agulló**

Título de la tesis: **OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión impresa presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso de que original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, de de 2021



## **AUTORIZACIÓN DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS**

### **Obtención de antioxidantes naturales a partir de residuos lignocelulósicos**

D<sup>a</sup>. Julia González Álvarez y D<sup>a</sup>. María Sonia Freire Leira

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D<sup>a</sup>. Adela Fernández Agulló, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaramos también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, de de 2021





*A mi madre*



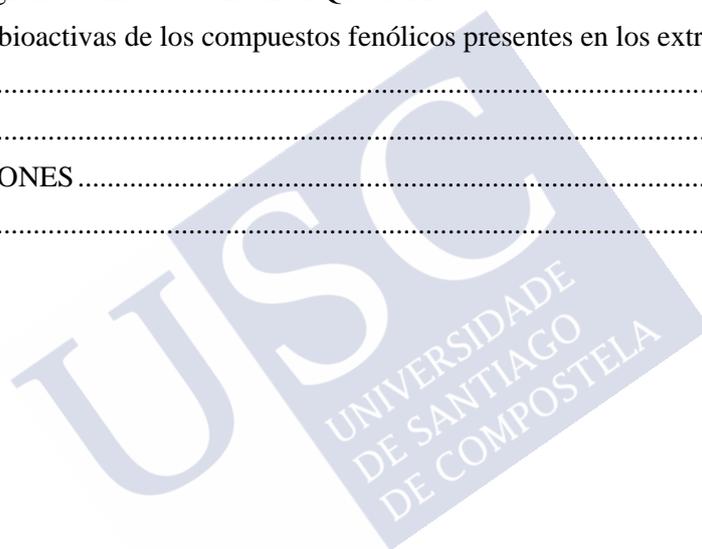


## LISTA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
RESUMEN .....	IX
RESUMO .....	XIII
ABSTRACT .....	XVII
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Los residuos lignocelulósicos .....	3
1.2 Los antioxidantes .....	5
1.2.1 Radicales libres y estrés oxidativo .....	5
1.2.2 Antioxidantes endógenos y exógenos .....	6
1.2.3 Antioxidantes en alimentos .....	7
1.2.4 Mecanismos de acción de los antioxidantes .....	8
1.2.5 Clasificación de los antioxidantes .....	9
1.2.5.1 Antioxidantes sintéticos .....	9
1.2.5.2 Antioxidantes naturales .....	10
1.3 Procesos para la extracción de compuestos antioxidantes .....	16
1.3.1 Tecnologías de extracción convencionales .....	16
1.3.2 Tecnologías de extracción no convencionales .....	17
1.4 Determinación de la capacidad antioxidante .....	19
1.5 Determinación de la capacidad antimicrobiana .....	21
2 OBJETIVOS .....	25
3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
3.1 Materiales lignocelulósicos.....	29
3.1.1 Residuos del procesado de la castaña: erizo y cáscara de castaña.....	29
3.1.2 Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto .....	30
3.1.3 Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal.....	30
3.1.4 Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual .....	31
3.2 Preparación de los materiales .....	32
3.3 Obtención de los extractos .....	33
3.3.1 Extracción Soxhlet .....	33
3.3.2 Maceración con disolventes .....	33
3.3.3 Extracción asistida por microondas.....	34

3.4 Caracterización de los extractos .....	34
3.4.1 Determinación del contenido en fenoles totales.....	35
3.4.2 Método FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	36
3.4.2.1 Método del Poder Reductor.....	36
3.4.3 Método DPPH.....	37
3.4.4 Método ABTS .....	38
3.4.5 Método de inhibición del radical Óxido Nítrico .....	38
3.4.6 Determinación de la capacidad antimicrobiana .....	39
3.4.7 Identificación y cuantificación de los compuestos por espectroscopía de masas .....	39
3.4.7.1 Análisis por espectroscopía de masas RP-HPLC-ESI-TOF .....	40
3.4.7.2 Análisis por espectroscopía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS.....	41
3.5 Planificación de la experimentación.....	43
3.5.1 Estudio preliminar de las condiciones de extracción .....	43
3.5.1.1 Residuos del procesado de la castaña: erizo de castaña.....	43
3.5.1.2 Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto .....	43
3.5.1.3 Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal .....	43
3.5.1.4 Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual .....	44
3.5.2 Estudio del proceso de extracción del erizo y cáscara de castaña.....	44
3.5.2.1 Optimización del proceso de extracción del erizo de castaña.....	44
3.5.2.2 Estudio comparativo de extractos de erizo y cáscara de castaña .....	45
3.5.2.3 Extracción asistida por microondas (EAM) de erizo y cáscara de castaña.....	46
3.5.2.4 Estudio de la cinética del proceso de extracción de erizo y cáscara de castaña.....	46
3.5.3 Optimización del proceso de extracción de las chapas de eucalipto.....	47
3.5.4 Optimización del proceso de extracción de hojas de nogal .....	48
3.5.5 Caracterización de los extractos.....	48
3.5.6 Análisis estadístico.....	49
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1 Estudio preliminar de las condiciones de extracción.....	53
4.1.1 Residuos del procesado de la castaña: erizo de castaña .....	54
4.1.2 Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto .....	58
4.1.3 Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal .....	63
4.1.4 Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual.....	67
4.1.5 Relaciones entre propiedades.....	70
4.2 Estudio del proceso de extracción del erizo y cáscara de castaña .....	72
4.2.1 Optimización del proceso de extracción del erizo de castaña.....	72
4.2.2 Estudio comparativo de extractos de erizo y cáscara de castaña .....	84

4.2.3 Extracción asistida por microondas (EAM) de erizo y cáscara de castaña .....	91
4.2.4 Estudio de la cinética del proceso de extracción de erizo y cáscara de castaña .....	94
4.3 Optimización del proceso de extracción de chapas de eucalipto. ....	98
4.4 Optimización del proceso de extracción de hojas de nogal .....	105
4.5 Determinación de la capacidad antimicrobiana de extractos de erizo y cáscara de castaña, chapa de eucalipto y pericarpio de nuez .....	115
4.6 Estudio del perfil fenólico de los extractos .....	120
4.6.1 Análisis del perfil fenólico de extractos mediante espectrometría de masas RP-HPLC-ESI- TOF .....	120
4.6.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS/MS.....	126
4.6.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hoja de nogal mediante cromatografía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS .....	127
4.6.4 Propiedades bioactivas de los compuestos fenólicos presentes en los extractos.....	129
5 CONCLUSIONES.....	133
6 BIBLIOGRAFÍA.....	139
LISTA DE PUBLICACIONES .....	149
Agradecimientos.....	153







## ABREVIATURAS

---

### EXTRACTOS

BF	Extractos de biomasa forestal
CC	Extractos de cáscara de castaña
ChE	Extractos de chapas de eucalipto
EC	Erizo de castaña
EC.A	Extractos acuosos de erizo de castaña
EC.Ac	Extractos de erizo de castaña con acetona
EC.Et	Extractos etanólicos de erizo de castaña
EC.Me	Extractos metanólicos de erizo de castaña
HN	Extractos de hoja de nogal
InAv	Extractos de involucro de avellana
MAc	Extractos de madera de acacia
PN	Extractos de pericarpio de nuez
A	Antioxidante
AAE	Equivalente de ácido ascórbico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
b.s.	Base seca
CCD	Diseño central compuesto
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CUPRAC	<i>Cupric reducing antioxidant capacity</i> (Capacidad antioxidante de reducción del cobre)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
DS	Diferencia significativa
EAM	Extracción asistida por microondas
EC <sub>50</sub>	Concentración a la que se alcanza el 50% de inhibición del radical
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
Exp.	Experimental
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos)
FRAP	<i>Ferric reducing antioxidant power</i> (Capacidad antioxidante de reducción del hierro)
GAE	Equivalente de ácido gálico
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> (generalmente reconocido como seguro)
HAT	<i>Hydrogen atom transfer</i> (transferencia de un átomo de hidrógeno)
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IE	Compuesto identificado según estándar
IMZ	Compuesto identificado según su peso molecular
LC-MS/MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas
EAM	Extracción asistida por microondas

MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
NDS	No existe diferencia significativa
NT	No testado
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
PG	Propil Galato
PI	Porcentaje de inhibición
PLE	Extracción líquida presurizada
Pred.	Predicho
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (especies reactivas del nitrógeno)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas del oxígeno)
RP-HPLC-ESI-TOF	Espectroscopía de masas con ionización por electrospray y analizador de tiempo de vuelo acoplada con cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
RSS	<i>Reactive Sulfur Species</i> (especies reactivas del azufre)
SET	<i>Single electron transfer</i> (Transferencia de un electrón)
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SFEM	Extracción por microondas libre de disolvente
SNP	Nitroprusiato de sodio
SPLET	<i>Sequential proton loss electron transfer</i> (transferencia secuencial de pérdida de electrone y protonación)
SWE	Extracción con agua subcrítica
TBHQ	Terbutilhidroquinona
TFC	Contenido en fenoles totales
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
T.R.	Tiempo de retención
TRAP	<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i> (Poder de captación de radicales totales)
TRE	Equivalente de Trolox
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
ufc	Unidades formadoras de colonias
UPLC/ESI-QTOF-MS	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con ionización por electrospray y espectrometría de masas de tiempo de vuelo
$x_i$	Variable independiente
$x_i^*$	Variable independiente codificada
$Y_i$	Variable dependiente

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.4.1 Condiciones del análisis por espectroscopía de masas RP-HPLC-ESI-TOF .....	40
Tabla 3.4.2 Condiciones del análisis por espectroscopía de masas LC-MS/MS.....	41
Tabla 3.4.3 Recta de calibrado para los compuestos estándar analizados mediante LC-MS/MS .....	41
Tabla 3.4.4 Condiciones del análisis por espectroscopía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS.....	42
Tabla 3.4.5 Recta de calibrado para los compuestos estándar analizados mediante UPLC/ESI-QTOF-MS .....	42
Tabla 3.5.1 Diseño experimental Box-Behnken aplicado al erizo de castaña.....	45
Tabla 3.5.2 Diseño experimental Box-Behnken aplicado a las chapas de eucalipto.....	47
Tabla 3.5.3 Diseño experimental Box-Behnken aplicado a las hojas de nogal.....	48
Tabla 4.1.1 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de erizo de castaña.....	54
Tabla 4.1.2 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de cáscara de castaña .....	54
Tabla 4.1.3 Propiedades antioxidantes de extractos de distintos materiales .....	57
Tabla 4.1.4 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de chapa de eucalipto .....	59
Tabla 4.1.6 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de pericarpio de nuez.....	63
Tabla 4.1.7 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de hoja de nogal.....	66
Tabla 4.1.8 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual.....	67
Tabla 4.2.1 Diseño experimental Box-Behnken aplicado al erizo de castaña con disoluciones metanólicas .....	73
Tabla 4.2.2 Diseño experimental Box-Behnken aplicado al erizo de castaña con disoluciones etanólicas .....	74
Tabla 4.2.3 Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para las extracciones metanólicas de erizo de castaña.....	76
Tabla 4.2.4 Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para las extracciones etanólicas de erizo de castaña.....	77
Tabla 4.2.5 Ecuaciones del modelo para el diseño experimental Box-Behnken de la extracción de erizo de castaña.....	78
Tabla 4.2.6 Propiedades de los extractos de erizo de castaña en las condiciones óptimas .....	80
Tabla 4.2.7 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de erizo y cáscara de castaña .	84
Tabla 4.2.8 Extracción asistida por microondas. Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de erizo y cáscara de castaña.....	92
Tabla 4.2.9 Parámetros del modelo de Peleg para el contenido en fenoles totales .....	97
Tabla 4.2.10 Parámetros del modelo de Peleg para la capacidad antioxidante FRAP .....	97
Tabla 4.3.1 Diseño experimental Box-Behnken para la EAM de chapas de eucalipto con EtOH.....	99
Tabla 4.3.2 Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para la EAM de chapas de eucalipto .....	99
Tabla 4.3.3 Ecuaciones del modelo para el diseño experimental Box-Behnken de la EAM de chapa de eucalipto .....	101
Tabla 4.3.4 Propiedades de los extractos de chapa de eucalipto en las condiciones óptimas .....	104

Tabla 4.4.1	Diseño experimental Box-Behnken aplicado a la extracción de hojas de nogal .....	106
Tabla 4.4.2	Coefficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para las extracciones de hojas de nogal .....	107
Tabla 4.4.3	Ecuaciones del modelo del diseño experimental Box-Behnken para la extracción de hojas de nogal.....	108
Tabla 4.4.4	Propiedades de los extractos de hojas de nogal en las condiciones óptimas .....	113
Tabla 4.5.1	Codificación de la actividad antimicrobiana en función del radio de inhibición .....	115
Tabla 4.5.2	Actividad antimicrobiana frente a bacterias de extractos acuosos seleccionados .....	116
Tabla 4.5.3	Actividad antimicrobiana frente a levaduras de extractos acuosos seleccionados .....	116
Tabla 4.6.1	Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de erizo de castaña.....	121
Tabla 4.6.2	Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de cáscara de castaña.....	122
Tabla 4.6.3	Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de chapa de eucalipto .....	123
Tabla 4.6.4	Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de involucro de avellana .....	124
Tabla 4.6.5	Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de madera de acacia.....	124
Tabla 4.6.6	Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de biomasa forestal .....	125
Tabla 4.6.7	Cuantificación de compuestos fenólicos mediante LC-MS/MS.....	126
Tabla 4.6.8	Compuestos fenólicos identificados y cuantificados mediante UPLC/ESI-QTOF-MS en extractos de hoja de nogal.....	128

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2.1 Esquema de la reacción de peroxidación lipídica .....	7
Figura 1.2.2 Estructura de los ácidos fenólicos cinámico y benzoico.....	12
Figura 1.2.3 Estructura base de los flavonoides.....	12
Figura 1.2.4 Estructura de los flavonoles.....	13
Figura 1.2.5 Estructura de los principales flavanoles.....	13
Figura 1.2.6 Estructura de las antocianidinas.....	14
Figura 1.2.7 Estructura de las isoflavonas.....	14
Figura 1.2.8 Estructura de las flavanonas.....	14
Figura 1.2.9 Estructura de las flavonas .....	15
Figura 3.1.1 Cáscara y erizo de la castaña .....	30
Figura 3.1.2 Chapas de eucalipto .....	30
Figura 3.1.3 Pericarpio de nuez.....	31
Figura 3.1.4 Hoja de nogal.....	31
Figura 3.1.5 Involucro de avellana.....	31
Figura 3.1.6 Madera de acacia molida .....	32
Figura 3.1.7 Biomasa residual molida.....	32
Figura 3.4.1 Calibrado para la determinación del contenido total en fenoles. Método de Folin-Ciocalteu.....	35
Figura 3.4.2 Calibrado para la determinación de la actividad antioxidante FRAP .....	36
Figura 3.4.3 Calibrado para la determinación del equivalente en Trolox de los extractos. Método DPPH.....	37
Figura 3.4.4 Calibrado para la determinación del equivalente en Trolox de los extractos. Método ABTS.....	38
Figura 4.1.1 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de los extractos de erizo de castaña comparados con los del compuesto de referencia Trolox .....	56
Figura 4.1.2 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos de chapa de eucalipto sin moler y molida, comparados con los del compuesto de referencia Trolox .....	61
Figura 4.1.3 Dendograma correspondiente a las propiedades antioxidantes de los extractos de chapa de eucalipto sin moler .....	63
Figura 4.1.4 Poder reductor de los extractos de pericarpio de la nuez.....	65
Figura 4.1.5 Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos de pericarpio de nuez comparados con los del compuesto de referencia Trolox.....	65
Figura 4.1.6 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos con mayor capacidad antioxidante de involucro de avellana, madera de acacia y biomasa forestal, comparados con los del compuesto de referencia Trolox.....	69
Figura 4.1.7 Correlación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante FRAP de los extractos de erizo de castaña (EC), chapa de eucalipto (ChE), hoja de nogal (HN), involucro de avellana (InAV), madera de acacia (MAc) y biomasa forestal (BF).....	70

Figura 4.1.8 Correlación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad de inhibición DPPH (a) y ABTS (b) de los extractos de erizo de castaña (EC), chapa de eucalipto (ChE), pericarpio de nuez (PN), involucro de avellana (InAV), madera de acacia (MAc) y biomasa forestal (BF).....	70
Figura 4.1.9 Correlación entre la capacidad antioxidante FRAP y la capacidad de inhibición del radical DPPH de los extractos de erizo de castaña (EC), chapa de eucalipto (ChE), involucro de avellana (InAV), madera de acacia (MAc) y biomasa forestal (BF).....	71
Figura 4.2.1 Valores experimentales frente a valores predichos por el modelo para el rendimiento de extracción (a) ( $Y_1$ , %) y el contenido en fenoles totales (TFC) (b) ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) del erizo de castaña.....	75
Figura 4.2.2 Superficie de respuesta para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH (a tiempos de 30, 75 y 120 min) y de EtOH del erizo de castaña.....	81
Figura 4.2.3 Superficie de respuesta para el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH y EtOH a tiempos de 30, 75 y 120 min de extractos de erizo de castaña.....	82
Figura 4.2.4 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH y EtOH de extractos de erizo de castaña.....	83
Figura 4.2.5 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante DPPH ( $Y_4$ ) y ABTS ( $Y_5$ ) (mmol TRE/g extracto) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH y EtOH de extractos de erizo de castaña.....	83
Figura 4.2.6 Influencia de la temperatura en el rendimiento de extracción (a), contenido en fenoles totales (b), capacidad antioxidante FRAP (c), DPPH (d) y ABTS (e) de los extractos de erizo (EC, línea sólida) y cáscara de castaña (CC, línea discontinua).....	86
Figura 4.2.7 Dendograma de los extractos de cáscara (a) y erizo (b) de castaña.....	88
Figura 4.2.8 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos de erizo (EC) y cáscara (CC) de castaña comparados con los del compuesto de referencia Trolox.....	89
Figura 4.2.9 Porcentaje de inhibición del radical óxido nítrico de extractos acuosos a 75°C de erizo (EC) y cáscara (CC) de castaña.....	90
Figura 4.2.10 Comparación entre los resultados obtenidos mediante extracción por maceración con disolventes y extracción asistidas por microondas (EAM) para el rendimiento de extracción (a), el contenido en fenoles totales (b) y la capacidad antioxidante FRAP (c). .....	93
Figura 4.2.11 Contenido en fenoles totales de los extractos de erizo EC (a) y cáscara de castaña CC (b) frente al tiempo (símbolos) junto con los valores predichos por el modelo de Peleg.....	95
Figura 4.2.12 Capacidad antioxidante FRAP de los extractos de erizo EC (a) y cáscara de castaña CC (b) frente al tiempo (símbolos) junto con los valores predichos por el modelo de Peleg.....	96
Figura 4.3.1 Valores experimentales frente a valores predichos para la capacidad antioxidante FRAP de extractos de chapas de eucalipto ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto).....	100
Figura 4.3.2 Superficie de respuesta para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) en función de la temperatura y del tiempo de la EAM de chapa de eucalipto.....	102
Figura 4.3.3 Superficie de respuesta para el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100g extracto) en función de la temperatura y la relación líquido/sólido de extractos obtenidos por EAM de chapa de eucalipto.....	102
Figura 4.3.4 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto) en función de la temperatura y la relación líquido/sólido para tiempo 5, 15 y 10 min para extractos obtenidos por EAM de chapa de eucalipto.....	103

Figura 4.4.1 Valores experimentales frente a valores predichos para el rendimiento de extracción (a) ( $Y_1$ , %) y la capacidad antioxidante DPPH (b) ( $Y_4$ , mmol TRE/g extracto).....	108
Figura 4.4.2 Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH a 30, 75 min y 120 min .....	110
Figura 4.4.3 Superficie de respuesta para el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH .....	111
Figura 4.4.4 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH.....	111
Figura 4.4.5 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante DPPH ( $Y_4$ , mmol TRE/g extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH.....	112
Figura 4.4.6 Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante ABTS ( $Y_4$ , mmol TRE/g extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y la concentración de EtOH para tiempos de 120 y 35 y 75 min.....	112
Figura 4.4.7 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos de hojas de nogal obtenidos en las condiciones óptimas comparados con los del compuesto de referencia Trolox .....	114
Figura 4.5.1 Radios de inhibición frente a bacterias de extractos acuosos de (a) erizo de castaña (EC) y (b) cáscara de castaña (CC) a diferentes concentraciones .....	117
Figura 4.5.2 Radios de inhibición frente a bacterias (a) y levaduras (b) de extractos acuosos de chapa de eucalipto (ChE) a diferentes concentraciones.....	118
Figura 4.5.3 Radio de inhibición frente a bacterias de extractos acuosos de pericarpio de nuez (PN) a diferentes concentraciones.....	119
Figura 4.6.1 Cromatograma HPLC de los extractos de erizo de castaña obtenidos con agua, MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C .....	121
Figura 4.6.2 Cromatograma HPLC de los extractos de cáscara de castaña obtenidos con agua, MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C .....	122
Figura 4.6.3 Cromatograma HPLC de los extractos de chapa de eucalipto obtenidos con agua y EtOH a 50°C .....	123
Figura 4.6.4 Cromatograma HPLC de los extractos de involucro de avellana (EtOH 50%), madera de acacia (EtOH) y biomasa forestal (MeOH 50%).....	125
Figura 4.6.5 Cromatograma UPLC de los extractos de hoja de nogal en las condiciones óptimas ....	128



## RESUMEN

Los compuestos antioxidantes son sustancias que protegen a los productos de reacciones de degradación que pueden afectar a sus propiedades. Así, la industria alimentaria utiliza aditivos antioxidantes para aumentar la vida útil de los productos y evitar cambios en su sabor, color y textura que pueden afectar a la seguridad del consumidor. Los antioxidantes actúan inhibiendo la formación de radicales libres involucrados en procesos de estrés oxidativo por lo que se utilizan también en la industria cosmética como agentes fotoprotectores y preventivos del envejecimiento celular. El estrés oxidativo está relacionado con numerosas enfermedades, lo que justifica su interés para la industria farmacéutica.

En la actualidad, existe una marcada tendencia hacia el consumo de sustancias naturales lo que, unido a la percepción de inseguridad que el consumidor tiene del uso de aditivos sintéticos, está incentivando la búsqueda de compuestos antioxidantes de origen natural como alternativa a los sintéticos.

Las investigaciones están siendo dirigidas hacia la obtención de antioxidantes naturales a partir de materiales vegetales, especialmente de aquellos más económicos como son los residuos lignocelulósicos generados en la industria alimentaria, agrícola o forestal. Estos materiales contienen compuestos de tipo fenólico con demostradas propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

En esta tesis doctoral se planteó la separación de compuestos antioxidantes de alto valor añadido a partir de residuos generados durante el procesado de la castaña (erizo y cáscara de castaña), de la nuez (pericarpio de la nuez y hojas de nogal) y de la avellana (involucro de avellana), residuos de la industria maderera (restos del cizallado de la preparación de chapas de eucalipto) y de la industria forestal (madera de acacia y biomasa forestal). Muchos de estos residuos están en la actualidad infrutilizados o destinados a la producción de energía y su valorización contribuiría al desarrollo de la economía circular.

Respecto a los residuos del procesado de la castaña (*Castanea sativa*), se comenzó por un estudio preliminar de las condiciones de extracción del erizo para analizar el efecto del disolvente sobre el rendimiento de extracción y las propiedades de los extractos (contenido en fenoles totales (TFC) y capacidad antioxidante según los métodos FRAP, DPPH y ABTS). Los disolventes empleados fueron acetona, etanol, metanol y agua. Los mejores resultados de rendimiento y propiedades de los extractos se obtuvieron en la extracción con agua a 90°C durante 1 h, seguida por las extracciones Soxhlet con metanol y etanol durante 15 h.

En base a los resultados obtenidos, se planificó un diseño experimental Box-Behnken y se aplicó la metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de la extracción del erizo de castaña empleando disoluciones acuosas de etanol y metanol. Se analizó la influencia de la temperatura (25-50-75°C), tiempo (30-75-120 min) y concentración de

disolvente (50-70-90%, v/v) sobre el rendimiento de extracción y propiedades de los extractos, resultando ser la temperatura y la concentración los factores más influyentes. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron 75°C de temperatura, 50% de concentración de disolvente y tiempo de 75 min en las extracciones metanólicas y 30 min en las etanólicas. En estas condiciones, los rendimientos de extracción fueron similares para ambos disolventes (18,95% para las extracciones metanólicas y 17,95% para las etanólicas), aunque las propiedades de los extractos resultaron superiores en las metanólicas (TFC de 36,32 g equivalentes en ácido gálico (GAE)/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 2361 nmol equivalentes en ácido ascórbico (AAE)/mg extracto; DPPH de 3,24 mmol equivalentes en Trolox (TRE)/g extracto y ABTS de 3,58 mmol TRE/g extracto) respecto a las etanólicas (TFC de 26,11 g GAE/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 1547 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 2,43 mmol TRE/g extracto y ABTS de 2,95 mmol TRE/g extracto).

En la siguiente etapa se realizó un estudio comparativo entre los extractos de erizo y cáscara de castaña obtenidos bajo las mismas condiciones. Las extracciones se realizaron a 25, 50 y 75°C con disoluciones acuosas de etanol y metanol a la concentración que resultó óptima en el diseño experimental previamente realizado (50%) y con agua, que fue el disolvente que mejores resultados proporcionó en el estudio preliminar. Los rendimientos de extracción resultaron más elevados para el erizo (8,54-19,58%) que para la cáscara (2,91-13,27%) mientras que las propiedades antioxidantes resultaron superiores en los extractos de la cáscara, seleccionándose como óptima la extracción con agua a 75°C (TFC de 56,23 g GAE/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 3891 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 5,84 mmol TRE/g extracto y ABTS de 4,88 mmol TRE/g extracto). Los extractos de erizo con mejores propiedades antioxidantes se obtuvieron con metanol al 50% a 75°C, aunque al obtenerse resultados similares con etanol al 50%, se decidió priorizar su uso al ser un disolvente catalogado como GRAS, es decir, seguro para su aplicación en alimentos. Los extractos acuosos de ambos materiales demostraron capacidad para inhibir el radical óxido nítrico superior a la del antioxidante sintético BHA. La cinética del proceso de extracción se ajustó al modelo de Peleg. El uso de la extracción asistida por microondas mejoró ligeramente las propiedades de los extractos de erizo de castaña, aunque no los de la cáscara; sin embargo, esta tecnología no convencional supuso una ventaja al reducir el tiempo de extracción de entre 60 y 120 min a 15 min.

Respecto a los residuos de chapas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), en una primera etapa se analizó el efecto de la temperatura (50-75°C), disolvente (agua, metanol, etanol, metanol al 50% y etanol al 50%) y tamaño de partícula (chapas molidas o sin moler) sobre el rendimiento y las propiedades de los extractos obtenidos en maceración con disolventes. El aumento de la temperatura y la reducción del tamaño de partícula incrementó el rendimiento de la extracción, pero no mejoró las propiedades de los extractos. La extracción con etanol a 50°C condujo a las mejores propiedades de los extractos (TFC de 85,71 g GAE/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 7787 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 9,67 mmol TRE/g extracto y ABTS de 5,94 mmol TRE/g extracto).

En una segunda etapa se aplicó un diseño factorial Box-Behnken empleando la extracción asistida por microondas para analizar la influencia de la temperatura (50-60-70°C), la relación sólido/líquido (1/5, 1/7,5 y 1/10 g/ml) y el tiempo (5-10-15 min). Las condiciones óptimas seleccionadas fueron 65°C de temperatura, relación sólido/líquido 1/8,8 g/ml y tiempo de 10 min. El tiempo resultó ser la variable menos significativa sobre las propiedades de los extractos, mientras que la relación sólido/líquido no afectó al rendimiento de extracción. Las propiedades

de los extractos no mejoraron respecto a las obtenidas en la extracción convencional; sin embargo, la extracción asistida por microondas redujo el tiempo de extracción de 90 a 10 min y el volumen de disolvente.

Respecto a los residuos del nogal, en la extracción de pericarpio de nuez (*Juglans regia* L.) se estudió la influencia del disolvente (agua, metanol, etanol, metanol al 50% y etanol al 50%) obteniéndose los mejores resultados, tanto de rendimiento de extracción como de propiedades de los extractos, en las extracciones con agua a ebullición (rendimiento de 44,11%, TFC de 4,04 g GAE/100 g extracto y actividad antioxidante DPPH de 0,22 mmol TRE/g extracto). Para las hojas de nogal (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*), tras establecer como óptima una relación sólido/líquido de 1/10 g/ml, se analizó el efecto de la temperatura (25-50-75°C), el tiempo (30-75-120 min) y la concentración de etanol (10-50-90%, v/v) sobre el rendimiento y propiedades de los extractos mediante un diseño factorial Box-Behnken. Las variables más significativas resultaron ser la temperatura y la concentración de disolvente, y las condiciones de extracción seleccionadas como óptimas fueron 75°C de temperatura, 120 min y concentración de etanol del 50%. En estas condiciones, el rendimiento de extracción fue del 30,21%, el contenido en fenoles totales de 24,72 g GAE/100 g extracto, la capacidad antioxidante FRAP de 1529 nmol AAE/mg extracto, la capacidad de inhibición DPPH de 1,40 mmol TRE/g extracto y ABTS de 1,25 mmol TRE/g extracto.

Se analizó también el efecto del disolvente (agua, metanol, etanol, metanol al 50% y etanol al 50%) sobre el rendimiento y las propiedades de extractos de involucro de avellana (*Corylus avellana*), madera de acacia (*Acacia dealbata*) y biomasa forestal (fracciones de *Eucalyptus globulus* y *Pinus pinaster*) obtenidos a 50°C y 90 min. Para el involucro de avellana, los mejores resultados de rendimiento (21,41%) y propiedades de los extractos se obtuvieron con etanol al 50% (TFC de 13,43 g GAE/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 961 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 1,05 mmol TRE/g extracto y ABTS de 1,70 mmol TRE/g extracto). Para la madera de acacia, el mayor rendimiento (16,33%) se obtuvo con etanol al 50%; no obstante, los extractos con mayor capacidad antioxidante fueron los obtenidos con etanol (TFC de 27,86 g GAE/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 1889 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 1,67 mmol TRE/g extracto y ABTS de 3,02 mmol TRE/g extracto). Para la biomasa forestal, las mayores propiedades antioxidantes se obtuvieron con metanol al 50% (TFC de 25,70 g GAE/100 g extracto; capacidad antioxidante FRAP de 1496 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 2,23 mmol TRE/g extracto y ABTS de 2,96 mmol TRE/g extracto). No se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos con etanol, metanol y sus disoluciones acuosas (10,23-11,88%).

Se confirmó la capacidad antimicrobiana de los extractos acuosos de cáscara y erizo de castaña, de chapas de eucalipto y de pericarpio de nuez al ser capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram +. Los extractos de erizo, cáscara y chapa de eucalipto también fueron capaces de inhibir bacterias Gram -, aunque solo estos últimos, que presentaron la mayor capacidad antioxidante, resultaron eficaces ante el crecimiento de levaduras.

En una última etapa del trabajo, se determinó el perfil fenólico de los extractos obtenidos confirmándose la presencia de compuestos con demostrada capacidad antioxidante. Los ácidos elágico y gálico fueron los mayoritarios en los extractos de erizo y cáscara de castaña, así como en los de chapa de eucalipto. En los extractos de hoja de nogal, los compuestos mayoritarios fueron la quercetina 3-β-D-glucósido y los ácidos neoclorogénico, clorogénico y gálico.

Por tanto, además de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos previamente analizadas, la presencia en los mismos de compuestos fenólicos bioactivos confirmó el potencial de los extractos para su aplicación en formulación de antioxidantes para la industria y el interés en el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos de los que proceden para este fin.



**RESUMO**

Os compostos antioxidantes son substancias que protexen aos produtos de reaccións de degradación que poden afectar as súas propiedades. Así, a industria alimentaria utiliza aditivos antioxidantes para aumentar a vida útil dos produtos e evitar cambios no seu sabor, cor e textura que poden afectar á seguridade do consumidor. Os antioxidantes actúan inhibindo a formación de radicais libres involucrados en procesos de estrés oxidativo, polo que se utilizan tamén na industria cosmética como axentes fotoprotectores e preventivos do envellecemento celular. O estrés oxidativo está relacionado con numerosas enfermidades o que xustifica o seu interese para a industria farmacéutica.

Na actualidade, existe unha marcada tendencia cara ao consumo de substancias naturais o que unido á percepción de inseguridade que o consumidor ten do uso de aditivos sintéticos, está a incentivar a procura de compostos antioxidantes de orixe natural como alternativa aos sintéticos.

As investigacións están a ser dirixidas cara á obtención de antioxidantes naturais a partir de materiais vexetais, especialmente daqueles máis económicos como son os residuos lignocelulósicos xerados na industria alimentaria, agrícola ou forestal. Estes materiais conteñen compostos de tipo fenólico con demostradas propiedades antioxidantes e antimicrobianas.

Nesta tese doutoral propónse a obtención de compostos antioxidantes de alto valor engadido a partir de residuos xerados durante o procesado da castaña (ourizo e casca de castaña), da noz (pericarpo da noz e follas de nogueira) e da abelá (involucro de abelá), residuos da industria madeireira (restos do cizallado da preparación de chapas de eucalipto) e da industria forestal (madeira de acacia e biomasa forestal). Moitos destes residuos están na actualidade infrautilizados ou destinados á produción de enerxía e a súa valorización contribuiría ao desenvolvemento da economía circular.

Respecto aos residuos do procesado da castaña (*Castanea sativa*), comezouse por un estudo preliminar das condicións de extracción do ourizo para analizar o efecto do disolvente sobre o rendemento de extracción e as propiedades dos extractos (contido en fenóis totais (TFC) e capacidade antioxidante segundo os métodos FRAP, DPPH e ABTS). Os disolventes empregados foron acetona, etanol, metanol e auga. Os mellores resultados de rendemento e propiedades dos extractos obtivéronse na extracción con auga a 90° C durante 1 h, seguida polas extraccións Soxhlet con metanol e etanol durante 15 h.

En base aos resultados obtidos, planificouse un deseño experimental Box-Behnken e aplicouse a metodoloxía de superficie de resposta para determinar as condicións óptimas da extracción do ourizo de castaña empregando disolucións acuosas de etanol e metanol. Analizouse a influencia da temperatura (25-50-75° C), tempo (30-75-120 min) e concentración de disolvente (50-70-90%, v/v) sobre o rendemento de extracción e propiedades dos extractos,

resultando a temperatura e a concentración os factores máis influentes. As condicións óptimas seleccionadas foron 75°C de temperatura, 50% de concentración de disolvente e tempo de 75 min nas extraccións metanólicas e 30 min nas etanólicas. Nestas condicións, os rendementos de extracción foron similares para ambos os disolventes (18,95% para as extraccións metanólicas e 17,95% para as etanólicas), aínda que as propiedades dos extractos resultaron superiores nas metanólicas (TFC de 36,32 g equivalentes en ácido gálico (GAE)/100 g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 2361 nmol equivalentes en ácido ascórbico (AAE)/mg extracto; DPPH de 3,24 mmol equivalentes en Trolox (TRE)/g extracto e ABTS de 3,58 mmol TRE/g extracto) con relación ás etanólicas (TFC de 26,11 g GAE/100 g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 1547 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 2,43 mmol TRE/g extracto e ABTS de 2,95 mmol TRE/g extracto).

Na seguinte etapa realizouse un estudo comparativo entre os extractos de ourizo e casca de castaña obtidos baixo as mesmas condicións. As extraccións realizáronse a 25, 50 e 75°C con disolucións acuosas de etanol e metanol á concentración que resultou óptima no deseño experimental previamente realizado (50%) e con auga, que foi o disolvente que mellores resultados proporcionou no estudo preliminar. Os rendementos de extracción resultaron máis elevados para o ourizo (8,54-19,58%) que para a casca (2,91-13,27%), mentres que as propiedades antioxidantes resultaron superiores nos extractos da casca, seleccionándose como óptima a extracción con auga a 75°C (TFC de 56,23 g GAE/100g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 3891 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 5,84 mmol TRE/g extracto e ABTS de 4,88 mmol TRE/g extracto). Os extractos de ourizo con mellores propiedades antioxidantes obtivéronse con metanol ao 50% a 75°C, aínda que ao obterse resultados similares con etanol ao 50% decidiuse priorizar o seu uso ao ser un disolvente catalogado como GRAS, é dicir, seguro para a súa aplicación en alimentos. Os extractos acuosos de ambos materiais demostraron capacidade para inhibir o radical óxido nítrico superior á do antioxidante sintético BHA. A cinética do proceso de extracción axustouse ao modelo de Peleg. O uso da extracción asistida por microondas mellorou lixeiramente as propiedades dos extractos de ourizo de castaña, aínda que non os da casca; con todo, esta tecnoloxía non convencional supuxo unha vantaxe ao reducir o tempo de extracción de entre 60 e 120 min a 15 min.

Respecto aos residuos de chapas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), nunha primeira etapa analizouse o efecto da temperatura (50-75° C), disolvente (auga, metanol, etanol, metanol ao 50% e etanol ao 50%) e tamaño de partícula (chapas moídas ou sen moer) sobre o rendimento e as propiedades dos extractos obtidos na maceración con disolventes. O aumento da temperatura e a redución do tamaño de partícula incrementou o rendimento da extracción, pero non mellorou as propiedades dos extractos. A extracción con etanol a 50°C conduciu ás mellores propiedades dos extractos (TFC de 85,71 g GAE/100 g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 7787 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 9,67 mmol TRE/g extracto e ABTS de 5,94 mmol TRE/g extracto).

Nunha segunda etapa aplicouse un deseño factorial Box-Behnken empregando a extracción asistida por microondas para analizar a influencia da temperatura (50-60-70° C), a relación sólido/líquido (1/5, 1/7,5 e 1/10 g/ml) e o tempo (5-10-15 min). As condicións óptimas seleccionadas foron 65°C de temperatura, relación sólido/líquido 1/8,8 g/ml e tempo de 10 min. O tempo resultou ser a variable menos significativa sobre as propiedades dos extractos, mentres que a relación sólido/líquido non afectou o rendimento de extracción. As propiedades dos extractos non melloraron con relación ás obtidas na extracción convencional; con todo, a

extracción asistida por microondas reduciu o tempo de extracción de 90 a 10 min e o volume de disolvente.

Respecto aos residuos da nogueira, na extracción de pericarpo de noz (*Juglans regia* L.) estudouse a influencia do disolvente (auga, metanol, etanol, metanol ao 50% e etanol ao 50%) obténdose os mellores resultados, tanto de rendemento de extracción como de propiedades dos extractos, nas extraccións con auga a ebulición (rendemento de 44,11%, TFC de 4,04 g GAE/100 g extracto e actividade antioxidante DPPH de 0,22 mmol TRE/g extracto). Para as follas de nogueira (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*), tras establecer como óptima unha relación sólido/líquido de 1/10 g/ml, analizouse o efecto da temperatura (25-50-75°C), o tempo (30-75-120 min) e a concentración de etanol (10-50-90%, v/v) sobre o rendemento e propiedades dos extractos mediante un deseño factorial Box-Behnken. As variables máis significativas resultaron ser a temperatura e a concentración de disolvente, e as condicións de extracción seleccionadas como óptimas foron 75°C de temperatura, 120 min e concentración de etanol do 50%. Nestas condicións, o rendemento de extracción foi do 30,21%, o contido en fenóis totais de 24,72 g GAE/100 g extracto, a capacidade antioxidante FRAP de 1529 nmol AAE/mg extracto, a capacidade de inhibición DPPH de 1,40 mmol TRE/g extracto e ABTS de 1,25 mmol TRE/g extracto.

Analizouse tamén o efecto do disolvente (auga, metanol, etanol, metanol ao 50% e etanol ao 50%) sobre o rendemento e as propiedades de extractos de involucro de abelá (*Corylus avellana*), madeira de acacia (*Acacia dealbata*) e biomasa forestal (fraccións de *Eucalyptus globulus* e *Pinus pinaster*) obtidos a 50°C e 90 min. Para o involucro de abelá, os mellores resultados de rendemento (21,41%) e propiedades dos extractos obtivéronse con etanol ao 50% (TFC de 13,43 g GAE/100 g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 961 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 1,05 mmol TRE/g extracto e ABTS de 1,70 mmol TRE/g extracto). Para a madeira de acacia, o maior rendemento (16,33%) obtívose con etanol ao 50%; con todo, os extractos con maior capacidade antioxidante foron os obtidos con etanol (TFC de 27,86 g GAE/100 g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 1889 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 1,67 mmol TRE/g extracto e ABTS de 3,02 mmol TRE/g extracto). Para a biomasa forestal, as maiores propiedades antioxidantes obtivéronse con metanol ao 50% (TFC de 25,70 g GAE/100 g extracto; capacidade antioxidante FRAP de 1496 nmol AAE/mg extracto; DPPH de 2,23 mmol TRE/g extracto e ABTS de 2,96 mmol TRE/g extracto). Non se atoparon diferenzas significativas entre os rendementos obtidos con etanol, metanol e as súas disolucións acuosas (10,23-11,88%).

Confírmouse a capacidade antimicrobiana dos extractos acuosos de casca e ourizo de castaña, das chapas de eucalipto e do pericarpo de noz ao ser capaces de inhibir o crecemento de bacterias Gram +. Os extractos de ourizo, casca e chapa de eucalipto tamén foron capaces de inhibir bacterias Gram -, aínda que só estes últimos, que presentaron a maior capacidade antioxidante, resultaron eficaces fronte o crecemento de fungos.

Nunha última etapa do traballo, determinouse o perfil fenólico dos extractos obtidos confirmándose a presenza de compostos con demostrada capacidade antioxidante. Os ácidos eláxico e gálico foron os maioritarios nos extractos de ourizo e casca de castaña, así como nos de chapa de eucalipto. Nos extractos de folla de nogueira, os compostos maioritarios foron a quercetina 3-β-D-glucósido e os ácidos neocloroxénico, cloroxénico e gálico.

Por tanto, ademais das propiedades antioxidantes e antimicrobianas dos extractos previamente analizadas, a presenza nos mesmos de compostos fenólicos bioactivos confirmou o potencial dos extractos para a súa aplicación en formulación de antioxidantes para a industria e o interese no aproveitamento dos residuos lignocelulósicos dos que proceden para este fin.



**ABSTRACT**

Antioxidants are substances that protect products from degradation reactions that can affect their properties. Thus, the food industry uses antioxidant additives to increase the shelf life of food products and avoid changes in their taste, colour and texture that could affect the consumer safety. Antioxidants act by inhibiting the formation of free radicals involved in oxidative stress processes. For this reason, they are also used in the cosmetic industry as photoprotective and preventive agents of cellular aging. Oxidative stress is also related to numerous diseases, which justifies the interest of antioxidants for the pharmaceutical industry.

At present, the trend towards the consumption of natural substances, together with the perception of insecurity of synthetic additives by the consumer, is promoting the search of natural antioxidants as an alternative to the synthetic ones.

Research is being directed to obtain natural antioxidants from plant materials, especially those cheaper, such as lignocellulosic residues generated in the food, agricultural or forest industries. These materials contain phenolic compounds with demonstrated antioxidant and antimicrobial properties.

In this PhD Thesis, the separation of antioxidant compounds of high added value from waste biomass products was proposed. The wastes studied were generated during the chestnut (spiny bur and chestnut shell), walnut (walnut green husk and leaves) and hazelnut (hazelnut husk) processing in the food industry, in the wood industry (eucalyptus veneers trimmings) and in the forest industry (acacia wood and forest biomass). Most of these wastes are currently underused or intended for energy production, and their valorisation would contribute to the development of the circular economy.

In a preliminary study of chestnut (*Castanea sativa*) bur extraction conditions, the effect of the solvent on extraction yield and extract properties (total phenol content (TFC) and FRAP, DPPH and ABTS antioxidant capacity) was evaluated. The solvents used were acetone, ethanol, methanol and water. The best extraction yield and extract properties were obtained using water at 90°C for 1 h, followed by Soxhlet extractions with methanol and ethanol for 15 h.

Based on the results obtained, a Box-Behnken experimental design was planned, and the response surface methodology was applied to determine the optimal conditions for chestnut bur extraction using aqueous solutions of ethanol and methanol. The influence of temperature (25-50-75°C), time (30-75-120 min) and solvent concentration (50-70-90%, v/v) on extraction yield and extract properties was analysed. Temperature and solvent concentration were the most influential factors. The optimal extraction conditions were 75°C, solvent concentration of 50% for both solvents, and 75 min for the methanolic extractions and 30 min for the ethanolic ones. Under these conditions, the extraction yield was similar for both solvents (18.95% for methanolic extraction and 17.95% for the ethanolic one), although the extract properties were

higher in the methanolic extraction (TFC of 36.32 g gallic acid equivalent (GAE)/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 2361 nmol ascorbic acid equivalent (AAE)/mg extract; DPPH of 3.24 mmol Trolox equivalent (TRE)/g extract and ABTS of 3.58 mmol TRE/g extract) compared to the ethanolic one (TFC of 26.11 g GAE/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 1547 nmol AAE/mg extract; DPPH of 2.43 mmol TRE/g extract and ABTS of 2.95 mmol TRE/g extract).

In the next stage, a comparative study between chestnut bur and shell extracts obtained under the same conditions was carried out. Extractions were done at 25, 50 and 75°C with aqueous solutions of ethanol and methanol at the optimal concentration determined in the experimental design (50%) and with water, the solvent selected as optimal in the preliminary study. The extraction yield was higher for the bur (8.54%-19.58%) than for the shell (2.91%-13.27%); however, antioxidant properties were higher for shell extracts and water extraction at 75°C was selected as the optimal (TFC of 56.23 g GAE/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 3891 nmol AAE/mg extract; DPPH of 5.84 mmol TRE/g extract and ABTS of 4.88 mmol TRE/g extract). The bur extracts with the best antioxidant properties were obtained with 50% methanol at 75°C, although similar results were obtained with 50% ethanol; since ethanol is a GRAS (General Recognized as Safe) solvent and can be used safely for food applications, its use will be prioritized. Aqueous shell and bur extracts have demonstrated higher capacity to inhibit the nitric oxide radical than the synthetic antioxidant BHA. The kinetics of the extraction process was fitted by the Peleg's model. The use of microwave assisted extraction slightly improved the bur extract properties, although not those of the shell. However, this non-conventional technology had the advantage of reducing extraction time from 60 and 120 min to 15 min.

With respect to the eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) veneers, in a first stage using maceration, the effect of temperature (50-75°C), solvent (water, methanol, ethanol, 50% methanol and 50% ethanol) and particle size (grounded or not grounded veneers) on extraction yield and extract properties were analysed. The extraction yield increased by increasing temperature and reducing the particle size, but extract properties did not improve. The best extract properties were achieved with ethanol at 50°C (TFC of 85.71 g GAE/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 7787 nmol AAE/mg extract; DPPH of 9.67 mmol TRE/g extract and ABTS of 5.94 mmol TRE/g extract).

In a second stage, a Box-Behnken experimental design was applied using microwave assisted extraction to study the influence of temperature (50-60-70°C), solid/liquid ratio (1/5 1/7.5 1/10 g/ml) and time (5-10-15 min). The optimal conditions selected were 65°C, 1/8.8 g/ml and 10 min. Time was the least significant variable on extract properties, while extraction yield did not depend on solid/liquid ratio. The extract properties did not improve with respect to those obtained using maceration; however, microwave assisted extraction reduced the extraction time from 90 to 10 min and the amount of solvent required.

With respect to walnut wastes, the influence of solvent (water, methanol, ethanol, 50% methanol and 50% ethanol) on green husk walnut (*Juglans regia* L.) extraction was studied. The best extraction yield and extract properties were obtained with boiling water (extraction yield of 44.11%, TFC of 4.04 g GAE/100 g extract and DPPH antioxidant activity of 0.22 mmol TRE/g extract). For walnut leaves (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*), after setting a solid/liquid ratio of 1/10 g/ml as the optimal, the effect of temperature (25-50-75°C), time (30-74-120 min) and ethanol concentration (10-50-90%, v/v) on the extraction yield and extract

properties, was analysed using a Box-Behnken factorial design. The most significant variables were temperature and solvent concentration and the optimal extraction conditions selected were 75°C, 120 min and 50% ethanol. Under these conditions, extraction yield was 30.21%, total phenol content was 24.72 g/GAE/100 g extract, FRAP antioxidant capacity was 1529 nmol AAE/mg extract, DPPH inhibition capacity was 1.40 mmol TRE/g extract and ABTS was 1.25 mmol TRE/g extract.

The influence of the solvent (water, methanol, ethanol, 50% methanol and 50% ethanol) on extraction yield and extract properties of hazelnut husk (*Corylus avellana*), acacia wood (*Acacia dealbata*) and waste forest biomass (mainly fractions of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster*) was also analysed in extractions carried out at 50°C for 90 min. For hazelnut waste, the best results for extraction yield (21.41%) and extract properties (TFC of 13.43 g GAE/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 961 nmol AAE/mg extract; DPPH of 1.05 mmol TRE/g extract and ABTS of 1.70 mmol TRE/g extract) were obtained with 50% ethanol. For acacia wood, the highest extraction yield (16.33%) was obtained with 50% ethanol and the highest antioxidant properties with ethanol ((TFC of 27.86 g GAE/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 1889 nmol AAE/mg extract; DPPH of 1.67 mmol TRE/g extract and ABTS of 3.02 mmol TRE/g extract). For forest biomass, the highest antioxidant properties were obtained with 50% methanol (TFC of 25.70 g GAE/100 g extract; FRAP antioxidant capacity of 1496 nmol AAE/mg extract; DPPH of 2.23 mmol TRE/g extract and ABTS of 2.96 mmol TRE/g extract). For this material, no significant differences were found between the extraction yields obtained with ethanol, methanol and their aqueous solutions (10.23-11.88%).

The antimicrobial capacity of the aqueous extracts of chestnut bur and shell, eucalyptus veneers and walnut green husk was confirmed. All the extracts were able to inhibit the growth of Gram + bacteria. Chestnut bur and shell and eucalyptus veneer extracts were also able to inhibit Gram – bacteria. Only the eucalyptus veneer extracts, those with the highest antioxidant capacity, were effective against fungi growth.

In the last stage of the thesis, the phenolic profile of the extracts was determined and the presence of compounds with demonstrated antioxidant capacity was confirmed. Ellagic and gallic acids were the major compounds found in chestnut bur and shell extracts, as well as in eucalyptus veneer extracts. In walnut leaves extracts, the main compounds were quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside and neochlorogenic, chlorogenic and gallic acids.

Therefore, the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts previously analysed together with the presence of bioactive phenolic compounds confirmed the potential of the extracts for the formulation of antioxidants for industrial applications and the interest in the reuse of the lignocellulosic wastes studied for this purpose.





## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 LOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

En los procesos industriales orientados a la obtención de productos de origen vegetal, como los relacionados con la industria alimentaria, maderera o forestal, se generan inevitablemente una gran cantidad de residuos que proceden en muchos casos del desaprovechamiento de una fracción del material de partida o material de rechazo. Estos residuos de carácter lignocelulósico están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Además, también contienen compuestos bioactivos como carotenoides, flavonoides y otros compuestos polifenólicos (Srivastava et al., 2021).

Una de las estrategias de los procesos de transformación medioambientalmente sostenibles es la generación de subproductos en lugar de residuos. Se considera como residuo a cualquier material derivado de los procesos industriales que solo puede ser eliminado a través de un sistema de gestión de residuos o incinerado. Sin embargo, un subproducto es un material que se genera inevitablemente durante los procesos de transformación, y que puede ser posteriormente utilizado para otra aplicación, utilizando la materia prima desde un enfoque integrado (Chemat et al., 2012). El concepto de economía circular promovido en los últimos años sugiere que las industrias agrícola y forestal deben adaptar sus procesos de fabricación valorizando los subproductos obtenidos (Fraga-Corral et al., 2020).

Los materiales vegetales como las hojas, la madera, la corteza o las raíces de los árboles, los frutos, sus cáscaras y sus pieles, las hierbas y especias o los granos y las semillas contienen una numerosa cantidad de sustancias que pueden ser aprovechadas, muchas de ellas con propiedades bioactivas como los polifenoles, cuyas propiedades antioxidantes han sido ampliamente demostradas (Balasundram et al., 2006; Dudonné et al., 2009; Brewer, 2011; Xu et al., 2017).

Los residuos lignocelulósicos estudiados en esta tesis doctoral derivan de las industrias alimentaria, maderera y forestal y son el erizo y la cáscara de la castaña (*Castanea sativa*), el involucre de avellana (*Corylus avellana*), el pericarpio de nuez (*Juglans regia*, L.), las hojas de nogal (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*), restos de cizallado de la producción de chapa de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), la madera de acacia (*Acacia dealbata*) y biomasa forestal (mezcla heterogénea de *Eucalyptus globulus* y *Pinus pinaster*).

### ○ *Erizo y cáscara de la castaña*

La cáscara y el erizo son dos residuos generados durante el procesado de la castaña. La castaña es el fruto del castaño (*Castanea sativa*), un cultivo de gran importancia en Europa, constituyendo la base de su alimentación hasta la llegada de la patata y el maíz en el siglo XVI.

Se trata de un cultivo tradicional en Galicia, en donde la superficie destinada al cultivo de castaños es de 25.500 hectáreas. De hecho, Galicia es la comunidad autónoma con mayor producción de castaña, sobre 74.000 t al año en plantación regular (datos del 2018), siendo Ourense la provincia con mayor producción, seguida de Lugo, A Coruña y Pontevedra ([www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)). La castaña gallega es una de las más apreciadas por el consumidor español y cada vez más exportada internacionalmente. Su uso se destina al consumo humano como castañas frescas o congeladas, secas, envasadas o transformadas en harinas, cremas, purés o confituras. Las castañas son un fruto muy valorado, además de por sus cualidades nutricionales, por no contener gluten y por su bajo contenido en grasas saturadas.

### ○ *Involucro de avellana*

El involucro de avellana es un residuo generado en la producción de la avellana. El avellano común (*Corylus avellana*) es un árbol de pequeña talla procedente de Europa y Asia que se cultiva, principalmente, por sus frutos, que se consumen como aperitivos, aunque también tiene muchas aplicaciones en la industria pastelera y turrонера. También se cultiva por su madera, compacta y flexible, que se emplea en ebanistería, marquetería, cestería, etc. España ocupa el cuarto lugar entre los países productores, con una producción anual de 8000 t (datos del 2018, [www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)). La superficie dedicada a la plantación se concentra en la provincia de Tarragona (84% de la superficie española), con pequeñas cosechas también en Barcelona, Gerona, Castellón, Oviedo y Lugo.

### ○ *Pericarpio de nuez y hoja de nogal*

El pericarpio de la nuez y las hojas son unos de los residuos derivados de la producción del nogal. El nogal europeo (*Juglans regia, L.*) es la especie de nogal más difundida en Europa. Es un árbol tradicionalmente cultivado por su madera y por su fruto. La nuez es un fruto muy apreciado tanto por su valor nutritivo como por sus beneficios para la salud. En los últimos diez años, en España se han duplicado las hectáreas dedicadas a plantación de nogal. En la Península Ibérica se producen al año cerca de 15.000 t de nuez, (datos del 2018, [www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)), 75% de la producción en España y el resto en Portugal. El pericarpio verde de nuez se conoce también como nogalina y es, junto con las hojas, la parte más utilizada por sus propiedades medicinales y para la extracción de un colorante de aplicación en ebanistería. Las hojas de nogal analizadas en este trabajo pertenecen a la especie híbrida (*Juglans major 209 x Juglans regia*).

### ○ *Chapas de eucalipto*

Los restos de cizallado de chapa de eucalipto se generan durante el proceso de obtención de chapas de eucalipto. El eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus*) es una especie originaria de Australia. Por la rapidez de su crecimiento se puede encontrar cultivado en muchas regiones del mundo, sobre todo en regiones tropicales y templadas como España. Sus principales aplicaciones son la producción de madera, fabricación de pasta de papel y obtención de aceites esenciales. Galicia y Portugal, constituyen las principales áreas a nivel mundial de plantaciones de *Eucalyptus globulus* siendo la superficie gallega dedicada a la plantación de 268.000 ha (datos del 2017, [www.mediorural.xunta.gal](http://www.mediorural.xunta.gal)).

- *Madera de acacia*

La acacia (*Acacia dealbata*) es una especie arbustiva perteneciente a la familia de las leguminosas. Se comporta como una planta invasora que puede desplazar la vegetación natural, sobre todo después de los incendios. Por su potencial colonizador y por constituir una amenaza para las especies autóctonas, está catalogada como especie invasora en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (RD 630/2013 de 2 de agosto). En Galicia se encuentra ampliamente naturalizada, invadiendo las partes bajas y medias de la comunidad autónoma hasta el punto de resultar un elemento característico del paisaje gallego. Su erradicación es difícil y costosa ([www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)).

- *Biomasa forestal*

La biomasa forestal analizada se obtiene de los procesos de limpieza de montes. Se trata de residuos forestales generados durante tratamientos silvícolas (entresacas, clareos y podas) realizados para evitar plagas e incendios y residuos de cortas de pies maderables. Es una mezcla heterogénea de madera, corteza, hojas y frutos de *Eucalyptus globulus* y *Pinus pinaster*, principalmente.

En este trabajo se propone la valorización de estos subproductos como fuente de antioxidantes naturales. Actualmente, existe una demanda por parte de los consumidores hacia los productos de origen natural, por lo que la obtención de compuestos bioactivos a partir de esta biomasa residual resulta de gran interés para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. Además, la obtención de productos de alto valor añadido a partir de subproductos infrutilizados supone una contribución al desarrollo de la economía circular.

## 1.2 LOS ANTIOXIDANTES

### 1.2.1 Radicales libres y estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas debido a la presencia de uno o más de sus electrones desapareados, lo que las hace muy inestables y con tendencia a estabilizarse a través de la reacción con otras moléculas.

En los sistemas biológicos, los radicales libres se producen como parte de los procesos metabólicos derivados de la respiración celular, a través de enzimas como la xantina oxidasa, procesos inflamatorios o ejercicio físico (Carocho y Ferreira, 2013). Durante estos procesos, parte del oxígeno se reduce parcialmente dando lugar a las especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) que pueden ser radicales libres o no radicales y que reaccionan fácilmente oxidando a otros compuestos o formando radicales. Dentro de las principales ROS se encuentran el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical hidroxilo ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), el ozono ( $\text{O}_3$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). De forma similar, también se producen las especies reactivas del nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) como el óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Boots et al., 2008) y las especies reactivas del sulfuro (RSS, *Reactive Sulfur Species*) resultado de la reacción de ROS con tioles ( $\text{RS}^{\bullet}$ ), paso intermedio para la formación de óxidos de disulfuro ( $\text{RS}(\text{O})_2\text{SR}$ ) (Carocho et al., 2018). En la producción de estas especies reactivas afectan además factores

externos como el tabaco, la contaminación ambiental, la radiación, los pesticidas o el ozono (Carocho y Ferreira, 2013).

Las especies reactivas, en concentraciones adecuadas, cumplen algunas funciones beneficiosas para el organismo relacionadas con la relajación del músculo liso o con los procesos inflamatorios que se producen en las infecciones como defensa contra microorganismos invasores. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en la producción de radicales libres, estos pueden actuar causando daño a moléculas como el ADN, lípidos, proteínas y azúcares. La reacción con estas biomoléculas suele comenzar mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno o de un electrón y, como desde el punto de vista electroquímico la molécula donante se oxida, los radicales libres y especies reactivas actúan como prooxidantes (Boots et al., 2008).

Cuando existe un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y su neutralización tiene lugar lo que se denomina estrés oxidativo, relacionado con numerosas enfermedades graves como el Alzheimer, el Parkinson, los accidentes cerebrovasculares, la diabetes, la artritis reumatoide, la hipertensión, el asma o algunas alergias, entre otras (Carocho et al., 2018). Para contener el efecto de los radicales libres sobre los compuestos celulares, el cuerpo humano cuenta con un sistema de defensa antioxidante endógeno.

### **1.2.2 Antioxidantes endógenos y exógenos**

Los antioxidantes pueden definirse como “cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones comparada con la del sustrato oxidable, reduce o inhibe significativamente la oxidación del sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1995).

Los antioxidantes endógenos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos e inhiben el efecto de los radicales libres a través de tres vías de acción: mediante la prevención de las reacciones que dan lugar a los radicales, como es el caso de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o de los antioxidantes no enzimáticos ferritina, transferrina o albúmina; una segunda vía de acción en donde las moléculas interrumpen las reacciones de oxidación de los radicales y en la que intervienen sustancias como vitaminas, compuestos organosulfurados, coenzima Q10 o derivados no-proteicos del nitrógeno y una tercera vía en la que se produce la inactivación del producto de reacción de los radicales libres reparando o eliminando el daño (Carocho et al., 2018).

No obstante, el sistema antioxidante endógeno por sí solo no es suficiente, por lo que es necesario complementarlo con antioxidantes exógenos que, normalmente, se introducen a través de la dieta. Estos antioxidantes exógenos pueden ser vitaminas como el ácido ascórbico (vitamina C) o los tocoferoles (vitamina E), los carotenoides, los ácidos fenólicos y los flavonoides. La vitamina C es efectiva en la inhibición de diversas especies reactivas del oxígeno y del óxido nítrico; la vitamina E detiene el proceso de peroxidación lipídica; los carotenoides proporcionan protección a los tejidos ricos en lípidos; los ácidos fenólicos actúan como agentes quelantes e inhibidores de radicales libres y los flavonoides pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, pueden desactivar el oxígeno singulete e inhibir el radical superóxido (Singh y Sing, 2008; Carocho y Ferreira, 2013). Las principales fuentes de antioxidantes exógenos son las frutas y los vegetales.

### 1.2.3 Antioxidantes en alimentos

En los alimentos, como ya se mencionó anteriormente para los sistemas biológicos y como ocurre en el cuerpo humano, también tienen lugar procesos de oxidación y generación de radicales libres. Así, son muy comunes los procesos de autooxidación que afectan a las cualidades organolépticas de los alimentos, como a su textura y a la seguridad para el consumidor (Carocho et al., 2018).

Uno de los compuestos más afectados por los procesos oxidativos en los alimentos son las grasas, como los ácidos grasos insaturados, el colesterol o los fosfolípidos. Los ácidos grasos insaturados presentan una deficiencia de electrones en los puntos de insaturación carbono-carbono que los hace susceptibles de sufrir los efectos del estrés oxidativo, al ser atacados por agentes oxidantes o por radicales libres a través de un mecanismo denominado peroxidación lipídica (Figura 1.2.1). Esta reacción se inicia con la sustracción de un átomo de hidrógeno del ácido graso insaturado (LH) formando un radical lipídico (L•) altamente inestable que tiende a reaccionar rápidamente propagándose la reacción (Brewer et al., 2011).

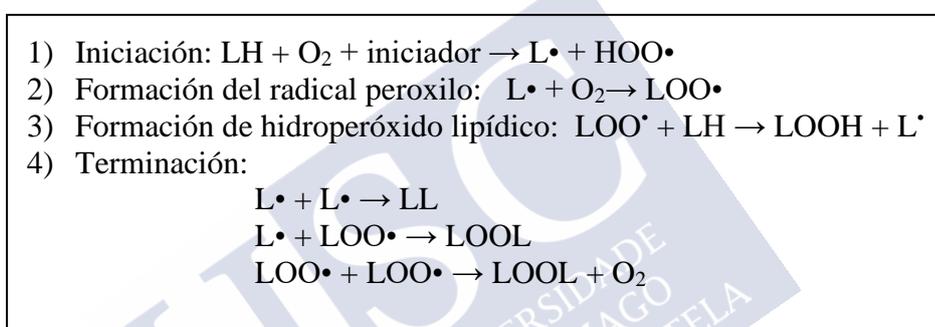


Figura 1.2.1 Esquema de la reacción de peroxidación lipídica (LH: ácido graso insaturado)

La oxidación de los lípidos está promovida por varios factores. Así, en los procesos de autooxidación, el calentamiento, la presencia de metales o la luz pueden acelerar la formación de radicales lipídicos que reaccionan con el oxígeno rápidamente, actuando los radicales formados como catalizadores de la reacción en cadena de los radicales libres. La luz también acelera la oxidación de los lípidos, especialmente en presencia de compuestos fotosensibilizadores como la clorofila que, tras absorber energía lumínica, reacciona con el oxígeno, produciendo oxígeno singlete que reacciona, a su vez, con los ácidos grasos insaturados dando lugar a lípidos hidroperóxidos, que pueden ser dienos conjugados o no conjugados a diferencia de lo que ocurría en la autooxidación. El calentamiento produce el mismo mecanismo de oxidación que la autooxidación, aunque es superior la velocidad de la oxidación térmica y produce compuestos volátiles como aldehídos y cetonas tras la rápida descomposición de los hidroperóxidos (Choe y Min., 2009).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de peroxidación lipídica produce cambios en el sabor de los alimentos al volverlos rancios, cambios en el color y en la textura y puede formar compuestos tóxicos como los malonaldehídos, entre otros (Carocho et al., 2018), los cuales pueden estar relacionados con varias enfermedades al reaccionar con las bases del ADN (Boots et al., 2008). Por ello, la presencia de antioxidantes en los alimentos contribuye a evitar y controlar las reacciones de degradación al inhibir las reacciones en cadena (Brewer, 2011; Carocho et al., 2018).

### 1.2.4 Mecanismos de acción de los antioxidantes

Los compuestos antioxidantes actúan previniendo los procesos de oxidación inhibiendo la formación de radicales libres o interrumpiendo su propagación a través de una combinación de los siguientes mecanismos:

○ *Inhibiendo los radicales libres que inician los procesos de peroxidación*

Los antioxidantes pueden inhibir los radicales libres mediante la donación de un hidrógeno, dando lugar a un radical antioxidante intermedio que se estabiliza por la deslocalización de los electrones en el anillo aromático. Algunos ejemplos de antioxidantes que siguen este mecanismo son los antioxidantes sintéticos como el BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno), TBHQ (terbutilhidroquinona) y PG (propil galato), el ácido ascórbico, los carotenoides, los flavonoides y los ácidos fenólicos (Choe y Min., 2009; Brewer, 2011). La efectividad de los antioxidantes para inhibir radicales libres va a depender de la energía de disociación del enlace O-H (cuanto más baja sea, mejor capacidad antioxidante presentan, al ser más eficiente la donación del hidrógeno), del pH (los ácidos fenólicos a pH básico se ionizan a su forma fenolada, con alta capacidad donante de electrones), del potencial de reducción de los radicales antioxidantes (a menor potencial de reducción, mayor capacidad de donar hidrógeno por el antioxidante) y de la deslocalización de los radicales antioxidantes (Choe y Min., 2009).

○ *A través de la quelación de iones metálicos*

Los metales pueden catalizar la formación de los procesos oxidativos que dan lugar a la formación de radicales hidroxilo y pueden descomponer los hidroperóxidos. A través de la quelación de esos metales se puede reducir, por tanto, la oxidación (Brewer, 2011). Los antioxidantes quelantes de metales más comunes son el ácido cítrico y el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), aunque los flavonoides también actúan a través de este mecanismo.

○ *A través de procesos de desactivación del oxígeno singulete*

El oxígeno singulete reacciona con los lípidos rápidamente debido a su alta energía. Algunos antioxidantes con capacidad para desactivarlo son los tocoferoles, los carotenoides, los fenoles o el ácido ascórbico. La desactivación puede ser física, desactivando el oxígeno singulete a su estado fundamental transfiriéndole energía o carga, o química, a través de la oxidación del antioxidante (Choe y Min., 2009).

○ *Inactivación de agentes fotosensibilizadores*

Los agentes fotosensibilizadores como la clorofila y la riboflavina, al activarse por el efecto de la luz, transfieren energía al oxígeno atmosférico formando el oxígeno singulete o el anión superóxido transfiriéndole un electrón, especies que son altamente reactivas. Uno de los antioxidantes que inactiva estos agentes son los carotenoides de menos de nueve dobles enlaces conjugados; los carotenoides con mayor número de enlaces actúan preferentemente como desactivadores del oxígeno singulete. Los agentes fotosensibilizadores transfieren su energía a los carotenoides, que vuelven a su estado fundamental liberando esa energía al medio o emitiendo fosforescencias (Choe y Min., 2009).

Los antioxidantes pueden actuar en combinación con otros antioxidantes y, aunque muchas veces sus interacciones son de carácter aditivo, en otras ocasiones se produce un efecto sinérgico en el que la combinación de varios antioxidantes tiene mayor capacidad que la de los compuestos individuales. Esta sinergia puede darse entre dos antioxidantes que actúen inhibiendo los radicales libres, como el sistema formado por el tocoferol y el ácido ascórbico, en donde el primero reacciona con el radical libre consumiéndose (antioxidante primario) y el otro (sinergista) actúa regenerándolo (Choe y Min., 2009; Brewer, 2011). El efecto sinérgico también se da entre antioxidantes que actúan bajo mecanismos diferentes, como es el caso de la quercetina y el  $\alpha$ -tocoferol, en donde la quercetina actúa como quelante de metales inhibiendo el efecto catalizador del metal y generándose, por tanto, menos niveles de radicales que son reducidos por el  $\alpha$ -tocoferol, que actúa como inhibidor de radicales libres (Choe y Min., 2009).

Aunque no hay duda de que los antioxidantes juegan un papel vital en la protección de los sistemas biológicos, en determinadas condiciones algunos de ellos pueden actuar como agentes prooxidantes. La actividad prooxidante se ve favorecida por la alta concentración del antioxidante, como es el caso del  $\alpha$ -tocoferol que, en altas concentraciones, al reaccionar con los radicales libres dando lugar a su forma radicalaria, puede permanecer en esta forma altamente reactiva al no conseguir ser regenerado y promover la autooxidación del ácido linoleico (Carocho y Ferreira, 2013). También depende del pH y de la presencia de metales con actividad redox, ya que los metales de transición se caracterizan por su solubilidad y estabilidad en pH ácido, por lo que pueden catalizar reacciones redox de los compuestos fenólicos y dar lugar a la formación de radicales fenoxilo prooxidantes (Carocho y Ferreira., 2013; Olszowy, 2019)

### 1.2.5 Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden clasificarse en función de su origen como sintéticos y naturales.

#### 1.2.5.1 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos están regulados en la Unión Europea por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) y están identificados con el código “E”, tras ser previamente evaluados y autorizado su uso. Además, se regula de manera estricta la cantidad de cada aditivo que puede añadirse para no sobrepasar la Ingesta Diaria Admisible (IDA), que es la que limita la cantidad máxima consumida diariamente sin efectos perjudiciales para la salud del consumidor.

Dentro de los antioxidantes sintéticos, los más utilizados son los compuestos fenólicos butilados BHA (butilhidroxianisol, E 320), BHT (butilhidroxitolueno, E 321), TBHQ (terbutilhidroquinona, E 319) y el PG (propil galato, E 310). Sus aplicaciones principales están relacionadas con el mantenimiento de la calidad y estabilidad en productos de las industrias alimentaria y farmacológica (Olszowy, 2019).

El BHA se utiliza tanto en alimentos como en el empaquetado de estos y, aunque es uno de los antioxidantes más utilizados para controlar la rancidez de grasas animales, su uso se ve limitado por su baja solubilidad en agua. Su valor IDA está establecido en 1 mg/kg de peso corporal. El BHT es uno de los antioxidantes sintéticos más baratos de producir; es altamente soluble en aceite, pero no en agua, y al ser estable a altas temperaturas, se usa en preparados

que van a ser cocinados. Su valor IDA es de 0,25 mg/kg de peso corporal. La TBHQ es insoluble en agua y se aplica en cereales, margarinas, carnes y aceites. y su principal ventaja frente a otros es que no pierde color en contacto con metales. Su valor IDA es de 0,7 mg/kg de peso corporal. El PG es el galato más usado de los aprobados por la EFSA, tanto en alimentos como en envases y su función principal es evitar la peroxidación lipídica manteniendo las cualidades organolépticas de los alimentos. Su valor IDA es de 1,4 mg/kg de peso corporal (Carocho et al., 2018).

En la actualidad, el uso de los antioxidantes BHA y BHT está siendo cuestionado debido a la existencia de dudas acerca de su toxicidad y, por tanto, de su seguridad para el consumidor (Olszowy, 2019; Gullón et al., 2020). Por ello, la EFSA ha realizado en los últimos años una reevaluación de la seguridad de estos aditivos y tras las revisiones se mantiene su uso como seguro bajo los valores IDA especificados, aunque se ajustó el valor del BHT (EFSA, 2012) y se mantiene a los gatos como especie más sensible al BHA en los alimentos para mascotas (EFSA, 2018).

La tendencia actual hacia el consumo de productos naturales, así como las dudas que genera entre los consumidores el uso de aditivos sintéticos, está incentivando la búsqueda de antioxidantes de origen vegetal como alternativa a los antioxidantes sintéticos.

### *1.2.5.2 Antioxidantes naturales*

Los antioxidantes naturales forman parte de la composición de frutos, plantas y demás especies del reino vegetal. Entre los diferentes tipos de compuestos de origen natural con actividad antioxidante están las vitaminas (vitamina C y vitamina E), los carotenoides y los polifenoles (Oroian y Escriche, 2015).

- *Vitamina C y vitamina E*

El ácido ascórbico y el tocoferol son los nombres que toman las vitaminas C y E, respectivamente. El ácido ascórbico actúa como inhibidor de especies reactivas del oxígeno, siendo efectivo contra el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, así como contra especies reactivas del nitrógeno (Gülçin, 2012; Carocho y Ferreira, 2013; Oroian y Escriche, 2015). Es una vitamina soluble en agua y está presente en alta concentración en frutas cítricas y en vegetales como el tomate, el calabacín o el brócoli. La vitamina E está presente mayoritariamente en las hojas en su forma  $\alpha$ -tocoferol y su principal función antioxidante es la inhibición de la peroxidación lipídica a través de la donación de un hidrógeno al radical peroxilo. Las principales fuentes de vitamina E son los aceites vegetales, las nueces y las semillas (Oroian y Escriche, 2015).

- *Carotenoides:*

Los carotenoides son pigmentos naturales sintetizados por las plantas cuyo principal mecanismo antioxidante es la inactivación del oxígeno singulete protegiendo, de este modo, a las plantas de los procesos fotooxidativos (Gülçin, 2012). Los radicales peroxilo son los únicos radicales libres que consiguen atacar a estos compuestos. Sus propiedades químicas están relacionadas con la presencia de enlaces dobles conjugados en su estructura. Los carotenoides más consumidos habitualmente a través de la dieta son el  $\beta$ -caroteno, el licopeno y las xantófilas (Carocho y Ferreira, 2013). Entre las principales fuentes de carotenoides están el aceite de oliva

y las patatas ( $\beta$ -caroteno), los tomates (licopeno) y las espinacas o la kale (xantófilas) (Oroian y Escriche, 2015).

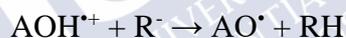
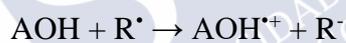
- *Polifenoles:*

Los polifenoles son el mayor grupo de compuestos bioactivos presentes en las plantas, aportándoles beneficios debido a sus propiedades antioxidantes. Es precisamente esta capacidad de inhibir los radicales libres, junto con sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antiproliferativas lo que ha incrementado el interés hacia este tipo de compuestos. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, identificándose hasta más de 8000 estructuras fenólicas diferentes (Oroian y Escriche, 2015). El mecanismo de reacción de los polifenoles está asociado con su capacidad para inactivar radicales libres a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno o de un electrón desde el antioxidante hacia el radical.

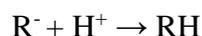
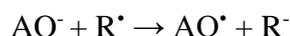
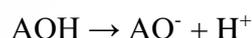
En el mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, *hydrogen atom transfer*), el antioxidante (A) reacciona con el radical libre a través de la rápida donación de un hidrógeno de la siguiente forma:



En el mecanismo de transferencia de electrón (SET, *single electron transfer*), el electrón se transfiere desde el antioxidante al radical y lo inhibe. El catión antioxidante formado sufre una desprotonación posterior, transfiriendo el hidrógeno del catión antioxidante al anión radical:



Un tercer mecanismo posible denominado SPLET (*sequential proton loss electron transfer*) se basa en la disociación del antioxidante, a continuación, el electrón del anión formado se transfiere al radical a inhibir, el cual se transforma en un radical aniónico que es protonado en la etapa final de la reacción:



Aunque los tres mecanismos siguen procesos diferentes, el resultado final es el mismo. La reacción entre los polifenoles y los radicales libres ocurre siguiendo un mecanismo u otro en función de las características del antioxidante, aunque la combinación principal es a través de los mecanismos SET y SPLET. El mecanismo SET es más lento y dominante en disolventes apolares o de baja constante dieléctrica, mientras que el SPLET es más rápido y dominante en disolventes de alta constante dieléctrica y basicidad (Olszowy, 2019).

Los compuestos fenólicos pueden contener uno o más anillos aromáticos y pueden clasificarse como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Gülçin, 2012) y formas menos comunes como estilbenos, lignanos y alcoholes fenólicos (Oroian y Escriche, 2015). A continuación, se describen las clases más abundantes:

### Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos engloban a los derivados del ácido cinámico y a los del ácido benzoico (Figura 1.2.2) que están presentes muchas veces en forma de ésteres o en su forma glucosada en los materiales vegetales. Dentro del grupo de los hidroxibenzoicos se encuentra el ácido gálico, precursor de muchos taninos (Carocho y Ferreira, 2013). Otros ácidos que se engloban en este grupo son el vainílico, el siríngico y el protocatéquico. Entre los derivados principales del ácido hidroxicinámico están el p-cumárico, el ferúlico, el cafeico y el clorogénico. Su mecanismo de acción antioxidante se basa en la transferencia del hidrógeno del grupo hidroxilo fenólico al radical (HAT) (Gülçin, 2012). El número de grupos hidroxilo es clave en la capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos, siendo mayor cuanto mayor es el número de grupo hidroxilo. Por ejemplo, el ácido cafeico con dos grupos hidroxilo tiene mayor capacidad antioxidante que el p-cumárico, con solo uno. También afecta la posición del segundo grupo hidroxilo, siendo más beneficiosa la posición *para*- que la *orto*- o la *meta*-. Los derivados del ácido cinámico presentan mayor capacidad antioxidante que los derivados del benzoico debido a la presencia en su estructura del grupo  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ . Este grupo estabiliza al radical antioxidante formado durante la inhibición del radical libre al deslocalizar los electrones en el doble enlace (Olszowy, 2019).

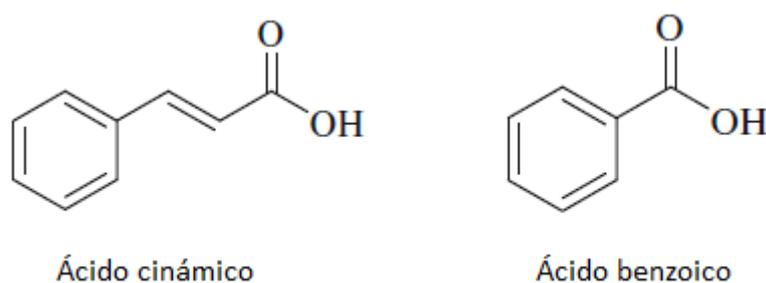


Figura 1.2.2 Estructura de los ácidos fenólicos cinámico y benzoico

### Flavonoides

Los flavonoides son unos de los compuestos más ampliamente presentes en las especies vegetales, formando parte tanto de hojas, raíces y cortezas como de semillas y frutos. Se caracterizan por su estructura  $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$  formada por dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, normalmente condensada en forma de anillo pirano (Figura 1.2.3). El anillo C es el que sienta las bases de las distintas clases de flavonoides en función de si presenta o no un doble enlace, un grupo carbonilo o un grupo hidroxilo. Las sustituciones en los anillos A y B por grupos hidroxilo caracterizan a los distintos compuestos dentro de cada clase (Gülçin, 2012).

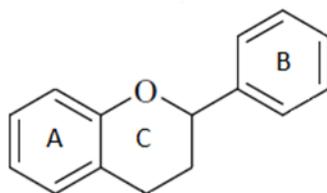


Figura 1.2.3 Estructura base de los flavonoides

La estructura de los flavonoides influye en su capacidad antioxidante, de tal manera que los compuestos con dos grupos hidroxilo en el anillo B presentan mayor capacidad antioxidante que cuando no tienen ninguno y esta capacidad aumenta con el número de grupos hidroxilos hasta tres. También mejora la actividad antioxidante cuando los anillos A y B se unen a través de un anillo C insaturado y conjugado con el anillo B (Olszowy, 2019). El principal mecanismo antioxidante que siguen los flavonoides se basa en reacciones HAT y SPLET y han demostrado ser eficaces en la inhibición de la peroxidación lipídica y de radicales superóxido, hidroxilo, oxígeno singulete y en la quelación de metales (Gülçin, 2012).

Los flavonoides se clasifican a su vez en flavonoles, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas, flavanonas y flavonas:

- Los *flavonoles* se identifican por la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo C (Figura 1.2.4) y son los antioxidantes más abundantes en las pieles de las uvas. Los flavonoles principales son la quercetina, la miricetina y el kaempferol. De ellos, la quercetina es uno de los más importantes estando presente en frutas y vegetales, muchas veces en su forma glucosada (Oroian y Escriche, 2015).

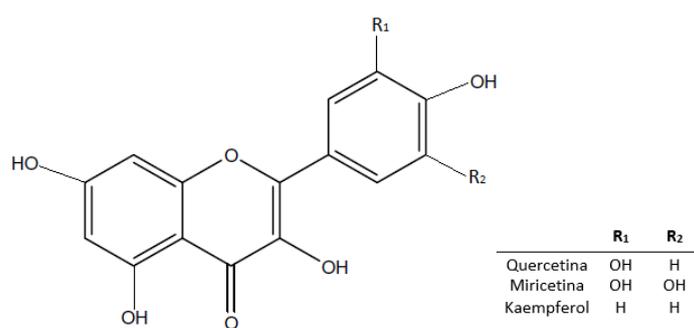


Figura 1.2.4 Estructura de los flavonoles

- Los *flavanoles* son los principales compuestos antioxidantes presentes en el té. Los principales flavonoles son la catequina y la epicatequina (Figura 1.2.5). Estos compuestos pueden polimerizar dando lugar a taninos que presentan mejor capacidad antioxidante que sus correspondientes monómeros (Brewer, 2011).

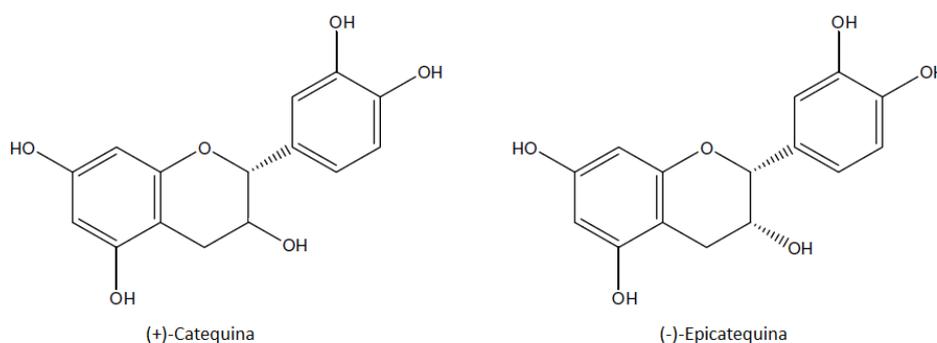


Figura 1.2.5 Estructura de los principales flavanoles

- Las *antocianidinas* (Figura 1.2.6) son compuestos fenólicos presentes en las uvas, granos de café o en las bayas cuya presencia se aprecia a la vista ya que aportan color. Son inestables y se degradan fácilmente por acción de la temperatura o la luz (Oroian y Escriche, 2015).

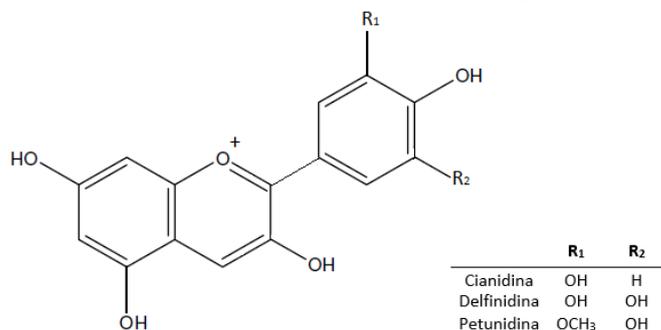


Figura 1.2.6 Estructura de las antocianidinas

- Las *isoflavonas* (Figura 1.2.7) son los antioxidantes más presentes en la soja, las lentejas y las habas. Las más comunes son la daidzeína y la genisteína (Oroian y Escriche, 2015).

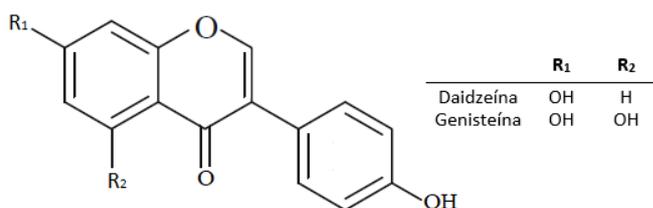


Figura 1.2.7 Estructura de las isoflavonas

- Las *flavanonas* (Figura 1.2.8) están presentes en las ciruelas, las naranjas y el pomelo y se presentan, principalmente, en forma de hesperetina y naringenina:

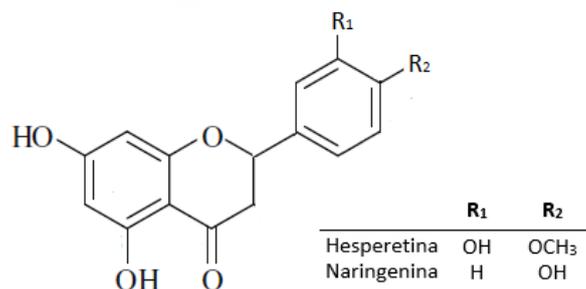


Figura 1.2.8 Estructura de las flavanonas

- Las *flavonas* (Figura 1.2.9) se encuentran en las hojas, los pétalos, la corteza, las raíces, las flores y los frutos de numerosas plantas:

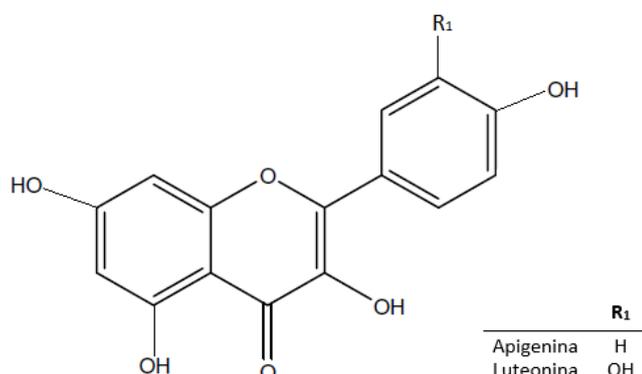


Figura 1.2.9 Estructura de las flavonas

### Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos altamente polimerizados presentes en muchas especies vegetales, principalmente en la madera y en la corteza, cumpliendo una función protectora frente a los radicales libres y frente al ataque de microorganismos como hongos o bacterias. Pueden estar compuestos por entre doce y dieciséis grupos fenólicos y de cinco a siete anillos aromáticos. Son solubles en disolventes acuosos y pueden formar complejos con proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y alcaloides (Fraga-Corral et al., 2021).

Se pueden clasificar como taninos hidrolizables y taninos condensados, aunque en los últimos tiempos esta clasificación se ha actualizado a galotaninos, elagitaninos, taninos condensados, taninos complejos y florotaninos que son exclusivos de algas (Fraga-Corral et al., 2021).

Los taninos hidrolizables son una combinación entre glucosa u otro polialcohol esterificado con ácidos fenólicos simples, principalmente ácido gálico o ácido elágico (Dai y Mumper, 2010). En función del ácido del que deriven se denominan como galotaninos o elagitaninos y las especies vegetales pueden presentar tanto de uno de los tipos de taninos hidrolizables como de ambos.

Los taninos condensados son oligómeros o poligómeros de unidades flavan-3-ol unidas, generalmente, a través de un enlace carbono-carbono entre el anillo A de un flavanol y el anillo pirano de otro. Se les conoce también como proantocianidinas ya que, al ser calentadas en disoluciones de etanol catalizadas en medio ácido, se descomponen a antocianidinas (Dai y Mumper, 2010). Las principales unidades en los taninos condensados son la catequina y la epicatequina, de los que derivan las procianidinas que son los taninos más abundantes, junto con otros como la prodelfinidina y la probinetidina (Shirmohammadli et al., 2018).

Los taninos complejos resultan de la combinación entre los flavan-3-oles y galotaninos o elagitaninos. Son compuestos de alto peso molecular que se han encontrado en especies como el roble y el castaño. Los florotaninos están formados por floroglucionol y existen diversos tipos en función del tipo de enlace entre las unidades de floroglucinol y el número de grupos hidroxilo (Fraga-Corral et al., 2021).

### 1.3 PROCESOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Para poder extraer compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de matrices vegetales es necesario seleccionar una técnica de extracción que resulte apropiada y que mantenga las propiedades bioactivas de los compuestos extraídos. Algunos factores que resultan clave en los procesos extractivos son la temperatura del proceso, el disolvente empleado, el tiempo, la relación sólido/líquido y el tamaño de partícula. Para poder obtener rendimientos de extracción elevados y extractos con buenas propiedades antioxidantes es necesario optimizar los factores que afectan al proceso de extracción para cada matriz vegetal en particular. Las etapas a seguir en la planificación de los procesos de extracción suelen comenzar por un análisis preliminar, en donde se estudia de manera independiente la influencia de cada factor en el proceso. Una vez determinados cuales son los factores más significativos se establecen sus valores óptimos a través de una metodología basada en diseños de experimentos como el de Box-Behnken o el diseño central compuesto (CCD), que permiten determinar las condiciones óptimas de extracción mediante la realización de un número reducido de experimentos (Xu et al., 2017).

Las tecnologías disponibles para la recuperación de compuestos bioactivos de materiales vegetales como los residuos lignocelulósicos objeto de estudio, se pueden clasificar en tecnologías convencionales y no convencionales.

#### 1.3.1 Tecnologías de extracción convencionales

Las tecnologías de extracción convencionales se basan en la extracción de compuestos bioactivos mediante la acción de disolventes. Los disolventes más utilizados en la extracción de compuestos bioactivos son el agua, el etanol, el metanol y la acetona, encontrándose que la polaridad del disolvente afecta al proceso de extracción. El material previamente preparado, normalmente seco y molido, se pone en contacto con el disolvente produciéndose la difusión de los compuestos en su seno. El extracto disuelto se separa de la matriz vegetal mediante filtración y posteriormente, el disolvente se evapora para obtener el extracto seco.

El uso de tecnologías convencionales está ampliamente extendido debido a su bajo coste y sencillez operacional; sin embargo, en comparación con las no convencionales, consumen mayor cantidad de disolvente, los rendimientos de extracción son más bajos y el tiempo y la temperatura de extracción son más elevados pudiendo dar lugar a la degradación térmica de algunos compuestos (Omeroglu et al., 2019).

Entre estas tecnologías se encuentran la extracción Soxhlet y la maceración con disolventes que son las aplicadas en este trabajo.

- *Extracción Soxhlet*

En esta técnica, la matriz vegetal se introduce en el interior de un cartucho de celulosa que se coloca en el cuerpo del equipo. En la parte inferior del extractor Soxhlet se coloca un balón que contiene el disolvente y en la parte superior un sistema de condensación. El disolvente se calienta hasta su temperatura de ebullición y al condensar, queda recogido en la cámara del Soxhlet en donde se pone en contacto con el material produciéndose la extracción de los compuestos bioactivos. El disolvente con el extracto se descarga al balón por un efecto de sifón. El proceso de reflujado del disolvente se repite hasta que se considera completa la extracción.

Las principales ventajas de la extracción Soxhlet son que la matriz vegetal entra en contacto con el disolvente de manera continua y no requiere etapa de filtración. Las principales desventajas de la técnica incluyen el elevado tiempo de operación, las altas temperaturas de extracción, el elevado consumo de disolvente y la imposibilidad de agitación (Omeroglu et al., 2019, Osorio-Tobón, 2020).

- *Maceración con disolventes*

En la maceración con disolventes, el material vegetal se pone en contacto directo con el disolvente y la extracción puede llevarse a cabo con agitación, favoreciendo el proceso y en general, obteniéndose mayores rendimientos de extracción. La temperatura del proceso es inferior a la de la extracción Soxhlet y su principal ventaja es la sencillez del montaje y su bajo coste. En esta técnica es necesaria una etapa de filtración para separar el disolvente con el extracto disuelto de la matriz vegetal. La selección del disolvente, la temperatura y el tiempo son los factores que más afectan al proceso. La solubilidad de los compuestos fenólicos es alta en compuestos polares como el agua, el etanol y sus mezclas; trabajar con temperaturas elevadas favorece la difusión de los extractos y aumentar el tiempo de extracción favorece el contacto efectivo entre el disolvente y la matriz vegetal (Osorio-Tobón, 2020).

### 1.3.2 Tecnologías de extracción no convencionales

Las tecnologías de extracción no convencionales surgen como una alternativa a las convencionales con el objetivo de mejorar la eficiencia en la extracción de antioxidantes a través de procesos que requieran menor consumo de disolventes y tiempos de extracción más cortos. Algunas de las técnicas más prometedoras son la extracción asistida por microondas (EAM), la extracción líquida presurizada (PLE), la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Omeroglu et al., 2019, Osorio-Tobón, 2020). En esta tesis doctoral se aplicó la extracción asistida por microondas.

- *Extracción asistida por microondas (EAM)*

La extracción asistida por microondas está siendo cada vez más utilizada en la extracción de compuestos fenólicos ya que reduce tanto el tiempo como la cantidad de disolvente en comparación con las tecnologías convencionales (Oroian y Escriche, 2015). Durante el proceso, se libera energía tanto al disolvente como a la matriz vegetal que puede ser absorbida por las moléculas del material. Debido a los cambios bruscos de temperatura y a la presión localizada se ven afectadas las propiedades de las paredes celulares favoreciendo su ruptura y la liberación de los compuestos bioactivos. Esta técnica resulta eficiente al producirse un calentamiento tanto de la matriz interna como de la externa sin un gradiente de temperaturas. En la extracción EAM hay dos sistemas de operación: cuando la energía microondas se dispersa al azar se considera sistema multimodo y está asociado a sistemas cerrados a alta presión; cuando la energía microondas está focalizada en una zona se considera modo simple y se asocia con extracciones a presión atmosférica (Osorio-Tobón, 2020).

La temperatura, el disolvente, la potencia de microondas y el tiempo de extracción son las variables que más afectan el proceso de extracción asistido por microondas. El disolvente seleccionado debe ser capaz de absorber la energía microondas. En general, temperatura y potencia altas favorecen la extracción, aunque estos factores deben ser controlados para evitar la degradación de las propiedades bioactivas de los compuestos extraídos. Por esta causa no es una técnica apropiada en la extracción de compuestos termolábiles (Xu et al., 2017).

Recientemente se han desarrollado una serie de técnicas que se basan en los principios de la extracción asistida por microondas. Así, la extracción por microondas libre de disolventes (SFEM), que opera a presión atmosférica, se basa en la absorción de la energía microondas por el agua contenida en las células vegetales provocando un aumento de la presión en el interior de las células, que provoca la ruptura de las paredes celulares liberando los compuestos bioactivos. Otra técnica es la que acopla un sistema de vacío a la extracción por microondas. Este sistema es apropiado cuando se trabaja con compuestos termolábiles y sensibles a la presencia de oxígeno (Xu et al., 2017).

- *Extracción líquida presurizada (PLE)*

La extracción líquida presurizada se basa en el uso de disolventes a temperaturas y presiones altas, en rangos de temperatura hasta 200 °C y presiones entre 4 y 20 MPa. Al trabajar a estas temperaturas, la viscosidad y la tensión superficial del disolvente disminuyen mejorando la capacidad de penetración del disolvente en la matriz vegetal y favoreciendo el proceso de extracción de los compuestos bioactivos. Además, utiliza cantidades reducidas de disolvente y los tiempos de extracción son bajos en comparación con otras técnicas (Xu et al., 2017, Omeroglu et al., 2019). Los parámetros más importantes son el disolvente, la temperatura, la presión, el tiempo y el número de ciclos de extracción. Cuando el disolvente empleado es agua, se denomina extracción con agua subcrítica (SWE). La SWE opera a temperaturas entre 100 y 375 °C y a la presión que permite mantener el agua en estado líquido y que, en estas condiciones, presenta valores de polaridad similares a los de los disolventes orgánicos. La extracción SWE está siendo cada vez más utilizada en la extracción de productos naturales (Oroian y Escriche, 2015).

- *Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)*

Este método de extracción es uno de los más utilizados y está asociado a grandes rendimientos de extracción, trabajando a baja temperatura y con bajos volúmenes de disolvente. Durante la aplicación de ultrasonidos se generan ciclos de altas y bajas presiones que dan lugar al fenómeno de cavitación que induce una serie de cambios bruscos de temperatura y presión en el líquido. Las burbujas formadas implosionan bruscamente en la superficie del material vegetal, degradándola y permitiendo la penetración del disolvente y la liberación de los compuestos bioactivos. El equipo consiste en un baño o una sonda de ultrasonidos, de sencillo funcionamiento y bajo coste (Osorio-Tobón, 2020). El rendimiento de la extracción por ultrasonidos se ve afectado por la frecuencia e intensidad de los ultrasonidos, la temperatura, el tiempo, el tipo y volumen de disolvente y el tamaño de partícula de la muestra a extraer (Xu et al., 2017).

- *Extracción con fluidos supercríticos (SFE)*

La extracción con fluidos supercríticos se basa en las propiedades que presenta el disolvente cuando está en condiciones de temperatura y presión superiores a su punto crítico, por lo que se puede comportar tanto como líquido como gas, pudiendo difundir fácilmente a través de los materiales dando lugar a altos rendimientos de extracción. La extracción SFE se lleva a cabo a través de una primera etapa en la que el fluido supercrítico extrae los compuestos de la matriz vegetal y una segunda etapa en la que los compuestos se separan del disolvente mediante la reducción brusca de la presión o mediante el incremento de la temperatura. Los factores que afectan a la extracción SFE son el caudal del disolvente, la presión, la temperatura, el tiempo y las propiedades del material a extraer. La elección del disolvente es clave para la

viabilidad, toxicidad y coste del proceso y uno de los más empleados es el CO<sub>2</sub>. Debido a su baja polaridad a menudo es utilizado en combinación con un modificador. Los disolventes modificadores son compuestos polares que se usan en pequeñas cantidades, siendo el etanol el más empleado (Xu et al., 2017).

#### 1.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Una vez extraídos los compuestos bioactivos de las matrices vegetales, es necesario caracterizarlos en función de su actividad antioxidante. Existen numerosos métodos para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* y debido a los distintos mecanismos empleados por los compuestos antioxidantes para desactivar los radicales libres, a la diversa naturaleza de los antioxidantes extraídos y a las sinergias que se producen entre los distintos compuestos presentes, es necesario aplicar diferentes métodos de determinación de capacidad antioxidante para obtener la máxima información posible de los extractos (Prior et al., 2005).

Uno de los criterios establecidos para clasificar los diferentes métodos existentes es en función de su mecanismo de actuación. Así, se pueden clasificar como métodos HAT, basados en la habilidad de los antioxidantes de inhibir los radicales libres mediante la donación de un hidrógeno, los métodos ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) y TRAP (*total radical trapping antioxidant parameter*). Dentro de los análisis basados en el mecanismo SET de donación de un electrón están los métodos FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), CUPRAC (*cupric reducing antioxidant capacity*) y el método de Folin-Ciocalteu de determinación de los fenoles totales. Los métodos basados en la habilidad de inhibir radicales libres estables, como el ABTS (2,2'-azino-di (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) son clasificados por algunos autores dentro de los métodos SET (Xu et al., 2017), aunque otros autores los clasifican como métodos que utilizan de forma combinada los mecanismos HAT y SET (Gülçin, 2012, Liang y Kitts, 2014).

A continuación, se exponen los métodos que se aplicaron en este trabajo.

- **Ensayo de Folin-Ciocalteu**

El ensayo de Folin-Ciocalteu, o de determinación de fenoles totales, es uno de los métodos más ampliamente utilizados en el análisis de antioxidantes obtenidos de frutos, plantas y demás especies vegetales. Se engloba dentro de los métodos de determinación de capacidad antioxidante pues determina la capacidad reductora de la muestra. Se basa en la formación de un complejo de color azul entre el molibdeno y el tungsteno presentes en el reactivo de Folin-Ciocalteu al reaccionar con los agentes reductores; este complejo presenta máxima absorción en el rango de 700-760 nm (Tan y Lim, 2015; Xu et al., 2017). Inicialmente fue desarrollado para proteínas, por lo que no es específico para los compuestos fenólicos, pudiendo reaccionar con otros compuestos presentes y, por tanto, no sirve para cuantificar los fenoles totales, pero sí que da una estimación del contenido en fenoles y de la capacidad reductora de la muestra. Además, los resultados obtenidos en este método se han encontrado correlacionados con los obtenidos en otros métodos de determinación de capacidad antioxidante (Gülçin, 2012, Xu et al., 2017).

- **Ensayos de reducción de iones metálicos**

El método FRAP, o poder antioxidante de reducción férrica, determina la capacidad reductora de los antioxidantes en base a la medida de la reducción del complejo férrico tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) al complejo ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ). Este complejo presenta un intenso color azul con una absorción máxima a 593 nm. Existe proporcionalidad entre la absorbancia obtenida y la capacidad de los antioxidantes de reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  (Xu et al., 2017). El ensayo FRAP debe realizarse a pH ácido de 3,6 para mantener la solubilidad de hierro. Aunque se ha puesto en duda la relación entre la capacidad de reducción del hierro con la capacidad del antioxidante para inhibir radicales, se ha demostrado que la reducción del radical a ion frena la cadena de propagación de radicales y que, por tanto, la determinación del poder reductor de los compuestos es indicativa de su capacidad de regular el potencial redox. Algunas limitaciones de este método se relacionan con su incapacidad para determinar la capacidad reductora de algunos compuestos como los tioles, con un umbral del potencial redox inferior al detectado por el método (Liang y Kitts, 2014), así como otros compuestos que reaccionan más lentamente y necesitan más tiempo que el establecido para el método (Gülçin, 2012).

El ensayo CUPRAC de capacidad antioxidante reductora del cobre se engloba también en este apartado y su metodología es similar a la del FRAP. En este trabajo se optó por aplicar el método FRAP al encontrarse más extendido y poder establecer comparaciones con los resultados de otros autores.

- **Ensayos de inhibición de radicales libres**

Estos métodos se basan en determinar la capacidad de los compuestos para inhibir los radicales libres. Los métodos ABTS y DPPH son los más utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante de materiales vegetales al ser métodos estandarizados rápidos, simples y reproducibles (Gülçin, 2012).

El método ABTS se basa en la capacidad del antioxidante para inhibir el radical libre  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que se genera por la acción oxidativa del persulfato potásico. Así, el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  formado, en contacto con los compuestos antioxidantes va perdiendo su color verde, lo cual puede medirse espectrofotométricamente a 734 nm (Xu et al; 2017). Este método puede aplicarse tanto a compuestos antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos (Liang y Kitts, 2014).

El método DPPH es análogo al ABTS, pero en este caso el radical a inhibir por el antioxidante es el radical estable  $\text{DPPH}^{\bullet}$  que no necesita ser generado previamente, como ocurre con el  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , ya que se encuentra comercialmente disponible. Al poner en contacto el antioxidante con el radical DPPH, la actividad antioxidante se evalúa mediante el seguimiento de la pérdida de color púrpura a 517 nm (Xu et al., 2017). El radical DPPH es lipofílico por lo que, para asegurar la máxima solubilidad, la reacción debe llevarse a cabo en disolución alcohólica (Liang y Kitts, 2014).

La mayor limitación de estos métodos es que los radicales libres no están implicados en procesos fisiológicos (Liang y Kitts, 2014), además de que no se tiene en cuenta el tiempo que necesita el antioxidante para inhibir el 50% del radical, siendo esta velocidad de inhibición un parámetro importante en los sistemas biológicos (Tan y Lim, 2015).

- **Ensayos de inhibición de especies reactivas específicas**

Estos ensayos se basan en la capacidad de los antioxidantes de inhibir especies reactivas específicas, tanto ROS como RNS presentes en los sistemas biológicos. Así, existen métodos para determinar la capacidad de inhibición del radical peroxilo ( $\text{RCOO}^\bullet$ ), del anión radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), del radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), del oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), del peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y del radical óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ). Existen numerosos ensayos disponibles para cada una de las especies reactivas.

En este trabajo, los extractos se ensayaron frente al radical óxido nítrico a través de la reacción de Griess en la que el óxido nítrico que permanece tras la reacción con el antioxidante se determina como nitrito. El azoderivado cromóforo formado tras la reacción de Griess se evalúa a 540 nm (Gülçin, 2012).

Los distintos métodos disponibles para determinar la capacidad antioxidante, las diferentes metodologías existentes para un mismo método y las diferentes formas de expresar los resultados obtenidos dificultan que se pueda establecer una comparación entre los resultados publicados. Aunque la aplicación de métodos de determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* está ampliamente extendida debido a su sencillez, rapidez y reproducibilidad, hay que destacar que los ensayos *in vitro* no tienen por qué presentar similitud con la actividad antioxidante en los sistemas biológicos. Por tanto, el análisis de la capacidad antioxidante de los extractos debería estar compuesto de análisis basados tanto en mecanismos HAT como SAT, abarcando diferentes tipos de radicales y completados con análisis que identifiquen y cuantifiquen los compuestos fenólicos individuales, como la espectrometría de masas HPLC (Tan y Lim., 2015).

## 1.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

Además de capacidad antioxidante, los compuestos extraídos de las plantas como flavonoides, glucósidos, terpenos y taninos han demostrado también poseer actividad antimicrobiana. En la actualidad, existe la necesidad de obtener nuevos compuestos antimicrobianos para hacer frente a la resistencia a los antibióticos que están desarrollando numerosas bacterias patógenas (Ofosu et al., 2020).

Al igual que en el caso de la determinación de la actividad antioxidante, la selección de un método apropiado es clave en la determinación de la actividad antimicrobiana.

Uno de los métodos más utilizados es el de difusión radial ya que su preparación es sencilla y de bajo coste y no necesita equipos especiales (Tan y Lim., 2015). La técnica se basa en poner en contacto el extracto con el medio agar inoculado con la bacteria a analizar. El extracto se puede depositar sobre un disco de papel de filtro o empleando la siembra en pozo (Ferreira et al., 2004; Sousa et al., 2006). Si el compuesto presenta actividad antimicrobiana, pasado el tiempo de incubación, aparece una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco o pozo en donde se colocó la disolución de extracto. Otros métodos disponibles son el ensayo de dilución en agar, en donde la muestra esterilizada se mezcla con el agar y se inocula con la bacteria y la microdilución en caldo, normalmente caldo Mueller-Hinton, en el que la muestra diluida a diversas concentraciones se inocula con la bacteria en placas de 96 pocillos (Tan y Lim., 2015).

Los factores clave para poder establecer resultados comparables son el tamaño del inóculo, la concentración de bacterias inoculadas en cada placa ( $10^6$  ufc/ml, unidades formadoras de colonias) y el tiempo de incubación al que se determina el valor de concentración inhibitoria mínima (CIM). El uso de algunos disolventes empleados para compuestos insolubles en agua, que a determinadas concentraciones pueden resultar tóxicos para las bacterias o la tendencia a precipitar de algunos polifenoles menos polares puede dar como resultado valores de CIM alterados (Tan y Lim., 2015).





## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

En los procesos que se llevan a cabo en la industria alimentaria, agrícola y forestal se generan una gran cantidad de residuos de carácter lignocelulósico, en la actualidad infrautilizados y cuyo principal destino es su aprovechamiento energético a través de su combustión, por lo que resulta de interés la búsqueda de vías alternativas de aprovechamiento de estos residuos que reduzcan su impacto ambiental e incrementen el beneficio económico de los procesos.

Basándonos en las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los compuestos fenólicos presentes en los materiales vegetales, cuyo interés para la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica viene promovido por la demanda actual hacia productos naturales que reemplacen el uso de aditivos sintéticos, el objetivo de este trabajo es la valorización de diversos residuos lignocelulósicos como fuente de estos compuestos bioactivos de alto valor añadido.

A este respecto, se propone la obtención de antioxidantes naturales a partir de residuos derivados de la industria alimentaria, como la cáscara y el erizo de castaña (*Castanea sativa*), el involucro de avellana (*Corylus avellana*) y el pericarpio verde de nuez (*Juglans regia*, L), residuos de la industria maderera como restos del cizallado de chapas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y residuos forestales como la madera de acacia (*Acacia dealbata*), biomasa forestal derivada de la limpieza de montes (mezcla heterogénea de madera, corteza, hojas y frutos de *Eucalyptus globulus* y *Pinus pinaster*) y hojas de nogal (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*).

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

- Determinar el potencial antioxidante de los residuos a través de una serie de extracciones preliminares empleando diferentes condiciones de extracción analizando el efecto del disolvente, temperatura, tamaño de partícula y relación sólido/líquido. El objetivo es seleccionar, para cada residuo analizado, aquellas condiciones en las que se obtengan altos rendimientos de extracción junto con extractos de alta capacidad antioxidante. Los extractos se caracterizarán en base al contenido en fenoles totales y a la capacidad antioxidante utilizando distintos métodos analíticos como FRAP, DPPH y ABTS.
- Seleccionar en base a los resultados de las extracciones preliminares, aquellos residuos que por su disponibilidad y sus propiedades pueden tener mayor interés para la industria, para los que se realizará la optimización del proceso de extracción.
- Para los residuos del procesado de la castaña, optimizar el proceso de extracción del erizo de castaña mediante un diseño de experimentos con el objetivo de seleccionar las condiciones de extracción, temperatura, tiempo y concentración de disolvente (disoluciones acuosas de metanol y etanol), que optimicen el rendimiento y las propiedades de los

extractos. En base a los resultados del diseño, comparar los extractos de erizo y cáscara de castaña obtenidos en las mismas condiciones respecto al efecto de la temperatura y del disolvente y modelizar la cinética del proceso.

- Analizar el uso de tecnologías no convencionales de extracción, como la extracción asistida por microondas con el objetivo de reducir el tiempo y aumentar el rendimiento de la extracción de erizo y cáscara de castaña y chapa de eucalipto; para este residuo, optimizar el proceso a través de un diseño de experimentos para seleccionar la temperatura, relación líquido/sólido y tiempo con los que se obtengan los mejores resultados.
- Para las hojas de nogal, establecer a través de un diseño de experimentos, los valores de temperatura, concentración de etanol y tiempo que optimizan el proceso en cuanto a rendimiento de extracción y propiedades antioxidantes de los extractos.
- Determinar la capacidad de diversos extractos acuosos para inhibir el crecimiento de diversas bacterias y levaduras. Este aspecto es interesante en cuanto a su futura aplicación debido a la cada vez mayor resistencia de los microorganismos a los tratamientos disponibles.
- Establecer el perfil fenólico de una selección de los extractos obtenidos, cualitativamente a través de espectrometría de masas RP-HPLC-ESI-TOF y cuantitativamente a través de análisis LC-MS/MS y UPLC/ESI-QTOF-MS. El objetivo es establecer los compuestos que contribuyen a las propiedades antioxidantes de los extractos para orientar su futura aplicación industrial.



## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

- 
- Gonzalo Vázquez<sup>a</sup>, Adela Fernández-Agulló<sup>a</sup>, Cristina Gómez-Castro<sup>a</sup>; María Sonia Freire<sup>a</sup>, Gervasio Antorrena<sup>a</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2012. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. *Ind. Crop. Prod.*, 35, 126-134; Elsevier. B.V. ISSN: 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.022>
  - Adela Fernández-Agulló<sup>a</sup>, Eric Pereira<sup>b</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Patricia Valentão<sup>c</sup>, Paula.B. Andrade<sup>c</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, José Alberto Pereira<sup>b</sup>, 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind. Crop. Prod.*, 42, 126-132; Elsevier. B.V. ISSN: 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
  - Adela Fernández Agulló<sup>a</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Gervasio Antorrena<sup>a</sup>, José Alberto Pereira<sup>b</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2014. Effect of the extraction technique and operational conditions on the recovery of bioactive compounds from chestnut (*Castanea sativa*) bur and shell. *Sep. Sciencie. Technol.* 49(2), 267-277; Taylor & Francis Group, LLC, ISSN: 0149-6395, <https://doi.org/10.1080/01496395.2013.838264>
  - Adela Fernández Agulló<sup>a</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2015. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Ind. Crops. Prod.*, 64: 105-113; Elsevier. B.V. ISSN: 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.031>
  - Adela Fernández-Agulló<sup>a</sup>, Aída Castro<sup>b</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2019. Optimization of the extraction of bioactive compounds from walnut (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*) leaves: antioxidant capacity and phenolic profile. *Antioxidants*, 9, 18; MDPI eISSN: 2076-3921, <https://doi.org/10.3390/antiox9010018>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Química, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, España

<sup>b</sup> Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolonia, Apartado 1172, 5301-855, Bragança, Portugal

<sup>c</sup> REQUIMTE/Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade de Porto, Rúa Jorge Viterbo Ferreira, 2284050-313, Porto, Portugal



## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen los materiales lignocelulósicos objeto de este estudio, las técnicas de extracción empleadas, los métodos analíticos utilizados para caracterizar los extractos obtenidos, así como la planificación de la experimentación realizada.

### 3.1 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Los materiales naturales que se han estudiado en este trabajo como fuente de compuestos antioxidantes son residuos generados en las industrias alimentaria y de la madera gallegas y diversos materiales y residuos forestales:

- Residuos del procesado de la castaña: erizo y cáscara de castaña
- Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto
- Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal
- Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual

Durante el estudio no se han tenido en cuenta factores que pueden tener influencia en la composición de los materiales tales como la edad, localización del árbol, etc.

#### 3.1.1 Residuos del procesado de la castaña: erizo y cáscara de castaña

Durante el procesado de la castaña (*Castanea sativa*) se generan dos residuos principalmente, la cáscara y el erizo (Figura 3.1.1). La cáscara de la castaña está formada por la piel externa (pericarpio) de aspecto liso y brillante y color marrón oscuro, una cara interna de aspecto aterciopelado y el tegumento, que es la piel fina pegada a la semilla (parte comestible de la castaña). La cáscara de castaña utilizada en este estudio procede de la empresa gallega Marrón Glacé S.L. (Ourense), dedicada a la producción de derivados de la castaña. Es un residuo que se genera en el proceso de pelado en la propia industria y que, actualmente, está destinado para la producción de energía en la propia planta. El erizo de la castaña es la cápsula dura y espinosa que envuelve y protege al fruto. El erizo estudiado proviene de una plantación particular de castaños situada en Santiago de Compostela (A Coruña, Galicia). Se trata de un residuo generado durante la recolección del fruto y que, generalmente, se abandona en el monte lo que puede causar la proliferación de insectos que pueden dañar el fruto.



Figura 3.1.1 Cáscara y erizo de la castaña

### 3.1.2 Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto

Los restos del cizallado de chapas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) analizados en este trabajo provienen de la empresa Aserpal S.A. (Grupo Losán S.A., Galicia) dedicada a la industria del tablero. Se trata de residuos generados durante el proceso de obtención de láminas de madera de reducido espesor (inferior a 7 mm) que se emplean como recubrimiento (chapas decorativas) de tableros. Estas chapas decorativas se obtienen a partir de madera en rollo que ha sido pretratada (cocción en agua a 75°C durante 16 h) para facilitar su corte posterior por desenrollo. Tras su paso por un túnel de secado, las chapas pasan a una cizalladora para dimensionarlas. Los recortes generados en el cizallado de las chapas junto con los rechazos del proceso son los residuos analizados en este estudio (Figura 3.1.2).



Figura 3.1.2 Chapas de eucalipto

### 3.1.3 Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal

La semilla del nogal (parte comestible del fruto) aparece dentro de un endocarpio duro y corrugado que a su vez se encuentra dentro de un involucro semi-carnoso (pericarpio) verde y liso que al secarse se desprende y se vuelve de color negro. Las muestras de pericarpio verde de nuez (*Juglans regia* L., variedad *Cv. Mellanise*, Figura 3.1.3) analizadas en este trabajo fueron recogidas en Bragança (Portugal) en una plantación de nogales cultivados sin la aplicación de tratamientos fitosanitarios.



**Figura 3.1.3** Pericarpio de nuez  
(Imagen bajo licencia CC-BY-SA 2.0)

La hoja de nogal analizada en este trabajo (Figura 3.1.4) pertenece a la especie híbrida *Juglans major 209 x Juglans regia*, una especie caracterizada por su buen crecimiento y capacidad de adaptación. Las hojas fueron recogidas en una plantación localizada en A Coruña (Galicia).



**Figura 3.1.4** Hoja de nogal

### **3.1.4 Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual**

La avellana es el fruto del avellano común (*Corylus avellana*), que se produce en grupos de uno a cinco, contenidos en un involucro hojoso. Una vez maduro el fruto, el involucro se abre liberando la avellana. Este residuo verde que recubre la avellana (Figura 3.1.5) es el que se estudia en este trabajo y ha sido recogido de forma manual en una plantación particular en Ourense (Galicia).



**Figura 3.1.5** Involucro de avellana  
(Imagen bajo licencia CC-BY-SA 3.0)

La mimosa o acacia (*Acacia dealbata*) es una especie invasora con gran presencia en Galicia. La madera de acacia (*Acacia dealbata*) utilizada (Figura 3.1.6) ha sido recogida de forma manual en una plantación particular en Ourense (Galicia).



**Figura 3.1.6** Madera de acacia molida

La biomasa residual analizada proviene de la empresa Allarluz S.A., central de biomasa forestal residual situada en Allariz (Galicia). Los objetivos de la central de Allarluz son dos: la limpieza de montes y la producción energética. El residuo forestal analizado en este trabajo (Figura 3.1.7) es una mezcla heterogénea de madera, corteza, hojas y frutos de *Eucalyptus globulus* y *Pinus pinaster*, principalmente.



**Figura 3.1.7** Biomasa residual molida

### 3.2 PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES

Para asegurar la estabilidad y evitar los procesos de degradación que podrían ocurrir durante su almacenamiento, los materiales se secaron al aire hasta alcanzar su humedad de equilibrio, a excepción del pericarpio verde de nuez que fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y, posteriormente, liofilizado. Una vez secos, los diversos materiales se molieron para reducir su tamaño (en el caso de las chapas de eucalipto también se realizaron análisis de piezas recortadas de 0,60 mm x 10 mm x 20 mm) y fueron clasificados por tamaños mediante una tamizadora electromagnética digital Filtra (FTL-0200), seleccionándose la fracción de tamaño de partícula comprendido entre 0,1 y 2 mm para la cáscara y el erizo de castaña y entre 0,1 y 1 mm para el resto de los residuos estudiados. La fracción seleccionada se guardó en bolsas de polietileno para preservarla de la luz.

Para determinar el contenido en humedad de cada material se utilizó una balanza de humedades (Sartorius Moisture Analyzer MA30) que se basa en el método termogravimétrico, donde la muestra es sometida a un proceso de secado a 105°C durante 99 minutos, proporcionando el contenido de humedad de la muestra a partir de la pérdida de peso que ésta experimenta durante el proceso.

### 3.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La extracción de los diversos tipos de biomasa se llevó a cabo empleando técnicas de extracción convencionales, como la extracción Soxhlet y la maceración con disolventes, y técnicas alternativas, como la extracción asistida por microondas (EAM). A continuación, se describen los distintos procedimientos utilizados.

#### 3.3.1 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet se empleó en los experimentos preliminares realizados para el erizo de castaña (apartado 3.5.1.1). Las extracciones se llevaron a cabo empleando disolventes orgánicos (acetona, etanol y metanol) a presión atmosférica y a la temperatura de ebullición de cada disolvente. Teniendo en cuenta la capacidad del cartucho de extracción, la cantidad de erizo a emplear en cada extracción fue de entre 8 y 10 g de erizo seco y el volumen de disolvente necesario para la realización correcta de la extracción fue de 250 ml. El tiempo de extracción fue de 15 horas con una frecuencia de sifonado de entre 3 y 5 sifonadas por hora. La disolución de extracto obtenida se concentró en un rotavapor Büchi R-210 para eliminar el disolvente y recuperar el extracto obtenido. El contenido en extractos referido al material original seco se obtuvo a partir del sólido que queda en el cartucho de extracción, una vez seco tras 24 horas en estufa a 105°C, y se calculó como porcentaje de pérdida de peso respecto al material de partida.

#### 3.3.2 Maceración con disolventes

Las extracciones aplicando la técnica convencional de maceración con disolventes se llevaron a cabo, dependiendo de la cantidad de biomasa a extraer, en un reactor de vidrio Pyrex de 2 L provisto de agitación mecánica y control de temperatura, o en un baño orbital (UNITRONIC-OR, Selecta) con agitación y control de temperatura a una velocidad de agitación de 90 rpm (extracciones preliminares, apartado 3.5.1; optimización, comparativa y cinéticas de los residuos de la castaña, apartado 3.5.2; optimización de la extracción de hojas de nogal, apartado 3.5.4). En el caso concreto del pericarpio de nuez, la extracción se llevó a cabo en vaso de precipitados utilizando agitación magnética (apartado 3.5.1.4). Los disolventes empleados fueron agua, etanol y metanol puros y en disolución acuosa.

El procedimiento seguido fue mezclar una cantidad determinada de cada material a extraer (en peso seco) con la cantidad de disolvente correspondiente a la relación sólido/líquido establecida en cada caso. La mezcla se calentó a la temperatura establecida en cada experimento manteniendo agitación constante durante el tiempo establecido para cada extracción. En el caso de las extracciones realizadas en el reactor, el tiempo se contabilizó una vez alcanzada la temperatura fijada. Transcurrido el tiempo de extracción, la suspensión resultante se filtró a vacío a través de un embudo Büchner y se lavó abundantemente con agua hasta obtener un color transparente en las aguas de lavado. En las extracciones con agua, la disolución de extractos obtenida junto con los primeros lavados se concentró mediante secado por pulverización (*spray-*

*drying*) en un secador Büchi Mini Spray Dryer B-191. En el caso de las extracciones con etanol y metanol, la disolución de extractos se concentró en un rotavapor Büchi R-210. El material extraído, una vez lavado, se dejó secar al aire durante 24 horas y luego se mantuvo en una estufa a 105°C durante otras 24 horas. El porcentaje de extracción se calculó como el porcentaje de pérdida de peso del sólido respecto al peso seco del material de partida.

### 3.3.3 Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (EAM) se llevó a cabo en un microondas Discover SP-CEM utilizando como recipientes viales de Pyrex de 10 ml. El equipo permite agitación constante de la muestra y control de temperatura y presión en el vial. Los parámetros del microondas se fijaron en los siguientes valores: potencia de 150 W, presión de extracción de 250 psi, alto nivel de agitación, premezclado de 15 s y enfriamiento final de la muestra. La temperatura, el tiempo, la relación sólido/líquido y la concentración del disolvente se establecieron en base a las condiciones de cada experimento. La extracción asistida por microondas se aplicó en extracciones de erizo y cáscara de castaña (apartado 3.5.2.3) y chapas de eucalipto (apartado 3.5.3) empleando como disolventes agua y disoluciones acuosas de etanol y metanol.

## 3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los métodos empleados para caracterizar los diferentes extractos obtenidos desde el punto de vista de sus propiedades antioxidantes, capacidad antimicrobiana y perfil fenólico fueron los siguientes:

- Determinación del contenido en fenoles totales
- Determinación de la capacidad antioxidante:
  - Métodos basados en la capacidad de los antioxidantes para la reducción del  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ : método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) y poder reductor
  - Métodos basados en la capacidad de inhibición de radicales libres: método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) y método ABTS (2,2'-azino-di (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))
  - Método basado en la captura de radicales libres específicos: método de inhibición del radical óxido nítrico
- Determinación de la capacidad antimicrobiana: método de difusión radial
- Identificación y cuantificación de los compuestos presentes en los extractos mediante espectroscopia de masas RP-HPLC-ESI-TOF, LC-MS/MS y UPLC/ESI-QTOF-MS.

### 3.4.1 Determinación del contenido en fenoles totales

El contenido en fenoles totales de los extractos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

En un tubo de ensayo se colocaron 0,5 ml de una disolución acuosa de extracto y se añadieron, en el siguiente orden, 2,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido con agua en una proporción de 1/10 (v/v), y 2 ml de una disolución acuosa de carbonato sódico (75 g/l). La mezcla se homogeneizó y se mantuvo en un bloque térmico a 50°C durante 5 min. Tras su enfriamiento se determinó la absorbancia a 760 nm. Para las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Jasco V-630.

El contenido en fenoles totales se expresó como g de equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada 100 g de extracto seco, y se determinó a partir de la recta de calibrado (Figura 3.4.1) obtenida con disoluciones de ácido gálico (2-40 µg/ml). Los análisis se realizaron por triplicado tomando como valor final la media de los resultados.

En el caso particular de los extractos de pericarpio de nuez, el contenido en fenoles totales se determinó aplicando algunas modificaciones al método descrito por Singleton y Rossi (1965) al llevarse a cabo durante una estancia de investigación realizada en el Instituto Politécnico de Bragança (Portugal). En este caso, se mezclaron 1 ml de disolución acuosa de extracto con 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 3 minutos se añadió 1 ml de disolución de carbonato sódico saturado y se ajustó el volumen hasta 10 ml con agua destilada. La reacción se mantuvo durante 90 minutos a oscuras y posteriormente, se midió la absorbancia a 725 nm.

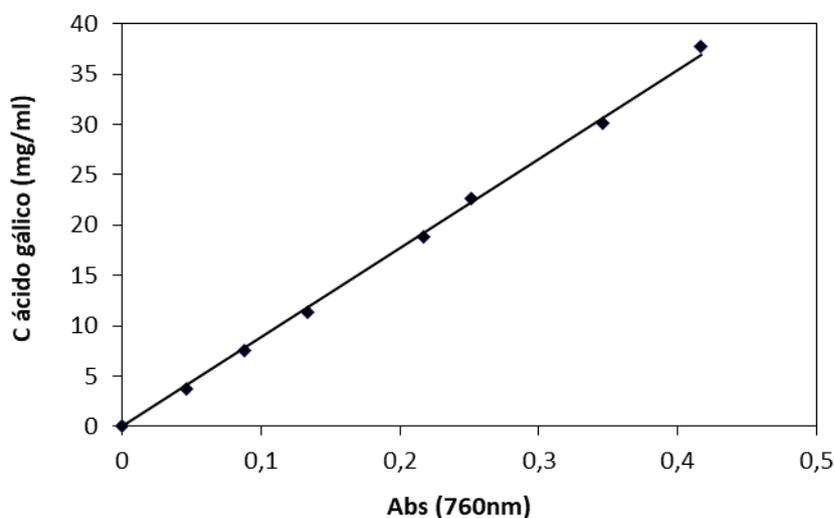


Figura 3.4.1 Calibrado para la determinación del contenido total en fenoles. Método de Folin-Ciocalteu

### 3.4.2 Método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

El método FRAP se basa en la reducción del complejo [Fe(III)-TPTZ] (2,4,6-tripiridil-s-triazina) a su forma ferrosa [Fe(II)-TPTZ]. Este complejo de color azulado presenta una absorción máxima a 593 nm.

El procedimiento se basó en el método propuesto por Szöllösi y Szöllösi-Varga (2002) en donde 0,1 ml de una disolución acuosa de extractos se transfirieron a un tubo de ensayo donde se añadieron 3,0 ml de disolución FRAP. La disolución FRAP se preparó en el momento de su utilización de la siguiente forma: 25 ml de disolución tampón de acetato (300 mmol/l y pH=3,6) se mezclaron con 2,5 ml de disolución TPTZ (10 mmol/l en ácido clorhídrico 40 mmol/l) y con 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/l en agua destilada).

Los tubos de ensayo se homogeneizaron y se mantuvieron durante 5 min a 25°C en un bloque térmico. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 593 nm. Los resultados se expresaron como nmol equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por mg de extracto en base seca (Maksimović et al., 2005) y se determinaron a partir de la recta de calibrado (Figura 3.4.2) obtenida a partir de disoluciones de L-ácido ascórbico (0,1-1 mmol/l). Los análisis se realizaron por triplicado tomando como valor final la media de los resultados.

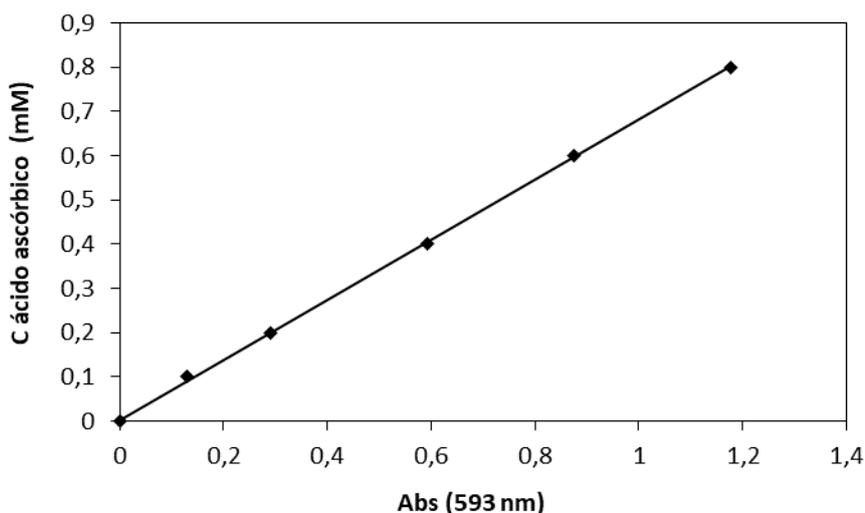


Figura 3.4.2 Calibrado para la determinación de la actividad antioxidante. Método FRAP

#### 3.4.2.1 Método del Poder Reductor

En el caso particular del pericarpio de nuez, analizado durante una estancia de investigación en el Instituto Politécnico de Bragança, el poder reductor fue determinado según el procedimiento descrito por Berker et al. (2007). El poder reductor se basa, en este caso, en la reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricianuro a su forma ferrosa  $\text{Fe}^{2+}$  en presencia de antioxidantes. Para ello se mezcló 1 ml de disolución de extracto a diferentes concentraciones (0,01-5 mg/ml) con 2,5 ml de disolución tampón de fosfato sódico (200 mmol/l, pH=6,6) y 2,5 ml de ferricianuro de potasio (1%). La mezcla se incubó a 50°C durante 20 min y posteriormente se le añadieron 2,5 ml de ácido tricloroacético (10%). La mezcla fue centrifugada a 1000 rpm durante 8 min (en una centrífuga refrigerada Centorion K24OR-2003). Posteriormente 2,5 ml

del sobrenadante se mezclaron con 2,5 ml de agua desionizada y con 0,5 ml de cloruro férrico (1%). La absorbancia se midió a 700 nm, en donde valores altos de la misma indican elevado poder reductor de la muestra. A partir de la representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración de extracto se obtuvo el valor  $EC_{50}$ , que indica la concentración de extracto necesaria para obtener una absorbancia de 0,5. Bajos valores de  $EC_{50}$  están relacionados con alta capacidad antioxidante.

### 3.4.3 Método DPPH

Para determinar la capacidad de los extractos de capturar el radical DPPH• se aplicó el método propuesto por Barreira et al. (2008) con algunas modificaciones. Se mezclaron 0,3 ml de disolución acuosa de extracto, preparada a distintas concentraciones, con 2,7 ml de disolución recién preparada de DPPH ( $6,0 \cdot 10^{-5}$  M en metanol al 80% (v/v)). La mezcla se agitó en un mezclador tipo vórtex y se mantuvo en reposo y protegida de la luz durante 20 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se determinó a una longitud de onda de 517 nm.

A partir de los valores de la absorbancia se determinó el porcentaje de inhibición del radical (PI, %) aplicando la ecuación 3.1, donde  $A_S$  es la absorbancia de la disolución de extractos y  $A_0$  es la absorbancia de la disolución control preparada sin extractos.

$$PI (\%) = \left[ \frac{A_0 - A_S}{A_0} \right] \cdot 100 \quad \text{[Ecuación 3.1]}$$

A partir de la representación gráfica del porcentaje de inhibición frente a la concentración de extractos se obtiene la concentración de extracto con la que se alcanza el 50% de la inhibición del radical DPPH ( $EC_{50}$ ).

Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox (TRE) por gramo de extracto en base seca. Para su cálculo se parte de la recta de calibrado (Figura 3.4.3) que se obtuvo al representar el porcentaje de inhibición correspondiente para cada concentración de Trolox ensayada (0,04-0,30 mM).

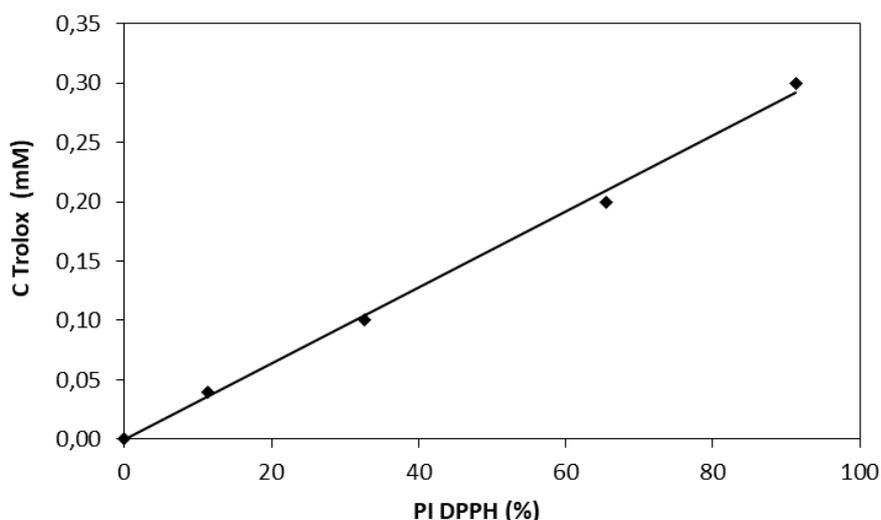


Figura 3.4.3 Calibrado para la determinación del equivalente en Trolox de los extractos. Método DPPH

### 3.4.4 Método ABTS

Según Re et al. (1999), a diferencia del método DPPH, el primer paso en el método ABTS es generar el radical  $ABTS^{\bullet+}$ . Para ello se mezclaron a volúmenes iguales una disolución de ABTS (7 mM en agua) con una disolución de persulfato potásico (2,45 mM). La mezcla se mantuvo protegida de la luz y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante un mínimo de 40 h.

En el momento de analizar la capacidad de inhibición de los extractos se preparó una disolución del radical  $ABTS^{\bullet+}$  con agua destilada hasta que la absorbancia de la misma a 734 nm fue de 0,7. En un tubo de ensayo se mezclaron 25  $\mu$ l de disolución acuosa de extractos con 2,5 ml de la disolución de  $ABTS^{\bullet+}$ . La mezcla se agitó en un mezclador tipo vórtex y se mantuvo en reposo y protegida de la luz durante 6 min a temperatura ambiente. Entonces se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 734 nm. El ensayo se repitió para distintas concentraciones de extractos.

Se calculó el porcentaje de inhibición del radical  $ABTS^{\bullet+}$  de forma análoga a la expuesta para el método DPPH (ecuación 3.1) así como los valores de  $EC_{50}$  y el equivalente en Trolox de los extractos (TRE). La recta de calibrado (Figura 3.4.4) se obtuvo de la representación del porcentaje de inhibición del radical  $ABTS^{\bullet+}$  frente a la concentración de Trolox (0,1-2,0 mM).

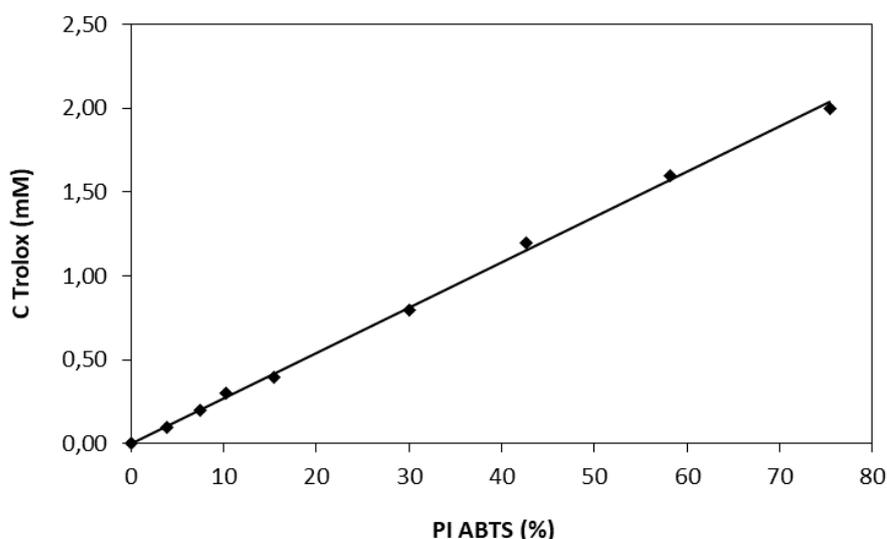


Figura 3.4.4 Calibrado para la determinación del equivalente en Trolox de los extractos. Método ABTS

### 3.4.5 Método de inhibición del radical óxido nítrico

El radical óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) se genera de manera espontánea a partir del nitroprusiato de sodio (SNP) en disolución acuosa y condiciones fisiológicas (pH 7,4). La reacción de Griess es capaz de determinar el nitrito que se produce al reaccionar el radical óxido nítrico con el oxígeno a través de medidas de la absorbancia del cromóforo formado. Los agentes inhibidores del óxido nítrico compiten con el oxígeno reduciendo la producción de nitrito.

La capacidad de atrapamiento del radical NO se determinó según el método descrito por Sousa et al. (2008). Los extractos se disolvieron en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). La actividad

antirradical se determinó en un lector de placas Multiskan Ascent. En primer lugar, 100  $\mu$ l de nitroprusiato de sodio (20 mM) se incubaron con 100  $\mu$ l de cada disolución de extracto (a diferentes concentraciones) durante 60 minutos, a temperatura ambiente y bajo el efecto de la luz. Todas las disoluciones se prepararon en tampón fosfato. Después de la incubación, se añadieron 100  $\mu$ l de reactivo de Griess (1% de sulfanilamida y 0,1% de naftiletildiamina en 2% de ácido fosfórico) y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 10 min. La absorbancia se midió a 562 nm. Se determinó el porcentaje de inhibición del radical NO y el valor de EC<sub>50</sub> de manera análoga a los métodos DPPH y ABTS (ecuación 3.1).

### 3.4.6 Determinación de la capacidad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana de los extractos se analizó frente a los siguientes microorganismos clasificados como bacterias Gram +: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*; bacterias Gram -: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y levaduras: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Todos ellos fueron proporcionados por el Departamento de Biología de la Universidad de Minho (Braga, Portugal). Las poblaciones bacterianas se mantuvieron a 4°C en agar LB [triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) y agar 2% (p/v)] siendo subcultivadas periódicamente a 37°C. Las poblaciones de levaduras se mantuvieron a 4°C en agar YPD [peptona 1% (p/v), extracto de levadura 2% (p/v), glucosa 2% (p/v) y agar 2% (p/v)] siendo subcultivadas periódicamente a 32°C.

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos frente a bacterias y levaduras se basa en una adaptación del método de difusión radial (Ferreira et al., 2004; Sousa et al., 2006). En primer lugar, se prepararon suspensiones de los microorganismos a analizar conteniendo aproximadamente 10<sup>6</sup> ufc/ml (unidades formadoras de colonias) en agar blando (0,8% p/v). Se inocularon placas conteniendo medio agar LB en el análisis de bacterias y medio agar YPD en el de levaduras con 8 ml de suspensión de microorganismo. Se practicaron agujeros en el agar (3 mm de profundidad y 4 mm de diámetro) y en cada uno de ellos se introdujeron 85  $\mu$ l de disolución de extracto a distintas concentraciones. Para cada microorganismo se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la concentración más baja de muestra ensayada (entre 0,1 y 100 mg/ml) capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias después de 24 h a 37°C y de las levaduras tras 48 h a 32°C. El radio de las zonas de inhibición correspondientes a los valores CIM se determinó utilizando una regla con precisión de 0,5 mm. Cada radio de la zona de inhibición se determinó por triplicado (tres placas distintas), tomándose como valor final la media de los resultados.

### 3.4.7 Identificación y cuantificación de los compuestos por espectroscopía de masas

Los análisis por espectroscopía de masas fueron realizados en la Unidad de Espectrometría de Masas y Proteómica de la Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológico (RAIDT) de la Universidade de Santiago de Compostela en base a los métodos que se detallan a continuación.

### 3.4.7.1 Análisis por espectroscopía de masas RP-HPLC-ESI-TOF

El perfil fenólico de los extractos se determinó por RP-HPLC-ESI-TOF (espectroscopía de masas con ionización por *electrospray* y analizador de tiempo de vuelo acoplada con cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa). Los equipos utilizados fueron un HPLC Agilent Technologies 1100 y un espectrómetro ESI-TOF Bruker Mictotof. Para la separación de los compuestos fenólicos presentes se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 5  $\mu\text{m}$  (4,6 x 150 mm) con una fase móvil compuesta por una mezcla de disolvente A (ácido acético acuoso del 2%) y disolvente B (0,5% de ácido acético en agua/acetonitrilo (1/1, v/v)) con un caudal de 1 ml/min. El análisis fue llevado a cabo en modo de ionización negativa y las condiciones del mismo, así como el gradiente de elución se resumen en la tabla 3.4.1.

**Tabla 3.4.1** Condiciones del análisis por espectroscopía de masas RP-HPLC-ESI-TOF

Parámetro	Condición		
Columna	Zorbax Eclipse XDB-C18 5 $\mu\text{m}$ (4,6 x 150 mm)		
Caudal	1 ml/min		
Fase móvil A	Ácido acético 2% en agua		
Fase móvil B	Ácido acético 0,5% en agua/acetonitrilo (1/1, v/v)		
Analizador	TOF (tiempo de vuelo)		
Fuente de ionización	ESI ( <i>electrospray</i> )		
Voltaje capilar	+4,5 kV		
Presión del gas nebulizador	32 psi		
Flujo de gas seco	12 l/min		
Volumen de inyección	10 $\mu\text{l}$		
Gradiente	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
	0	90	10
	50	45	55
	60	0	100
	65	90	10

Se analizaron en las mismas condiciones los siguientes estándares: (+)-catequina hidratada, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, procianidina B2, quercetina-3- $\beta$ -D glucósido, quercetina-3-o-rhamnosido, ácido elágico, isorhamnetina, kaempferol, ácido tánico, (-)-galocatequina y (-)-ácido gálico. Las muestras y los estándares fueron disueltos en agua en un rango de concentración de 100-200 ppm. Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC.

Una vez identificados los compuestos fenólicos presentes en los diferentes extractos analizados, se llevó a cabo la cuantificación de los mismos en extractos seleccionados. Para ello se utilizó un cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas LC-MS/MS triple cuadrupolo API 4000 de AB Sciex Instruments. La columna y el método fueron los empleados en la caracterización con ligeras modificaciones. La fase móvil A fue ácido acético 0,1% mientras que la fase B se mantuvo en 0,5% de ácido acético en agua/acetonitrilo (1/1, v/v). El gradiente lineal se resume en la tabla 3.4.2:

Tabla 3.4.2 Condiciones del análisis por espectroscopía de masas LC-MS/MS

Parámetro	Condición		
Fase móvil A	Ácido acético 0,1% en agua		
Fase móvil B	Ácido acético 0,5% en agua/acetoneitrilo (1:1, v/v)		
Gradiente	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
	0	90	10
	50	45	55
	65	0	100
	70	90	10

Las curvas de calibración obtenidas para los compuestos estándar, que servirán para cuantificar los diferentes compuestos fenólicos presentes en los extractos, se presentan en la Tabla 3.4.3.

Tabla 3.4.3 Recta de calibrado para los compuestos estándar analizados mediante LC-MS/MS

Compuesto	Rango lineal (mg/l)	Recta de calibrado	R <sup>2</sup>
(-)-Ácido gálico	50-5000	$y = 3,07 \cdot 10^3 x + 5,39 \cdot 10^4$	0,9945
Ácido elágico	50-5000	$y = 2,02 \cdot 10^3 x - 1,97 \cdot 10^4$	0,9966
(+)-Catequina hidratada	50-5000	$y = 8,40 \cdot 10^3 x + 7,13 \cdot 10^4$	0,9981
(-)-Epicatequina	50-5000	$y = 9,13 \cdot 10^3 x - 2,44 \cdot 10^4$	0,9981
(-)-Epigallocatequina	50-5000	$y = 1,13 \cdot 10^3 x - 5,55 \cdot 10^4$	0,9837
(-)-Galocatequina	50-5000	$y = 1,08 \cdot 10^4 x - 4,69 \cdot 10^4$	0,9922
Quercetina	50-5000	$y = 2,81 \cdot 10^3 x - 1,31 \cdot 10^4$	0,9914

### 3.4.7.2 Análisis por espectroscopía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS

En el caso concreto de los extractos de hoja de nogal, para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó un análisis UPLC/ESI-QTOF-MS (cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con ionización por *electrospray* y espectrometría de masas de tiempo de vuelo). Los equipos utilizados fueron el Bruker Elute UHPLC (Billerica) y el Bruker TimsTOF (Billerica). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna Bruker Intensity Solo C18 2  $\mu\text{m}$  (2,1 mm  $\times$  100 mm) y un gradiente binario de ácido fórmico acuoso del 0,1% para la fase móvil A y 0,1% de ácido fórmico en metanol para la fase móvil B, con un caudal de 0,25 ml/min. En la tabla 3.4.4 se muestran las condiciones del análisis y en la tabla 3.4.5 las rectas de calibrado para cada compuesto estándar analizado.

**Tabla 3.4.4** Condiciones del análisis por espectroscopía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS

Parámetro	Condición		
Columna	Bruker Intensity Solo C18 2 $\mu$ m (2,1 mm $\times$ 100 mm)		
Caudal	0,25 ml/min		
Fase móvil A	Ácido fórmico 0,1% en agua		
Fase móvil B	Ácido fórmico 0,1% en metanol		
Gradiente	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
	0	100	0
	0,4	95	5
	0,5	65	35
	7	0	100
	12	0	100
	12,1	95	5
	15	95	5

**Tabla 3.4.5** Recta de calibrado para los compuestos estándar analizados mediante UPLC/ESI-QTOF-MS

Compuesto	Rango lineal (mg/l)	Recta de calibrado	R <sup>2</sup>
(-)-Galocatequina	1-200	$y = 8068x + 17932$	0,9941
(+)-Catequina hidratada	1-200	$y = 15461x + 52943$	0,9958
Ácido clorogénico	1-1000	$y = 8181x + 22563$	0,9936
Ácido elágico	1-1000	$y = 9647x + 38987$	0,9959
Epicatequina	1-1000	$y = 9780x + 17102$	0,9976
Ácido ferúlico	1-200	$y = 3455x + 22085$	0,9936
Ácido gálico	1-1000	$y = 3814x + 4250$	0,9977
Isorhamnetina	1-200	$y = 61453x + 78552$	0,9915
Kaempferol	1-200	$y = 61712x + 75935$	0,9923
Ácido neoclorogénico	1-200	$y = 10675x + 15125$	0,9989
Ácido p-cumárico	1-200	$y = 4442x + 4535$	0,9972
Procianidina B2	1-200	$y = 4014x + 7252$	0,9925
Quercetina	1-1000	$y = 45006x + 111541$	0,9922
Quercetina 3-B-D-glucósido	1-1000	$y = 13239x + 42498$	0,9836
Taxifolina	1-200	$y = 21398x + 28956$	0,9903

### 3.5 PLANIFICACIÓN DE LA EXPERIMENTACIÓN

A continuación, se detallan las distintas etapas experimentales que se llevaron a cabo en este trabajo con los materiales y métodos previamente descritos.

#### 3.5.1 Estudio preliminar de las condiciones de extracción

En primer lugar, se realizó un estudio preliminar de las condiciones de extracción de cada uno de los materiales analizados que se detalla a continuación.

##### 3.5.1.1 Residuos del procesado de la castaña: erizo de castaña

Se realizó un estudio preliminar de las condiciones de extracción para analizar el efecto del disolvente empleado en el rendimiento y propiedades de los extractos de erizo de castaña. Las extracciones se llevaron a cabo con acetona (99,5% p/p), etanol (96%, v/v) y metanol (99,5% p/p) en un extractor Soxhlet a la temperatura de ebullición del disolvente durante 15 h. También se realizaron extracciones con agua en un reactor de vidrio Pyrex a 90°C y 1 h con una relación sólido/líquido de 1/10 (g/ml).

##### 3.5.1.2 Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto

En el caso de las chapas de eucalipto, en primer lugar, se analizó la influencia del disolvente en el proceso de extracción del material sin moler (piezas recortadas previamente con unas dimensiones de 0,60 mm x 10 mm x 20 mm). Las extracciones se llevaron a cabo en un baño orbital (UNITRONIC-OR, Selecta) a 90 rpm y con una relación sólido/líquido de 1/10 (g/ml) a 50°C y 90 min utilizando como disolventes agua, metanol, etanol y disoluciones acuosas de los mismos al 50% (MeOH 50% y EtOH 50%, v/v). En una segunda etapa se analizó el efecto de la temperatura en el proceso realizando extracciones con agua, MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C y manteniendo constantes el resto de las condiciones. En una tercera etapa se analizó el efecto de la molienda de las chapas de eucalipto seleccionando como condiciones de extracción las que ofrecieron resultados más favorables en cuanto a las propiedades de los extractos obtenidos en las etapas anteriores (agua, EtOH y EtOH 50% a 50°C).

##### 3.5.1.3 Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal

El proceso de extracción del pericarpio de nuez se llevó a cabo en condiciones ligeramente diferentes al resto de materiales analizados en este trabajo al llevarse a cabo durante una estancia de investigación realizada en el Instituto Politécnico de Bragança (Portugal). Los disolventes empleados en la extracción fueron agua a temperatura de ebullición durante 45 minutos y relación sólido-líquido de 1/50 (g/ml) y metanol, etanol y disoluciones acuosas de los mismos al 50% (v/v), en este caso a temperatura ambiente poniendo en contacto 1,5 g de muestra con 25 ml de disolvente.

En el caso de las hojas de nogal, las extracciones preliminares se llevaron a cabo en un baño orbital con control de temperatura y velocidad de agitación de 90 rpm utilizando como disolvente etanol al 50% (v/v). La temperatura y el tiempo se fijaron en 50°C y 60 min, respectivamente, y en este caso, se analizó la influencia de la relación sólido/líquido en el proceso de extracción ensayando las siguientes tres relaciones: 1/5, 1/7,5 y 1/10 g/ml.

### 3.5.1.4 Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual

Para estudiar el potencial antioxidante de estos residuos forestales se llevaron a cabo extracciones con agua, etanol, metanol y disoluciones acuosas de los mismos al 50% (v/v) en un baño orbital durante 90 min a 50°C fijando la relación sólido/líquido en 1/10 g/ml.

## 3.5.2 Estudio del proceso de extracción del erizo y cáscara de castaña

En base a los resultados obtenidos en las extracciones preliminares de erizo de y cáscara de castaña (Vázquez et al., 2008), se planificaron una serie de experimentos para profundizar en el efecto de diversos factores en el proceso de extracción y en las propiedades de los extractos obtenidos que se especifican a continuación:

### 3.5.2.1 Optimización del proceso de extracción del erizo de castaña

En primer lugar, se analizó la influencia de las condiciones de extracción sobre el rendimiento y propiedades de los extractos de erizo de castaña aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). En esta metodología se aplica un diseño de experimentos con el objetivo de, en el menor número de experimentos posible, determinar las condiciones que optimizan el proceso. El diseño experimental seleccionado fue el Box-Behnken, que para tres factores supone la realización de doce experimentos además de tres réplicas en el punto central. Los tres factores estudiados fueron, la temperatura ( $x_1$ , 25-50-75°C), el tiempo ( $x_2$ , 30-75-120 min) y la concentración de disolvente ( $x_3$ , 50-70-90%, v/v). Como disolventes se ensayaron disoluciones acuosas de etanol y de metanol. En la tabla 3.5.1 se presenta la matriz de diseño.

Las variables dependientes analizadas fueron las siguientes:

- $Y_1$ : rendimiento de extracción (% , g extracto/100 g de erizo seco)
- $Y_2$ : contenido en fenoles totales (g GAE/100 g extracto)
- $Y_3$ : actividad antioxidante FRAP (nmol AAE/mg extracto)
- $Y_4$ : capacidad de inhibición del radical DPPH (mmol TRE/g extracto)
- $Y_5$ : capacidad de inhibición del radical ABTS (mmol TRE/g extracto)

Los resultados experimentales se analizaron por regresión lineal mediante el software IBM SPSS Statistics 24 aplicando el método de eliminación “*hacia atrás*” y los modelos matemáticos de superficie de respuesta se ajustaron al siguiente polinomio:

$$Y_j = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i x_i^* + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2>i}^3 a_{ij} x_i^* x_j^* + \sum_{i=1}^3 a_{ii} x_i^{*2} \quad [\text{Ecuación 3.2}]$$

donde  $Y_j$  representa la variable dependiente (o variable respuesta),  $a_0$ , es el término constante del modelo,  $a_i$  el coeficiente de los efectos principales,  $a_{ij}$  el coeficiente del efecto de interacción doble y  $a_{ii}$  el coeficiente del efecto cuadrático.

Las variables independientes  $x_i^*$  se presentan codificadas en tres niveles: bajo (-1), alto (1) y medio (0). Para la codificación se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$x_i^* = \frac{x_i - x_M}{\Delta x} \quad i = 1, 2, 3 \quad [\text{Ecuación 3.3}]$$

$$x_M = \frac{x_{LI} + x_{LS}}{2} \quad [\text{Ecuación 3.4}]$$

$$\Delta x = \frac{x_{LS} - x_{LI}}{2} \quad [\text{Ecuación 3.5}]$$

siendo  $x_i$  el valor real de la variable independiente y  $x_{LS}$ ,  $x_{LI}$  los límites superior e inferior de la variable independiente, respectivamente.

Tabla 3.5.1 Diseño experimental Box-Behnken aplicado al erizo de castaña

EXP	Variables codificadas			Variables sin codificar		
	$x_1^*$	$x_2^*$	$x_3^*$	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de disolvente (% v/v)
1	-1	-1	0	25	30	70
2	-1	0	-1	25	75	50
3	-1	0	1	25	75	90
4	-1	1	0	25	120	70
5	0	-1	-1	50	30	50
6	0	-1	1	50	30	90
7	0	1	-1	50	120	50
8	0	1	1	50	120	90
9	1	-1	0	75	30	70
10	1	0	-1	75	75	50
11	1	0	1	75	75	90
12	1	1	0	75	120	70
13	0	0	0	50	75	70
14	0	0	0	50	75	70
15	0	0	0	50	75	70

$x_1^*$ , temperatura;  $x_2^*$ , tiempo;  $x_3^*$ , concentración de disolvente

### 3.5.2.2 Estudio comparativo de extractos de erizo y cáscara de castaña

En base a los resultados obtenidos en el diseño experimental del erizo de castaña, en los que la concentración óptima de disolvente resultó ser del 50% (v/v), se realizaron extracciones de erizo y cáscara de castaña en las mismas condiciones para comparar ambos materiales y analizar el efecto de la temperatura y del disolvente en el rendimiento de extracción y propiedades de los extractos. Los disolventes utilizados fueron MeOH 50% (v/v), EtOH 50% (v/v) y agua.

Las temperaturas ensayadas fueron las utilizadas en el diseño experimental aplicado al erizo de castaña, 25, 50 y 75°C. Como tiempo de extracción se decidió mantener el correspondiente a los experimentos 2, 7 y 10 del diseño experimental (Tabla 3.5.1), que fueron los experimentos en los que, para cada temperatura ensayada, la concentración de disolvente fue del 50%. En las extracciones acuosas se decidió mantener el tiempo empleado en las extracciones preliminares. Así, las extracciones alcohólicas a 25°C y 75°C se llevaron a cabo durante 75 min, las realizadas a 50°C durante 120 min y las extracciones acuosas durante 60 min. Las extracciones se realizaron en un baño orbital con control de temperatura y la relación sólido/líquido fue de 1/10 (g/ml).

### 3.5.2.3 Extracción asistida por microondas (EAM) de erizo y cáscara de castaña

Con el objetivo de comparar la técnica de extracción convencional utilizada hasta el momento, maceración con disolventes, con tecnologías no convencionales, en esta parte del trabajo se analizó el efecto de aplicar la extracción asistida por microondas en la extracción de erizo y cáscara de castaña. Las temperaturas ensayadas fueron 50 y 75°C y los disolventes empleados MeOH 50%, EtOH 50% y agua. El tiempo se fijó en 15 minutos y la relación sólido/líquido en 1/10 (g/ml). Las condiciones de la extracción asistida por microondas fueron las especificadas en el apartado 3.3.3. A efecto comparativo, se realizaron extracciones convencionales con MeOH 50% en las mismas condiciones (50 y 75°C y 15 min).

### 3.5.2.4 Estudio de la cinética del proceso de extracción de erizo y cáscara de castaña

Para analizar la variación de las propiedades de los extractos de erizo y cáscara de castaña con el tiempo se decidió estudiar la cinética del proceso de extracción. Las propiedades analizadas fueron el contenido en fenoles totales (apartado 3.4.1) y la capacidad antioxidante FRAP (apartado 3.4.2). Las cinéticas de extracción se analizaron a tres temperaturas (25, 50 y 75°C) y las extracciones se llevaron a cabo mediante maceración con disolventes. Los disolventes empleados fueron agua y EtOH 50% y los tiempos de extracción variaron entre 5 y 150 minutos.

Debido a que las curvas de extracción (concentración de compuestos bioactivos frente al tiempo) presentaron una forma similar a las curvas de sorción-desorción (contenido en humedad frente al tiempo), para caracterizar el proceso de extracción se propuso el modelo matemático planteado por Peleg (1988), adaptado al proceso de extracción de la siguiente forma:

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad \text{[Ecuación 3.6]}$$

En esta ecuación,  $C(t)$  es la concentración/actividad antioxidante de los extractos frente al tiempo (mg GAE/g material seco y nmol AAE/mg material seco, para las curvas de contenido en fenoles totales y actividad antioxidante FRAP, respectivamente);  $t$  es el tiempo de extracción en min;  $K_1$  es la constante de Peleg (min·g material seco/mg GAE o min·g material seco/nmol AAE) y  $K_2$  es la constante de capacidad de Peleg (g material seco/mg GAE o mg material seco/nmol AAE).

La constante de Peleg,  $K_1$ , está relacionada con la tasa inicial de extracción ( $B_0$ , mg GAE/min·g material seco o nmol AAE/min·mg material seco):

$$B_0 = \frac{1}{K_1} \quad \text{[Ecuación 3.7]}$$

La constante de capacidad de Peleg,  $K_2$ , está relacionada con el contenido en fenoles totales máximo o la capacidad antioxidante FRAP máxima en el equilibrio ( $t \rightarrow \infty$ ) ( $C_e$ , mg GAE/g material seco o nmol AAE/mg material seco):

$$C_e = \frac{1}{K_2} \quad \text{[Ecuación 3.8]}$$

Los parámetros se obtienen de la representación de  $t/C(t)$  frente al tiempo, al transformar la ecuación 3.6 de la siguiente forma:

$$\frac{t}{c(t)} = K_1 + K_2 t \quad [\text{Ecuación 3.9}]$$

### 3.5.3 Optimización del proceso de extracción de las chapas de eucalipto

La optimización del proceso de extracción de chapas de eucalipto se llevó a cabo aplicando, al igual que en el caso del erizo de castaña, la Metodología de Superficie de Respuesta. En este caso las extracciones se llevaron a cabo mediante la tecnología no convencional de extracción asistida por microondas (EAM) en las condiciones descritas en el apartado 3.3.3. El disolvente de extracción fue EtOH.

Se aplicó un diseño experimental Box-Behnken, compuesto de doce experimentos y tres réplicas en el punto central para los tres factores seleccionados. En este caso los factores a estudiar fueron la temperatura de extracción ( $x_1$ , 50-60-70°C), la relación líquido/sólido ( $x_2$ , 5/1-7,5/1-10/1 ml/g) y el tiempo ( $x_3$ , 5-10-15 min). La matriz de diseño se presenta en la Tabla 3.5.2.

Las variables dependientes analizadas fueron:

- $Y_1$ : rendimiento de extracción (% , g extracto/100 g de chapa seca)
- $Y_2$ : contenido en fenoles totales (g GAE/100 g extracto)
- $Y_3$ : actividad antioxidante FRAP (nmol AAE/mg extracto)

Los resultados experimentales se ajustaron al polinomio correspondiente a la ecuación 3.2 tal y como se describe en el apartado 3.5.2.1.

Tabla 3.5.2 Diseño experimental Box-Behnken aplicado a las chapas de eucalipto

EXP	Variables codificadas			Variables sin codificar		
	$x_1^*$	$x_2^*$	$x_3^*$	Temperatura (°C)	Relación líquido/sólido (ml/g)	Tiempo (min)
1	-1	-1	0	50	5/1	10
2	-1	0	-1	50	7,5/1	5
3	-1	0	1	50	7,5/1	15
4	-1	1	0	50	10/1	10
5	0	-1	-1	60	5/1	5
6	0	-1	1	60	5/1	15
7	0	1	-1	60	10/1	5
8	0	1	1	60	10/1	15
9	1	-1	0	70	5/1	10
10	1	0	-1	70	7,5/1	5
11	1	0	1	70	7,5/1	15
12	1	1	0	70	10/1	10
13	0	0	0	60	7,5/1	10
14	0	0	0	60	7,5/1	10
15	0	0	0	60	7,5/1	10

$x_1^*$ , temperatura;  $x_2^*$ , relación líquido/sólido;  $x_3^*$ , tiempo

### 3.5.4 Optimización del proceso de extracción de hojas de nogal

Para la optimización del proceso de extracción de las hojas de nogal, una vez determinada la relación sólido/líquido óptima de 1/10 g/ml, se aplicó de nuevo un diseño experimental Box-Behnken compuesto, en este caso, por doce experimentos replicados para las tres variables independientes seleccionadas, junto con dos réplicas en el punto central (Tabla 3.5.3). Las variables independientes analizadas fueron la temperatura ( $x_1$ , 25-50-75°C), el tiempo ( $x_2$ , 30-75-120 min) y la concentración de etanol ( $x_3$ , 10-50-90%, v/v) y se estudió su efecto sobre las siguientes variables dependientes:

- $Y_1$ : rendimiento de extracción (% g extracto/100 g de hoja seca)
- $Y_2$ : contenido en fenoles totales (g GAE/100 g extracto)
- $Y_3$ : actividad antioxidante FRAP (nmol AAE/mg extracto)
- $Y_4$ : capacidad de inhibición del radical DPPH (mmol TRE/g extracto)
- $Y_5$ : capacidad de inhibición del radical ABTS (mmol TRE/g extracto)

Los resultados experimentales se ajustaron al polinomio correspondiente a la ecuación 3.2 tal y como se describe en el apartado 3.5.2.1.

Tabla 3.5.3 Diseño experimental Box-Behnken aplicado a las hojas de nogal

EXP	Variables codificadas			Variables sin codificar		
	$x_1^*$	$x_2^*$	$x_3^*$	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de disolvente (% v/v)
1	-1	-1	0	25	30	50
2	-1	0	-1	25	75	10
3	-1	0	1	25	75	90
4	-1	1	0	25	120	50
5	0	-1	-1	50	30	10
6	0	-1	1	50	30	90
7	0	1	-1	50	120	10
8	0	1	1	50	120	90
9	1	-1	0	75	30	50
10	1	0	-1	75	75	10
11	1	0	1	75	75	90
12	1	1	0	75	120	50
13	0	0	0	50	75	50
14	0	0	0	50	75	50

$x_1^*$ , temperatura;  $x_2^*$ , tiempo,  $x_3^*$ , concentración de disolvente

### 3.5.5 Caracterización de los extractos

Los extractos obtenidos se caracterizaron según el contenido en fenoles totales (apartado 3.4.1) y según la capacidad antioxidante FRAP (apartado 3.4.2), DPPH (apartado 3.4.3) y ABTS (apartado 3.4.4). En los extractos acuosos de erizo y de cáscara de castaña, también se determinó la capacidad de inhibición del radical óxido nítrico (apartado 3.4.5). En el caso de los extractos acuosos de erizo y cáscara de castaña, pericarpio verde de nuez y chapas de eucalipto se determinó también su capacidad antimicrobiana. El perfil fenólico de los

extractos se obtuvo de manera cualitativa mediante análisis RP-HPLC-ESI-TOF y de forma cuantitativa mediante LC-MS/MS triple cuadrupolo para los extractos con mayores propiedades antioxidantes del erizo, de la cáscara y de las chapas de eucalipto y mediante la técnica UPLC/ESI-QTOF-MS para los extractos de hoja de nogal.

### 3.5.6 Análisis estadístico

En este estudio, tanto las extracciones como los análisis de las propiedades se realizaron replicados y los resultados se expresaron indicando el valor medio y su desviación estándar.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software IBM SPSS Statistics 24 estableciendo un nivel de significación del 95%.

Para determinar si existía o no diferencia significativa entre los resultados obtenidos en distintas condiciones, se aplicó el análisis ANOVA de un factor seguido de las pruebas post hoc, el test HSD Tukey o el T3 de Dunnet, en función de si podía o no asumirse la igualdad de las varianzas.

Para el caso particular de analizar si reducir el tamaño de partícula de la chapa de eucalipto tenía o no efecto sobre el rendimiento y las propiedades de los extractos, se aplicó la prueba T para muestras independientes.

En los diseños de experimentos realizados, para determinar la validez del modelo se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) que incluye la prueba F para establecer la significancia global del modelo a un nivel de confianza del 95% y los coeficientes  $R^2$  y  $R^2_{\text{corregido}}$ . Además, para cada variable dependiente se compararon los valores experimentales y los calculados por el modelo.

En los análisis llevados a cabo para la chapa de eucalipto, el erizo y la cáscara de castaña con el objetivo de asociar las diferentes condiciones de extracción en grupos de semejanza, se aplicó un análisis de clúster de conglomerados jerárquicos, siendo el algoritmo de clasificación utilizado el método del promedio entre grupos y para los cálculos se aplicó el cuadrado de la distancia euclídea.





## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 
- Gonzalo Vázquez<sup>a</sup>, Adela Fernández-Agulló<sup>a</sup>, Cristina Gómez-Castro<sup>a</sup>; María Sonia Freire<sup>a</sup>, Gervasio Antorrena<sup>a</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2012. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. *Ind. Crop. Prod.*, 35, 126-134; Elsevier. B.V. ISSN: 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.022>
  - Adela Fernández-Agulló<sup>a</sup>, Eric Pereira<sup>b</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Patricia Valentão<sup>c</sup>, Paula.B. Andrade<sup>c</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, José Alberto Pereira<sup>b</sup>, 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind. Crop. Prod.*, 42, 126-132; Elsevier. B.V. ISSN: 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
  - Adela Fernández Agulló<sup>a</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Gervasio Antorrena<sup>a</sup>, José Alberto Pereira<sup>b</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2014. Effect of the extraction technique and operational conditions on the recovery of bioactive compounds from chestnut (*Castanea sativa*) bur and shell. *Sep. Sciencie. Technol.* 49(2), 267-277; Taylor & Francis Group, LLC, ISSN: 0149-6395, <https://doi.org/10.1080/01496395.2013.838264>
  - Adela Fernández Agulló<sup>a</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2015. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Ind. Crops. Prod.*, 64: 105-113; Elsevier. B.V. ISSN: 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.031>
  - Adela Fernández-Agulló<sup>a</sup>, Aída Castro<sup>b</sup>, María Sonia Freire<sup>a</sup>, Julia González-Álvarez<sup>a</sup>, 2019. Optimization of the extraction of bioactive compounds from walnut (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*) leaves: antioxidant capacity and phenolic profile. *Antioxidants*, 9, 18; MDPI eISSN: 2076-3921, <https://doi.org/10.3390/antiox9010018>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Química, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, España

<sup>b</sup> Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolonia, Apartado 1172, 5301-855, Bragança, Portugal

<sup>c</sup> REQUIMTE/Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade de Porto, Rúa Jorge Viterbo Ferreira, 2284050-313, Porto, Portugal



## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

El objetivo en la extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales es conseguir su liberación a través de la ruptura de tejidos vegetales o a través de mecanismos de difusión. Las extracciones basadas en disolventes empleando técnicas tradicionales como la maceración o la extracción Soxhlet son las más utilizadas para la recuperación de compuestos antioxidantes. El rendimiento del proceso de extracción, así como las propiedades de los extractos obtenidos, dependen tanto del tipo de disolvente a emplear como del tiempo, de la temperatura y de la relación sólido/líquido seleccionados, así como de las propias características fisicoquímicas de las muestras. Entre los disolventes más empleados en la extracción de compuestos fenólicos de fuentes vegetales están el metanol, el etanol, la acetona y el agua (Moure et al., 2001; Dai y Mumper, 2010).

Las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos se determinaron según los métodos de contenido en fenoles totales, capacidad antioxidante FRAP y capacidad de inhibición de los radicales libres DPPH y ABTS. Los criterios seguidos para la selección de estos métodos se basaron en su amplia aplicación en la caracterización de extractos vegetales, en su sencillez de uso, así como en su rapidez, bajo coste y disponibilidad de la instrumentación necesaria para su aplicación (Takashima et al., 2012; Tan y Lim, 2014). Dado que cada método se basa en unos mecanismos de acción determinados, es necesario analizar los extractos bajo diferentes métodos para poder obtener una información más amplia de sus propiedades antioxidantes (Prior et al., 2005). Además, la diversidad de protocolos existentes dificulta la comparación entre diversos materiales analizados en bibliografía (Tan y Lim, 2014).

Para la determinación del contenido en fenoles totales se aplicó el método de Folin-Ciocalteu. Su sencillez y reproducibilidad hace que sea uno de los más utilizados para determinar el contenido en fenoles de extractos vegetales. Está basado en mecanismos de oxidación/reducción y puede considerarse como método complementario para determinar la capacidad antioxidante, al dar idea de la capacidad reductora de los extractos. Sin embargo, este método presenta algunas limitaciones ya que el reactivo puede reaccionar con otros compuestos, como azúcares, aminas alifáticas y aromáticas, ácido ascórbico o sulfitos pudiendo dar lugar a la sobrestimación del contenido en fenoles totales. A pesar de estas limitaciones, el método ofrece una estimación del contenido en fenoles totales y puede ser luego combinado con otros métodos cuantitativos basados en compuestos estándar como el análisis HPLC (Tan y Lim, 2014). El método FRAP se basa en la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  en presencia de antioxidantes y es un método rápido, sencillo, barato y robusto en comparación con otros métodos. Los métodos DPPH y ABTS se basan en la capacidad de los extractos de inhibir estos dos radicales libres. Ambos métodos son rápidos, reproducibles y sencillos de aplicar (Gülçin, 2012; Tan y Lim, 2014). Algunos factores clave a la hora de aplicar estos métodos son la

concentración del radical, el tiempo de incubación, el volumen de muestra, el tipo de muestra analizada y su manipulación, el pH en el caso del radical DPPH o el disolvente empleado (Tan y Lim, 2014).

Tal y como se explicó en el apartado 3.5.1, se realizó un estudio preliminar de las condiciones de extracción para cada uno de los materiales analizados en este trabajo. A continuación, se muestran los resultados de rendimientos de extracción y propiedades antioxidantes de cada uno de los extractos obtenidos.

#### 4.1.1 Residuos del procesamiento de la castaña: erizo de castaña

Las extracciones preliminares del erizo de la castaña (EC) se llevaron a cabo en un extractor Soxhlet empleando acetona, etanol y metanol como disolventes. Las extracciones acuosas se llevaron a cabo por maceración con el disolvente tal y como se describe en el apartado 3.5.1.1. En la tabla 4.1.1 se muestran los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción, el contenido en fenoles totales (TFC) y la actividad antioxidante de los extractos según los métodos FRAP, DPPH y ABTS.

Tabla 4.1.1 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de erizo de castaña

Extracto	Disolvente	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)	DPPH (mmol TRE/g extracto)	ABTS (mmol TRE/g extracto)
EC.Ac	Acetona	2,43±0,25 <sup>a</sup>	12,27±0,79 <sup>a</sup>	379±11 <sup>a</sup>	1,54±0,27 <sup>a</sup>	0,70±0,07 <sup>a</sup>
EC.Et	EtOH	6,54±0,38 <sup>b</sup>	27,85±0,93 <sup>b</sup>	1047±32 <sup>b</sup>	2,00±0,24 <sup>b</sup>	1,53±0,10 <sup>b</sup>
EC.Me	MeOH	11,05±0,15 <sup>c</sup>	28,91±1,21 <sup>b</sup>	2060±20 <sup>c</sup>	3,26±0,29 <sup>c</sup>	2,11±0,09 <sup>c</sup>
EC.A	Agua	21,24±0,72 <sup>d</sup>	37,64±1,74 <sup>c</sup>	2120±73 <sup>c</sup>	3,68±0,22 <sup>c</sup>	3,68±0,22 <sup>d</sup>

En cada columna, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias (p<0,05)

Un análisis similar fue realizado en un trabajo previo (Vázquez et al., 2008) para la cáscara de castaña (CC) y, a continuación, se resumen los resultados que se obtuvieron en el mismo con fin comparativo:

Tabla 4.1.2 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de cáscara de castaña (Vázquez et al., 2008).

Disolvente	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)
Acetona	0,69	-	-
EtOH	2,24	26,6	704
MeOH	2,87	32,5	475
Agua	12,2	55,8	3555

Como se puede observar, en el caso del erizo de la castaña, tal y como se encontró para la cáscara, el mayor rendimiento de extracción junto con los valores más altos del contenido en fenoles y actividad antioxidante de los extractos se obtuvieron en la extracción con agua. Los extractos metanólicos y etanólicos presentaron también alto contenido en fenoles totales y alta

capacidad antioxidante, mientras que los resultados más bajos se obtuvieron para las extracciones con acetona.

En la figura 4.1.1 se presenta el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH y ABTS, respectivamente, frente a la concentración de los extractos de erizo de castaña obtenidos. En la misma gráfica se representa también el porcentaje de inhibición del Trolox, que es el antioxidante sintético utilizado como referencia. Se observó que, aunque a valores bajos de concentración de extracto, los extractos acuosos EC.A presentaron una capacidad de inhibición del radical DPPH similar a la del Trolox, todos los extractos obtenidos resultaron inferiores a este, tanto en la capacidad de inhibición del DPPH como del ABTS. Así, en el caso del radical DPPH, la inhibición máxima alcanzada por los extractos, en torno al 80%, fue inferior a la alcanzada por el Trolox (91,48%). A partir de estas representaciones también se obtuvieron los valores  $EC_{50}$ , que es la concentración de extracto necesaria para alcanzar un 50% de inhibición del radical y que resultaron en los siguientes valores para el radical DPPH:  $EC_{50}$  de 0,123 mg/ml para los extractos de acetona; 0,091 mg/ml para los extractos de etanol; 0,062 mg/ml para los de metanol y 0,044 mg/ml para los acuosos. Para el radical ABTS los valores obtenidos fueron los siguientes:  $EC_{50}$  de 1,672 mg/ml para los extractos de acetona; 0,841 mg/ml para los extractos de etanol; 0,589 mg/ml para los de metanol y 0,337 mg/ml para los acuosos. Los valores  $EC_{50}$  de los extractos acuosos resultaron, tanto para el DPPH como para el ABTS similares a los obtenidos para el Trolox (DPPH  $EC_{50}$  = 0,042 mg/ml y ABTS  $EC_{50}$  = 0,300 mg/ml). Los valores de  $EC_{50}$  obtenidos para ambos radicales aumentaron en el mismo orden en que disminuyó la capacidad antioxidante, ya que la concentración de extracto necesaria para alcanzar un 50% de inhibición del radical es mayor cuanto menor es la capacidad antioxidante del extracto.

Al igual que en el estudio de la cáscara de la castaña (Vázquez et al., 2008), se encontró una relación entre la polaridad del disolvente y los resultados obtenidos en las extracciones de erizo de castaña. Los disolventes de mayor polaridad fueron con los que se obtuvo mayor rendimiento, así como mayor capacidad antioxidante de los extractos, quedando ordenados de la siguiente forma: EC.A > EC.Me > EC.Et > EC.Ac. Esta misma relación con la polaridad se encontró en otros estudios realizados con corteza de eucalipto (Vázquez et al., 2008), aunque no en otro tipo de materiales vegetales como la cáscara de almendra o el serrín de pino (Pinelo et al., 2004). Teniendo en cuenta el análisis estadístico (Tabla 4.1.1.), no se encontró diferencia significativa entre los resultados de contenido en fenoles totales de los extractos de erizo obtenidos con etanol y metanol, ni tampoco entre las propiedades antioxidantes según FRAP y DPPH de los extractos acuosos y los obtenidos con metanol.

Finalmente, comparando los resultados obtenidos para ambos materiales (Tablas 4.1.1 y 4.1.2), los rendimientos de extracción más elevados se obtuvieron en las extracciones con erizo. Respecto al contenido en fenoles totales, los extractos obtenidos con metanol y etanol presentaron valores similares para ambos materiales. Sin embargo, no se encontró correspondencia con su capacidad antioxidante FRAP, puesto que ésta fue considerablemente superior para los extractos de erizo en ambos disolventes. En el caso de los extractos acuosos, las propiedades antioxidantes de los de cáscara fueron superiores a los del erizo. También se compararon los resultados obtenidos para los extractos acuosos del erizo de castaña con los de otros materiales similares, obtenidos por extracción con agua a su temperatura de ebullición (Tabla 4.1.3). Se encontró que el contenido en fenoles y el valor  $EC_{50}$  del DPPH fueron inferiores a los de la cáscara interna y externa de castaña, y superiores a los de la hoja del castaño (Barreira et al., 2008). Con respecto a los extractos etanólicos del erizo, su contenido

en fenoles fue superior al de los obtenidos con extracción por ultrasonidos a temperatura ambiente por Mujic et al. (2011) y del mismo orden que los encontrados para extractos obtenidos con etanol a temperatura ambiente por Silva et al. (2020).

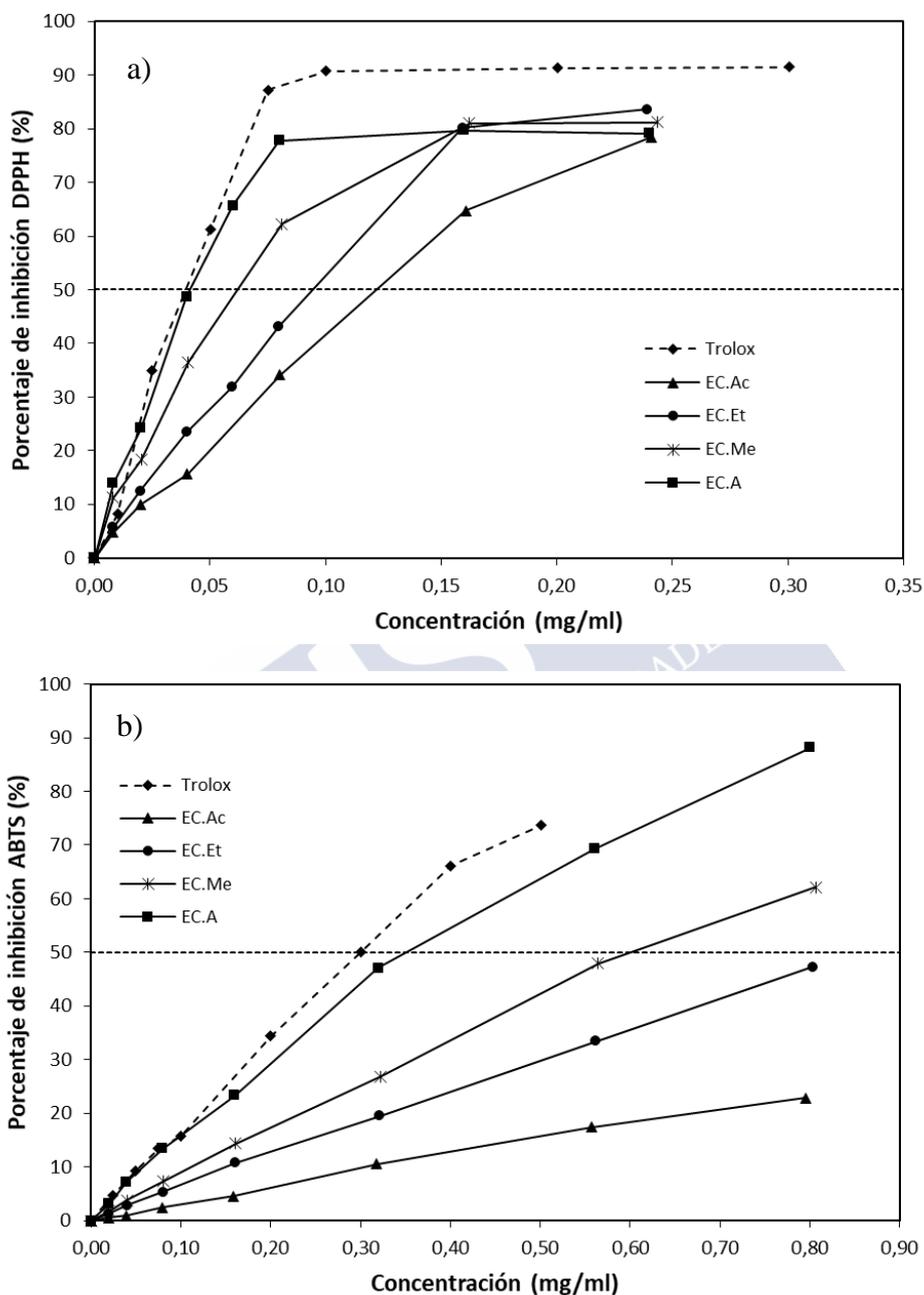


Figura 4.1.1 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de los extractos de erizo de castaña comparados con los del compuesto de referencia Trolox

Tabla 4.1.3 Propiedades antioxidantes de extractos de distintos materiales

Material	Condiciones de extracción	TFC (g GAE/100 g extracto)	Actividad antioxidante	Fuente
Cáscara interna de castaña	Agua- T <sup>a</sup> ebullición	52,0	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,040 mg/ml	Barreira et al., 2008
Cáscara externa de castaña		47,5	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,033 mg/ml	
Hojas de castaño		10,3	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,170 mg/ml	
Erizo de castaña	EtOH 50%-T <sup>a</sup> ambiente (ultrasonidos)	0,49	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,014 mg/ml	Mujić et al., 2011
Erizo de castaña	EtOH-T <sup>a</sup> ambiente	-	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,09 mg/ml	Silva et al., 2020
Cáscara interna de castaña		-	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,06 mg/ml	
Cáscara externa de castaña		-	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,12 mg/ml	
Corteza de eucalipto	Agua-90°C	18,09	FRAP: 912 nmol AAE/mg extracto	Vázquez et al., 2008
	MeOH- T <sup>a</sup> ebullición	20,1	FRAP: 2199 nmol AAE/mg extracto	
	EtOH- T <sup>a</sup> ebullición	22,3	FRAP: 2146 nmol AAE/mg extracto	
Astillas de madera de eucalipto	Acetato de etilo (hidrólisis previa)	-	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,23-0,39 mg/ml	González et al., 2004
Hojas de eucalipto	EtOH 56% - 50°C	28,35	-	Gullón et al., 2017
Astillas de eucalipto	EtOH, MeOH y EtOH 75%	26,27 (EtOH); 25,10 (MeOH); 21,87 (EtOH 75%)	DPPH-EC <sub>50</sub> (mg/ml) = 0,009 (EtOH); 0,011 (MeOH); 0,017 (EtOH 75%)	Luís et al., 2014
Madera de tocón de eucalipto		46,0 (EtOH); 45,11 (MeOH); 44,46 (EtOH 75%)	DPPH-EC <sub>50</sub> (mg/ml) = 0,006 (EtOH); 0,006 (MeOH); 0,006 (EtOH 75%)	
Corteza de tocón de eucalipto		25,31 (EtOH); 23,39 (MeOH); 38,25 (EtOH 75%)	DPPH-EC <sub>50</sub> (mg/ml) = 0,011 (EtOH); 0,012 (MeOH); 0,009 (EtOH 75%)	
Biomasa forestal	MeOH 50% - 75°C	25,78	FRAP: 1542 nmol AAE/mg extracto DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,083 mg/ml ABTS-EC <sub>50</sub> = 0,698 mg/ml	Piowarska y González-Álvarez, 2012
Biomasa forestal	EtOH 30% - 75°C	30,3	FRAP: 1901 nmol AAE/mg extracto ABTS-EC <sub>50</sub> = 0,63 mg/ml	Xavier et al., 2019
Involucro de avellana	Agua y MeOH 80% -70°C	0,218 (agua) 1,301 (MeOH 80%)	-	Cabo et al., 2020

Tabla 4.1.3 (Continuación) Propiedades antioxidantes de extractos de distintos materiales

Material	Condiciones de extracción	TFC (g GAE/100 g extracto)	Actividad antioxidante	Fuente
Piel de avellana tostada	EtOH 50% - T <sup>a</sup> ambiente (ultrasonidos)	5,88	0,052	Ivanović et al., 2020
Cáscara de avellana	Acetona 61% - 50°C (ultrasonidos)	1,12	-	Yuan et al., 2018
Corteza y duramen de <i>Acacia dealbata</i>	MeOH- T <sup>a</sup> ambiente	32,14 (corteza) 3,19 (duramen)	-	Yildiz et al., 2018
Corteza de <i>Acacia seyal</i>	EtOH 80% MeOH 80% T <sup>a</sup> ambiente	30,45 (EtOH 80%) 30,93 (MeOH 80%)	-	Suleiman y Brima, 2020
Pericarpio de nuez ( <i>Mellanaise</i> )	Agua, T <sup>a</sup> ebullición	3,26	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,59 mg/ml	Oliveira et al., 2008
Hojas de nogal	Agua, T <sup>a</sup> ebullición	-	DPPH-EC <sub>50</sub> = 0,151-0,202 mg/ml	Pereira et al., 2007
Hojas de nogal	MeOH, T <sup>a</sup> ebullición	12,11	-	Akin et al., 2013

#### 4.1.2 Residuos de la industria maderera: chapas de eucalipto

Como se explicó en el apartado 3.5.1.2, las chapas de eucalipto preparadas en piezas rectangulares de 0,60 mm x 10 mm x 20 mm se extrajeron con agua, metanol, etanol y sus disoluciones acuosas al 50%, utilizando la técnica de extracción de maceración con disolventes. Posteriormente, se analizó el efecto de la temperatura en el proceso realizando extracciones a 50 y 75°C. Aunque se hicieron también pruebas a 25°C, como los rendimientos de extracción obtenidos fueron muy bajos se descartó seguir trabajando con esta temperatura. En una última etapa, se analizó también el efecto de reducir el tamaño de partícula empleando chapas de eucalipto molidas y tamizadas, con un tamaño de partícula entre 0,1 y 1 mm. En la tabla 4.1.4 se resumen los resultados obtenidos en cada condición experimental ensayada.

En primer lugar, se analizaron los resultados obtenidos para la chapa de eucalipto sin moler. Se observó que, tanto para la temperatura de 50°C como para la de 75°C, los rendimientos de extracción más elevados se obtuvieron utilizando MeOH 50% como disolvente, mientras que el disolvente con el que más bajos rendimientos se alcanzaron a ambas temperaturas fue el agua. Por otra parte, al aumentar la temperatura de 50 a 75°C se obtuvieron rendimientos más elevados para todos los disolventes empleados. Un incremento de la temperatura está relacionado, en general, con un aumento del rendimiento de extracción ya que aumenta tanto la solubilidad como el coeficiente de difusión de los compuestos fenólicos. Otras propiedades como la viscosidad y la tensión superficial de los disolventes disminuyen cuando se eleva la temperatura, lo que favorece su acceso a la muestra. Además, el calentamiento favorece la ruptura de los tejidos, facilitando el proceso de liberación de los compuestos fenólicos (Al-Farsi y Lee, 2008; Dai y Mumper, 2010; González et al., 2017; Tchabo et al., 2018).

**Tabla 4.1.4 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de chapa de eucalipto**

Chapa de Eucalipto	Condiciones de extracción	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)	DPPH (mmol TRE/g extracto)	ABTS (mmol TRE/g extracto)
Sin moler	Agua 50°C	2,47±0,20 <sup>a</sup>	73,23±3,48 <sup>ab</sup>	7308±138 <sup>a</sup>	8,30±0,30 <sup>a</sup>	4,83±0,44 <sup>abcd</sup>
	MeOH 50°C	4,70±0,08 <sup>bc</sup>	77,42±1,63 <sup>ab</sup>	7017±195 <sup>ab</sup>	8,10±0,38 <sup>a</sup>	4,16±0,78 <sup>abcd</sup>
	EtOH 50°C	2,87±0,54 <sup>ab</sup>	85,71±2,20 <sup>f</sup>	7787±104 <sup>e</sup>	9,67±0,06 <sup>b</sup>	5,94±0,23 <sup>b</sup>
	MeOH 50% 50°C	5,82±0,37 <sup>cde</sup>	67,61±1,67 <sup>bd</sup>	6538±189 <sup>c</sup>	7,92±0,25 <sup>ac</sup>	5,23±0,14 <sup>a</sup>
	EtOH 50% 50°C	5,78±0,20 <sup>e</sup>	70,23±1,28 <sup>bd</sup>	6695±169 <sup>bc</sup>	7,85±0,09 <sup>ac</sup>	5,13±0,21 <sup>ac</sup>
	Agua 75°C	4,08±0,14 <sup>bd</sup>	64,95±2,24 <sup>de</sup>	5837±169 <sup>d</sup>	7,40±0,31 <sup>cd</sup>	5,46±0,18 <sup>ab</sup>
	MeOH 50% 75°C	7,83±0,29 <sup>f</sup>	64,23±0,68 <sup>ce</sup>	5629±242 <sup>d</sup>	7,39±0,23 <sup>cd</sup>	4,74±0,19 <sup>c</sup>
	EtOH 50% 75°C	7,26±0,21 <sup>cef</sup>	65,28±2,14 <sup>cd</sup>	5635±421 <sup>d</sup>	6,98±0,25 <sup>d</sup>	4,32±0,05 <sup>d</sup>
Molida	Agua 50°C	3,84±0,29 (DS)	68,39±3,62 (DS)	6470±187 (DS)	8,54±0,31 (NDS)	5,79±0,22 (DS)
	EtOH 50°C	4,35±0,1 (DS)	78,96±6,94 (DS)	6707±301 (DS)	8,47±0,31 (DS)	5,63±0,18 (NDS)
	EtOH 50% 50°C	7,89±0,12 (DS)	70,93±2,55 (NDS)	6031±242 (DS)	8,17±0,23 (DS)	5,76±0,20 (DS)

En cada columna, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias ( $p < 0,05$ )

Para las mismas condiciones de extracción, los códigos DS y NDS indican si existe o no diferencia significativa entre las medias para la chapa sin moler y molida ( $p < 0,05$ )

Sin embargo, la temperatura tiene que estar limitada debido a que muchos compuestos fenólicos presentan inestabilidad térmica pudiendo degradarse a altas temperaturas (Osorio-Tobón, 2020). Esto es lo que parece ocurrir en el caso concreto de la chapa de eucalipto sin moler, en donde tanto los fenoles totales como la capacidad antioxidante de los extractos disminuyó al aumentar la temperatura, a excepción de la capacidad antioxidante ABTS de los extractos obtenidos con agua. Los extractos que presentaron una mayor capacidad antioxidante fueron los obtenidos con EtOH a 50°C y, desde el punto de vista estadístico, estos valores resultaron significativamente diferentes al resto de condiciones. Los valores más bajos fueron, en general, los de los extractos obtenidos con MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C. El comportamiento de la capacidad de inhibición del radical ABTS se diferenció de la tendencia general al ser el valor más bajo el obtenido con MeOH a 50°C. A 75°C, se obtuvieron extractos con propiedades antioxidantes muy similares, independientemente del disolvente empleado.

Para analizar el efecto del tamaño de partícula sobre el proceso de extracción se realizaron extracciones a 50°C, que, como se mencionó anteriormente, resultó ser la más favorable respecto a las propiedades antioxidantes de los extractos. Como disolventes se seleccionaron EtOH, para el que se obtuvieron los extractos con las mejores propiedades antioxidantes, así como agua y EtOH 50% a efectos comparativos. Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla 4.1.4. Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos con la chapa molida y sin moler en las mismas condiciones de extracción a través de un análisis estadístico de existencia de diferencia significativa entre las medias. Respecto al rendimiento de extracción,

para todos los disolventes ensayados los resultados obtenidos con la chapa de eucalipto molida fueron significativamente superiores a los obtenidos para la chapa sin moler. Varios autores han recogido que la reducción del tamaño de partícula favorece el proceso de extracción de compuestos fenólicos. Al reducir el tamaño de partícula, los compuestos fenólicos pueden ser extraídos con mayor facilidad, ya que aumenta la difusividad del soluto en el disolvente (Moure et al., 2001; Dai y Mumper, 2010).

Este aumento del rendimiento de extracción no se correspondió con un incremento en las propiedades antioxidantes de los extractos de chapa molida, resultando en muchos casos muy similar o incluso inferior a los resultados obtenidos con la chapa sin moler. Así, en el caso concreto del contenido en fenoles totales y de la capacidad antioxidante FRAP, los resultados fueron más bajos en todos los casos para la chapa molida, o iguales, desde el punto de vista estadístico, para el contenido en fenoles totales de los extractos obtenidos con EtOH 50%. Respecto a la capacidad de atrapamiento de los radicales DPPH y ABTS, este comportamiento también se mantuvo en el caso de los extractos obtenidos con EtOH. Para los extractos obtenidos con agua y EtOH 50%, los resultados fueron ligeramente superiores al moler la chapa, siendo iguales desde el punto de vista estadístico los resultados de capacidad antioxidante DPPH de los extractos acuosos molidos y sin moler. Esto puede ser debido a que al permanecer los compuestos extraídos más tiempo expuestos a la temperatura del proceso que en el caso del material sin moler, se produjo una degradación de estos, resultando disminuida su capacidad antioxidante (Dai y Mumper, 2010; Tchabo et al., 2018).

En la figura 4.1.2 se muestra la capacidad de inhibición de los radicales DPPH y ABTS de los extractos de chapa de eucalipto sin moler con la mayor y menor actividad antioxidante, EtOH a 50°C y EtOH 50% a 75°C, respectivamente, junto con los extractos etanólicos que presentaron la mayor capacidad antioxidante obtenidos con EtOH a 50°C empleando la chapa molida. Se presenta también la capacidad antioxidante del compuesto de referencia Trolox, observando que, para ambos radicales, los extractos de chapa de eucalipto presentaron una capacidad superior a la de este antioxidante sintético. Asimismo, la inhibición máxima alcanzada por los extractos (entre 89,26% y 90,13% para el radical DPPH y entre 90,35% y 93,90% para el radical ABTS) es del mismo orden que la alcanzada por el Trolox para el DPPH (91,48%) y superior a la alcanzada por el ABTS (73,71%). Se encontró además que el porcentaje de inhibición de ambos radicales resultó dependiente de la concentración de extracto. Así, el menor valor de  $EC_{50}$  se obtuvo con los extractos de mayor capacidad antioxidante (EtOH a 50°C sin moler), siendo de 0,016 mg/ml para el método DPPH y 0,146 mg/ml para el ABTS.

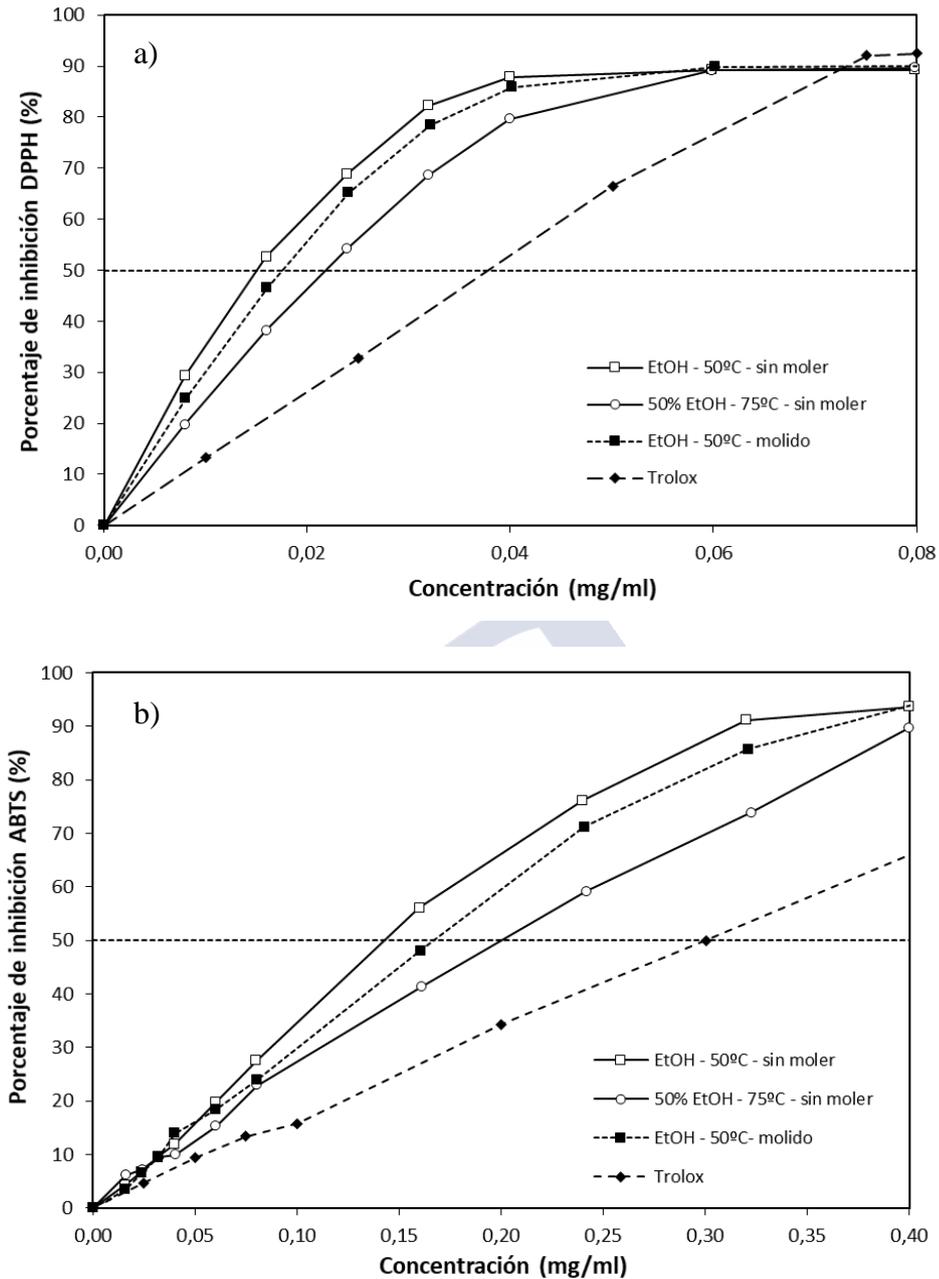


Figura 4.1.2 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos de chapa de eucalipto sin moler y molido, comparados con los del compuesto de referencia Trolox

Comparando con otros materiales derivados del eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Tabla 4.1.3), los resultados obtenidos para la chapa de eucalipto fueron superiores a los obtenidos para la corteza de eucalipto (Vázquez et al., 2008), a las astillas de madera de eucalipto extraídas con acetato de etilo tras una hidrólisis previa (González et al., 2004) y a las hojas de eucalipto (Gullón et al., 2017). Respecto a los resultados obtenidos por Luís et al. (2014) para extractos metanólicos y etanólicos de astillas, madera de tocón y corteza de tocón, aunque el valor del contenido en fenoles totales fue mayor en los extractos de chapa, los valores de EC<sub>50</sub> para el DPPH fueron más altos y, por tanto, su capacidad antioxidante resultó inferior.

En base a los resultados obtenidos para la chapa de eucalipto y teniendo en cuenta que la reducción de tamaño no conllevó una mejora significativa de las propiedades antioxidantes de los extractos, se decidió continuar el estudio de la chapa utilizando el material sin moler.

Para los extractos utilizando el material sin moler, el análisis estadístico para determinar si existen o no diferencias significativas entre los resultados obtenidos en las distintas condiciones resultó complejo de interpretar. Por ello, para facilitar la interpretación de los resultados se decidió aplicar un análisis de clústers.

El análisis de clústers, también conocido como análisis de conglomerados, busca las similitudes existentes entre un grupo de variables, clasificándolas en grupos homogéneos en los cuales las variables de cada grupo son lo más parecidas entre sí y diferentes a las del resto de grupos. Para realizar el análisis es necesario establecer un criterio de similitud, en este caso el criterio de asignación elegido fue la similitud entre las propiedades de los extractos (contenido en fenoles totales y propiedades antioxidantes FRAP, DPPH y ABTS). Para los cálculos se aplicó el cuadrado de la distancia euclídea y el algoritmo de clasificación seleccionado fue el método del promedio entre grupos. Una vez formados, los conglomerados se representaron como dendogramas, donde en el eje de abscisas se muestran los casos analizados y en el de ordenadas, los diferentes niveles de similitud entre los que se van agrupando los casos (Rodríguez-Jaume y Mora, 2001). Para interpretar los dendogramas, la lectura se realiza de izquierda a derecha. Las líneas verticales de su interior indican el punto de unión entre los distintos casos, la cual puede relacionarse con el eje de ordenadas, en donde se indica la distancia a la que tiene lugar la unión entre grupos. De esta forma, cuanto mayor sea esta, más diferencia existirá entre los grupos y serán más heterogéneos. Por el contrario, distancias más pequeñas indican conglomerados más homogéneos. De este modo, en función de la distancia a la que se detenga el proceso, habrá mayor o menor número de conglomerados. Para tomar esta decisión, un criterio válido es establecer el punto de corte cuando el salto en las distancias a las que se produce la fusión de los clústers ocurre de forma brusca (De la Fuente, 2011).

La figura 4.1.3 muestra el dendograma obtenido tras aplicar el análisis de clústers a las propiedades antioxidantes de los extractos de la chapa de eucalipto sin moler. Se observa que a la distancia de 1 se forma un único clúster integrado por los extractos obtenidos con disoluciones al 50% de MeOH y EtOH a 50°C. A una distancia de aproximadamente 3 se forma otro clúster formado por los extractos obtenidos con estos mismos disolventes, pero a la temperatura de 75°C. A la distancia de 6, al clúster formado por los extractos obtenidos con MeOH 50% y EtOH 50% a 50°C se unen los obtenidos con agua y a la distancia de 10 se unen los obtenidos con MeOH a la misma temperatura. Los extractos obtenidos con agua a 75°C se unen al clúster de extractos a 75°C a una distancia de 8. Se decidió considerar la distancia de corte en aproximadamente 11, por lo que el dendograma final estaría compuesto por tres clústers: un primer clúster formado por los extractos obtenidos a 50°C con MeOH 50%, EtOH 50% y agua; un segundo clúster formado por los extractos obtenidos a 75°C, que se corresponden con los que presentaron más bajas propiedades antioxidantes y un último clúster formado únicamente con los extractos obtenidos con EtOH a 50°C, que, como se ha visto anteriormente, fueron los de mayor contenido en fenoles totales y mayor capacidad antioxidante según los métodos aplicados.

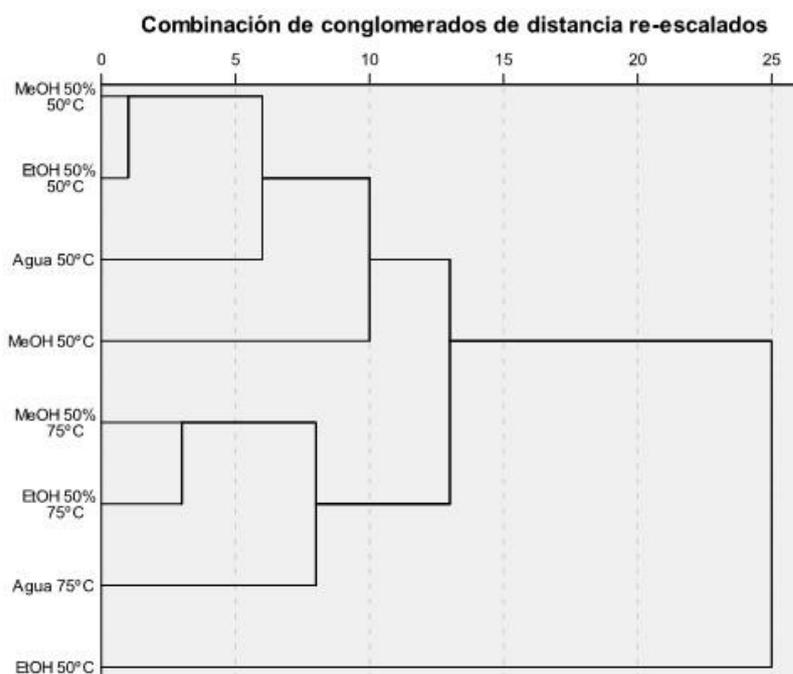


Figura 4.1.3 Dendrograma correspondiente a las propiedades antioxidantes de los extractos de chapa de eucalipto sin moler

#### 4.1.3 Residuos del nogal: pericarpio de la nuez y hoja de nogal

Los extractos del pericarpio de la nuez se obtuvieron mediante maceración con disolventes (Apartado 3.5.1.4). Las extracciones se llevaron a cabo con agua a temperatura de ebullición y con EtOH, MeOH, EtOH 50% y MeOH 50% a temperatura ambiente. En la tabla 4.1.6 se recogen los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción, el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos, determinada en este caso concreto en base al poder reductor y capacidad de atrapamiento del radical DPPH, como se explicó en el apartado 3.4.

Tabla 4.1.6 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de pericarpio de nuez

Pericarpio de nuez	Disolvente	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	Poder reductor EC <sub>50</sub> (mg/ml)	DPPH	
					mmol TRE/g extracto	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
T <sup>a</sup> ebullición 1/50 g/ml	Agua	44,11±1,11 <sup>a</sup>	4,04±0,19 <sup>a</sup>	2,16±0,06 <sup>a</sup>	0,22±0,01 <sup>a</sup>	0,72±0,02 <sup>a</sup>
T <sup>a</sup> ambiente 1,5/25 g/ml	EtOH	3,90±0,86 <sup>b</sup>	5,19±0,56 <sup>ab</sup>	1,68±0,18 <sup>ab</sup>	0,33±0,03 <sup>b</sup>	0,49±0,17 <sup>b</sup>
	MeOH	11,26±1,06 <sup>c</sup>	6,58±0,23 <sup>b</sup>	1,65±0,06 <sup>b</sup>	0,41±0,01 <sup>c</sup>	0,38±0,01 <sup>bc</sup>
	EtOH 50%	20,21±1,03 <sup>d</sup>	8,49±0,24 <sup>c</sup>	0,95±0,02 <sup>c</sup>	0,53±0,04 <sup>d</sup>	0,33±0,02 <sup>d</sup>
	MeOH 50%	17,66±2,25 <sup>d</sup>	8,15±0,25 <sup>c</sup>	1,14±0,14 <sup>c</sup>	0,46±0,03 <sup>cd</sup>	0,34±0,02 <sup>cd</sup>

En cada columna, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias (p<0,05)

El rendimiento de extracción del pericarpio de nuez resultó significativamente dependiente del disolvente y de las condiciones de extracción. El valor más bajo se obtuvo con EtOH (extracción a temperatura ambiente) y el más alto con agua, que resultó ser once veces superior al rendimiento obtenido empleando etanol. Al igual que en el análisis del erizo de la castaña, se encontró una dependencia del rendimiento de extracción con la polaridad del disolvente, aumentando el rendimiento a medida que aumentó la polaridad (EtOH < MeOH < agua). Además del disolvente, la mayor temperatura empleada en el caso del agua (temperatura de ebullición frente a temperatura ambiente) y una menor relación sólido/líquido (1/50 g/ml frente a 1,5/25 g/ml) pudieron estar relacionadas con los rendimientos obtenidos. De este modo, al aumentar la temperatura de extracción, al igual que ocurrió para la chapa de eucalipto, se favoreció el proceso de extracción (Al-Farsi y Lee, 2008; Dai y Mumper, 2010; González et al., 2017; Tchabo et al., 2018). Respecto a la relación sólido/líquido, el rendimiento fue mayor a menor relación sólido/líquido (1/50 g/ml). Cuanto mayor es la relación sólido/líquido, mayor es la cantidad de sólido que está en contacto con el mismo volumen de disolvente pudiéndose producir su saturación (González et al., 2017). Por el contrario, al disminuir la relación sólido/líquido se favorece el proceso de transferencia de materia al aumentar la fuerza impulsora, que promueve que los antioxidantes pasen del material al seno del disolvente (Tchabo et al., 2018).

Respecto al contenido en fenoles totales, los valores más altos se obtuvieron con EtOH 50% y los más bajos con agua. Los extractos obtenidos con MeOH 50% presentaron un contenido en fenoles totales ligeramente inferior a los obtenidos con EtOH 50%, aunque iguales desde el punto de vista estadístico. Otros autores también han encontrado que la recuperación de compuestos fenólicos de muestras vegetales se ve favorecida por el empleo de disoluciones de alcoholes frente a sistemas de un solo componente (Spigno et al., 2007; Chew et al., 2011).

El poder reductor del pericarpio de nuez se determinó, como se indicó en la parte de Materiales y Métodos (apartado 3.4.2.1), mediante un método alternativo al método FRAP. A diferencia de éste, en donde el poder reductor se expresó como equivalente de ácido ascórbico, en este caso se expresó a través del valor de EC<sub>50</sub>, que indica la concentración de extracto a la que la absorbancia tomó el valor de 0,5. Se considera que valores bajos del EC<sub>50</sub> están relacionados con un poder reductor elevado de la muestra (Berker et al., 2007). En la figura 4.1.4 se muestra la evolución del poder reductor de los diferentes extractos en función de la concentración de estos. En base a los resultados que se presentan en la figura 4.1.4 y en la tabla 4.1.6, los extractos con mayor poder reductor fueron los obtenidos con EtOH 50%. No obstante, estos valores resultaron, desde el punto de vista estadístico, equivalentes a los obtenidos con MeOH 50%. Tampoco se encontró diferencia significativa entre el poder reductor de los extractos obtenidos con EtOH y MeOH. Los extractos acuosos, al igual que con el contenido en fenoles totales, son los que presentaron menor poder reductor.

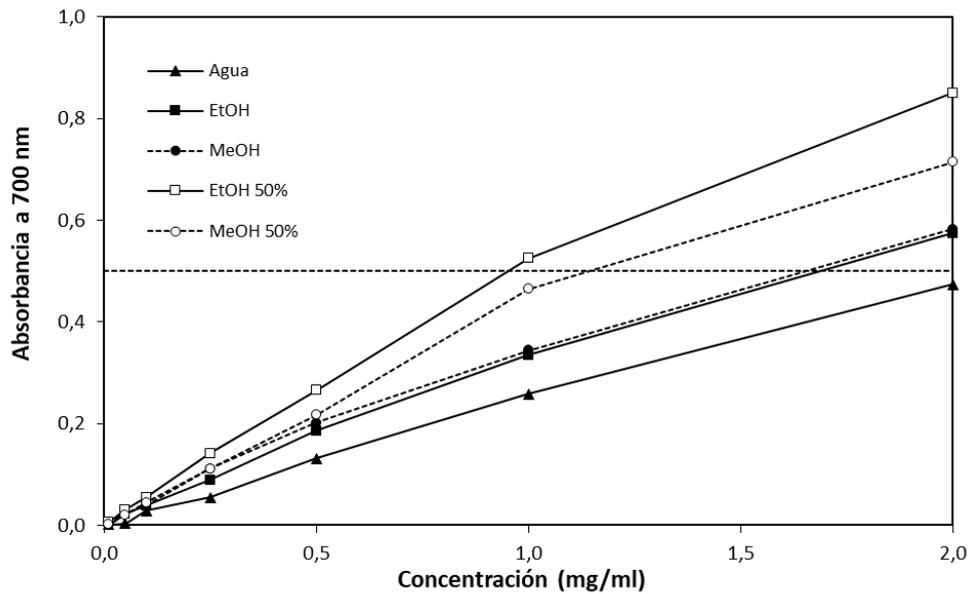


Figura 4.1.4 Poder reductor de los extractos de pericarpio de la nuez

Respecto a la capacidad de atrapamiento del radical DPPH (Figura 4.1.5), de nuevo los valores más elevados se obtuvieron con las disoluciones de etanol y metanol al 50% y los más bajos con agua. Tal y como se observa en la figura, la capacidad de inhibición del radical fue dependiente de la concentración de extracto tendiendo a un valor de inhibición máxima de entre el 82% y el 90% para concentraciones de extracto superiores a 1 mg/ml. Este valor del porcentaje de inhibición fue similar al alcanzado por el Trolox, sin embargo, se puede observar que la concentración a la que este lo alcanza ( $EC_{50} = 0,042$  mg/ml) fue mucho más baja que las obtenidas con los extractos de pericarpio de nuez, presentando estos una capacidad antioxidante DPPH inferior a la del compuesto empleado como referencia.

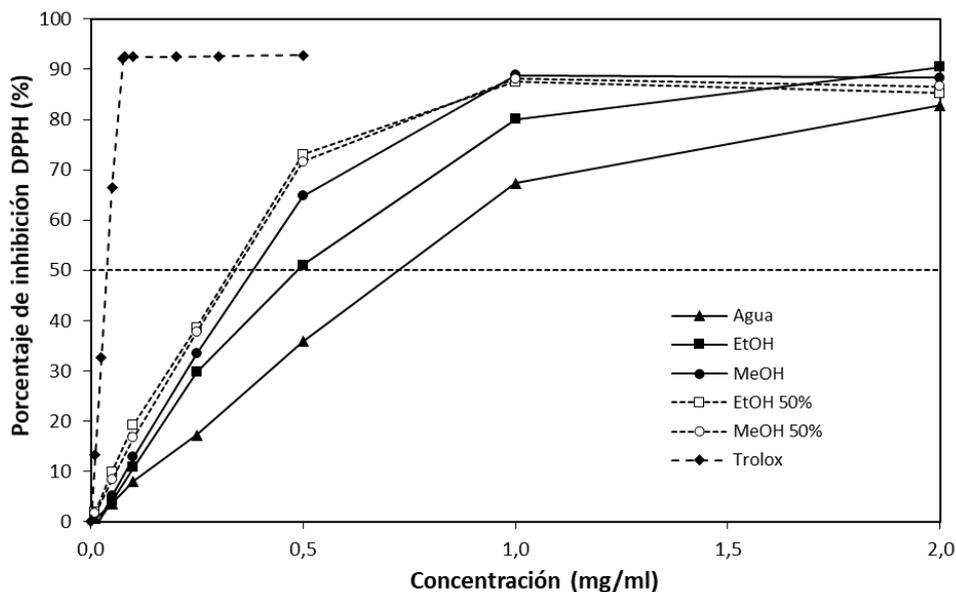


Figura 4.1.5 Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos de pericarpio de nuez comparados con los del compuesto de referencia Trolox

Comparando los resultados con los obtenidos por Oliveira et al. (2008) para la misma variedad de cultivo (*Mellanaise*) (Tabla 4.1.3), los extractos acuosos obtenidos en este trabajo presentaron una capacidad antioxidante inferior, aunque los extractos etanólicos y metanólicos resultaron superiores.

Por otra parte, respecto al otro residuo del nogal analizado, en un trabajo previo se habían utilizado las hojas de nogal para la obtención de aceites esenciales mediante un proceso de hidrodestilación, en el cual además de obtener el aceite esencial, se produjo la extracción acuosa de otros compuestos, por estar la hoja fresca de nogal en contacto con agua a su temperatura de ebullición. Los extractos acuosos obtenidos, después de eliminar el agua por secado por pulverización, fueron analizados según sus propiedades antioxidantes resultando un contenido en fenoles totales de 26,70 g GAE/100 g extracto y actividad antioxidante FRAP de 26,70 nmol AAE/mg extracto. Estos resultados confirmaron el alto potencial antioxidante de las hojas de nogal, por lo que se decidió continuar el estudio del proceso de extracción, utilizando la técnica convencional de maceración con disolvente. Así, en este estudio preliminar se analizó la influencia de la relación sólido/líquido en el proceso, seleccionando como disolvente EtOH 50%, temperatura de 50°C y tiempo de una hora. En la tabla 4.1.7 se muestran los resultados obtenidos para las tres relaciones sólido/líquido ensayadas.

Tabla 4.1.7 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de hoja de nogal

Relación sólido/líquido (g/ml)	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)
1/5	25,82 ± 0,25 <sup>a</sup>	23,67 ± 0,68 <sup>a</sup>	1246 ± 48 <sup>a</sup>
1/7,5	27,04 ± 0,42 <sup>b</sup>	24,91 ± 0,41 <sup>b</sup>	1350 ± 53 <sup>b</sup>
1/10	27,86 ± 0,04 <sup>b</sup>	25,28 ± 0,80 <sup>b</sup>	1512 ± 61 <sup>c</sup>

En cada columna, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias (p<0,05)

Se observó que, al igual que para el pericarpio de nuez, a medida que la relación sólido/líquido disminuyó de 1/5 a 1/10 g/ml, aumentó el rendimiento de extracción obtenido. Al disminuir la relación sólido/líquido se favorece el paso de los compuestos bioactivos de la hoja de nogal hacia el disolvente (Tchabo et al., 2018) y se evita la saturación del mismo (González et al., 2017).

En cuanto al contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante FRAP de los extractos se observó el mismo comportamiento, ambos aumentaron a medida que disminuyó la relación sólido/líquido empleada. En el caso del rendimiento y el contenido en fenoles totales, no se encontró diferencia significativa entre las extracciones realizadas a 1/7,5 y a 1/10 mg/ml. Se decidió seleccionar la relación sólido/líquido de 1/10 mg/ml para continuar la experimentación con la hoja de nogal, al ser la que proporcionó una mayor capacidad antioxidante de los extractos. Además, las relaciones sólido/líquido superiores dificultaban la correcta agitación del material con el disolvente afectando al proceso. Se descartó realizar pruebas a menores relaciones sólido/líquido por consideraciones económicas y ambientales (Tchabo et al., 2018). Los resultados obtenidos fueron superiores a los obtenidos para el pericarpio de nuez (Tabla 4.1.6) y a los obtenidos para hojas de *Juglans regia* L. extraídas con MeOH (Akin et al., 2013) y del orden de los obtenidos por Gullón et al. (2017) para hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Tabla 4.1.3).

#### 4.1.4 Otros materiales y residuos forestales: involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual

En este caso se analizó el potencial antioxidante de estos tres subproductos forestales utilizando como método de extracción, la maceración con disolventes a 50°C (Apartado 3.5.1.4). Los disolventes seleccionados fueron agua, MeOH, EtOH y sus disoluciones acuosas al 50%. Los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante se muestran en la tabla 4.1.8.

**Tabla 4.1.8** Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de involucro de avellana, madera de acacia y biomasa residual

Extracto	Disolvente	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)	DPPH (mmol TRE/g extracto)	ABTS (mmol TRE/g extracto)
Involucro de avellana	Agua	30,06±0,92 <sup>bc</sup>	5,52±0,44 <sup>a</sup>	537±23 <sup>a</sup>	0,47±0,03 <sup>a</sup>	0,68±0,03 <sup>a</sup>
	EtOH	25,15±0,73 <sup>a</sup>	11,27±0,17 <sup>b</sup>	801±18 <sup>b</sup>	0,75±0,01 <sup>b</sup>	1,15±0,04 <sup>c</sup>
	MeOH	28,29±0,31 <sup>b</sup>	12,03±0,22 <sup>c</sup>	826±23 <sup>b</sup>	0,83±0,01 <sup>c</sup>	1,39±0,08 <sup>d</sup>
	EtOH 50%	32,41 ±1,02 <sup>c</sup>	13,43±0,20 <sup>d</sup>	961±12 <sup>c</sup>	1,05±0,01 <sup>d</sup>	1,70±0,01 <sup>b</sup>
	MeOH 50%	31,02±0,06 <sup>bc</sup>	12,29±0,88 <sup>bcd</sup>	881±53 <sup>b</sup>	0,97±0,01 <sup>e</sup>	1,54±0,01 <sup>db</sup>
Madera de acacia	Agua	8,85±0,66 <sup>a</sup>	8,91±0,45 <sup>a</sup>	659±17 <sup>a</sup>	0,47±0,01 <sup>a</sup>	1,12±0,09 <sup>a</sup>
	EtOH	11,02±0,41 <sup>ab</sup>	27,86±0,72 <sup>b</sup>	1889±17 <sup>b</sup>	1,67±0,01 <sup>c</sup>	3,02±0,08 <sup>b</sup>
	MeOH	12,23±1,96 <sup>ab</sup>	25,31±0,49 <sup>c</sup>	1733±18 <sup>c</sup>	1,40±0,04 <sup>b</sup>	2,71±0,04 <sup>c</sup>
	EtOH 50%	16,33±0,57 <sup>c</sup>	25,69±1,62 <sup>bc</sup>	1488±63 <sup>d</sup>	1,47±0,02 <sup>b</sup>	2,73±0,05 <sup>c</sup>
	MeOH 50%	14,92±0,38 <sup>b</sup>	24,04±0,82 <sup>c</sup>	1408±19 <sup>d</sup>	1,42±0,00 <sup>b</sup>	2,56±0,01 <sup>c</sup>
Biomasa residual	Agua	7,36±0,03 <sup>a</sup>	19,27±0,39 <sup>a</sup>	978±19 <sup>a</sup>	1,36±0,01 <sup>a</sup>	2,32±0,12 <sup>a</sup>
	EtOH	10,23±0,07 <sup>b</sup>	13,14±0,56 <sup>b</sup>	579±45 <sup>b</sup>	0,68±0,05 <sup>b</sup>	1,19±0,09 <sup>b</sup>
	MeOH	11,88±1,06 <sup>b</sup>	17,50±0,50 <sup>c</sup>	891±11 <sup>c</sup>	1,17±0,03 <sup>a</sup>	1,95±0,11 <sup>c</sup>
	EtOH 50%	11,82±0,89 <sup>b</sup>	21,82±0,22 <sup>d</sup>	1198±28 <sup>d</sup>	1,96±0,11 <sup>c</sup>	2,53±0,04 <sup>d</sup>
	MeOH 50%	10,73±0,41 <sup>b</sup>	25,70±0,40 <sup>e</sup>	1496±10 <sup>e</sup>	2,23±0,04 <sup>d</sup>	2,96±0,06 <sup>e</sup>

En cada columna para cada material, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias (p<0,05)

En el caso del involucro de avellana y de la madera de acacia se encontró que el rendimiento de extracción fue significativamente dependiente del disolvente empleado. Para ambos materiales, los disolventes con los que se obtuvo un mayor rendimiento fueron las disoluciones acuosas de EtOH y de MeOH al 50% no encontrándose diferencia significativa entre ellos. Como se observa, el rendimiento más bajo se obtuvo con EtOH para el involucro de avellana y con agua para la madera de acacia. Para el involucro de avellana, tal y como se encontró para otros materiales como el erizo de castaña o el pericarpio de nuez, el rendimiento aumentó con la polaridad del disolvente (EtOH < MeOH < agua). Respecto a la biomasa residual, no se encontraron diferencias significativas entre los valores del rendimiento para EtOH, MeOH y sus disoluciones acuosas, pero sí con el agua, disolvente para el que se obtuvo el valor más bajo de rendimiento.

Respecto al contenido en fenoles totales y propiedades antioxidantes de los extractos, los resultados obtenidos para los tres materiales resultaron ser significativamente dependientes del

disolvente a emplear. Los extractos acuosos de involucro de avellana y de la madera de acacia presentaron los más bajos contenidos en fenoles totales y actividad antioxidante según los métodos FRAP, DPPH y ABTS. Los extractos de involucro de avellana con mayores propiedades antioxidantes se obtuvieron con EtOH 50%. No obstante, no se encontraron diferencias significativas con las propiedades de los extractos de MeOH 50%, excepto para el método DPPH. En cuanto a la madera de acacia, los extractos de mayor capacidad antioxidante se obtuvieron con EtOH. Asimismo, para este material, no se encontró diferencia significativa ni en el contenido en fenoles totales ni en la capacidad de inhibición de los radicales DPPH ni ABTS entre los extractos obtenidos con MeOH, MeOH 50% y EtOH 50%. Para los extractos de biomasa forestal, sin embargo, se observó una mayor influencia del disolvente sobre las propiedades antioxidantes. Los valores más bajos se obtuvieron con EtOH y los más altos con MeOH 50%. Las propiedades antioxidantes aumentaron en el siguiente orden: EtOH < MeOH < agua < EtOH 50% < MeOH 50%.

Como ya se encontró para el pericarpio de nuez, en el caso del involucro de avellana y de la biomasa residual, la recuperación de compuestos fenólicos se vio favorecida por el empleo de disoluciones acuosas de MeOH y EtOH frente al disolvente puro (Spigno et al., 2007; Chew et al., 2011). Sin embargo, este comportamiento no se encontró en otros materiales estudiados en este trabajo como la chapa de eucalipto o la madera de acacia.

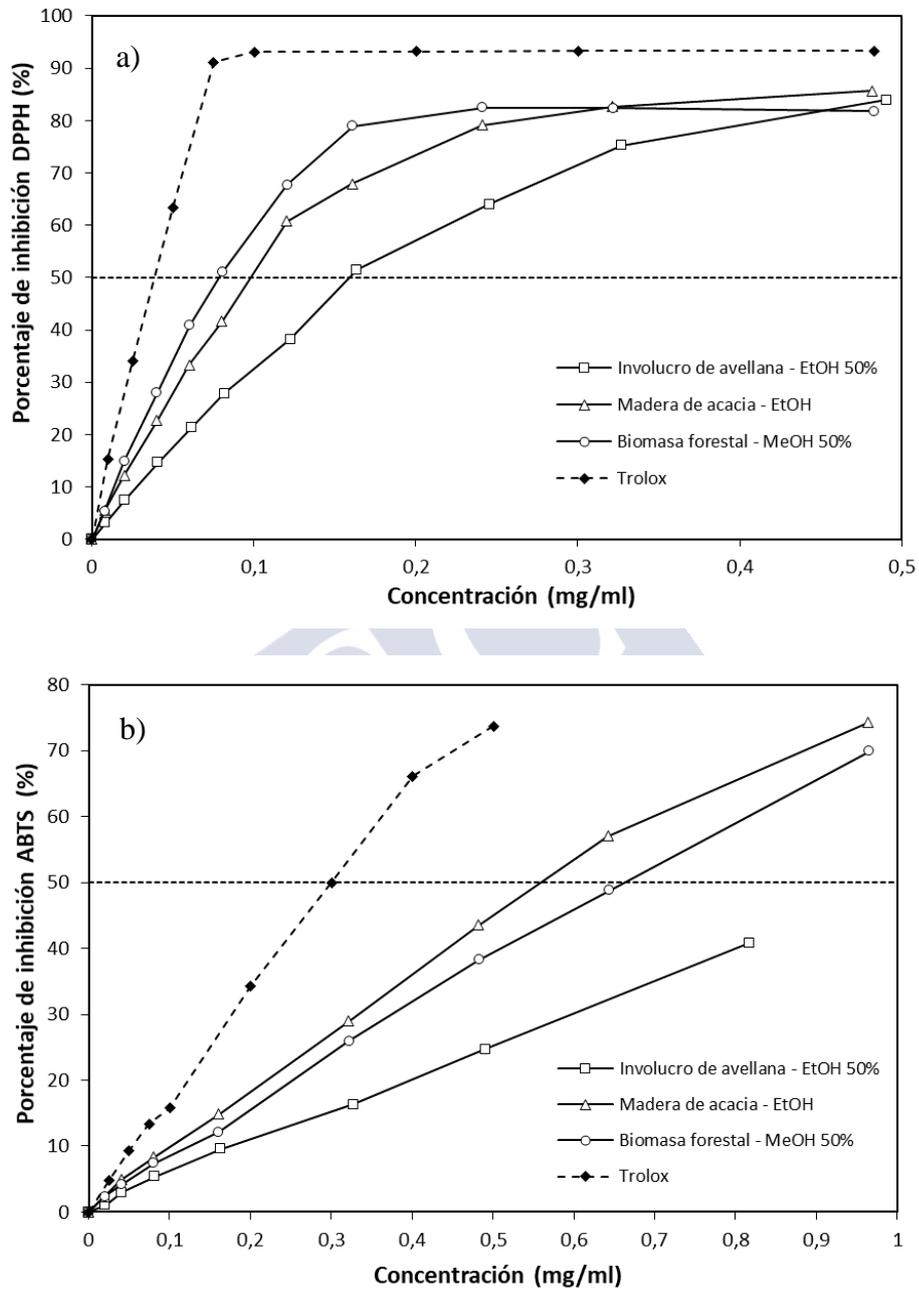
En la figura 4.1.6 se muestra la capacidad de inhibición frente a los radicales DPPH y ABTS de los extractos de involucro de avellana, madera de acacia y biomasa forestal obtenidos con el disolvente que proporcionó los mejores valores de las propiedades antioxidantes. Se observó que la capacidad de inhibir ambos radicales fue dependiente de la concentración de extracto y resultó inferior a la obtenida para el Trolox. En el caso del DPPH, la inhibición máxima alcanzada fue del 80%. Para este radical, el extracto que mayor capacidad de inhibición presentó fue el de biomasa forestal obtenido con MeOH 50%. Para el radical ABTS, los mejores resultados correspondieron a los del extracto de madera de acacia obtenido con EtOH. Para cada extracto, los valores del  $EC_{50}$  para el DPPH y ABTS fueron los siguientes: para los extractos de involucro de avellana obtenidos con EtOH 50%, 0,155 mg/ml para el radical DPPH y 0,988 mg/ml para el ABTS; para los extractos de madera de acacia obtenidos con EtOH, 0,096 mg/ml para el DPPH y 0,556 mg/ml para el ABTS y, finalmente, para los extractos de biomasa forestal obtenidos con MeOH 50%, 0,076 mg/ml para el DPPH y 0,668 mg/ml para el ABTS. Estos valores resultaron todos superiores a los  $EC_{50}$  correspondientes al Trolox (para el DPPH de 0,042 mg/ml y para el ABTS de 0,300 mg/ml).

Comparando los resultados obtenidos con los de materiales similares publicados por otros autores (Tabla 4.1.3), se encontró que el extracto de involucro de avellana analizado presentó mayor capacidad antioxidante que los extraídos con agua y MeOH 80% a 70°C por Cabo et al. (2020) y que los extractos de cáscara de avellana obtenidos por extracción con ultrasonidos (Yuan et al., 2018), siendo del mismo orden de los obtenidos por ultrasonidos a partir de piel de avellana tostada con EtOH 50% (Ivanović et al., 2020).

Los extractos etanólicos de madera de acacia obtenidos en este trabajo fueron comparables a los obtenidos para la corteza de la misma especie con MeOH y superiores a los del duramen (Yildiz et al., 2018). También presentaron propiedades similares a los de la corteza de *Acacia seval* obtenidos con disoluciones de EtOH y MeOH (Suleiman y Brima, 2020).

Respecto a los extractos de biomasa forestal, los resultados fueron del mismo orden a los obtenidos para el mismo material con MeOH 50% a 75°C (Piwowarska y González-Álvarez,

2012) y ligeramente inferiores a los obtenidos con EtOH 30% a 75°C (Xavier et al., 2019) en trabajos previos del grupo de investigación.



**Figura 4.1.6** Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos con mayor capacidad antioxidante de involucro de avellana, madera de acacia y biomasa forestal, comparados con los del compuesto de referencia Trolox

### 4.1.5 Relaciones entre propiedades

Tal y como se muestra en la figura 4.1.7, se encontró una alta relación lineal positiva entre el contenido en fenoles totales de los extractos analizados en este trabajo y la capacidad antioxidante FRAP ( $R^2=0,9492$ ). De la misma forma (Figura 4.1.8), también se encontró relación lineal entre el contenido en fenoles totales y la capacidad de inhibición frente al radical DPPH ( $R^2=0,9795$ ) y ABTS ( $R^2=0,9102$ ). Estos resultados demostraron la contribución de los compuestos fenólicos a la actividad antioxidante de los extractos, como se encontró para otros materiales como extractos derivados de la castaña (Barreira et al., 2008), extractos acuosos de diversas plantas (Dudonné et al., 2009), extractos de plantas medicinales de la flora mediterránea (Piluzza y Bullitta, 2011) o extractos de corteza de acacia y rosa del desierto (Suleiman y Brima, 2020).

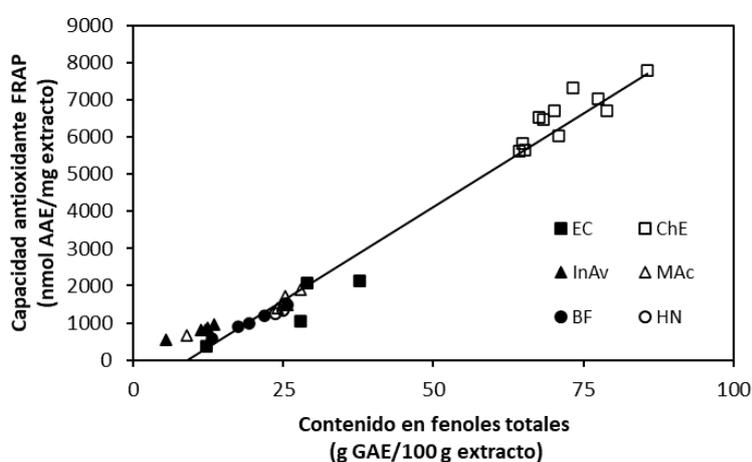


Figura 4.1.7 Correlación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante FRAP de los extractos de erizo de castaña (EC), chapa de eucalipto (ChE), hoja de nogal (HN), involucro de avellana (InAV), madera de acacia (MAc) y biomasa forestal (BF)

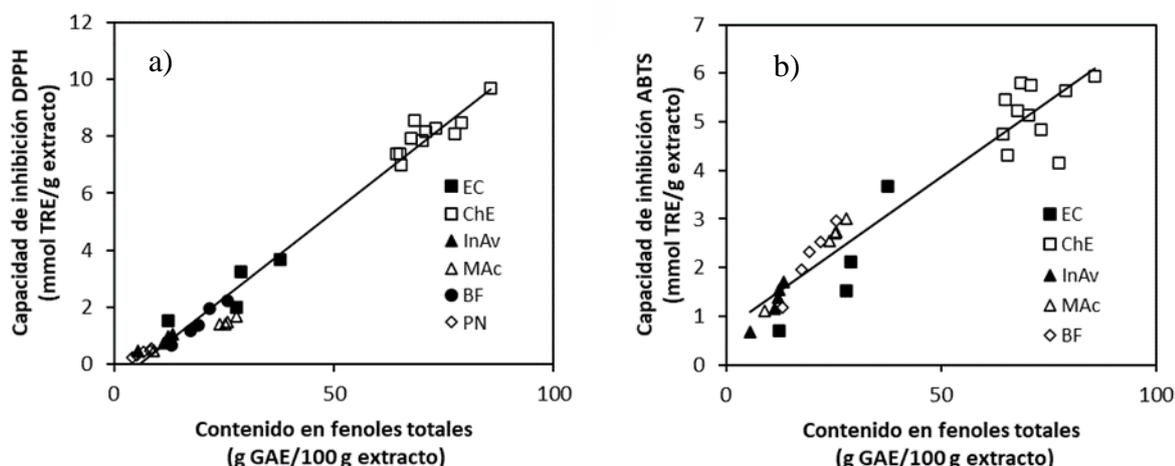
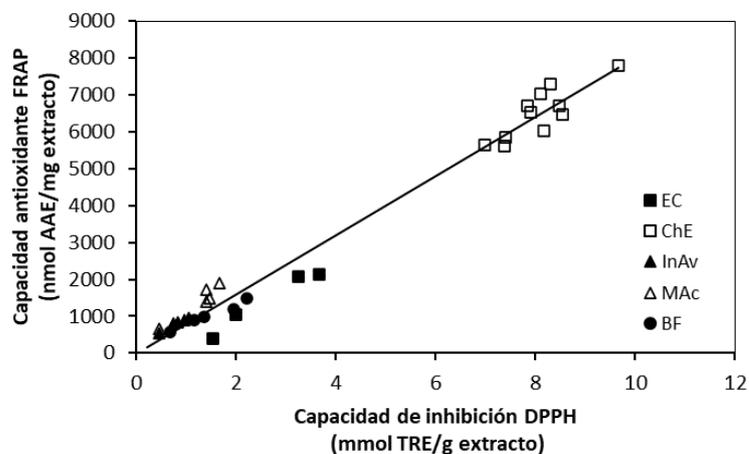


Figura 4.1.8 Correlación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad de inhibición DPPH (a) y ABTS (b) de los extractos de erizo de castaña (EC), chapa de eucalipto (ChE), pericarpio de nuez (PN), involucro de avellana (InAV), madera de acacia (MAc) y biomasa forestal (BF)

También se encontró alta relación lineal ( $R^2=0,9775$ ) entre las capacidades antioxidantes FRAP y DPPH teniendo en cuenta todos los extractos obtenidos, tal y como se observa en la figura 4.1.9.



**Figura 4.1.9** Correlación entre la capacidad antioxidante FRAP y la capacidad de inhibición del radical DPPH de los extractos de erizo de castaña (EC), chapa de eucalipto (ChE), involucro de avellana (InAV), madera de acacia (MAc) y biomasa forestal (BF)

De entre los materiales analizados en el estudio preliminar que mayores propiedades antioxidantes presentaron, se seleccionaron el erizo y la cáscara de castaña, las chapas de eucalipto y las hojas de nogal para continuar con estudios de optimización del proceso de extracción y analizar los factores que influyen en este, con el objetivo de obtener no solo extractos con altas propiedades antioxidantes sino también altos rendimientos de extracción.

## 4.2 ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ERIZO Y CÁSCARA DE CASTAÑA

Tras analizar el efecto del disolvente en la extracción de derivados de la castaña, con el fin de optimizar el proceso de extracción del erizo de la castaña, se analizó la influencia de otros factores clave en el proceso, como la temperatura, el tiempo y la concentración de disolvente mediante un diseño de experimentos. Posteriormente, se compararon los extractos de erizo y cáscara de castaña obtenidos en las condiciones óptimas seleccionadas, además de analizar el uso de otras técnicas de extracción no convencionales, como la extracción asistida por microondas. Asimismo, se estudió la cinética del proceso de extracción para ambos materiales.

### 4.2.1 Optimización del proceso de extracción del erizo de castaña

En esta etapa del trabajo se analizó el efecto de las condiciones de extracción del erizo de la castaña con el objetivo de optimizar el proceso para obtener altos rendimientos de extracción junto con altas propiedades antioxidantes de los extractos. Los parámetros a optimizar fueron la temperatura, el tiempo y la concentración de disolvente, ya que además de ser de los factores que más afectan al proceso de extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales (Dai y Mumper, 2010; Tchabo et al., 2018), afectan directamente a los costes energéticos y al impacto ambiental del mismo (Spigno et al., 2007; Vieira et al., 2017).

Los mejores resultados respecto a rendimiento de extracción y propiedades de los extractos de erizo de castaña en los experimentos preliminares se correspondieron con las extracciones realizadas con agua seguidas de las de metanol. Teniendo en cuenta que las mezclas acuosas de disolventes orgánicos han demostrado ser más efectivas en la extracción de compuestos fenólicos de materiales vegetales (Spigno et al., 2007; Tchabo et al., 2018) se decidió seleccionar disoluciones acuosas de metanol como disolvente para la optimización del proceso. Aunque los resultados obtenidos con etanol fueron inferiores a los del metanol, se decidió analizar también el efecto de disoluciones acuosas de etanol para minimizar el impacto ambiental del proceso. El etanol es un disolvente que puede obtenerse de la fermentación de biomasa rica en azúcares y es completamente biodegradable (Chemat et al., 2012). Además, como ya se mencionó, es un disolvente calificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) lo que lo hace seguro para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica (Vieira et al., 2017).

El rango de temperaturas seleccionado fue desde temperatura ambiente de 25°C hasta 75°C. El rango de tiempo seleccionado fue de 30 min como límite inferior a 120 min como límite superior. El efecto de la concentración de disolvente se estudió analizando concentraciones entre el 50 y 90% de metanol y de etanol en disolución acuosa

Para llevar a cabo la optimización del proceso se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), una herramienta matemática que ha demostrado ser útil en la optimización de procesos de extracción al optimizar todas las variables del proceso de manera simultánea dentro del rango experimental seleccionado (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Vieira et al., 2017). Los resultados experimentales para cada variable dependiente a analizar, en este caso rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) y capacidad antioxidante según los métodos FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto), DPPH ( $Y_4$ , mmol TRE/g extracto) y ABTS ( $Y_5$ , mmol TRE/g extracto), se ajustaron a un polinomio de

segundo orden que tiene en cuenta el efecto de las variables independientes, las interacciones dobles entre variables, así como los efectos cuadráticos (ecuación 3.2; apartado 3.5.2.1). En la tabla 4.2.1 se muestran las condiciones de cada experimento, así como los resultados obtenidos para las variables dependientes y los valores predichos por el modelo para las extracciones metanólicas y en la tabla 4.2.2 los correspondientes a las etanólicas.

Tabla 4.2.1 Diseño experimental Box-Behnken aplicado al erizo de castaña con disoluciones metanólicas

EXP	T <sup>a</sup>	t	[MeOH]	Rendimiento, Y <sub>1</sub> (%)		TFC, Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)		FRAP, Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)		DPPH, Y <sub>4</sub> (mmol TRE/g extracto)		ABTS, Y <sub>5</sub> (mmol TRE/g extracto)		
	°C	min	%, v/v	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	
1	25	30	70	11,52	11,38	19,93	19,05	1254	1434	1,93	2,08	1,97	2,20	
2	25	75	50	10,52	10,56	26,28	26,33	1832	1832	2,50	2,45	2,67	2,96	
3	25	75	90	13,63	13,73	16,88	16,61	952	1035	1,74	1,72	1,48	1,44	
4	25	120	70	12,95	12,96	24,73	23,88	1482	1434	2,17	2,08	2,15	2,20	
5	50	30	50	11,90	11,72	29,74	28,91	1770	2097	2,98	3,27	2,96	3,27	
6	50	30	90	13,05	13,06	17,66	19,19	1011	1300	2,09	2,54	1,37	1,75	
7	50	120	50	13,07	13,31	33,76	33,74	2261	2097	3,42	3,27	3,80	3,27	
8	50	120	90	14,71	14,64	20,51	24,02	1297	1300	2,24	2,54	1,59	1,75	
9	75	30	70	17,62	17,93	28,33	29,05	1866	1963	2,65	2,87	2,55	2,82	
10	75	75	50	19,05	18,95	33,82	36,32	2151	2361	2,85	3,24	3,04	3,58	
11	75	75	90	18,48	18,45	29,68	26,61	1567	1564	2,74	2,50	1,95	2,06	
12	75	120	70	19,70	19,52	35,98	33,88	2050	1963	3,24	2,87	3,21	2,82	
13	50	75	70	13,53	14,42	29,43	26,47	2183	1698	3,24	2,90	3,07	2,51	
14	50	75	70	15,14	14,42	28,26	26,47	2034	1698	3,18	2,90	2,89	2,51	
15	50	75	70	14,60	14,42	21,99	26,47	1764	1698	3,18	2,90	2,90	2,51	
Variables independientes				x <sub>1</sub> , Temperatura (°C)		x <sub>2</sub> , Tiempo (min)			x <sub>3</sub> , % MeOH (v/v)					
codificadas				-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1		
sin codificar				25	30	75	30	75	120	50	70	90		

Exp: resultados experimentales

Pred: valores predichos por el modelo

Tabla 4.2.2 Diseño experimental Box-Behnken aplicado al erizo de castaña con disoluciones etanólicas

EXP	T <sup>a</sup>	t	[EtOH]	Rendimiento, Y <sub>1</sub> (%)		TFC, Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)		FRAP, Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)		DPPH, Y <sub>4</sub> (mmol TRE/g extracto)		ABTS, Y <sub>5</sub> (mmol TRE/g extracto)		
	°C	min	%, v/v	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	
1	25	30	70	13,72	12,65	14,02	14,30	977	1035	1,19	1,20	1,58	1,68	
2	25	75	50	12,60	13,94	17,20	16,65	1263	1192	1,51	1,45	2,25	2,22	
3	25	75	90	11,82	11,35	12,88	11,49	709	602	0,98	0,95	1,33	1,13	
4	25	120	70	12,44	12,65	15,38	16,76	1028	1035	1,21	1,20	1,77	1,68	
5	50	30	50	13,62	14,39	19,97	20,76	1195	1369	1,79	1,94	2,17	2,59	
6	50	30	90	11,91	11,80	11,54	11,42	729	779	0,92	1,03	1,38	1,50	
7	50	120	50	16,16	14,39	24,63	23,23	1450	1369	1,84	1,94	2,43	2,59	
8	50	120	90	12,26	11,80	12,70	13,89	730	779	0,94	1,03	1,4	1,50	
9	75	30	70	15,35	16,47	21,56	20,80	1387	1390	1,64	1,76	2,52	2,41	
10	75	75	50	18,93	17,76	26,19	27,34	1569	1547	2,44	2,43	3,08	2,95	
11	75	75	90	14,95	15,17	13,51	13,82	948	956	1,08	1,10	1,46	1,86	
12	75	120	70	16,63	16,47	24,24	23,27	1491	1390	1,96	1,76	2,78	2,41	
13	50	75	70	12,42	13,10	19,13	18,78	1213	1213	1,53	1,48	2,35	2,04	
14	50	75	70	12,34	13,10	19,24	18,78	1190	1213	1,69	1,48	2,22	2,04	
15	50	75	70	12,97	13,10	17,90	18,78	1203	1213	1,53	1,48	1,89	2,04	
Variables independientes				x <sub>1</sub> , Temperatura (°C)			x <sub>2</sub> , Tiempo (min)			x <sub>3</sub> , % EtOH (v/v)				
codificadas				-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1		
sin codificar				25	30	75	30	75	120	50	70	90		

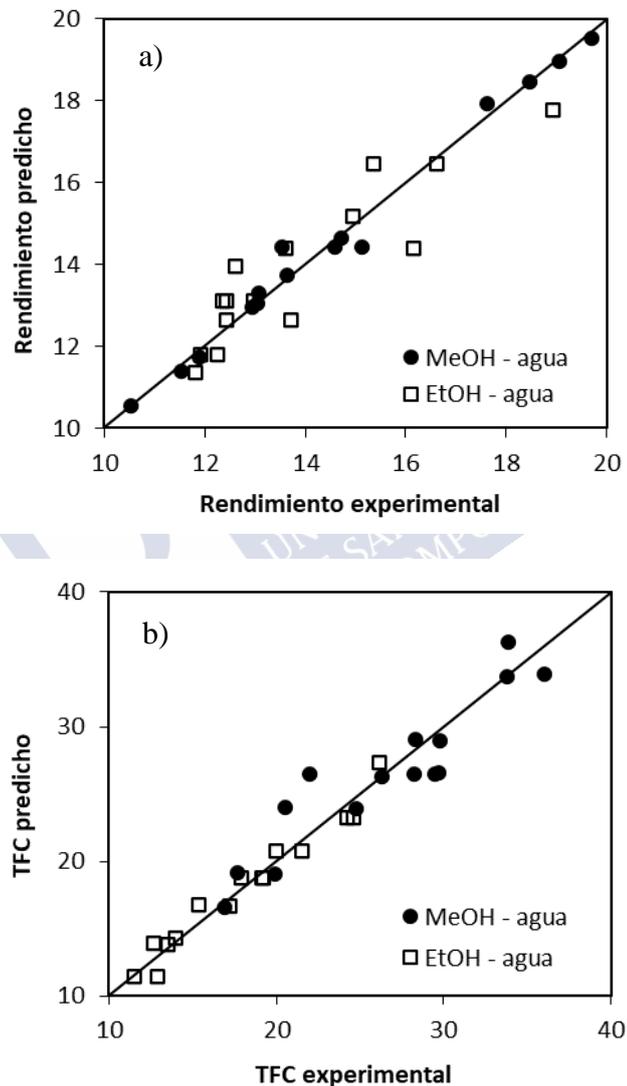
Exp: resultados experimentales

Pred: valores predichos por el modelo

Comparando los resultados obtenidos para los dos disolventes empleados en el diseño, se observó que los rendimientos obtenidos con disoluciones acuosas de metanol (10,52-19,70%) estuvieron aproximadamente en el mismo rango que los obtenidos con disoluciones acuosas de etanol (11,82-18,93%). El máximo rendimiento de extracción se obtuvo en el experimento 12 para las disoluciones metanólicas y en el 10 para las etanólicas, ambos realizados a 75°C. En estas mismas condiciones se obtuvieron también los extractos con mayor contenido en fenoles totales. Respecto a las propiedades antioxidantes según los métodos FRAP, DPPH y ABTS, los valores más elevados en las extracciones con metanol se correspondieron con el experimento 7, realizado a temperatura de 50°C, 120 min y concentración de MeOH del 50%. Los valores más elevados en las extracciones con etanol se obtuvieron de nuevo en el experimento 10, a temperatura de 75°C, 75 min y concentración del 50%. De nuevo, al igual que en los experimentos preliminares, las propiedades antioxidantes de los extractos metanólicos obtenidos resultaron superiores a los de los extractos obtenidos con disoluciones acuosas de etanol.

En las tablas 4.2.3 y 4.2.4 se recogen, para las extracciones metanólicas y etanólicas respectivamente, los valores de los coeficientes del modelo de segundo orden junto con los parámetros estadísticos y la significación del modelo. Para todas las variables dependientes analizadas se encontraron modelos significativos al nivel de confianza establecido del 95% siendo los coeficientes de correlación elevados (superiores a 0,8) para todos los modelos

establecidos en las extracciones con disoluciones acuosas de etanol. El ajuste obtenido en las extracciones con disoluciones acuosas de metanol fue muy alto para los modelos del rendimiento de extracción ( $Y_1$ ) y del contenido en fenoles totales ( $Y_2$ ), aunque para el resto de variables analizadas fue ligeramente inferior a 0,7. La alta correlación encontrada entre los valores experimentales y los predichos por el modelo (Tablas 4.2.1 y 4.2.2) puede visualizarse en la figura 4.2.1 para el rendimiento de extracción (a) y el contenido en fenoles totales (b). En ambas figuras se puede observar que, para ambos disolventes, los resultados se situaron siempre en torno a la diagonal que representa la igualdad entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.



**Figura 4.2.1** Valores experimentales frente a valores predichos por el modelo para el rendimiento de extracción (a) ( $Y_1$ , %) y el contenido en fenoles totales (TFC) (b) ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) del erizo de castaña

**Tabla 4.2.3** Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para las extracciones metanólicas de erizo de castaña

	Y <sub>1</sub> Rendimiento			Y <sub>2</sub> TFC			Y <sub>3</sub> FRAP			Y <sub>4</sub> DPPH			Y <sub>5</sub> ABTS		
	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p
<b>a<sub>0</sub></b>	14,423	0,277	0,000	26,465	0,650	0,000	1698,205	61,097	0,000	2,904	0,119	0,000	2,507	0,101	0,000
<b>a<sub>1</sub></b>	3,279	0,170	0,000	4,999	0,889	0,000	264,365	83,661	0,008	0,393	0,111	0,005	0,310	0,138	0,044
<b>a<sub>2</sub></b>	0,793	0,170	0,002	2,415	0,889	0,020	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
<b>a<sub>3</sub></b>	0,666	0,170	0,006	-4,859	0,889	0,000	-398,479	83,661	0,000	-0,368	0,111	0,007	-0,760	0,138	0,000
<b>a<sub>12</sub></b>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
<b>a<sub>13</sub></b>	-0,920	0,240	0,006	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
<b>a<sub>23</sub></b>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
<b>a<sub>11</sub></b>	1,631	0,250	0,000	-	-	NS	-	-	NS	-0,427	0,163	0,024	-	-	NS
<b>a<sub>22</sub></b>	-0,607	0,250	0,045	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
<b>a<sub>33</sub></b>	-0,634	0,250	0,039	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
<b>R<sup>2</sup></b>		0,986			0,862			0,731			0,734			0,747	
<b>R<sup>2</sup>corr.</b>		0,972			0,825			0,687			0,661			0,705	
<b>DS</b>		0,479			2,516			236,658			0,314			0,390	
<b>valor p</b>		0,000			0,000			0,000			0,002			0,000	

a<sub>0</sub>: constante del modelo; a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> y a<sub>3</sub>: coeficientes de los efectos principales; a<sub>12</sub>, a<sub>13</sub> y a<sub>23</sub>: coeficientes de las interacciones dobles; a<sub>11</sub>, a<sub>22</sub> y a<sub>33</sub>: coeficientes de los efectos cuadráticos  
 Coef.: valor del coeficiente; DS: desviación estándar; valor p: probabilidad; NS: coeficiente no significativo para un nivel de confianza del 95%  
 R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup>corr.: coeficiente de correlación y coeficiente de correlación corregido

Tabla 4.2.4 Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para las extracciones etanólicas de erizo de castaña

	Y <sub>1</sub> Rendimiento			Y <sub>2</sub> TFC			Y <sub>3</sub> FRAP			Y <sub>4</sub> DPPH			Y <sub>5</sub> ABTS		
	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p
a <sub>0</sub>	13,097	0,328	0,000	18,781	0,441	0,000	1212,657	30,815	0,000	1,483	0,031	0,000	2,041	0,065	0,000
a <sub>1</sub>	1,726	0,307	0,000	3,253	0,413	0,000	177,219	28,825	0,000	0,279	0,042	0,000	0,364	0,089	0,001
a <sub>2</sub>	-	-	NS	1,233	0,413	0,015	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>3</sub>	-1,480	0,307	0,001	-4,670	0,413	0,000	-295,171	28,825	0,000	-0,458	0,042	0,000	-0,545	0,089	0,000
a <sub>12</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>13</sub>	-	-	NS	-2,090	0,584	0,006	-	-	NS	-0,208	0,060	0,005	-	-	NS
a <sub>23</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>11</sub>	1,642	0,450	0,004	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>22</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>33</sub>	-	-	NS	-1,454	0,604	0,040	-138,543	42,195	0,007	-	-	NS	-	-	NS
R <sup>2</sup>		0,861			0,960			0,933			0,940			0,810	
R <sup>2</sup> corr.		0,823			0,938			0,915			0,924			0,789	
DS		0,869			1,168			81,528			0,119			0,252	
valor p		0,000			0,000			0,000			0,000			0,000	

a<sub>0</sub>: constante del modelo; a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> y a<sub>3</sub>: coeficientes de los efectos principales; a<sub>12</sub>, a<sub>13</sub> y a<sub>23</sub>: coeficientes de las interacciones dobles; a<sub>11</sub>, a<sub>22</sub> y a<sub>33</sub>: coeficientes de los efectos cuadráticos  
 Coef.: valor del coeficiente; DS: desviación estándar; valor p: probabilidad; NS: coeficiente no significativo para un nivel de confianza del 95%  
 R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup>corr.: coeficiente de correlación y coeficiente de correlación corregido

Tal y como se observa en las tablas 4.2.3 y 4.2.4, no todos los parámetros de la ecuación de ajuste (Ecuación 3.2) se utilizaron para construir los modelos para cada variable dependiente, ya que no resultaron ser significativos ( $p > 0,05$ ). Para ambos disolventes, la temperatura y la concentración de disolvente fueron los efectos principales más significativos tanto para el rendimiento de extracción como para las propiedades de los extractos. La temperatura afectó de modo positivo, siendo la variable más significativa para el rendimiento, contenido en fenoles totales y actividad antioxidante DPPH para ambos disolventes y para la actividad antioxidante FRAP en las extracciones con etanol. El efecto principal de la concentración afectó en modo negativo en todos los casos, a excepción de en el rendimiento de las extracciones metanólicas. En los únicos casos en los que apareció el efecto lineal del tiempo fue en el contenido en fenoles totales para ambos disolventes y en el rendimiento de las extracciones metanólicas, en dónde también apareció su efecto cuadrático. Las interacciones dobles de las variables independientes fueron significativas en algunos casos; la interacción entre la temperatura y la concentración causó un efecto negativo en el rendimiento de las extracciones metanólicas y en el contenido en fenoles totales y actividad antioxidante DPPH de las etanólicas. Respecto a los efectos cuadráticos, la temperatura ejerció un efecto positivo en el rendimiento de las extracciones metanólicas y etanólicas y el tiempo y la concentración ejercieron efecto negativo en las extracciones con metanol. Respecto a las propiedades antioxidantes, resultaron negativos los efectos cuadráticos de la temperatura en los valores de DPPH de los extractos metanólicos y de la concentración en el contenido en fenoles y la actividad antioxidante FRAP de los etanólicos.

Los modelos resultantes para cada variable dependiente analizada en función de las variables independientes que resultaron significativas se resumen en la tabla 4.2.5 y en base a ellos se construyeron las superficies de respuesta en función de la temperatura y de la concentración de disolvente (Figuras 4.2.2-4.2.5).

Tabla 4.2.5 Ecuaciones del modelo para el diseño experimental Box-Behnken de la extracción de erizo de castaña

Variable dependiente	Ecuaciones de ajuste del modelo	
	Extracciones metanólicas	Extracciones etanólicas
Rendimiento $Y_1$ (%)	$Y_1 = 14,423 + 3,279x_1^* + 0,793x_2^* + 0,666x_3^* - 0,920x_1^*x_3^* + 1,631x_1^{*2} - 0,607x_2^{*2} - 0,634x_3^{*2}$	$13,097 + 1,726x_1^* - 1,480x_3^* + 1,642x_1^{*2}$
TFC $Y_2$ (g GAE/100 g extracto)	$Y_2 = 26,465 + 4,999x_1^* + 2,415x_2^* - 4,859x_3^*$	$18,781 + 3,252x_1^* + 1,233x_2^* - 0,4670x_3^* - 2,090x_1^*x_3^* - 1,454x_3^{*2}$
FRAP $Y_3$ (nmol AAE/mg extracto)	$Y_3 = 1698,205 + 264,365x_1^* - 398,479x_3^*$	$1212,657 + 177,219x_1^* - 295,171x_3^* - 138,543x_3^{*2}$
DPPH $Y_4$ (mmol TRE/g extracto)	$Y_4 = 2,904 + 0,393x_1^* - 0,368x_3^* - 0,492x_1^{*2}$	$1,483 + 0,279x_1^* - 0,458x_3^* - 0,208x_1^*x_3^*$
ABTS $Y_5$ (mmol TRE/g extracto)	$Y_5 = 2,507 + 0,310x_1^* - 0,760x_3^*$	$2,041 + 0,364x_1^* - 0,545x_3^*$

$x_1^*$ , temperatura codificada;  $x_2^*$ , tiempo codificado;  $x_3^*$ , concentración de metanol o etanol codificada

El rendimiento de extracción, tal y como se muestra en la figura 4.2.2, aumentó para ambos disolventes, al aumentar la temperatura de extracción en el rango de 25 a 75°C. Como ya se ha puesto de manifiesto a lo largo de este trabajo, la temperatura favorece el proceso de extracción al aumentar la solubilidad de los compuestos a extraer y ablandar la matriz vegetal (Al-Farsi y Lee, 2008; Dai y Mumper; 2010; Tchabo et al., 2018). Se observó que en el caso de las extracciones metanólicas, a temperaturas superiores a 50°C, el rendimiento de extracción resultó prácticamente independiente de la concentración de disolvente. A valores de temperatura inferiores a ese valor, el rendimiento de extracción aumentó al aumentar la concentración de MeOH. Sin embargo, en las extracciones con EtOH, se obtuvo un mayor rendimiento al disminuir la concentración de disolvente. El tiempo solo resultó una variable significativa en las extracciones metanólicas. En estas se observó que, al aumentar el tiempo de 30 a 75 min, aumentó también el rendimiento de extracción mientras que aumentar el tiempo de 75 a 120 min prácticamente no condujo a mejores resultados, siendo estas dos superficies prácticamente idénticas.

Respecto a las propiedades de los extractos, tanto el contenido en fenoles totales como la actividad antioxidante según los métodos FRAP, DPPH y ABTS (Figuras 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5) aumentaron al aumentar la temperatura y disminuir la concentración de disolvente, tanto para las extracciones metanólicas como para las etanólicas. La capacidad antioxidante de los extractos fue, por tanto, sensible a la polaridad del disolvente, decreciendo considerablemente al aumentar su concentración al valor del 90%. Se puede concluir que los extractos obtenidos fueron de polaridad intermedia y sensibles a la del disolvente (Thoo et al., 2010).

Para las propiedades de los extractos, el tiempo sólo resultó una variable significativa en el caso del contenido en fenoles totales. Tal y como se observa en la figura 4.2.3, para ambos disolventes, al aumentar el tiempo de extracción aumentó el contenido en fenoles totales de los extractos. Este aumento fue más acusado en las extracciones con MeOH, en donde el valor más alto alcanzado aumentó de 33,91 g GAE/100 g extracto a 38,74 g GAE/100 g extracto al aumentar el tiempo de 30 a 120 min. En el caso de las extracciones con EtOH, los resultados obtenidos para los tres tiempos fueron muy similares entre sí, aumentando de 26,14 g GAE/100 g extracto a 28,57 g GAE/100 g extracto al aumentar el tiempo de 30 a 120 minutos.

Respecto a las superficies de respuesta obtenidas para la capacidad antioxidante FRAP (Figura 4.2.4), DPPH y ABTS (Figura 4.2.5), se encontró un comportamiento similar para ambos disolventes, ya que las propiedades aumentaron al aumentar la temperatura y disminuir la concentración de disolvente, obteniéndose los valores más altos a 75°C y 50% de concentración, revelando la presencia de un máximo fuera de la región experimental hacia valores crecientes de temperatura y decrecientes de concentración de disolvente. En el caso de la capacidad antioxidante DPPH de los extractos metanólicos, el valor más alto de la variable dependiente se alcanzó a 61,25°C y 50% de MeOH revelándose la presencia de un máximo fuera del rango analizado a valores inferiores de concentración de MeOH.

Teniendo en cuenta el análisis de todas las superficies de respuesta obtenidas, se seleccionaron las condiciones óptimas en las que se obtuvieron altos rendimientos de extracción junto con altas propiedades antioxidantes de los extractos. Estas condiciones se corresponden con temperaturas de 75°C y 50% de concentración de disolvente para ambos disolventes. Para seleccionar el tiempo óptimo, en el caso de las disoluciones metanólicas se seleccionó 75 min, ya que el ligero aumento que se obtiene tanto del rendimiento de extracción como del contenido

en fenoles totales al aumentar el tiempo a 120 min no compensa el efecto de trabajar a tiempos más largos. En el caso de las disoluciones etanólicas, el tiempo óptimo se seleccionó en 30 minutos. Trabajar a tiempos bajos además de reducir el coste del proceso, evita la probabilidad de que los compuestos fenólicos puedan degradarse disminuyendo sus propiedades (Tchabo et al., 2018).

En la tabla 4.2.6 se resumen las propiedades de los extractos predichas por el modelo en las condiciones seleccionadas como óptimas, así como los valores óptimos para cada una de las variables analizadas y las condiciones a las que se alcanzaron.

**Tabla 4.2.6** Propiedades de los extractos de erizo de castaña en las condiciones óptimas

Propiedades	Extracciones metanólicas		Extracciones etanólicas	
	Valor más alto en el rango estudiado (condiciones en las que se alcanzan)	Óptimo 75°C-50% MeOH-75 min	Valor más alto en el rango estudiado (condiciones en las que se alcanzan)	Óptimo 75°C-50% EtOH-30 min
Rendimiento Y <sub>1</sub> (%)	19,54 (75°C - 66% MeOH - 120 min)	18,95	17,95 (75°C - 50% EtOH)	17,95
TFC Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)	38,74 (75°C - 50% MeOH - 120 min)	36,32	28,57 (75°C - 50% EtOH - 120 min)	26,11
FRAP Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)	2361 (75°C - 50% MeOH)	2361	1547 (75°C - 50% EtOH)	1547
DPPH Y <sub>4</sub> (mmol TRE/g extracto)	3,36 (61,25°C - 50% MeOH)	3,24	2,43 (75°C - 50% EtOH)	2,43
ABTS Y <sub>5</sub> (mmol TRE/g extracto)	3,58 (75°C - 50% MeOH)	3,58	2,95 (75°C - 50% EtOH)	2,95

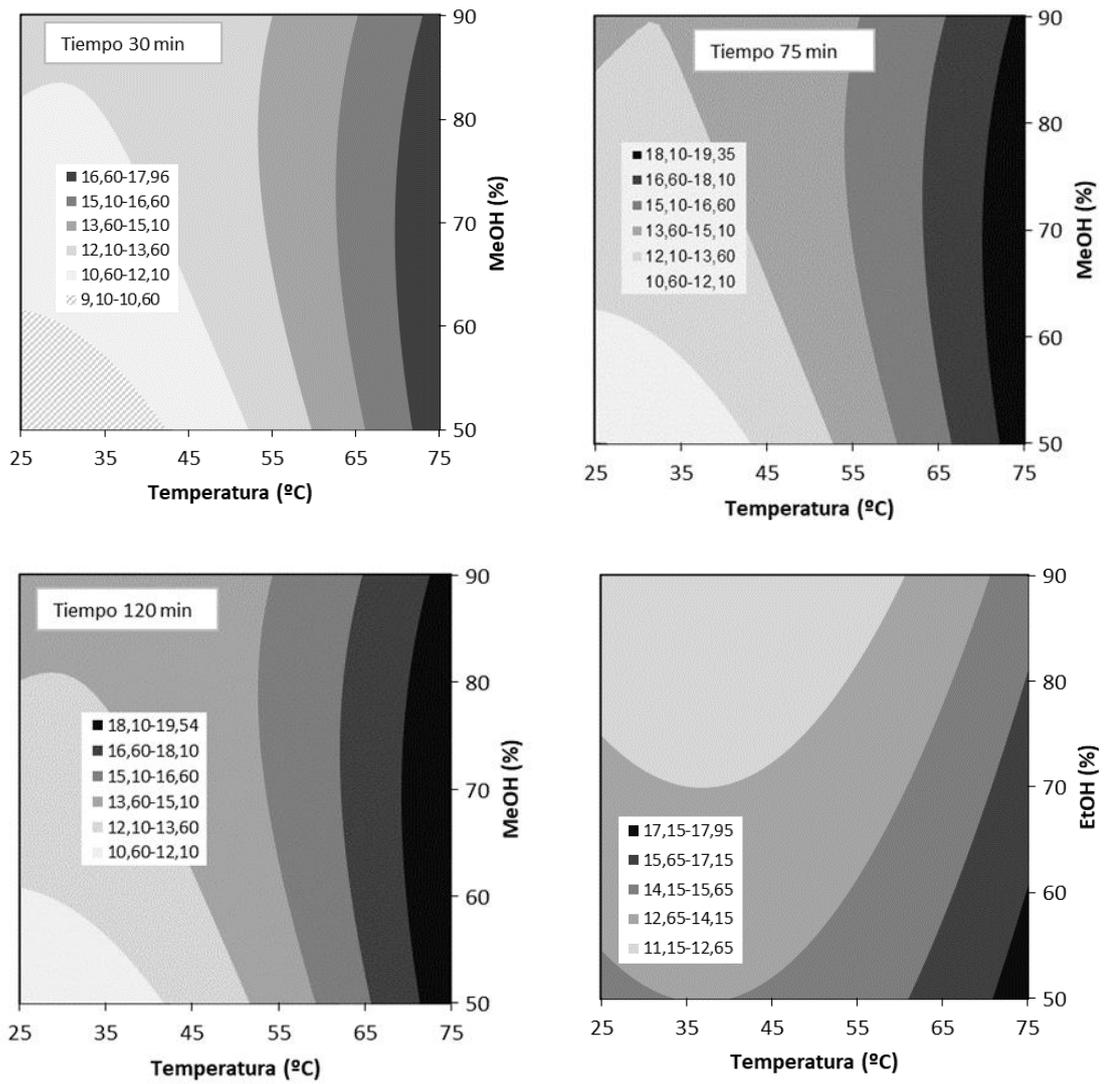


Figura 4.2.2 Superficie de respuesta para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH (a tiempos de 30, 75 y 120 min) y de EtOH del erizo de castaña

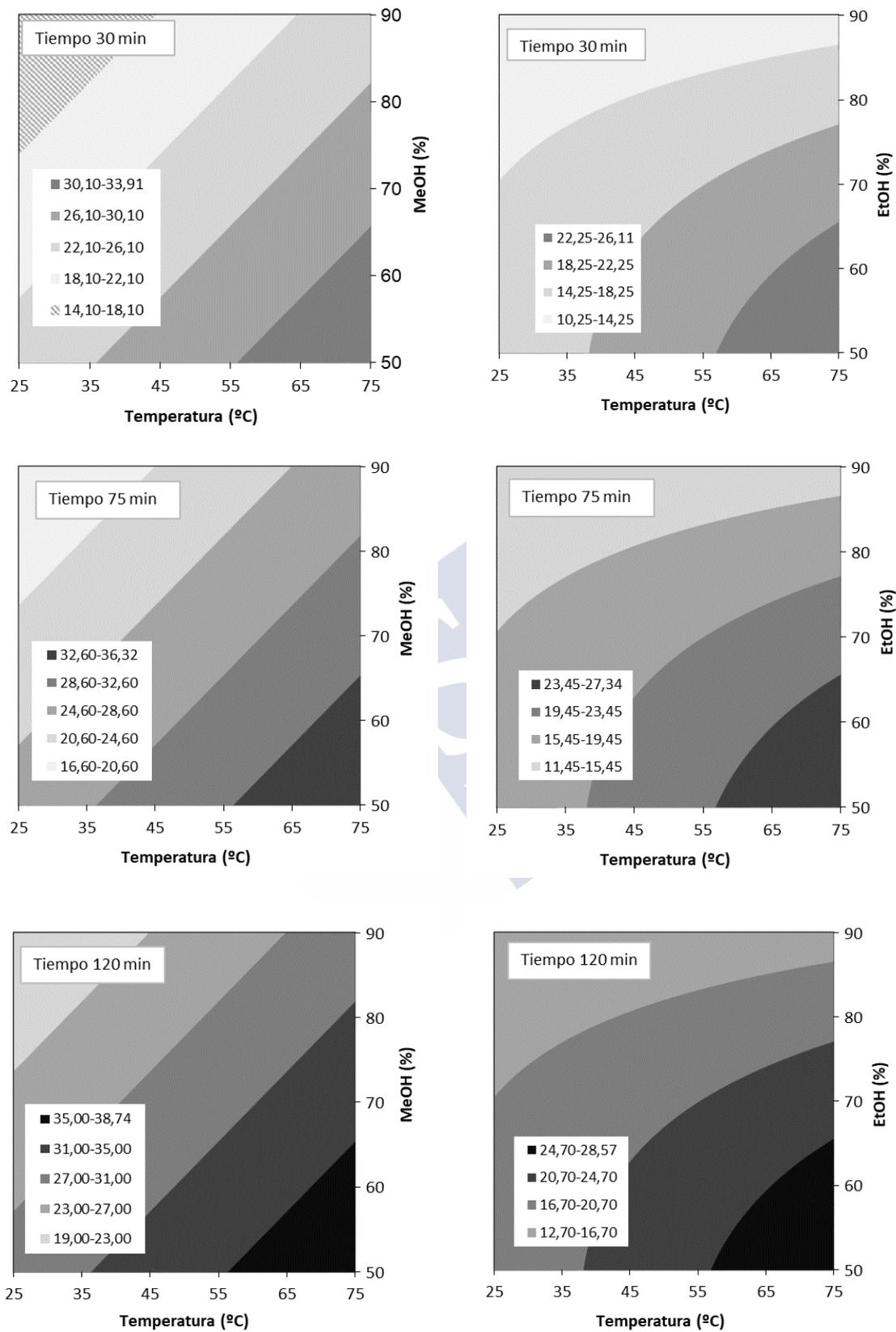


Figura 4.2.3 Superficie de respuesta para el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH y EtOH a tiempos de 30, 75 y 120 min de extractos de erizo de castaña

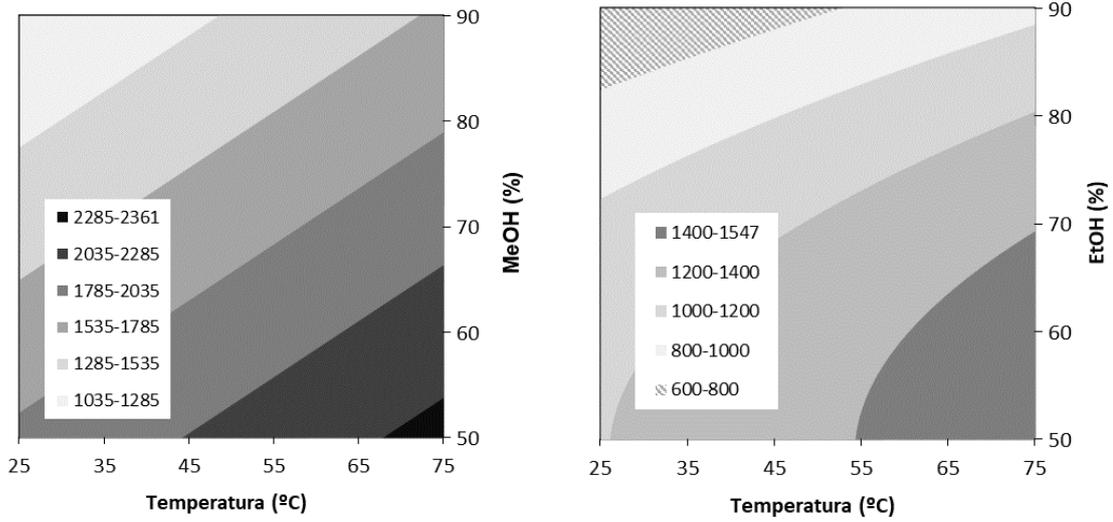


Figura 4.2.4 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante FRAP (Y<sub>3</sub>, nmol AAE/mg extracto) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH y EtOH de extractos de erizo de castaña

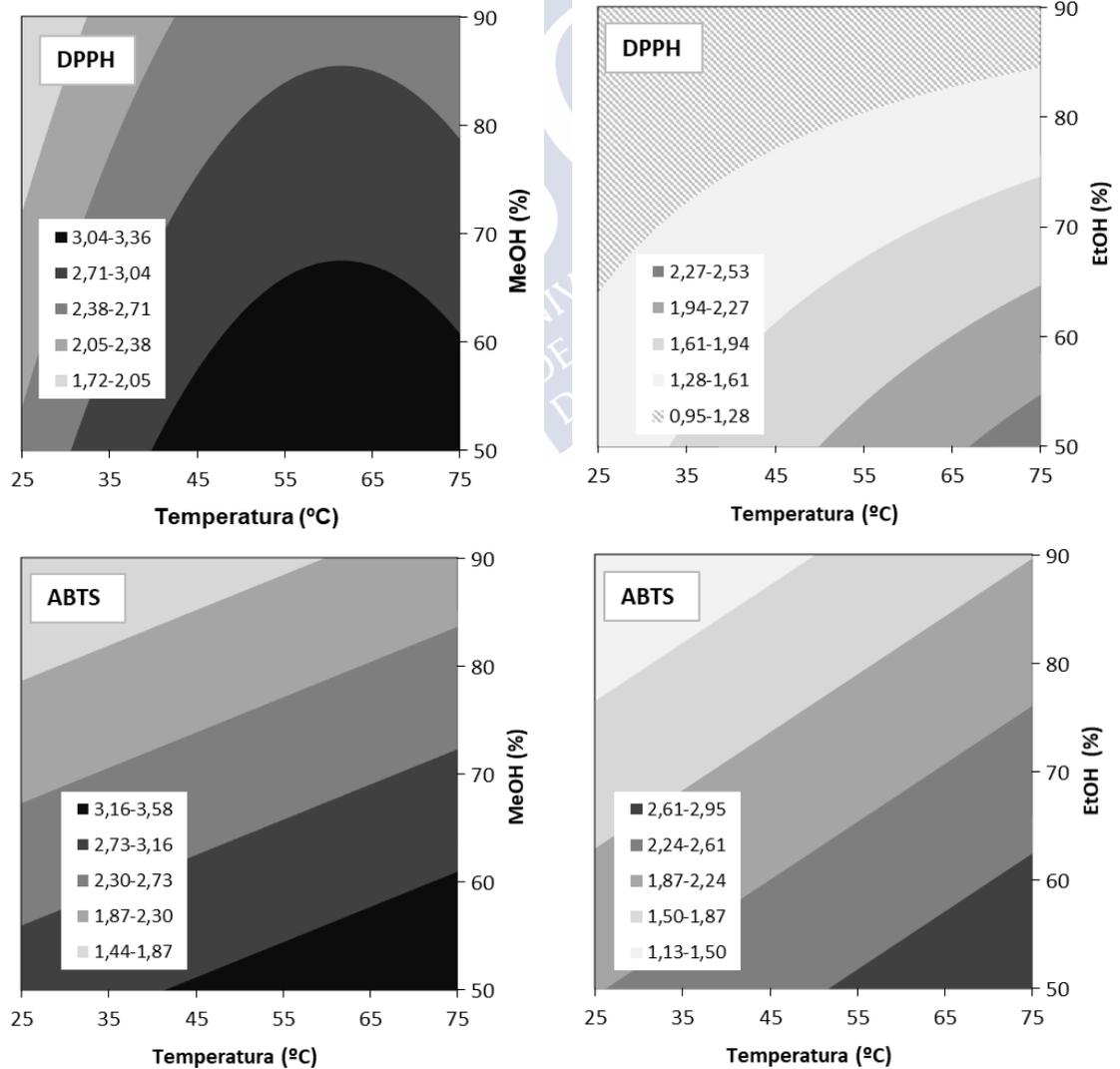


Figura 4.2.5 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante DPPH (Y<sub>4</sub>) y ABTS (Y<sub>5</sub>) (mmol TRE/g extracto) en función de la temperatura y de la concentración de MeOH y EtOH de extractos de erizo de castaña

4.2.2 Estudio comparativo de extractos de erizo y cáscara de castaña

En base a los resultados obtenidos en el diseño experimental del erizo de castaña, en esta parte del trabajo se realizó un estudio comparativo de los extractos de erizo y cáscara de castaña obtenidos bajo las mismas condiciones de operación. Los disolventes empleados fueron disoluciones acuosas de MeOH y EtOH al 50%, concentración que resultó óptima desde el punto de vista de la actividad antioxidante en el diseño experimental. También se realizaron extracciones con agua, al ser el disolvente con el que se obtuvieron mejores resultados en los experimentos preliminares. Con el objetivo de analizar la influencia de la temperatura en el proceso de extracción de ambos residuos de la castaña, se realizaron extracciones a 25, 50 y 75°C. Las condiciones de operación se hicieron coincidir con las correspondientes a los experimentos del diseño realizados al 50% de concentración de disolvente para cada temperatura ensayada (experimentos 2, 7 y 10; tabla 4.2.2). Se mantuvieron los tiempos de operación con los que se realizaron los experimentos 2, 7 y 10 (75 y 120 min), así como el tiempo empleado en la extracción con agua en el estudio preliminar (60 min). El tiempo resultó ser la variable menos significativa en el diseño de experimentos, por lo que se considera que las diferencias en los tiempos empleados en la extracción no afectan a la hora de realizar la comparación entre los extractos de cáscara y erizo de castaña, ni para analizar la influencia del disolvente ni la temperatura utilizados. En la tabla 4.2.7 se presentan los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TFC) y actividad antioxidante FRAP, DPPH y ABTS y en la figura 4.2.6 se representa el efecto de la temperatura para cada una de las propiedades de los extractos.

Tabla 4.2.7 Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de erizo y cáscara de castaña

	Dis.	T (°C)	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)	DPPH (mmol TRE/g extracto)	ABTS (mmol TRE/g extracto)
Erizo de castaña	Agua	25	8,54 ± 0,11 <sup>a</sup>	20,16 ± 0,87 <sup>a</sup>	1312 ± 54 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,07 <sup>a</sup>
		50	12,51 ± 0,66 <sup>bc</sup>	20,96 ± 1,47 <sup>a</sup>	1323 ± 37 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,30 <sup>ab</sup>	1,98 ± 0,01 <sup>b</sup>
		75	17,35 ± 0,07 <sup>d</sup>	25,27 ± 1,28 <sup>b</sup>	1738 ± 50 <sup>b</sup>	2,42 ± 0,04 <sup>cd</sup>	2,39 ± 0,11 <sup>c</sup>
	MeOH 50%	25	12,91 ± 0,33 <sup>b</sup>	17,74 ± 0,46 <sup>c</sup>	1323 ± 82 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,01 <sup>ab</sup>	1,64 ± 0,03 <sup>d</sup>
		50	14,81 ± 0,43 <sup>e</sup>	24,93 ± 0,84 <sup>b</sup>	1683 ± 125 <sup>b</sup>	2,66 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,26 ± 0,05 <sup>e</sup>
		75	19,58 ± 0,38 <sup>f</sup>	27,69 ± 0,30 <sup>d</sup>	1906 ± 85 <sup>c</sup>	3,06 ± 0,05 <sup>e</sup>	2,58 ± 0,05 <sup>f</sup>
	EtOH 50%	25	11,13 ± 0,83 <sup>c</sup>	17,15 ± 0,53 <sup>c</sup>	1267 ± 75 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,06 <sup>f</sup>	1,64 ± 0,08 <sup>d</sup>
		50	13,27 ± 1,54 <sup>be</sup>	23,11 ± 0,93 <sup>e</sup>	1546 ± 97 <sup>d</sup>	2,12 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,71 ± 0,02 <sup>fg</sup>
		75	18,38 ± 1,03 <sup>fd</sup>	26,45 ± 0,97 <sup>f</sup>	1840 ± 78 <sup>c</sup>	2,40 ± 0,11 <sup>d</sup>	2,74 ± 0,04 <sup>g</sup>
Cáscara de castaña	Agua	25	2,91 ± 0,24 <sup>a</sup>	41,57 ± 1,09 <sup>a</sup>	3053 ± 51 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,08 <sup>abc</sup>	3,79 ± 0,12 <sup>a</sup>
		50	4,81 ± 0,07 <sup>b</sup>	51,71 ± 1,54 <sup>bc</sup>	3292 ± 119 <sup>b</sup>	4,80 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,06 <sup>b</sup>
		75	8,72 ± 0,62 <sup>c</sup>	56,23 ± 2,44 <sup>d</sup>	3891 ± 133 <sup>c</sup>	5,84 ± 0,08 <sup>d</sup>	4,88 ± 0,08 <sup>b</sup>
	MeOH 50%	25	4,33 ± 0,69 <sup>b</sup>	49,07 ± 0,90 <sup>e</sup>	3285 ± 130 <sup>b</sup>	5,15 ± 0,21 <sup>abc</sup>	4,66 ± 0,00 <sup>b</sup>
		50	8,81 ± 0,40 <sup>c</sup>	48,73 ± 1,7 <sup>e</sup>	3337 ± 87 <sup>bd</sup>	5,24 ± 0,14 <sup>bce</sup>	4,40 ± 0,31 <sup>ab</sup>
		75	12,09 ± 0,85 <sup>d</sup>	50,03 ± 1,15 <sup>be</sup>	3353 ± 149 <sup>bde</sup>	5,25 ± 0,40 <sup>bce</sup>	4,40 ± 0,43 <sup>ab</sup>
	EtOH 50%	25	4,17 ± 0,54 <sup>b</sup>	53,53 ± 0,74 <sup>f</sup>	3526 ± 142 <sup>e</sup>	5,63 ± 0,11 <sup>de</sup>	4,74 ± 0,11 <sup>b</sup>
		50	7,54 ± 0,35 <sup>e</sup>	53,16 ± 1,38 <sup>cf</sup>	3472 ± 236 <sup>de</sup>	5,85 ± 0,11 <sup>d</sup>	4,85 ± 0,61 <sup>b</sup>
		75	13,27 ± 0,85 <sup>f</sup>	53,16 ± 1,36 <sup>cf</sup>	3783 ± 230 <sup>c</sup>	5,36 ± 0,12 <sup>ce</sup>	4,59 ± 0,10 <sup>b</sup>

En cada columna para cada material, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias (p<0,05)  
Dis.: disolvente; T: temperatura

Para cada material se determinó si existe diferencia significativa entre las medias de las propiedades obtenidas a las diferentes condiciones ensayadas ( $p < 0,05$ ). En el caso del rendimiento de extracción, tanto la temperatura como el disolvente empleado, resultaron ser factores significativos tanto para la cáscara como para el erizo, siendo los rendimientos del erizo de castaña superiores a los de la cáscara para todas las condiciones ensayadas. Para ambos materiales, los menores rendimientos de extracción fueron los obtenidos con agua a la temperatura más baja de 25°C. Los rendimientos más elevados para ambos materiales fueron los obtenidos en las extracciones alcohólicas a 75°C, con EtOH 50% en el caso de la cáscara y con MeOH 50% en el caso del erizo. Además, para el erizo de castaña, este valor máximo resultó equivalente, desde el punto de vista del análisis de diferencias significativas, al obtenido con EtOH 50% a la misma temperatura de 75°C. Tal y como se observa en la figura 4.2.6 (a), para ambos materiales el rendimiento aumentó al hacerlo la temperatura. Como se ha puesto de manifiesto a lo largo de este trabajo, el rendimiento de extracción se ve favorecido al aumentar la temperatura, al aumentar la solubilidad y el coeficiente de difusión del soluto, además de facilitar que los compuestos fenólicos pasen al disolvente al romperse el tejido vegetal por efecto del calentamiento (Al-Farsi y Lee, 2008; Dai y Mumper, 2010; Tchabo et al., 2018). Para una temperatura fija, el rendimiento de extracción, tanto del erizo como de la castaña, aumentó en el siguiente orden según el disolvente: MeOH 50% > EtOH 50% > agua, a excepción de la extracción de cáscara a 75°C, en donde fue superior el rendimiento obtenido con EtOH 50%. Comparando ambos materiales, los rendimientos fueron superiores en las extracciones con erizo de castaña.

Respecto a las propiedades de los extractos, a diferencia del rendimiento, los extractos de cáscara presentaron mayor capacidad antioxidante que los de erizo según los métodos analizados. El disolvente resultó ser un factor significativo ( $p < 0,05$ ) para las propiedades de ambos extractos, a excepción de la capacidad antioxidante FRAP de los extractos de erizo obtenidos a 25°C y de la capacidad antioxidante ABTS de los de cáscara. La temperatura también resultó significativa en el caso del erizo y de las extracciones acuosas de cáscara. Sin embargo, la temperatura no resultó significativa en las extracciones metanólicas y etanólicas de cáscara de castaña, a excepción de la capacidad antioxidante FRAP de los extractos con EtOH 50% a 75°C. Este comportamiento se ve reflejado en la figura 4.2.6 (b-e) en donde se observa también, que en las condiciones en las que la temperatura fue un factor significativo, las propiedades antioxidantes aumentaron al hacerlo esta. A 25 y 50°C, las propiedades de los extractos de cáscara de castaña fueron dependientes del disolvente en el siguiente orden: EtOH 50% > MeOH 50% > agua; en el caso concreto de la capacidad de inhibición del radical ABTS, a 50°C los extractos acuosos presentaron mayor capacidad que los obtenidos con MeOH 50%. A la temperatura de 75°C las propiedades de los extractos de cáscara siguieron el siguiente orden: agua > EtOH 50% > MeOH 50%. En el caso del erizo de castaña, las propiedades antioxidantes variaron, a una temperatura fija, en el siguiente orden: MeOH 50% > EtOH 50% > agua, a excepción del contenido total en fenoles y la capacidad antioxidante ABTS a 25°C, en donde los valores más elevados se obtuvieron con agua.

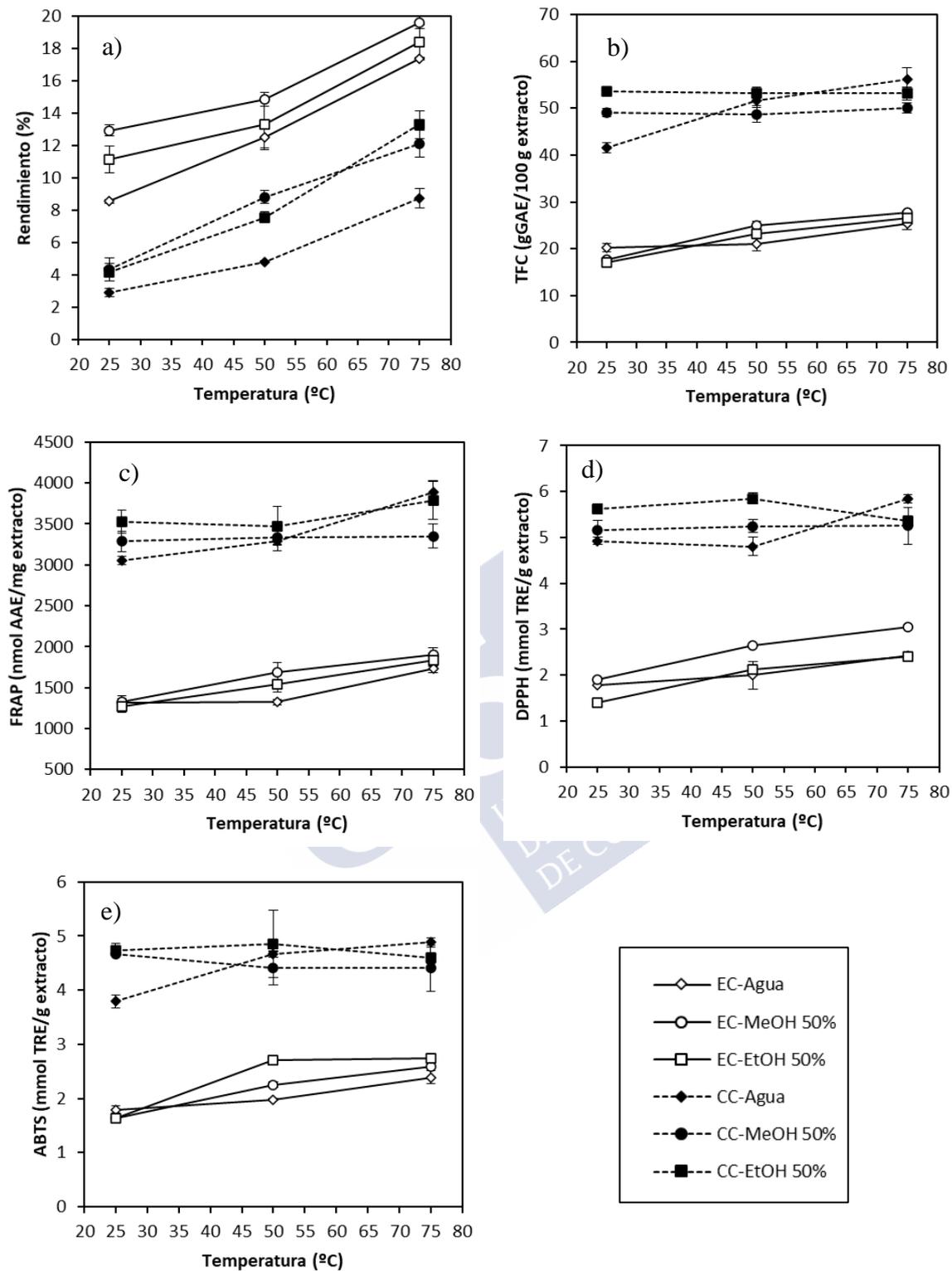


Figura 4.2.6 Influencia de la temperatura en el rendimiento de extracción (a), contenido en fenoles totales (b), capacidad antioxidante FRAP (c), DPPH (d) y ABTS (e) de los extractos de erizo (EC, línea sólida) y cáscara de castaña (CC, línea discontinua)

Para los extractos de cáscara de castaña, los mejores resultados de contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante FRAP y ABTS se obtuvieron con agua a 75°C (56,23 g GAE/100 g extracto; 3891 nmol AAE/mg extracto y 4,88 mmol TRE/g extracto, respectivamente) y la más alta capacidad de inhibición del radical DPPH se obtuvo con EtOH 50% a 50°C (5,85 mmol TRE/g extracto), aunque no se encontró diferencia significativa entre este valor y el obtenido con agua a 75°C. En el caso del erizo de castaña, los mejores resultados de contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante FRAP y DPPH se obtuvieron con MeOH 50% a 75°C (27,69 g GAE/100 g extracto; 1840 nmol AAE/mg extracto y 3,06 mmol TRE/g extracto respectivamente). En el caso de la capacidad antioxidante FRAP, el resultado obtenido con MeOH 50% a 75°C resultó significativamente igual al obtenido con EtOH 50% a la misma temperatura. En estas mismas condiciones se obtuvo la mayor capacidad según el método ABTS (2,74 mmol TRE/g extracto).

Para analizar las similitudes entre los diferentes extractos obtenidos para cada material, se aplicó un análisis de conglomerados estableciendo como criterio de similitud el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante según los métodos FRAP, DPPH y ABTS.

En la figura 4.2.7 (a) se muestra el dendograma obtenido para los extractos de cáscara de castaña. A la distancia de 1 se formó un único clúster integrado por los extractos obtenidos con MeOH 50% a 50 y 75°C. A la distancia de 3 se formó un segundo clúster integrado por los extractos obtenidos con EtOH 50% a 25 y 50°C. A la distancia de 4 se unieron al primer clúster los extractos de MeOH 50% a 25°C y a la distancia de 7 los obtenidos con agua a 50°C. A una distancia de 9, los extractos obtenidos con EtOH 50% a 75°C se unieron al segundo de los clústers formados y a la distancia de 10 se unieron los obtenidos con agua a 75°C. Considerando la distancia de corte en 11, el dendograma final está compuesto por tres clústers: el primero formado por las extracciones con MeOH 50% y agua a 50°C; el segundo formado por los extractos obtenidos con EtOH 50% y los acuosos a 75°C y un último clúster formado únicamente por los extractos obtenidos con agua a 25°C, que resultaron ser los de más bajas propiedades antioxidantes.

En la figura 4.2.7 (b) se muestra el dendograma obtenido para los extractos de erizo de castaña. En este caso, a la distancia de 1 se formaron dos clústers: el primero formado por las extracciones con MeOH 50% a 50°C y con agua a 75°C y el segundo formado por las de agua a 25 y 50°C. A este segundo clúster se unió, a una distancia de 4, las extracciones con MeOH 50% a 25°C y a la distancia de 7 las de EtOH 50% a 25°C. Al primer clúster formado se unen de manera sucesiva las extracciones de EtOH 50% a 75°C y a 50°C y las de MeOH 50% a 75°C, a las distancias de 5, 8 y 11 respectivamente. Seleccionando en este caso la distancia de corte en 10, el dendograma resultante está formado por tres clústers: el primero formado por las extracciones con EtOH 50% a 50 y 75°C, las de MeOH 50% a 50°C y las acuosas a 75°C; un segundo clúster formado por las extracciones con MeOH 50% a 75°C, las de mayor capacidad antioxidante de los extractos; y un último clúster formado por las extracciones con agua a 25 y 50°C y MeOH 50% y EtOH 50% a 25°C; que se corresponden con los extractos de menor capacidad antioxidante.

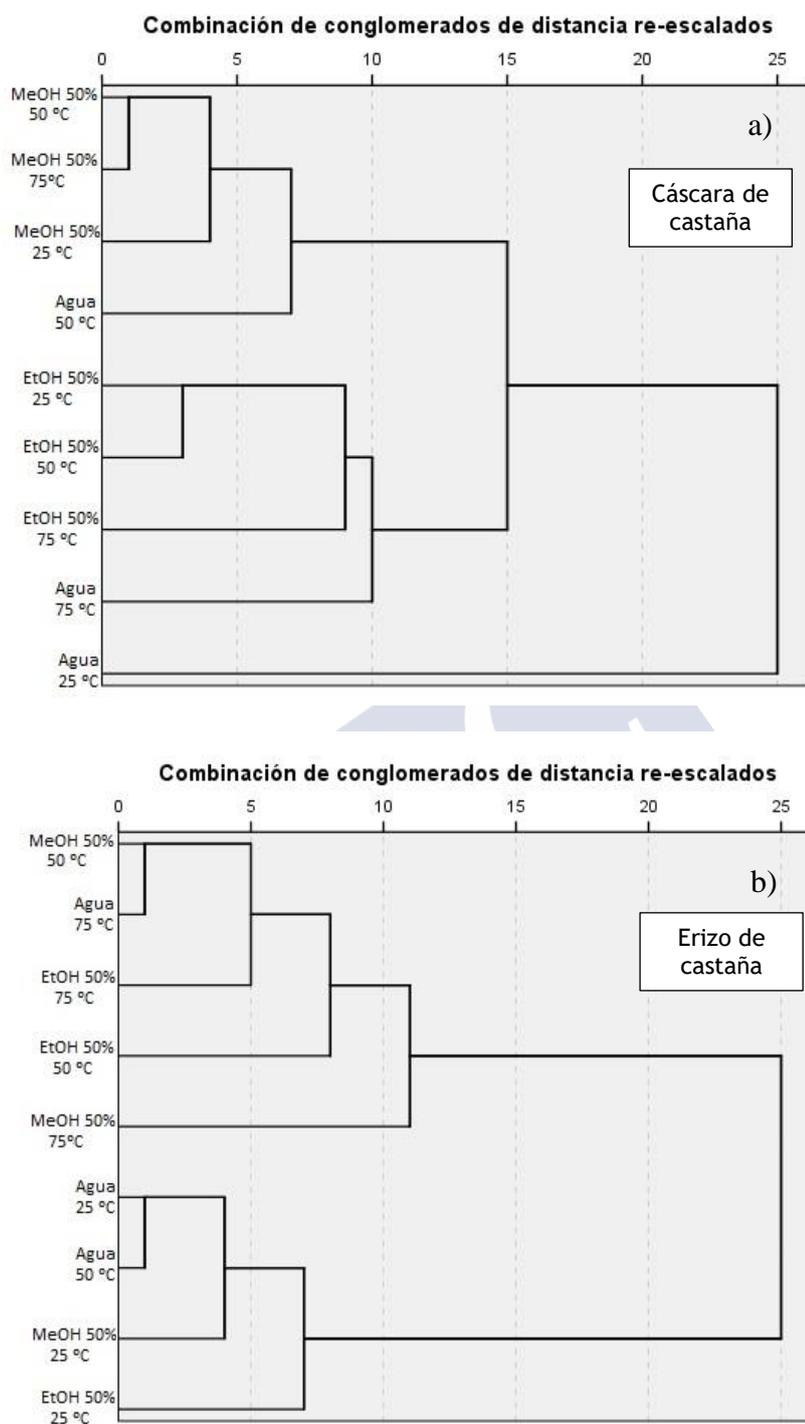
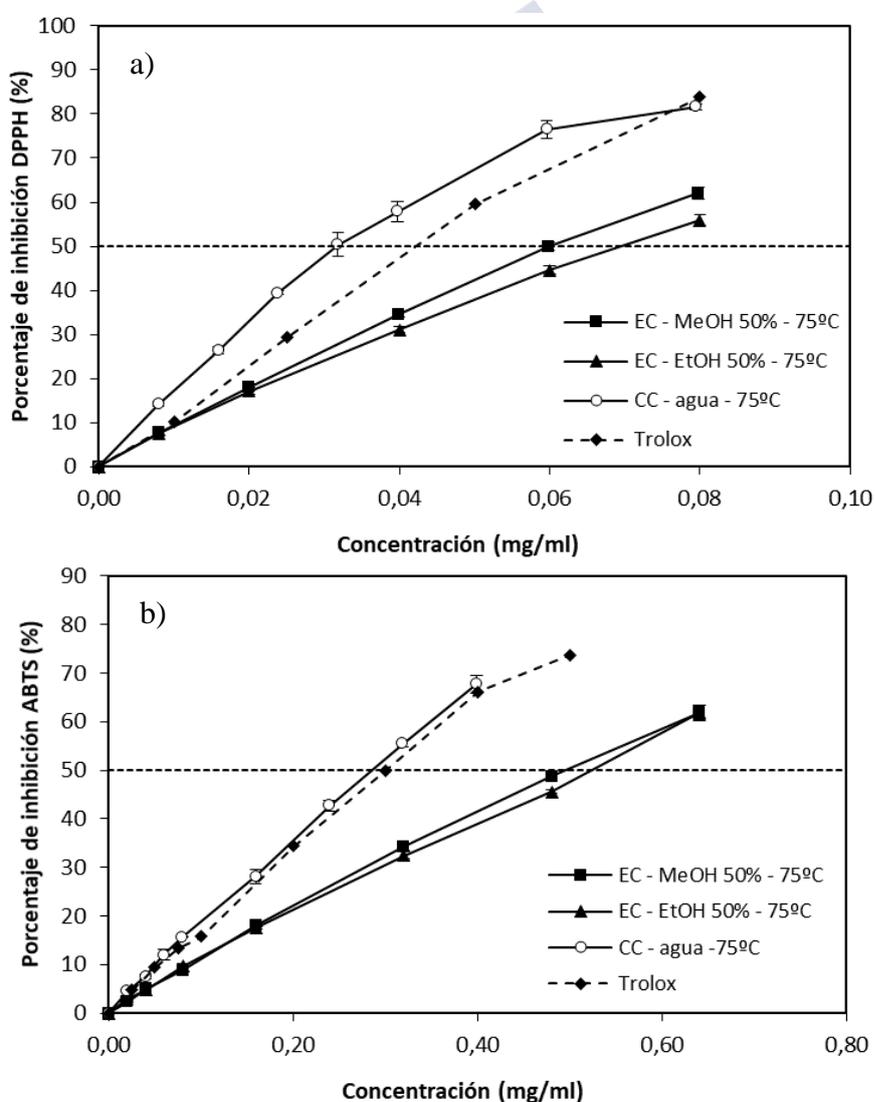


Figura 4.2.7 Dendrograma de los extractos de cáscara (a) y erizo (b) de castaña

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el rendimiento y propiedades de los extractos del erizo y cáscara de castaña, se seleccionaron como condiciones óptimas las correspondientes a las extracciones realizadas con agua a 75°C para la cáscara y con MeOH 50% a 75°C para el caso del erizo. En este caso, dado que los extractos obtenidos con EtOH 50% a 75°C proporcionaron resultados muy similares a los obtenidos con MeOH 50%, se va a priorizar el uso del etanol al ser una sustancia considerada como segura para su aplicación en

alimentos (GRAS). En la figura 4.2.8 se representa la capacidad de inhibición de los radicales DPPH y ABTS de los extractos seleccionados como óptimos para ambos materiales. Se representa también en la misma gráfica la capacidad de inhibición del Trolox, tomado con referencia. Se observó que, para ambos materiales, la capacidad de inhibición aumentó con la concentración de extracto siendo superior en los extractos de cáscara de castaña. Además, los extractos de castaña presentaron mayor capacidad de inhibición para ambos radicales que el compuesto de referencia (para el Trolox, DPPH  $EC_{50} = 0,042$  mg/ml y ABTS  $EC_{50} = 0,300$  mg/ml). Sin embargo, la capacidad de inhibición del erizo resultó ser inferior a la de este antioxidante sintético. Los valores de concentración a los que se alcanzó una inhibición del 50% fueron, para los extractos de cáscara de castaña obtenidos con agua a 75°C, los siguientes: DPPH- $EC_{50} = 0,031$  mg/ml y ABTS- $EC_{50} = 0,284$  mg/ml. Para los extractos de erizo de castaña, los valores de DPPH- $EC_{50}$  fueron de 0,059 mg/ml para los extractos obtenidos con MeOH 50% a 75°C y de 0,069 mg/ml para los obtenidos con EtOH 50% a 75°C; los valores de ABTS- $EC_{50}$  fueron de 0,498 mg/ml para los extractos metanólicos y de 0,514 mg/ml para los etanólicos a 75°C.



**Figura 4.2.8** Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos de erizo (EC) y cáscara (CC) de castaña comparados con los del compuesto de referencia Trolox

Para complementar el análisis de la capacidad antioxidante de los extractos de erizo y cáscara de castaña, se determinó, para los extractos acuosos a 75°C, la capacidad de inhibición frente al radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ). A diferencia de los radicales sintéticos DPPH y ABTS, el radical óxido nítrico es una especie reactiva presente en los sistemas biológicos. Se trata de una molécula que ejerce diferentes funciones de señalización en los procesos biológicos, como regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa contra agentes patógenos, relajación del músculo liso o regulación inmune. Si la capacidad del sistema biológico de neutralizar y eliminar las especies reactivas de nitrógeno no es suficiente, puede producirse una sobreproducción de NO que puede dar lugar a reacciones que alteran la estructura de las proteínas inhibiendo sus funciones (Valko et al., 2007; Harput et al., 2011).

La capacidad de inhibición del radical NO por los extractos acuosos de erizo y cáscara se muestra en la figura 4.2.9 que resultó dependiente de la concentración de extracto. A concentraciones bajas (0,1 mg/ml) fue ligeramente superior en los extractos de cáscara de castaña, siendo el valor de  $\text{EC}_{50}$  de  $0,055 \pm 0,008$  mg/ml para los extractos de erizo y de  $0,051 \pm 0,012$  mg/ml para los de cáscara. Para concentraciones superiores, la capacidad de inhibición de los extractos de erizo fue superior a los de cáscara de castaña. La capacidad de inhibición máxima para el radical óxido nítrico fue de 77,80% para los extractos acuosos de erizo y de 70,35% para los de cáscara de castaña. Tanto los extractos acuosos de erizo como los de cáscara de castaña presentaron una capacidad de inhibición frente al óxido nítrico superior a la de compuestos con capacidad antioxidante demostrada como el BHA o la quercetina ( $\text{EC}_{50}$  de 0,307 y 0,659 mg/ml, respectivamente; Harput et al., 2011).

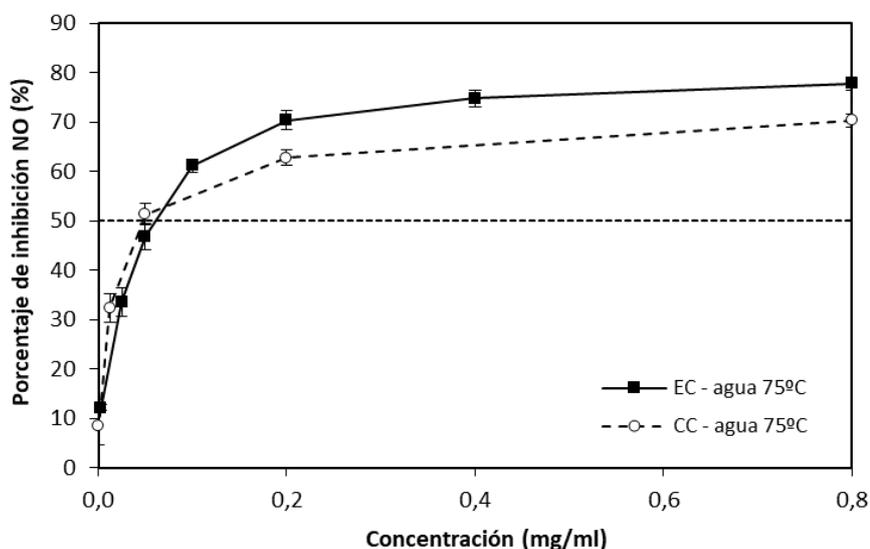


Figura 4.2.9 Porcentaje de inhibición del radical óxido nítrico de extractos acuosos a 75°C de erizo (EC) y cáscara (CC) de castaña

#### 4.2.3 Extracción asistida por microondas (EAM) de erizo y cáscara de castaña

En el estudio de optimización de la extracción del erizo de castaña, así como en los experimentos en los que se comparó el erizo con la cáscara, la técnica de extracción utilizada fue la maceración con disolvente, considerada como una de las técnicas convencionales más empleadas debido a su simplicidad, pero que presenta algunas desventajas como el empleo de grandes volúmenes de disolvente o la necesidad de tiempos elevados (Teo et al., 2013; Zengin et al., 2019). En esta etapa del trabajo se empleó una tecnología no convencional, la extracción asistida por microondas (EAM) para la obtención de compuestos bioactivos del erizo y cáscara de castaña y se compararon los resultados obtenidos con ambas tecnologías.

La extracción asistida por microondas es una de las tecnologías no convencionales más prometedoras y que presenta ventajas sobre las convencionales, como la necesidad de tiempos de extracción más bajos y menor cantidad de disolvente para obtener altos rendimientos de extracción sin degradar las propiedades de los compuestos, aunque el equipamiento necesario es más caro (Li et al., 2011; Oroian y Escriche, 2015; da Rosa et al., 2019; Tsaltaki et al., 2019; Zengin et al., 2019). La energía de microondas produce un sobrecalentamiento del agua presente en la matriz vegetal de forma que, al evaporarse, se produce presión en el interior de la pared celular que produce finalmente su ruptura, lo que facilita el paso de los compuestos bioactivos de la matriz al disolvente (Aspé y Fernández, 2011).

Los parámetros que mayor influencia tienen en la extracción asistida por microondas son el disolvente, la temperatura, la potencia de microondas y el tiempo de extracción (Osorio-Tobón, 2020). La selección del disolvente adecuado es fundamental ya que para absorber la energía de microondas son factores clave la constante dieléctrica y la polaridad del disolvente. El agua, el metanol, el etanol y sus disoluciones acuosas son disolventes apropiados para el empleo de EAM. Respecto a la temperatura, el uso de valores elevados favorece el proceso de extracción, pero debe ser controlada para evitar la degradación de los compuestos extraídos. Por este motivo debe ser también controlada la potencia de microondas, ya que una sobreexposición a la radiación de microondas puede producir un sobrecalentamiento de la muestra y afectar a las propiedades de los compuestos termolábiles (Teo et al., 2013; Osorio-Tobón, 2020). En cuanto al tiempo de extracción, fueron empleados con éxito tiempos entre 10 y 20 min (Osorio-Tobón, 2020), e incluso tiempos cercanos a 1 min, (Teo et al., 2013) en la extracción de materiales de origen vegetal. Otro de los factores a tener en cuenta es la relación sólido/líquido ya que el disolvente debe ser suficiente tanto como para garantizar el contacto con el material como la correcta agitación del medio (Wang y Weller, 2006; Xu et al., 2017).

Para poder comparar ambas tecnologías, en la extracción asistida por microondas de erizo y cáscara de castaña se emplearon los mismos disolventes que en la extracción convencional (agua, MeOH 50% y EtOH 50%) y las temperaturas seleccionadas fueron 50 y 75°C. El tiempo se redujo a 15 min y los extractos se caracterizaron en base al contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante FRAP. Los resultados se muestran en la tabla 4.2.8.

**Tabla 4.2.8** Extracción asistida por microondas. Rendimiento y propiedades antioxidantes de los extractos de erizo y cáscara de castaña

Material	Disolvente	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	TFC (g GAE/100 g extracto)	FRAP (nmol AAE/mg extracto)
Erizo de castaña	Agua	50	14,19 ± 0,59 <sup>a</sup>	21,47 ± 1,95 <sup>a</sup>	1384 ± 52 <sup>a</sup>
		75	20,12 ± 0,71 <sup>b</sup>	25,74 ± 2,70 <sup>ab</sup>	1919 ± 16 <sup>bc</sup>
	MeOH 50%	50	11,20 ± 1,05 <sup>c</sup>	28,45 ± 1,11 <sup>bc</sup>	1822 ± 1 <sup>b</sup>
		75	18,48 ± 0,48 <sup>bd</sup>	30,60 ± 1,22 <sup>bc</sup>	2173 ± 19 <sup>cd</sup>
	EtOH 50%	50	14,04 ± 0,57 <sup>a</sup>	29,92 ± 2,05 <sup>bc</sup>	1972 ± 65 <sup>bc</sup>
		75	17,91 ± 0,65 <sup>d</sup>	32,22 ± 0,26 <sup>c</sup>	2273 ± 69 <sup>d</sup>
Cáscara de castaña	Agua	50	3,17 ± 0,97 <sup>a</sup>	33,39 ± 1,86 <sup>a</sup>	1781 ± 105 <sup>a</sup>
		75	5,64 ± 1,16 <sup>ab</sup>	33,88 ± 1,62 <sup>a</sup>	2069 ± 73 <sup>b</sup>
	MeOH 50%	50	6,26 ± 0,77 <sup>b</sup>	46,49 ± 0,97 <sup>b</sup>	2940 ± 40 <sup>c</sup>
		75	10,75 ± 0,26 <sup>c</sup>	49,86 ± 0,24 <sup>b</sup>	3281 ± 35 <sup>d</sup>
	EtOH 50%	50	6,68 ± 0,52 <sup>b</sup>	34,89 ± 1,25 <sup>a</sup>	3143 ± 67 <sup>cd</sup>
		75	10,38 ± 0,72 <sup>c</sup>	40,75 ± 0,57 <sup>c</sup>	3220 ± 49 <sup>d</sup>

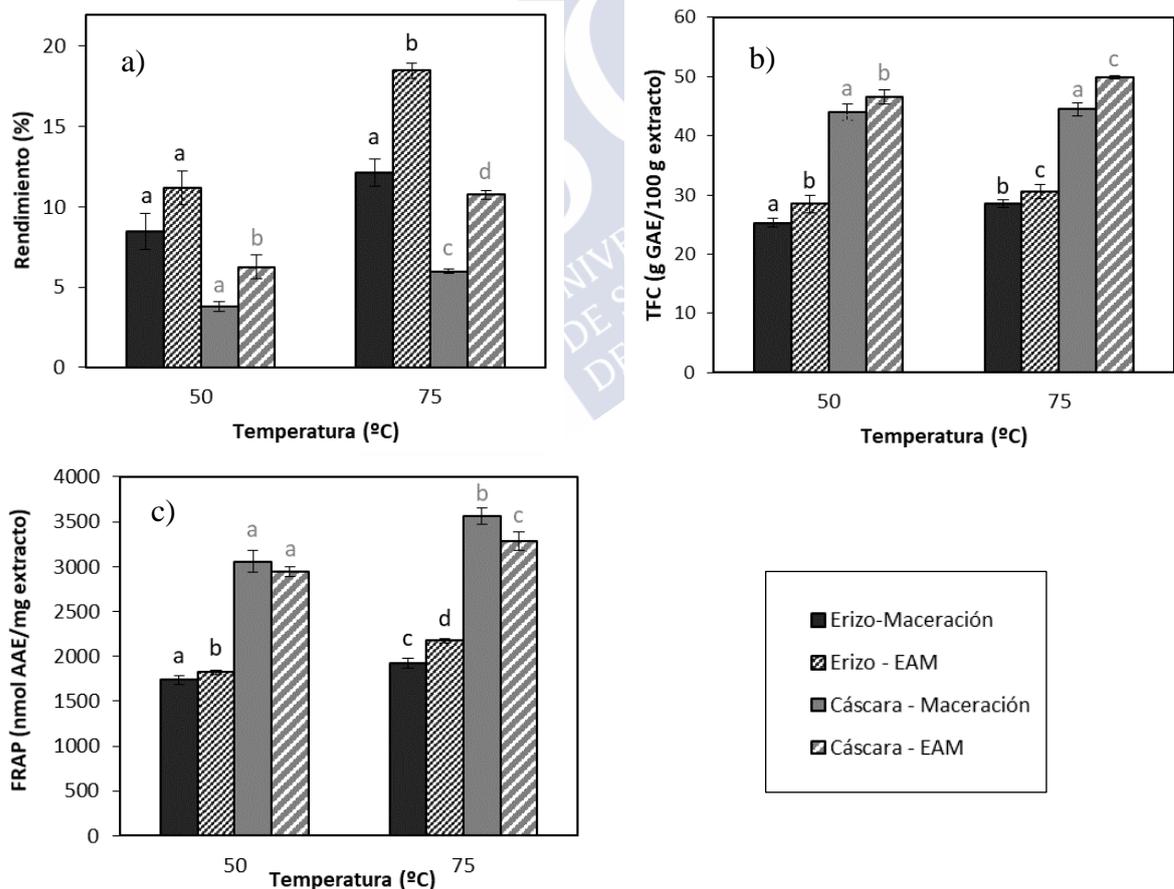
En cada columna para cada material, letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre las medias (p<0,05)

Los rendimientos de extracción más elevados, al igual que en la extracción convencional, se obtuvieron con el erizo de castaña mientras que las propiedades antioxidantes fueron superiores en los extractos de cáscara. Para el erizo de castaña, el rendimiento de extracción más elevado se obtuvo con agua a 75°C y los extractos con mayor capacidad antioxidante fueron los obtenidos con EtOH 50% a 75°C. En el caso de la cáscara de castaña, los rendimientos más altos se correspondieron con las extracciones con MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C siendo las extracciones metanólicas en las que se obtuvieron los extractos con mayor contenido en fenoles totales. Respecto a la capacidad antioxidante según el método FRAP, los extractos de MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C presentaron los valores más altos. Para ambos materiales, al aumentar la temperatura aumentaron tanto el rendimiento de extracción como la capacidad antioxidante FRAP. Respecto al contenido en fenoles totales, a excepción de los extractos de cáscara de castaña obtenidos con EtOH 50%, el aumento de la temperatura de 50 a 75°C no supuso un efecto significativo.

Comparando los resultados de la extracción asistida por microondas con los de la maceración con disolventes (Tabla 4.2.1) se observó que los rendimientos obtenidos para la cáscara de castaña con la tecnología de microondas fueron inferiores a los de la tecnología convencional. En el caso del erizo, la extracción asistida por microondas en las extracciones acuosas mejoró el rendimiento respecto a la maceración con disolventes; sin embargo, en las extracciones metanólicas los resultados obtenidos fueron similares con ambas tecnologías. Respecto a las propiedades de los extractos de cáscara de castaña, la extracción por microondas no supuso una ventaja frente a la convencional al obtenerse resultados muy similares en las extracciones con MeOH 50%, pero inferiores en el resto. Por el contrario, en el caso del erizo el uso de microondas mejoró las propiedades de los extractos metanólicos y etanólicos, manteniendo los acuosos en valores similares a los de la extracción convencional. Para la cáscara de castaña, el uso de microondas no supuso una ventaja frente a la maceración con disolventes. Este comportamiento fue también encontrado por Inglett et al. (2010) para extractos de trigo sarraceno. Para otros materiales como piel de granada, hojas de nogal, hojas de *Moringa oleifera* y *Cassia fistula* (Castro-López et al., 2017) y hojas de olivo (da Rosa et al., 2019) el uso de microondas frente a la extracción convencional supuso la obtención de

extractos con mayor capacidad antioxidante. En el caso del erizo y de la cáscara de castaña, no se tuvieron en cuenta parámetros como la relación sólido/líquido, la concentración de los disolventes o el tamaño de partícula del material que pueden influir en el proceso de extracción por microondas y podrían mejorar los resultados obtenidos (Wang y Weller, 2006).

En este análisis, además, el tiempo de las extracciones con microondas (15 min) fue inferior al de las extracciones convencionales. Para poder comparar los resultados entre ambas técnicas en similares condiciones, se realizaron nuevas extracciones con ambos materiales mediante maceración con MeOH 50%, seleccionando como tiempo de extracción el mismo que en la extracción con microondas, 15 min. En la figura 4.2.10 puede verse la comparación entre ambas técnicas. Se observó, que cuando el tiempo de extracción fue el mismo, tanto el rendimiento de extracción como el contenido en fenoles totales del erizo y de la cáscara de castaña fueron más altos en la extracción por microondas. Este mismo comportamiento se encontró en la capacidad antioxidante FRAP de los extractos de erizo, pero no en los de cáscara, para los que la mayor capacidad antioxidante FRAP fue la de los extractos obtenidos en la extracción convencional. Por tanto, a tiempos de extracción iguales, el uso de microondas presentó una clara ventaja frente a la maceración en cuanto al rendimiento de extracción, aunque no tan acusada en la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.



**Figura 4.2.10** Comparación entre los resultados obtenidos mediante extracción por maceración con disolventes y extracción asistidas por microondas (EAM) para el rendimiento de extracción (a), el contenido en fenoles totales (b) y la capacidad antioxidante FRAP (c). Para cada material, la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre las medias ( $p < 0,05$ ) (letra en negro, erizo de castaña; letra en gris, cáscara de castaña)

#### 4.2.4 Estudio de la cinética del proceso de extracción de erizo y cáscara de castaña

Para analizar la cinética del proceso de extracción del erizo y cáscara de castaña se realizaron extracciones a 25, 50 y 75°C a diferentes tiempos (entre 5 y 150 min). Las extracciones se llevaron a cabo de manera convencional y los disolventes seleccionados fueron agua y EtOH 50% al ser los más adecuados desde el punto de vista medioambiental.

En base a los resultados obtenidos para cada tiempo ensayado respecto al contenido en fenoles y a la capacidad antioxidante FRAP se construyeron las figuras 4.2.11 y 4.2.12 en donde se representó la evolución de estas propiedades frente al tiempo. Tanto el contenido en fenoles totales como la capacidad antioxidante se expresaron respecto al material de partida (en base seca, *bs*).

Para la modelización matemática de la cinética se aplicó el modelo de Peleg (Ecuación 3.6; apartado 3.5.2.4) en base a la similitud entre las curvas de extracción y las curvas de sorción-desorción. Los parámetros del modelo (las constantes de Peleg  $K_1$  y  $K_2$ , la tasa inicial de extracción  $B_0$  y la concentración máxima en el equilibrio  $C_e$ ) para cada curva se recogen en las tablas 4.2.9 y 4.2.10 junto con el coeficiente de determinación  $R^2$ . Los altos valores de  $R^2$  obtenidos confirmaron que el modelo de Peleg resultó adecuado para describir el proceso de extracción tanto del erizo como de la cáscara de castaña. Para el erizo de castaña, tanto para las curvas de contenido en fenoles totales como para la capacidad antioxidante FRAP, los valores del coeficiente de determinación resultaron superiores a 0,99 en las extracciones acuosas y a 0,94 en las etanólicas. Para la cáscara de castaña, las extracciones etanólicas se ajustaron al modelo de Peleg con un coeficiente de determinación superior a 0,91 en todos los casos, a excepción de la curva correspondiente a las extracciones acuosas a 50°C con valores cercanos a 0,87.

En base a los parámetros del modelo de Peleg se pudieron predecir los valores de contenido en fenoles y capacidad antioxidante, y tal y como puede observarse en las figuras 4.2.11 y 4.2.12, existió una elevada concordancia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. El modelo de Peleg ha resultado adecuado también para modelizar la cinética de extracción de otras especies como las semillas de uva (Bucić-Kojić et al., 2007), la soja (Jocić et al., 2010), la biomasa forestal (Piwowarska y González-Álvarez, 2012), la piel de patata (Kumari et al., 2017) o el orégano (Oreopoulou et al., 2020).

Respecto a la evolución con el tiempo, tal y como se observa en las figuras, para ambas propiedades analizadas se produjo un rápido crecimiento en los primeros 20 min para el erizo y en los primeros 40 min para la cáscara, tendiendo luego a un valor de equilibrio. En los primeros minutos del proceso, se produce una rápida transferencia al disolvente de los compuestos bioactivos localizados en la superficie y en las partículas rotas del material (Oreopoulou et al., 2020). En el caso del erizo, la tendencia a la estabilización de las propiedades a tiempos superiores a 20 min está en concordancia con los resultados obtenidos en el diseño experimental en el que el tiempo resultó no ser una variable significativa. Respecto a la evolución con la temperatura, los valores de ambas propiedades en el equilibrio ( $C_e$ ) aumentaron al aumentar la temperatura.

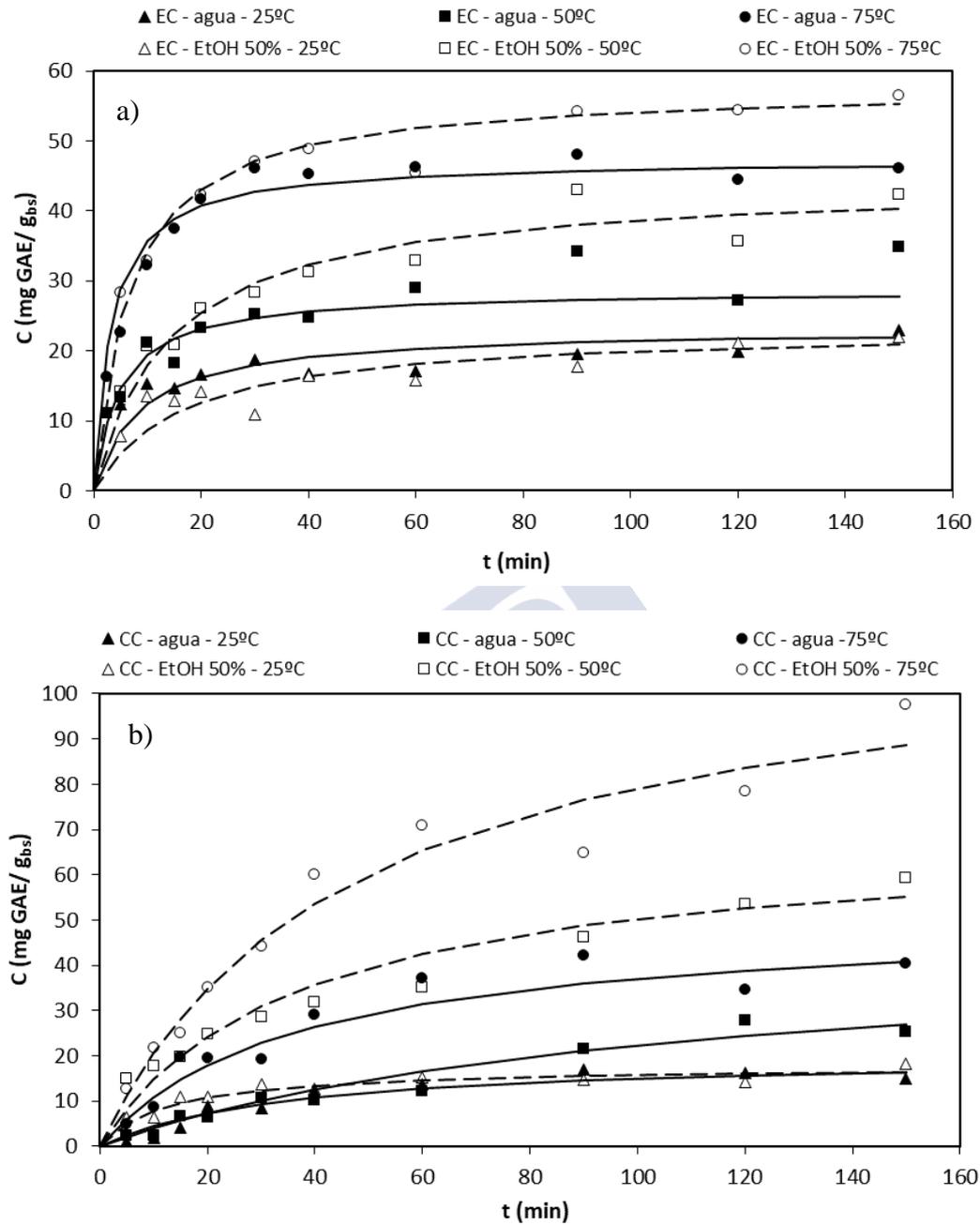


Figura 4.2.11 Contenido en fenoles totales de los extractos de erizo EC (a) y cáscara de castaña CC (b) frente al tiempo (símbolos) junto con los valores predichos por el modelo de Peleg (línea sólida: agua; línea punteada: EtOH 50%)

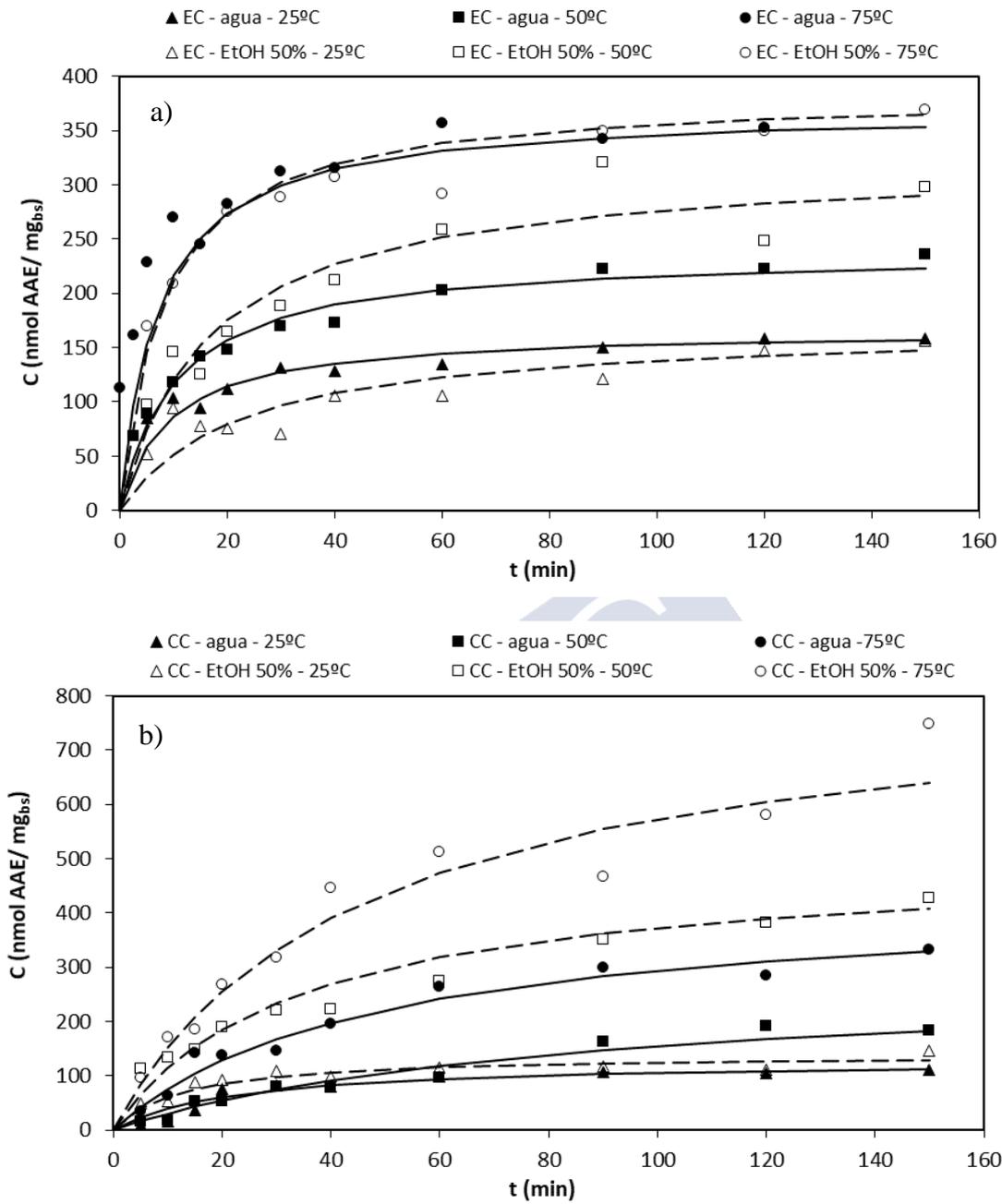


Figura 4.2.12 Capacidad antioxidante FRAP de los extractos de erizo EC (a) y cáscara de castaño CC (b) frente al tiempo (símbolos) junto con los valores predichos por el modelo de Peleg (línea sólida: agua; línea punteada: EtOH 50%)

Tabla 4.2.9 Parámetros del modelo de Peleg para el contenido en fenoles totales

Material	Disolvente	T (°C)	K <sub>1</sub> (min g <sub>bs</sub> /mg GAE)	K <sub>2</sub> (g <sub>bs</sub> /mg GAE)	B <sub>0</sub> (mg GAE/g <sub>bs</sub> min)	C <sub>e</sub> (mg GAE/g <sub>bs</sub> )	R <sup>2</sup>
Erizo de castaña	Agua	25	0,3771	0,043	2,65	23,26	0,9942
		50	0,1679	0,0348	5,96	28,74	0,9952
		75	0,0688	0,0211	14,53	47,39	0,9974
	EtOH 50%	25	0,7246	0,0431	1,38	23,20	0,9937
		50	0,3306	0,0226	3,02	44,25	0,9787
		75	0,1177	0,0173	8,50	57,80	0,9430
Cáscara de castaña	Agua	25	1,7707	0,0491	0,56	20,37	0,9162
		50	2,3119	0,0217	0,43	46,08	0,8748
		75	0,7181	0,0198	1,39	50,51	0,9338
	EtOH 50%	25	0,7428	0,0559	1,35	17,89	0,9701
		50	0,5332	0,0146	1,88	68,49	0,9505
		75	0,4018	0,0086	2,49	116,28	0,9447

K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>: constantes de Peleg  
 B<sub>0</sub>: tasa inicial de extracción  
 C<sub>e</sub>: concentración máxima en el equilibrio

Tabla 4.2.10 Parámetros del modelo de Peleg para la capacidad antioxidante FRAP

Material	Disolvente	T (°C)	K <sub>1</sub> (min g <sub>bs</sub> /nmol AAE)	K <sub>2</sub> (g <sub>bs</sub> /nmol AAE)	B <sub>0</sub> (nmol AAE/mg <sub>bs</sub> min)	C <sub>e</sub> (nmol AAE/mg <sub>bs</sub> )	R <sup>2</sup>
Erizo de castaña	Agua	25	0,0551	0,006	18,15	166,67	0,9964
		50	0,0432	0,0042	23,15	238,10	0,9951
		75	0,0192	0,0027	52,08	370,37	0,9981
	EtOH 50%	25	0,1338	0,0059	7,47	169,49	0,9498
		50	0,0520	0,0031	19,23	322,58	0,9665
		75	0,0213	0,0026	46,95	384,62	0,9929
Cáscara de castaña	Agua	25	0,1739	0,0078	5,75	128,21	0,9751
		50	0,2985	0,0035	3,35	285,71	0,8878
		75	0,1105	0,0023	9,05	434,78	0,9582
	EtOH 50%	25	0,0941	0,0071	10,63	140,85	0,9645
		50	0,0681	0,0020	14,68	500,00	0,9632
		75	0,0543	0,0012	18,42	833,33	0,9224

K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>: constantes de Peleg  
 B<sub>0</sub>: tasa inicial de extracción  
 C<sub>e</sub>: concentración máxima en el equilibrio

### 4.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE CHAPAS DE EUCALIPTO.

Tras analizar el efecto del disolvente, de la temperatura y del tamaño de partícula en las extracciones preliminares de chapa de eucalipto, se concluyó que el EtOH fue el disolvente con el que se obtuvieron los extractos con mejores propiedades antioxidantes trabajando con la chapa de eucalipto sin moler. Sin embargo, el rendimiento obtenido en esas condiciones fue bajo ( $2,87 \pm 0,54\%$ ), por lo que se decidió aplicar la tecnología de extracción asistida por microondas para intentar incrementar el rendimiento y reducir el tiempo de extracción.

Para optimizar el proceso de extracción (EAM) de la chapa de eucalipto, se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta seleccionando un diseño experimental Box-Behnken. El disolvente empleado fue EtOH y la chapa se extrajo sin moler. Como se explicó en los apartados 3.3.3 y 3.5.3, la potencia de microondas se fijó en 150 W y las variables independientes seleccionadas fueron la temperatura ( $x_1$ , 50-60-70°C), la relación líquido/sólido ( $x_2$ , 5/1, 7,5/1 y 10/1 ml/g) y el tiempo ( $x_3$ , 5-10-15 min). Las variables dependientes a analizar fueron el rendimiento de extracción ( $Y_1$  %), el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) y la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto). Los valores experimentales se ajustaron a un polinomio de segundo orden que tiene en cuenta el efecto de las variables independientes, las interacciones dobles entre variables, así como los efectos cuadráticos (ecuación 3.2; apartado 3.5.2.1). En la tabla 4.3.1 se muestran las condiciones experimentales y los resultados obtenidos para las variables dependientes junto con los valores predichos por el modelo y en la tabla 4.3.2 se resumen los valores de los coeficientes del modelo de segundo orden obtenidos junto con los parámetros estadísticos y la significación del modelo.

Los valores más elevados de rendimiento de extracción fueron los correspondientes al experimento 8 realizado a 60°C, relación líquido/sólido de 10/1 ml/g y 15 min. En el experimento 7, en similares condiciones, pero tiempo de 5 min se obtuvieron los extractos con mayor contenido en fenoles totales. Los extractos con mayor capacidad antioxidante FRAP se correspondieron a los obtenidos en las condiciones intermedias de 60 °C, relación líquido/sólido de 7,5/1 ml/g y 10 min. Los resultados experimentales obtenidos para el contenido en fenoles totales (entre 57,31 y 69,45 g GAE/100 g extracto) y la capacidad antioxidante FRAP (entre 3891 y 5444 nmol AAE/mg extracto) fueron inferiores a los valores obtenidos con etanol a 50°C empleando la técnica convencional de maceración por disolvente (Tabla 4.1.4; 85,71 g GAE/100 g extracto y 7787 nmol AAE/mg extracto, respectivamente). La radiación microondas pudo haber degradado los compuestos extraídos afectando a sus propiedades antioxidantes (Inglett et al., 2010; Osorio-Tobón, 2020).

Tabla 4.3.1 Diseño experimental Box-Behnken para la EAM de chapas de eucalipto con EtOH

EXP	T <sup>a</sup>	Relación l/s	Tiempo	Rendimiento, Y <sub>1</sub> (%)		TFC, Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)		FRAP, Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)				
	°C	ml/g	min	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.			
1	50	5/1	10	2,03	1,77	57,31	56,08	3891	3902			
2	50	7,5/1	5	1,44	1,48	60,64	61,76	4103	4396			
3	50	7,5/1	15	2,05	2,07	62,05	61,76	4615	4396			
4	50	10/1	10	1,34	1,77	67,49	67,45	5101	4996			
5	60	5/1	5	1,81	1,83	59,81	61,72	4538	4585			
6	60	5/1	15	2,40	2,42	61,34	61,72	4749	4585			
7	60	10/1	5	2,19	1,83	69,45	68,02	5114	5169			
8	60	10/1	15	2,85	2,42	66,67	68,02	5108	5169			
9	70	5/1	10	2,77	2,47	61,46	61,16	4884	4989			
10	70	7,5/1	5	2,20	2,18	63,41	61,76	5003	4974			
11	70	7,5/1	15	2,68	2,76	60,27	61,76	5019	4974			
12	70	10/1	10	1,99	2,47	61,48	62,37	5076	5065			
13	60	7,5/1	10	2,03	2,12	66,79	64,87	5379	5395			
14	60	7,5/1	10	2,10	2,12	66,32	64,87	5444	5395			
15	60	7,5/1	10	1,95	2,12	63,70	64,87	5363	5395			
Variables independientes				x <sub>1</sub> , Temperatura (°C)			x <sub>2</sub> , Relación líquido/sólido (ml/g)			x <sub>3</sub> , Tiempo (min)		
codificadas				-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1
sin codificar				50	60	70	5/1	7,5/1	10/1	5	10	15

Relación l/s: relación líquido/sólido; Exp: resultados experimentales; Pred: valores predichos por el modelo

Tabla 4.3.2 Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para la EAM de chapas de eucalipto

	Y <sub>1</sub> Rendimiento			Y <sub>2</sub> TFC			Y <sub>3</sub> FRAP		
	Coef.	DS	Valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p
a <sub>0</sub>	2,122	0,072	0,000	64,869	0,553	0,000	5395,333	90,952	0,000
a <sub>1</sub>	0,348	0,099	0,04	-	-	NS	289,000	55,696	0,001
a <sub>2</sub>	-	-	NS	3,146	0,517	0,000	292,125	55,696	0,001
a <sub>3</sub>	0,293	0,099	0,12	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>12</sub>	-	-	NS	-2,540	0,731	0,005	-254,500	78,766	0,012
a <sub>13</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>23</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>11</sub>	-	-	NS	-3,105	0,757	0,002	-424,792	81,983	0,001
a <sub>22</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-232,542	81,983	0,022
a <sub>33</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-285,542	81,983	0,008
R <sup>2</sup>		0,637			0,857			0,929	
R <sup>2</sup> corr.		0,576			0,818			0,876	
DS		0,280			1,462			156,530	
valor p		0,002			0,000			0,000	

a<sub>0</sub>: constante del modelo; a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> y a<sub>3</sub>: coeficientes de los efectos principales; a<sub>12</sub>, a<sub>13</sub> y a<sub>23</sub>: coeficientes de las interacciones dobles; a<sub>11</sub>, a<sub>22</sub> y a<sub>33</sub>: coeficientes de los efectos cuadráticos

Coef.: valor del coeficiente; DS: desviación estándar; valor p: probabilidad; NS: coeficiente no significativo para un nivel de confianza del 95%

R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup>corr.: coeficiente de correlación y coeficiente de correlación corregido

Se encontraron modelos significativos al nivel de confianza establecido del 95% para las tres variables dependientes analizadas siendo los coeficientes de regresión elevados (superiores a 0,8) en los modelos obtenidos para el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ ) y para la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ ). Aunque el coeficiente de correlación obtenido para el rendimiento ( $Y_1$ ) fue más bajo ( $R^2_{\text{corregido}}=0,566$ ) el modelo se consideró adecuado para determinar las variables que fueron significativas y su efecto sobre la variable respuesta, aunque el modelo no prediga con exactitud los valores de rendimiento en las diferentes condiciones experimentales. En la figura 4.3.1 se muestra a modo de ejemplo, la alta correlación encontrada entre los valores experimentales y los predichos por el modelo para la capacidad antioxidante FRAP. La correlación para el contenido en fenoles totales se puede observar en la tabla 4.3.1 ante la concordancia encontrada entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.

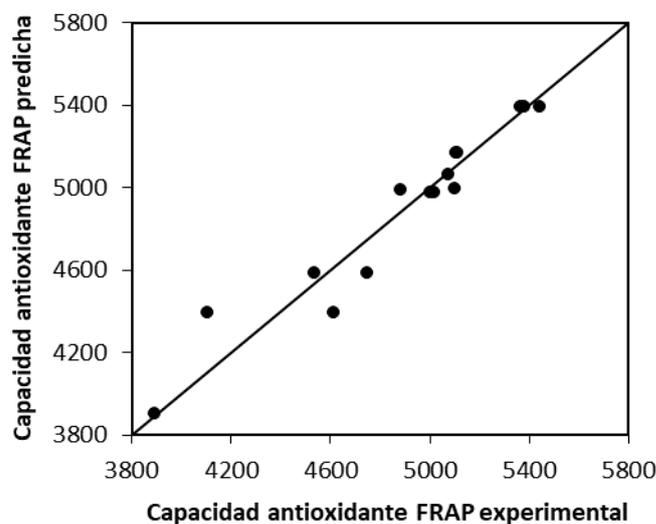


Figura 4.3.1 Valores experimentales frente a valores predichos para la capacidad antioxidante FRAP de extractos de chapas de eucalipto ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto)

En la tabla 4.3.2 se recogieron los efectos que resultaron significativos para cada variable dependiente estudiada. El rendimiento de extracción solo dependió de la temperatura y del tiempo, siendo el efecto lineal de la temperatura el más significativo. Para el contenido en fenoles totales, el efecto lineal en modo positivo de la relación líquido/sólido resultó ser el más significativo, seguido del efecto cuadrático de la temperatura y del efecto interactivo entre la temperatura y la relación líquido/sólido. La capacidad antioxidante FRAP dependió de manera lineal de la temperatura y de la relación líquido/sólido, del efecto interactivo entre la temperatura y la relación líquido/sólido y del efecto cuadrático de las tres variables. La variable menos significativa para las propiedades de los extractos fue el tiempo.

Los modelos obtenidos para cada variable dependiente analizada se resumen en la tabla 4.3.3 y en base a ellos se construyeron las superficies de respuesta que se presentan en las figuras 4.3.2-4.3.4.

Tabla 4.3.3 Ecuaciones del modelo para el diseño experimental Box-Behnken de la EAM de chapa de eucalipto

Variable dependiente	Ecuaciones del modelo
Rendimiento $Y_1$ (%)	$Y_1=2,122 + 0,348x_1^* + 0,293 x_3^*$
TFC $Y_2$ (g GAE/100 g extracto)	$Y_2=64,869 + 3,146 x_2^* -2,540 x_1^* x_2^* -3,105 x_1^{*2}$
FRAP $Y_3$ (nmol AAE/mg extracto)	$Y_3=5395,333 +289,000 x_1^* + 292,125 x_2^* - 254,500 x_1^* x_2^* -424,792 x_1^{*2} - 232,542 x_2^{*2} - 285,542 x_3^{*2}$

$x_1^*$ , temperatura codificada;  $x_2^*$ , relación líquido/sólido codificada;  $x_3^*$ , tiempo codificado

En la figura 4.3.2 se muestra la superficie de respuesta obtenida para el rendimiento de extracción en función del tiempo y de la temperatura. Se observó que el rendimiento aumentó al aumentar tanto el tiempo como la temperatura alcanzándose el valor más alto a la temperatura de 70°C y tiempo de 15 min. Sin embargo, los valores de rendimiento obtenidos fueron bajos (entre 1,34 y 2,85%) en comparación con los obtenidos con EtOH y EtOH 50% empleando maceración con disolvente (2,87-7,26%) y con otros materiales analizados en este trabajo. En este caso el uso del microondas no mejoró el rendimiento de extracción, pero consiguió reducir significativamente el tiempo necesario, 15 min frente a 90 min en la maceración con disolvente. Desde el punto de vista de la economía del proceso, la reducción del tiempo de extracción es una ventaja a tener en consideración.

En las figuras 4.3.3 y 4.3.4 se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante FRAP en función de la temperatura y de la relación líquido/sólido.

La superficie de respuesta obtenida para el contenido en fenoles totales (Figura 4.3.3) no dependió del tiempo de extracción e indicó la presencia de un máximo localizado fuera de la región de estudio de las variables. Se observó que al aumentar la relación líquido/sólido, a temperaturas inferiores a 60°C, aumentó el contenido en fenoles totales. Para temperaturas superiores a 60°C, el contenido en fenoles totales prácticamente no se vio afectado por cambios en la relación líquido/sólido. El valor más alto del contenido en fenoles totales se alcanzó para una temperatura de 55°C y una relación líquido/sólido de 10/1 ml/g.

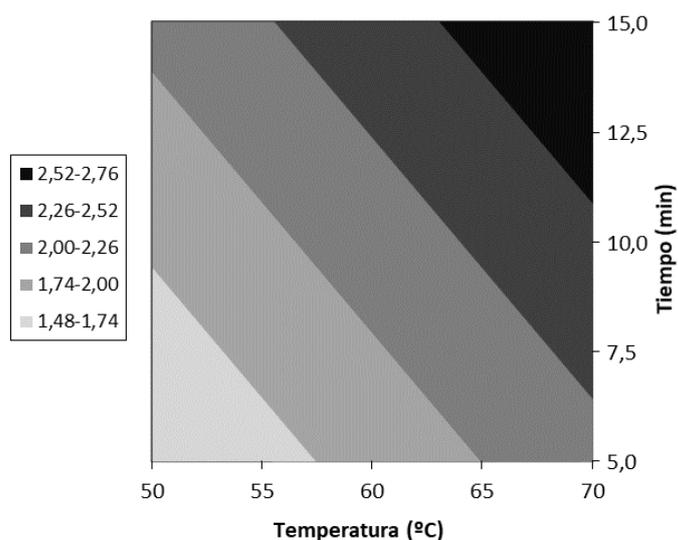


Figura 4.3.2 Superficie de respuesta para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) en función de la temperatura y del tiempo de la EAM de chapa de eucalipto

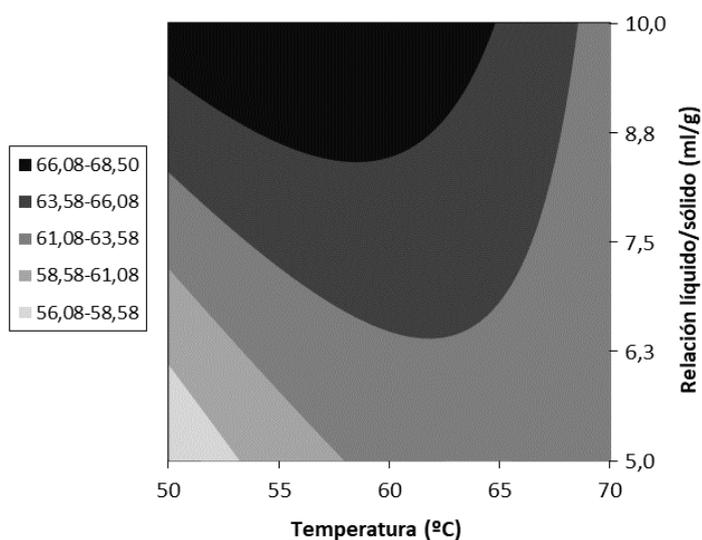
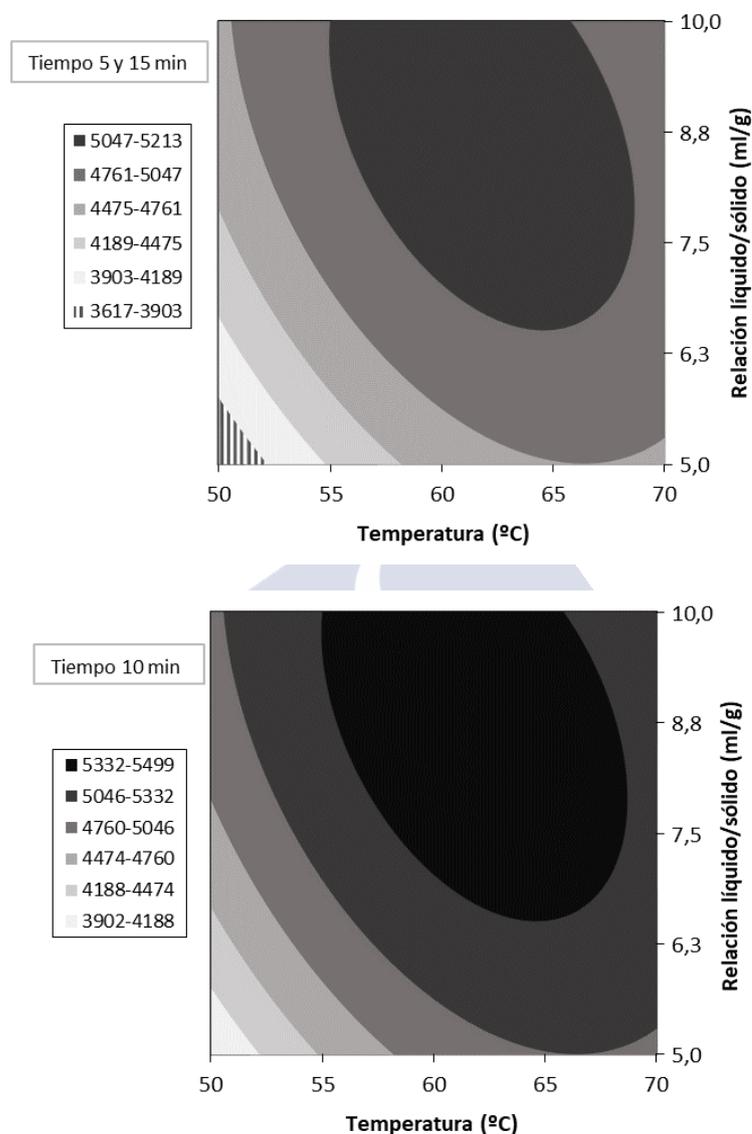


Figura 4.3.3 Superficie de respuesta para el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100g extracto) en función de la temperatura y la relación líquido/sólido de extractos obtenidos por EAM de chapa de eucalipto

La superficie de respuesta obtenida para la capacidad antioxidante FRAP en función de la temperatura y la relación líquido/sólido (Figura 4.3.4) mostró un punto de respuesta máximo situado a 62°C y relación líquido/sólido 8,8/1 ml/g de tal manera que, al alejarnos de este punto, disminuye la capacidad antioxidante de los extractos. El efecto de la temperatura y de la relación líquido/sólido sobre la capacidad antioxidante FRAP de los extractos fue más acusado a valores bajos de estas variables, presentando los extractos obtenidos entre 55 y 70°C y relación líquido/sólido superior a 6/1 ml/g valores muy similares de capacidad antioxidante. Respecto a la influencia del tiempo, al ser su efecto cuadrático, se observó que la capacidad antioxidante aumentó al pasar de 5 a 10 minutos para disminuir de nuevo al incrementar el tiempo a 15 minutos. Sin embargo, las diferencias obtenidas a los distintos tiempos no fueron significativas

siendo los valores máximos alcanzados para cada tiempo ensayado muy similares (5213 nmol AAE/mg extracto para 5 y 15 min y 5499 nmol AAE/mg extracto para 10 min).



**Figura 4.3.4** Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto) en función de la temperatura y la relación líquido/sólido para tiempo 5, 15 y 10 min para extractos obtenidos por EAM de chapa de eucalipto

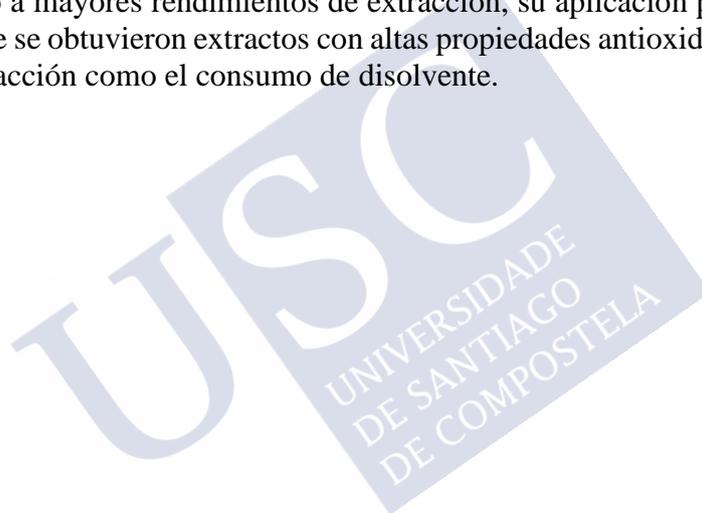
Teniendo en cuenta el análisis de todas las superficies de respuesta obtenidas en la extracción asistida por microondas de chapas de eucalipto, se seleccionaron las condiciones óptimas en las que se obtuvieron un alto rendimiento de extracción junto con buenas propiedades antioxidantes de los extractos. Además, se tuvieron en cuenta factores medioambientales buscando una solución de compromiso para alcanzar un rendimiento de extracción aceptable con un consumo energético menor. Estas condiciones se corresponden con temperatura de 62°C, relación líquido/sólido de 8,8/1 ml/g y tiempo de 10 min. En la tabla 4.3.4 se resumen las propiedades de los extractos predichas por el modelo en las condiciones en las

que cada variable dependiente analizada alcanzó su valor máximo, así como los valores de cada propiedad en las condiciones globales seleccionadas como óptimas.

Tabla 4.3.4 Propiedades de los extractos de chapa de eucalipto en las condiciones óptimas

Propiedades	Extracciones con EtOH	
	Valor más alto en el rango estudiado <i>(condiciones en las que se alcanzan)</i>	Óptimo 62°C - 8,8/1 ml/g - 10 min
Rendimiento Y <sub>1</sub> (%)	2,76 (70°C-15 min)	2,19
TFC Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)	68,5 (55°C-10/1 ml/g)	66,06
FRAP Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)	5499 (62°C-8,8/1 ml/g-10 min)	5499

Para la chapa de eucalipto, aunque el uso del microondas frente a la maceración con disolventes no condujo a mayores rendimientos de extracción, su aplicación presentó ventajas a tener en cuenta ya que se obtuvieron extractos con altas propiedades antioxidantes reduciendo tanto el tiempo de extracción como el consumo de disolvente.



#### 4.4 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE HOJAS DE NOGAL

En el estudio preliminar de la extracción de hojas de nogal (apartado 4.1.3) los mejores resultados se obtuvieron empleando una relación sólido/líquido de 1/10 g/ml utilizando EtOH 50% como disolvente. Como ya se planteó para otros materiales estudiados en este trabajo, en una segunda fase, con el objetivo de optimizar el proceso de extracción, se planificó un diseño experimental Box-Behnken para analizar el efecto de la temperatura ( $x_1$ , 25-50-75°C), el tiempo ( $x_2$ , 30-75-120 min) y la concentración de etanol en disolución acuosa ( $x_3$ , 10-50-90%, v/v) sobre el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %), el contenido en fenoles totales ( $Y_2$ , g GAE/100 g extracto) y la capacidad antioxidante FRAP ( $Y_3$ , nmol AAE/mg extracto), DPPH ( $Y_4$ , mmol TRE/g extracto) y ABTS ( $Y_5$ , mmol TRE/g extracto) de los extractos.

El diseño se compuso de doce experimentos y dos réplicas en el punto central, todos ellos realizados por duplicado. En la tabla 4.4.1 se muestran los valores que tomaron las variables independientes en cada experimento y los resultados experimentales obtenidos para las variables dependientes junto con los valores predichos por los modelos. El mayor valor de rendimiento y contenido en fenoles totales se obtuvo en el experimento 12, a 75°C, 120 min y 50% de EtOH. A la misma concentración de EtOH, pero a temperatura de 50°C y tiempo de 75 min (experimento 14) se obtuvo la mayor capacidad antioxidante FRAP y ABTS. Para el DPPH, el mayor valor se obtuvo en el experimento 9, a concentración intermedia de EtOH y a 75°C y 30 min. Los valores de los coeficientes del modelo de segundo orden (ecuación 3.2) junto con los parámetros y significación del modelo estadístico se resumen en la tabla 4.4.2.

En base a la comparación entre los resultados experimentales obtenidos y los predichos por el modelo (Tabla 4.4.1) y a los parámetros estadísticos determinados para cada variable dependiente (Tabla 4.4.2) se pudo concluir que los modelos obtenidos tanto para el rendimiento de extracción como para las propiedades de los extractos de hojas de nogal fueron significativos ( $p < 0,05$ ). Los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,91 para todos los modelos obtenidos, a excepción del correspondiente al contenido en fenoles totales que, aunque inferior ( $R^2_{\text{corregido}} = 0,789$ ), sigue siendo adecuado tanto para predecir el valor del contenido en fenoles totales de los extractos como para analizar el efecto de las condiciones de extracción sobre la variable dependiente. A modo de ejemplo, en la figura 4.4.1 se representan los valores experimentales frente a los calculados por el modelo para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ ) y la capacidad antioxidante DPPH ( $Y_4$ ).

En la tabla 4.4.3 se resumen los modelos obtenidos para cada variable dependiente analizada. Para todas las variables dependientes analizadas tanto la temperatura como la concentración de EtOH resultaron ser significativas. El efecto de la temperatura resultó ser en modo lineal positivo para todas las variables dependientes analizadas siendo una de las variables más significativas del proceso. La temperatura afectó también en modo negativo al rendimiento de extracción y a la capacidad de inhibición del radical DPPH a través de su efecto interactivo con la concentración de EtOH y a la capacidad de inhibición del radical ABTS a través de su efecto cuadrático. El efecto cuadrático de la concentración de EtOH fue otra de las variables más significativas afectando en modo negativo tanto al rendimiento como a las propiedades de los extractos. El tiempo resultó ser la variable menos significativa y solo afectó al rendimiento en modo lineal positivo y a la capacidad antioxidante ABTS en modo cuadrático negativo. A partir de las ecuaciones que modelizan cada variable dependiente analizada se construyeron los correspondientes mapas de superficie en función de las variables más significativas del proceso (Figuras 4.4.2-4.4.6).

Tabla 4.4.1 Diseño experimental Box-Behnken aplicado a la extracción de hojas de nogal

EXP	T <sup>a</sup>	t	[EtOH]	Rendimiento, Y <sub>1</sub> (%)		TFC, Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)		FRAP, Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)		DPPH, Y <sub>4</sub> (mmol TRE/g extracto)		ABTS, Y <sub>5</sub> (mmol TRE/g extracto)				
	°C	min	%, v/v	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.			
1	25	30	50	21,03±0,89	22,35	21,18±0,75	21,27	1181±39	1262	1,11±0,03	1,05	0,95±0,03	0,96			
2	25	75	10	20,35±0,18	19,86	14,87±0,35	16,80	842±46	908	0,66±0,04	0,67	0,67±0,03	0,77			
3	25	75	90	19,15±2,13	18,71	17,22±0,59	16,80	930±47	908	0,87±0,01	0,85	0,81±0,02	0,77			
4	25	120	50	23,89±0,28	24,16	22,28±0,71	21,27	1250±58	1262	1,01±0,16	1,05	1,05±0,05	0,96			
5	50	30	10	23,13±0,27	22,85	18,03±0,38	18,53	1160±37	1041	0,91±0,02	0,93	0,89±0,04	0,88			
6	50	30	90	20,03±1,16	19,96	18,46±0,42	18,53	1138±17	1041	0,92±0,04	0,93	0,87±0,05	0,88			
7	50	120	10	24,52±0,11	24,66	18,63±0,57	18,53	943±65	1041	0,87±0,04	0,93	0,87±0,03	0,88			
8	50	120	90	21,93±1,76	21,77	20,12±0,32	18,53	876±18	1041	1,00±0,04	0,93	0,88±0,03	0,88			
9	75	30	50	29,08±1,43	28,40	23,90±0,59	24,72	1364±42	1529	1,49±0,11	1,40	1,17±0,05	1,25			
10	75	75	10	27,01±0,30	27,64	20,46±0,52	20,25	1199±50	1174	1,19±0,02	1,20	1,09±0,04	1,06			
11	75	75	90	22,35±0,88	23,02	20,42±0,45	20,25	1238±32	1174	1,03±0,02	1,01	1,10±0,03	1,06			
12	75	120	50	30,17±0,09	30,21	24,57±0,67	24,72	1468±20	1529	1,32±0,05	1,40	1,26±0,02	1,25			
13	50	75	50	25,85±0,05	26,28	23,51±0,87	23,00	1389±78	1395	1,24±0,04	1,22	1,30±0,05	1,32			
14	50	75	50	27,19±0,51	26,28	22,52±0,42	23,00	1560±49	1395	1,19±0,03	1,22	1,33±0,03	1,32			
Variables independientes								x <sub>1</sub> , Temperatura (°C)		x <sub>2</sub> , Tiempo (min)		x <sub>3</sub> , EtOH (% v/v)				
codificadas								-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1
sin codificar								25	50	75	30	75	120	10	50	90

Exp: resultados experimentales  
 Pred: valores predichos por el modelo

Tabla 4.4.2 Coeficientes del modelo (Ecuación 3.2) y parámetros estadísticos del diseño Box-Behnken para las extracciones de hojas de nogal

	Y <sub>1</sub> Rendimiento			Y <sub>2</sub> TFC			Y <sub>3</sub> FRAP			Y <sub>4</sub> DPPH			Y <sub>5</sub> ABTS		
	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p	Coef.	DS	valor p
a <sub>0</sub>	26,281	0,274	0,000	22,999	0,306	0,000	1395,250	40,672	0,000	1,223	0,019	0,000	1,315	0,028	0,000
a <sub>1</sub>	3,024	0,274	0,000	1,725	0,306	0,000	13,250	40,672	0,006	0,173	0,019	0,000	0,143	0,019	0,000
a <sub>2</sub>	0,905	0,274	0,008	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>3</sub>	-1,444	0,274	0,000	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>12</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>13</sub>	-0,865	0,387	0,049	-	-	NS	-	-	NS	-0,093	0,027	0,005	-	-	NS
a <sub>23</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS
a <sub>11</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-0,083	0,028	0,012
a <sub>22</sub>	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-	NS	-0,125	0,028	0,001
a <sub>33</sub>	-3,973	0,387	0,000	-4,473	0,433	0,000	-354,500	57,519	0,000	-0,291	0,027	0,000	-0,315	0,028	0,000
R <sup>2</sup>		0,964			0,914			0,789			0,947			0,951	
R <sup>2</sup> corr.		0,947			0,901			0,757			0,934			0,933	
DS		0,774			0,866			115,038			0,053			0,055	
valor p		0,000			0,000			0,000			0,000			0,000	

a<sub>0</sub>: constante del modelo; a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> y a<sub>3</sub>: coeficientes de los efectos principales; a<sub>12</sub>, a<sub>13</sub> y a<sub>23</sub>: coeficientes de las interacciones dobles; a<sub>11</sub>, a<sub>22</sub> y a<sub>33</sub>: coeficientes de los efectos cuadráticos  
 Coef.: valor del coeficiente; DS: desviación estándar; valor p: probabilidad; NS: coeficiente no significativo para un nivel de confianza del 95%  
 R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup>corr.: coeficiente de correlación y coeficiente de correlación corregido

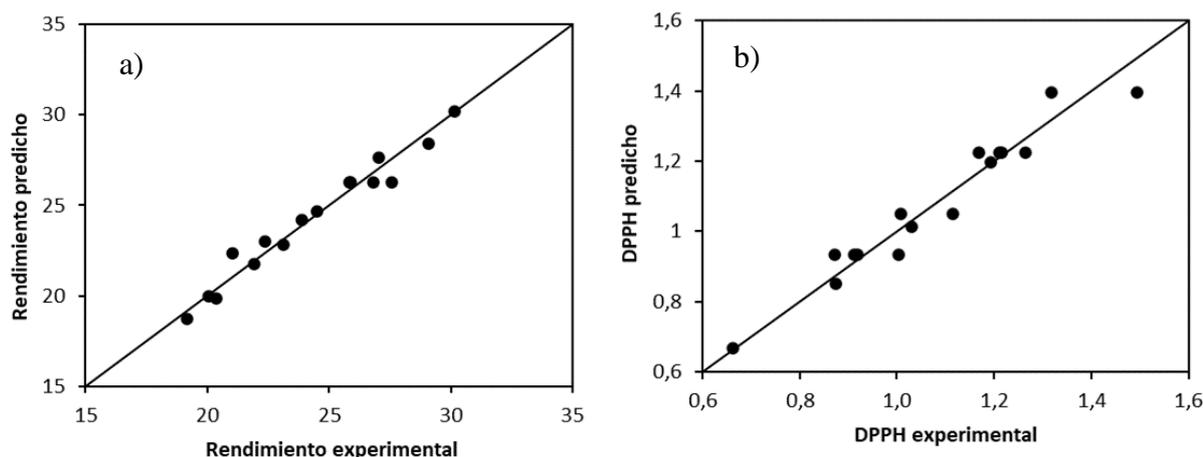


Figura 4.4.1 Valores experimentales frente a valores predichos para el rendimiento de extracción (a) ( $Y_1$ , %) y la capacidad antioxidante DPPH (b) ( $Y_4$ , mmol TRE/g extracto)

Tabla 4.4.3 Ecuaciones del modelo del diseño experimental Box-Behnken para la extracción de hojas de nogal

Variable dependiente	Ecuaciones de ajuste del modelo
Rendimiento $Y_1$ (%)	$Y_1=26,281 + 3,024x_1^* + 0,905 x_2^* - 1,444 x_3^* - 0,865 x_1^* x_3^* - 3,973 x_3^{*2}$
TFC $Y_2$ (g GAE/100 g extracto)	$Y_2=22,999 + 1,725 x_1^* - 4,473 x_3^{*2}$
FRAP $Y_3$ (nmol AAE/mg extracto)	$Y_3=1395,250 + 13,250 x_1^* - 354,500 x_3^{*2}$
DPPH $Y_4$ (mmol TRE/g extracto)	$Y_4=1,223 + 0,173 x_1^* - 0,093 x_1^* x_3^* - 0,291 x_3^{*2}$
ABTS $Y_5$ (mmol TRE/g extracto)	$Y_5=1,315 + 0,143 x_1^* - 0,083 x_1^{*2} - 0,125 x_2^{*2} - 0,315 x_3^{*2}$

$x_1^*$ , temperatura codificada;  $x_2^*$ , tiempo codificado;  $x_3^*$ , concentración de etanol codificada

El rendimiento de extracción varió entre 17,80% y 30,55% y las variables más significativas fueron la temperatura y la concentración de EtOH. En la figura 4.4.2 se representan las superficies de respuesta obtenidas para el rendimiento a los tres valores del tiempos ensayados, en las que se detectó la presencia de un máximo localizado fuera de los intervalos analizados de las variables. Los valores de rendimiento aumentaron al hacerlo el tiempo de extracción, aunque el valor más alto, que se alcanzó para una temperatura de 75°C y a una concentración de EtOH del 38%, fue similar para los tres tiempos ensayados (28,74% a 30 min, 29,64% a 75 min y 30,55% a 120 min).

Respecto al contenido en fenoles totales y a las propiedades antioxidantes de los extractos, solo la capacidad de inhibición frente al radical ABTS resultó dependiente del tiempo de extracción. Las superficies de respuesta para el contenido en fenoles totales, la capacidad antioxidante FRAP y la capacidad de inhibición del radical DPPH (Figuras 4.4.3, 4.4.4 y 4.4.5,

respectivamente) revelaron, al igual que para el rendimiento, la presencia de un máximo fuera de la región experimental hacia valores crecientes de la temperatura. El valor más alto de la variable dependiente se alcanzó a 75°C y 50% de EtOH para el contenido en fenoles totales y para la capacidad antioxidante FRAP y a 75°C y 44% de EtOH para la capacidad antioxidante DPPH. Sin embargo, no se valoró aumentar la temperatura de extracción ya que, además de problemas operacionales al perderse más disolvente por evaporación durante el proceso, aumentar la temperatura podría promover la degradación de los compuestos fenólicos extraídos afectando a sus propiedades antioxidantes (González et al., 2017; Tchabo et al., 2018).

Las superficies de respuesta para la capacidad de inhibición del radical ABTS (Figura 4.4.6) presentaron un máximo situado a 71,25°C y 50% de EtOH. La capacidad antioxidante ABTS fue la única de las propiedades en las que el tiempo resultó una variable significativa a través de su interacción cuadrática por lo que, al igual que en la capacidad antioxidante FRAP de los extractos de chapa de eucalipto, la capacidad antioxidante ABTS aumentó al pasar de 30 a 75 min para disminuir de nuevo a 120 min. Esto sugiere una posible degradación de los compuestos bioactivos al exponerlos al efecto de la temperatura durante más tiempo, por lo que al igual que ocurrió con la temperatura, no se valoró aumentar el tiempo de extracción a más de dos horas. Un comportamiento similar se encontró para las hojas de nogal extraídas en ultrasonidos con disoluciones acuosas de etanol (Nour et al., 2016).

Las condiciones óptimas seleccionadas, resultado del análisis global de todas las superficies de respuesta obtenidas, se correspondieron con las del experimento 12 del diseño (Tabla 4.4.1): 75°C, 50% EtOH y 120 min. Se seleccionó como temperatura óptima de extracción 75°C, ya que tanto el rendimiento como las propiedades de los extractos aumentaron al aumentar la temperatura. Respecto a la concentración de EtOH, los valores óptimos de rendimiento y de las propiedades de los extractos se encontraron a concentraciones entre 38% y 50%. Este rango está en concordancia con lo expuesto por otros autores que han demostrado que las disoluciones acuosas son más efectivas en la extracción de compuestos fenólicos que los disolventes puros (Spigno et al; 2007; Thoo et al., 2010; Tchabo et al; 2018). Se seleccionó como óptima la concentración de 50% de EtOH por ser la que condujo a los mayores valores para el contenido en fenoles totales y para la capacidad antioxidante FRAP y ABTS. Esta concentración fue casi idéntica a la determinada por Vieira et al. (2017) en la extracción de compuestos fenólicos de hojas de *Juglans regia* por maceración (50,5% ) y ligeramente inferior a la obtenida por Nour et al. (2016) en la extracción de hojas de nogal mediante ultrasonidos (62,82%). Dado que el tiempo fue la variable que menos afectó a las propiedades antioxidantes, se seleccionó como tiempo de extracción óptimo 120 min, al ser con el que se obtuvo el mayor rendimiento de extracción.

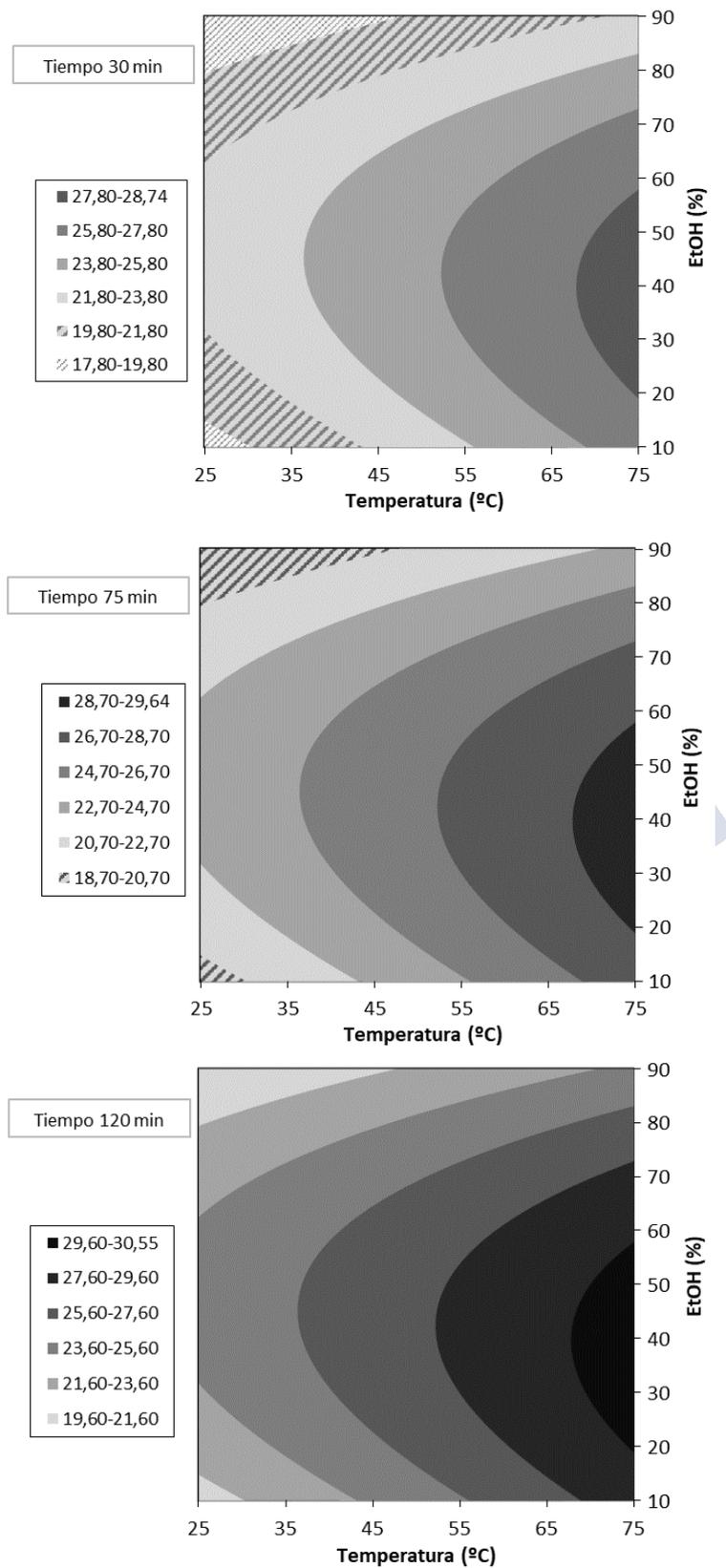


Figura 4.4.2 Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , %) de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH a 30, 75 min y 120 min

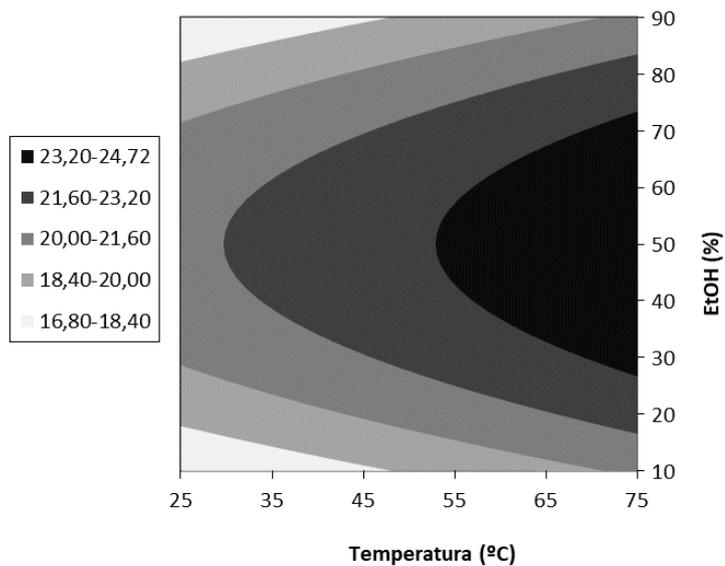


Figura 4.4.3 Superficie de respuesta para el contenido en fenoles totales (Y<sub>2</sub>, g GAE/100 g extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH

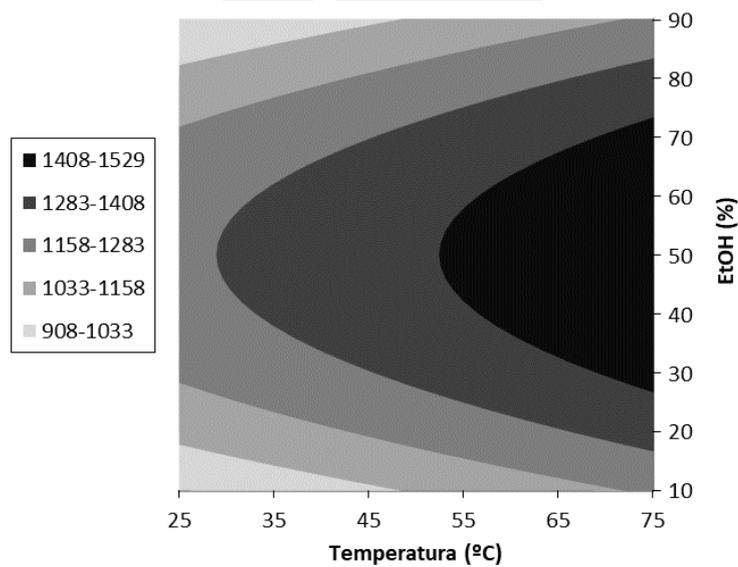


Figura 4.4.4 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante FRAP (Y<sub>3</sub>, nmol AAE/mg extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH

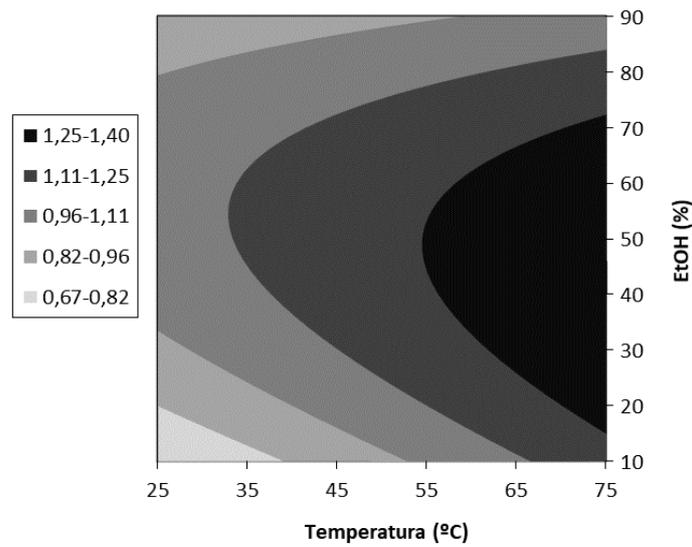


Figura 4.4.5 Superficie de respuesta para la capacidad antioxidante DPPH (Y<sub>4</sub>, mmol TRE/g extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y de la concentración de EtOH

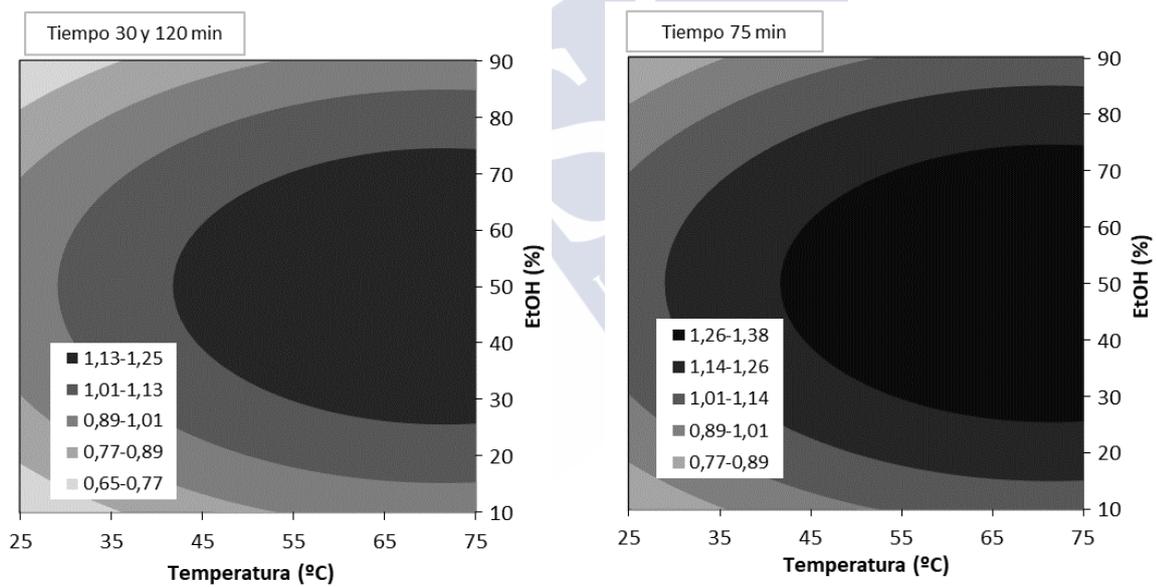


Figura 4.4.6 Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante ABTS (Y<sub>5</sub>, mmol TRE/g extracto) de los extractos de las hojas de nogal en función de la temperatura y la concentración de EtOH para tiempos de 30 y 120 min y 75 min

En la tabla 4.4.4 se resumen para todas las variables dependientes las condiciones que condujeron al valor más alto de las mismas en los intervalos ensayados, junto con los valores que alcanzó cada variable en las condiciones óptimas seleccionadas. Además, para comprobar la validez del modelo, se realizó una extracción por duplicado en las condiciones seleccionadas como óptimas mostrándose en la tabla 4.4.4 los resultados experimentales, que resultaron ser muy próximos a los predichos por el modelo.

Tabla 4.4.4 Propiedades de los extractos de hojas de nogal en las condiciones óptimas

Propiedades	Valor más alto en el rango estudiado (condiciones en las que se alcanzan)	Óptimo 75°C - 50% EtOH - 120 min	
		Predicho	Experimental
Rendimiento Y <sub>1</sub> (%)	30,55 (75°C - 38% EtOH - 120 min)	30,21	31,92±0,76
TFC Y <sub>2</sub> (g GAE/100 g extracto)	24,72 (75°C - 50% EtOH)	24,72	24,11±0,20
FRAP Y <sub>3</sub> (nmol AAE/mg extracto)	1529 (75°C - 50% EtOH)	1529	1473±35
DPPH Y <sub>4</sub> (mmol TRE/g extracto)	1,40 (75°C - 44% EtOH)	1,40	1,50±0,05
ABTS Y <sub>5</sub> (mmol TRE/g extracto)	1,38 (75°C - 50% EtOH - 75 min)	1,25	1,15±0,01

En la figura 4.4.7 se representa la capacidad de inhibición de los radicales DPPH y ABTS frente a la concentración de extracto comparando el extracto óptimo con el compuesto de referencia Trolox (DPPH EC<sub>50</sub> de 0,042 mg/ml y ABTS EC<sub>5</sub> de 0,300 mg/ml). Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, la capacidad de inhibición resultó dependiente de la concentración de extracto y aumentó al aumentar la concentración hasta alcanzar un valor de inhibición máximo en el caso del radical DPPH del 80%. Para ambos radicales los extractos presentaron una capacidad de inhibición inferior a la del Trolox, siendo la concentración a la que se alcanzó una inhibición del 50% (EC<sub>50</sub>) de 0,11 mg/ml para el radical DPPH y de 0,985 mg/ml para el ABTS. El valor de EC<sub>50</sub> obtenido para los extractos de hoja de nogal de *Juglans major* 209 x *Juglans regia* frente al radical DPPH resultó inferior y por tanto, de mayor capacidad antioxidante a los obtenidos con agua a ebullición de diversos cultivos de hoja de *Juglans regia* (0,151-0,202 mg/ml; Pereira et al., 2007) o a los obtenidos con metanol (0,199 mg/ml; Carvalho et al., 2010).

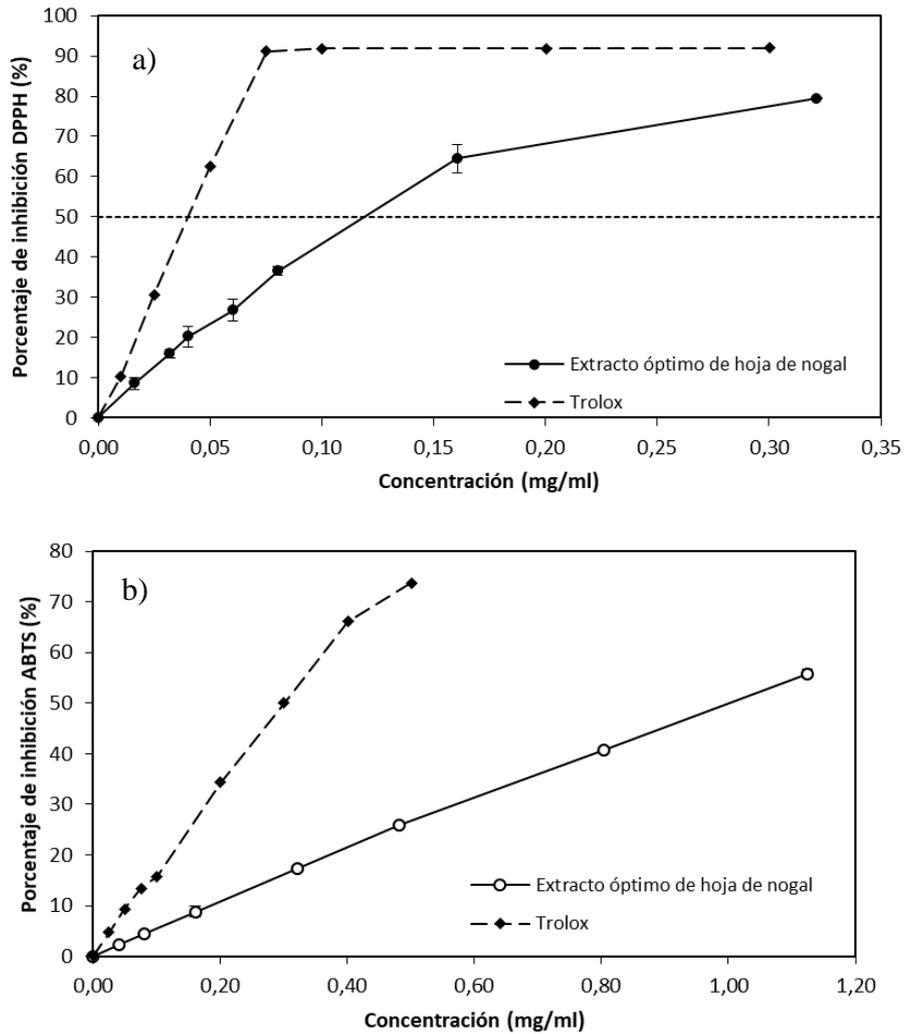


Figura 4.4.7 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (a) y ABTS (b) de extractos de hojas de nogal obtenidos en las condiciones óptimas comparados con los del compuesto de referencia Trolox

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE ERIZO Y CÁSCARA DE CASTAÑA, CHAPA DE EUCALIPTO Y PERICARPIO DE NUEZ

Los extractos fenólicos obtenidos de productos vegetales resultan interesantes no sólo por sus propiedades antioxidantes sino también por el potencial como agentes antimicrobianos que han demostrado tener (Pereira et al., 2007; Kavak et al., 2010; Živković et al., 2010; Luís et al., 2014; Carochó et al., 2018; Gullón et al., 2020). Por ello, en la actualidad, interesa la búsqueda de compuestos naturales que sean capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y levaduras y poder hacer frente al problema de resistencia, cada vez más presente, que presentan los patógenos a los tratamientos antibióticos actuales (Živković et al., 2010; Luís et al., 2014).

Así, en esta parte del trabajo se determinó la capacidad antimicrobiana de algunos extractos seleccionados, en concreto, los extractos acuosos de chapa de eucalipto obtenidos a 50°C a partir de la chapa sin moler (apartado 4.1.2), de pericarpio de nuez (apartado 4.1.3) y de erizo y cáscara de castaña obtenidos a 75°C (apartado 4.2.2).

Para todos los extractos se analizó la capacidad de inhibir el crecimiento de diversas bacterias Gram +: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis* y Gram -: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos de erizo y cáscara de castaña se testaron también frente a diversas levaduras: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*, así como los de chapa de eucalipto en los que, además de las levaduras nombradas (a excepción de la *Candida tropicalis* que no estaba disponible en el momento del análisis) se analizaron también la *Candida albicans* y *Candida krusei*. Los extractos de pericarpio de nogal no fueron probados frente a levaduras debido a que en estudios previos no se habían obtenido resultados positivos de su capacidad de inhibición frente a ellas (Oliveira et al., 2008).

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se aplicó el método de difusión radial indicado en el apartado 3.4.6. Una vez determinada la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada extracto, que es la concentración más baja a la que consigue inhibir el crecimiento de los microorganismos, se codificó su actividad antimicrobiana, desde extractos sin actividad antimicrobiana (radio de inhibición < 1 mm) a extractos con muy alta actividad (radio > 9 mm), en función del valor del radio de la zona de inhibición correspondiente al valor CIM, tal y como se indica en la tabla 4.5.1, resultando los valores de la capacidad inhibitoria mínima (CIM) de los extractos analizados frente a las bacterias y a las levaduras que se muestran en las tablas 4.5.2 y 4.5.3, respectivamente.

Tabla 4.5.1 Codificación de la actividad antimicrobiana en función del radio de inhibición

Radio de inhibición (mm)	<1	1-3	3-5	5-9	>9
Código	-	+	++	+++	++++
Actividad antimicrobiana	Sin actividad	Ligera	Moderada	Alta	Muy alta

Tabla 4.5.2 Actividad antimicrobiana frente a bacterias de extractos acuosos seleccionados

Material	CIM (mg/ml)					
	Bacterias Gram +				Bacterias Gram -	
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Erizo de castaña	10 (+)	10 (+)	5 (++)	5 (+)	20 (+)	20 (+)
Cáscara de castaña	2,5 (+)	2,5 (+)	2,5 (+)	2,5 (+)	2,5 (+)	2,5 (+)
Chapas de eucalipto	5 (+)	5 (+)	1 (+)	0,5 (++)	5 (+)	10 (++)
Pericarpio de nuez	20 (+)	50 (+)	50 (+)	50 (++)	100 (-)	100 (-)

Tabla 4.5.3 Actividad antimicrobiana frente a levaduras de extractos acuosos seleccionados

Material	CIM (mg/ml)					
	Levaduras					
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>
Erizo de castaña	50 (-)	50 (-)	50 (-)	50 (-)	NT	NT
Cáscara de castaña	50 (-)	50 (-)	50 (-)	50 (-)	NT	NT
Chapas de eucalipto	5 (++)	5 (++)	NT	100 (-)	5 (++)	100 (-)

NT: no testado

Como se observa, todos los extractos analizados fueron capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram + y, a excepción de los extractos de pericarpio de nuez, también las Gram -. Sin embargo, solo los extractos acuosos de chapa de eucalipto inhibieron el crecimiento de levaduras. Dado que la capacidad antimicrobiana está relacionada con la composición fenólica de los extractos, los diferentes comportamientos frente a los microorganismos analizados pudieron estar relacionados con su diferente composición y propiedades antioxidantes (Alvarez-Suarez et al., 2010; Živković et al., 2010).

Los extractos acuosos de cáscara de castaña, con un valor CIM de 2,5 mg/ml para todas las bacterias analizadas, presentaron mayor capacidad que los extractos de erizo de inhibir el crecimiento de las bacterias con una concentración de inhibición mínima para todos los microorganismos superior. La bacteria más sensible a la acción de los extractos de erizo fue la *S. aureus*, donde con un valor CIM de 5 mg/ml se consiguió una inhibición moderada de la bacteria. Las bacterias Gram - resultaron las más resistentes frente a los extractos de erizo, necesitando una concentración de 20 mg/ml para obtener una ligera inhibición de las mismas. Para ambos extractos, no se observó inhibición del crecimiento de las levaduras ni siquiera a la concentración más alta ensayada (50 mg/ml).

En la figura 4.5.1 se muestran los radios de inhibición de los extractos de erizo y cáscara de castaña en función de la concentración ensayada. Tanto para el erizo como para la cáscara, la actividad antimicrobiana aumentó al hacerlo la concentración de extracto. En el caso de los extractos de erizo se observó un rápido crecimiento inicial del radio de inhibición hasta la

concentración de 20 mg/ml, a partir de la cual los valores tendieron a estabilizarse. Para la bacteria más sensible, *S. aureus* la inhibición alcanzada a esa concentración fue muy alta. En general, la sensibilidad de las bacterias frente a los extractos de erizo siguió el siguiente orden: *S. aureus* > *S. epidermis* > *B. cereus* > *B. subtilis* > *P. aeruginosa* > *E. coli*, aunque a concentraciones de 100 mg/ml la inhibición alcanzada para la *P. aeruginosa* fue superior a la de todas las bacterias Gram +, a excepción de la *S. aureus*. En el caso de los extractos de cáscara de castaña, se produjo un rápido crecimiento del radio de inhibición hasta alcanzar la concentración de 5 mg/ml a partir de la cual se estabilizaron sus valores. La sensibilidad de las bacterias frente a los extractos de cáscara siguió el siguiente orden: *B. cereus* > *S. aureus* > *S. epidermis* > *B. subtilis* ≈ *P. aeruginosa* ≈ *E. coli*, aunque a la concentración CIM (2,5 mg/ml), los resultados para todas las bacterias fueron similares. Comparando los resultados con otros autores, Živković et al. (2010) encontraron también que extractos etanólicos de erizo y cáscara fueron también efectivos frente a *S. aureus* y *B. cereus*; sin embargo, los extractos etanólicos analizados por Silva et al. (2020) no mostraron efecto antimicrobiano frente a *B. cereus* ni *E. coli* ni tampoco frente a la *P. aeruginosa* en el caso de los extractos de erizo, siendo además los valores CIM superiores a los encontrados en esta tesis.

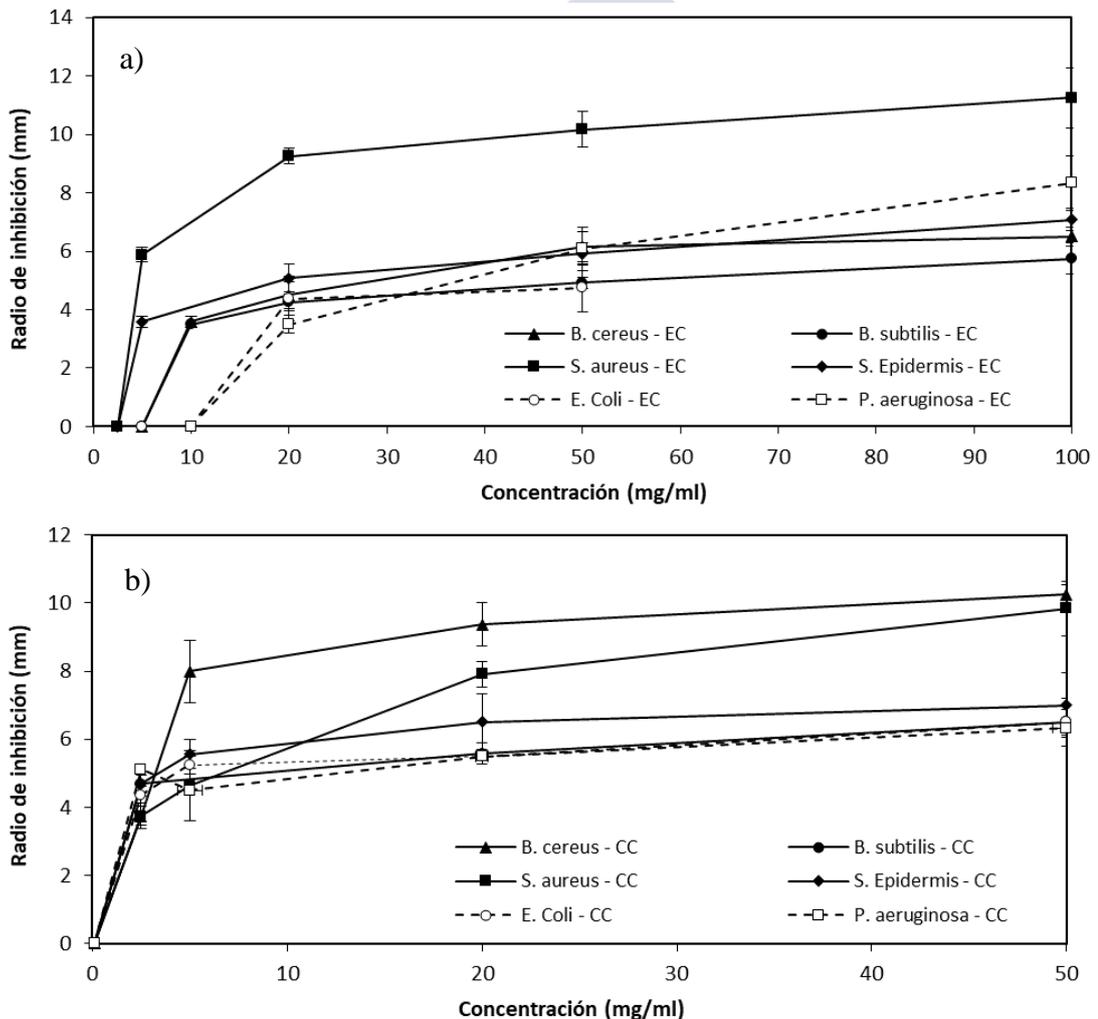


Figura 4.5.1 Radios de inhibición frente a bacterias de extractos acuosos de (a) erizo de castaña (EC) y (b) cáscara de castaña (CC) a diferentes concentraciones

Los extractos de chapa de eucalipto fueron, de todos los analizados, los que presentaron mayor capacidad antimicrobiana al conseguir inhibir tanto bacterias Gram + y Gram – como levaduras. De las cinco levaduras testadas, se consiguió inhibir la *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* a un valor de CIM de 5 mg/ml. Respecto a las bacterias analizadas, la *S. epidermis* resultó ser la más sensible al obtener una moderada inhibición para un valor CIM de 0,5 mg/ml y las más resistentes fueron las bacterias Gram - *E.coli* y *P. aeruginosa*. Tal y como se observa en la figura 4.5.2, los radios de inhibición aumentaron con la concentración con un crecimiento rápido a concentraciones bajas (5 mg/ml), a excepción de la *P. aeruginosa*, para luego estabilizarse. La sensibilidad de la chapa de eucalipto frente a las bacterias siguió el siguiente orden: *S. epidermis* > *S. aureus* > *B. cereus* > *B. subtilis* > *E. coli* > *E. aeruginosa* y frente a las levaduras: *C. krusei* > *C. parapsilosis* > *C. glabrata*. Los resultados estuvieron en concordancia con los extractos etanólicos y metanólicos de astillas de eucalipto (Luís et al., 2014) que resultaron efectivos tanto en la inhibición de bacterias como levaduras.

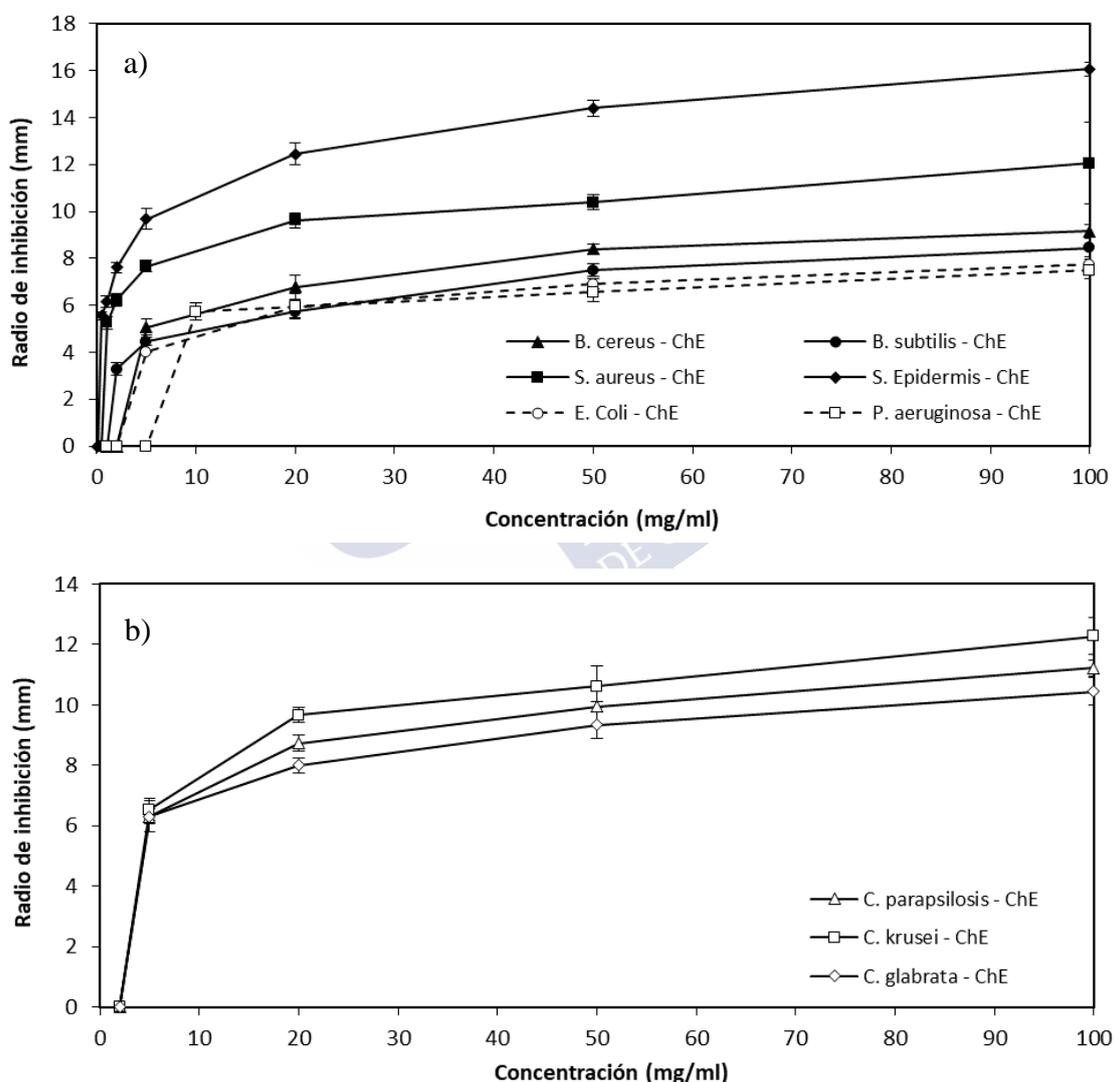


Figura 4.5.2 Radios de inhibición frente a bacterias (a) y levaduras (b) de extractos acuosos de chapa de eucalipto (ChE) a diferentes concentraciones

Los extractos de pericarpio de nuez resultaron los de menor capacidad antimicrobiana de entre los analizados, siendo solo capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram + y necesitando mayor concentración para conseguirlo que el resto de los extractos. La bacteria más sensible en este caso resultó la *B. cereus* con una concentración inhibitoria mínima de 20 mg/ml. Tal y como se observa en la figura 4.5.3, al aumentar la concentración de extracto de pericarpio de nuez, aumentó también el radio de inhibición para cada bacteria. A concentraciones elevadas de extracto, el mayor radio de inhibición se obtuvo frente a *S. epidermis*, mientras que la bacteria *S. aureus* resultó la más resistente. La capacidad antimicrobiana del pericarpio de nuez frente a *B. cereus*, *S.aureus* y *B.subtilis* fue también demostrada por Oliveira et al. (2008) encontrando además valores CIM inferiores.

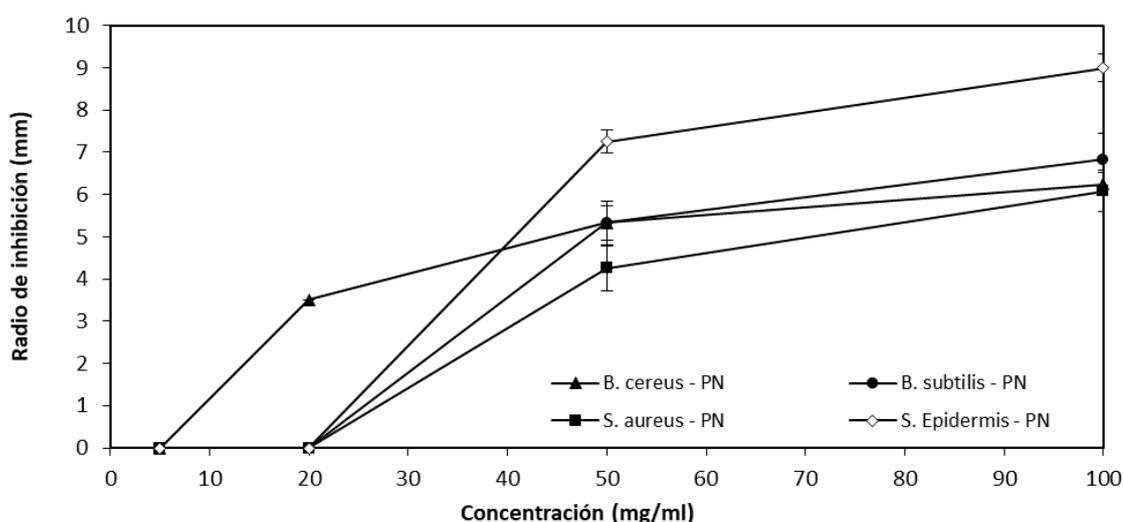


Figura 4.5.3 Radio de inhibición frente a bacterias de extractos acuosos de pericarpio de nuez (PN) a diferentes concentraciones

En general, las bacterias Gram - son menos susceptibles de ser inhibidas por los extractos, posiblemente porque poseen una membrana exterior con el componente lipopolisacárido que dificulta el paso de los compuestos al actuar como una barrera (Kavak et al; 2010; Silva et al., 2020). Aunque se ha encontrado que las bacterias Gram - y las levaduras son más resistentes a la acción de extractos vegetales (Luis et al., 2014), tanto los extractos de erizo y cáscara de castaña como los de chapa de eucalipto analizados en este estudio han demostrado ser capaces de inhibir tanto bacterias Gram + como Gram - e incluso levaduras en el caso de los extractos de chapa. Además, se encontró relación entre la capacidad antioxidante y la capacidad antimicrobiana de los extractos analizados, al ser los extractos con mayor contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante (en el orden chapas de eucalipto > cáscara de castaña > erizo de castaña > pericarpio de nuez) los que presentaron una mayor capacidad de inhibición del crecimiento de los microorganismos analizados.

## 4.6 ESTUDIO DEL PERFIL FENÓLICO DE LOS EXTRACTOS

Para determinar los compuestos fenólicos presentes en una selección de los extractos obtenidos en este trabajo se aplicaron diversas técnicas en función del material a analizar. En general, se seleccionaron aquellos extractos que presentaron mejores propiedades antioxidantes en los estudios de extracción previamente realizados. Los extractos de erizo y cáscara de castaña, de chapa de eucalipto, de involucro de avellana, de madera de acacia y de biomasa forestal se analizaron mediante espectrometría de masas RP-HPLC-ESI-TOF. Posteriormente, los compuestos fenólicos de extractos seleccionados de erizo y cáscara de castaña y de chapa de eucalipto fueron cuantificados mediante LC-MS/MS. Por último, los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hoja de nogal se cuantificaron mediante un análisis UPLC/ESI-QTOF-MS.

### 4.6.1 Análisis del perfil fenólico de extractos mediante espectrometría de masas RP-HPLC-ESI-TOF

Una selección de los extractos obtenidos en este trabajo se analizó por espectrometría de masas RP-HPLC-ESI-TOF. La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a la coincidencia con el peso molecular y tiempo de retención de compuestos estándar analizados bajo las mismas condiciones, aunque en algunos casos la identificación se asignó en base al peso molecular de compuestos referenciados en materiales similares. En las tablas 4.6.1-4.6.6 se muestran los compuestos identificados para cada extracto analizado (erizo y cáscara de castaña, chapa de eucalipto, involucro de avellana, madera de acacia y biomasa forestal) y en las figuras 4.6.1-4.6.4 los cromatogramas obtenidos. Se utilizó el código “IE” para indicar que el compuesto se identificó según el estándar y el código “IMZ” para indicar que se identificó en base a su peso molecular.

Los extractos de erizo (EC) y cáscara de castaña (CC) seleccionados fueron aquellos con la mayor capacidad antioxidante de los obtenidos en los estudios de extracción previos (apartado 4.2.2), en concreto, los extractos obtenidos con MeOH 50% a 75°C en el caso del erizo y los acuosos a 75°C en el caso de la cáscara. Se analizaron también los extractos obtenidos a 75°C con el resto de los disolventes empleados. En las figuras 4.6.1 y 4.6.2 y en las tablas 4.6.1 y 4.6.2 se muestran los cromatogramas obtenidos y los compuestos identificados en los extractos de erizo y cáscara, respectivamente.

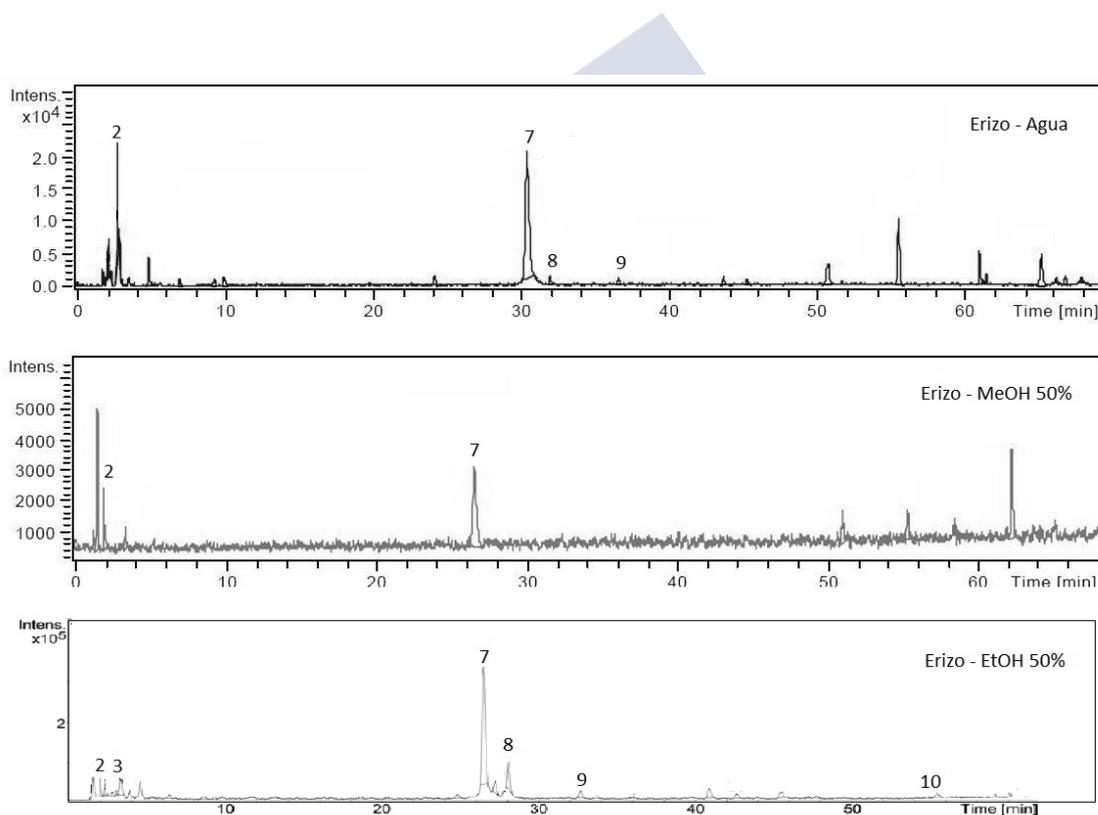
Los cromatogramas obtenidos para los extractos de erizo obtenidos resultaron similares para los tres extractos analizados. Sin embargo, en los extractos obtenidos con MeOH 50% solo se consiguieron caracterizar dos picos, lo que puede indicar que el resto de los compuestos que sí fueron identificados en los extractos acuosos o etanólicos estuvieran presentes en tan baja cantidad que no fueron detectados por el análisis. En el caso de la cáscara de castaña, los tres extractos presentaron también un perfil fenólico similar. En ambos residuos se identificaron ésteres de glucosa (mono, di y tri-galiloil glucosa), así como ácido elágico. El ácido gálico se identificó en todos los extractos de cáscara y en los etanólicos del erizo. Ambos compuestos están clasificados dentro del grupo de los taninos hidrolizables. Además, en los extractos acuosos y etanólicos del erizo se detectaron diversos flavonoides como la quercetina 3- $\beta$ -D-glucósido y la quercetina 3-O-rhamnósido, así como el flavonol kaempferol en los etanólicos. En los extractos de cáscara de castaña se detectaron compuestos de carácter condensado como la catequina, galocatequina y epigalocatequina, esta última solo en los extractos metanólicos.

Además, en la cáscara de castaña se identificaron atendiendo a su peso molecular el ácido protocatéquico y la vescalagina/castalagina, compuestos de carácter hidrolizable que también se detectaron en otras partes de la castaña (Vasconcelos et al., 2010).

**Tabla 4.6.1** Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de erizo de castaña

Pico	COMPUESTO	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	T.R. (min)	Erizo de castaña		
				Agua	MeOH 50%	EtOH 50%
2	Mono, di, tri-galoil glucosa	331,07/481,08/631,09	2,2	IE	IE	IE
3	Ácido gálico	169,01	3,0	-	-	IE
7	Ácido elágico	300,99	26,4	IE	IE	IE
8	Quercetina 3-β-D-glucósido	463,09	27,9	IE	-	IE
9	Quercetina 3-O-rhamnósido	447,10	32,6	IE	-	IE
10	Kaempferol	285,04	54,7	-	-	IE

T.R.: tiempo de retención  
IE: identificado según estándar



**Figura 4.6.1** Cromatograma HPLC de los extractos de erizo de castaña obtenidos con agua, MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C

Tabla 4.6.2 Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de cáscara de castaña

Pico	COMPUESTO	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	T.R. (min)	Cáscara de castaña		
				Agua	MeOH 50%	EtOH 50%
1	(-)-Epigallocatequina	305,07	1,4	-	IE	-
2	Mono, di, tri-galoil glucosa	331,07/481,08/631,09	2,2	IE	IE	-
3	Ácido gálico	169,01	3,0	IE	IE	IE
4	(-)-Galocatequina	305,06	4,7	IE	IE	IE
5	(+)-Catequina	289,07	10,4	IE	IE	IE
7	Ácido elágico	300,99	26,4	IE	IE	IE
-	Vescalagina/castalagina	933,63	-	IMZ	IMZ	-
-	Ácido protocatéquico	153,12	-	IMZ	-	IMZ

T.R.: tiempo de retención

IE: identificado según estándar

IMZ: identificado según peso molecular

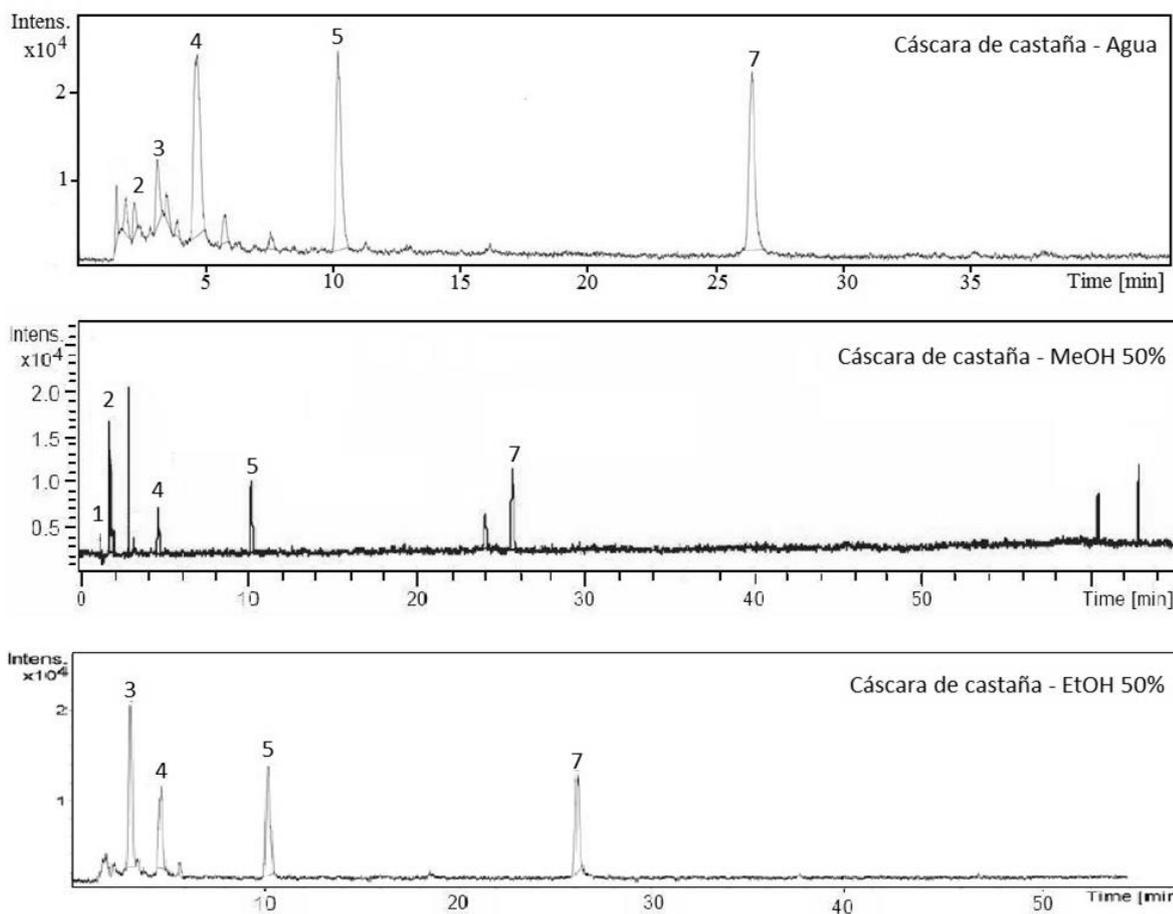


Figura 4.6.2 Cromatograma HPLC de los extractos de cáscara de castaña obtenidos con agua, MeOH 50% y EtOH 50% a 75°C

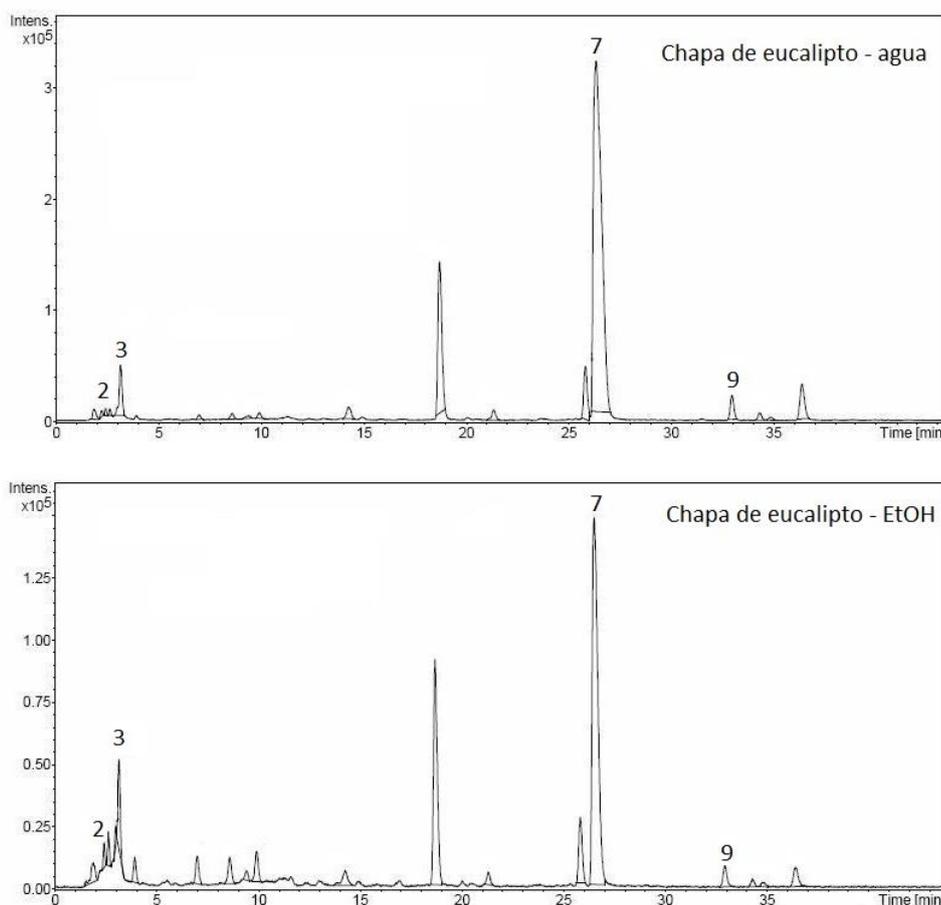
Los extractos de chapa de eucalipto (ChE) analizados fueron los de mayor capacidad antioxidante obtenidos mediante maceración con agua y EtOH a 50°C a partir de la chapa sin moler (apartado 4.1.2). Los cromatogramas obtenidos y los picos identificados se muestran en la figura 4.6.3 y en la tabla 4.6.3, respectivamente. Los cromatogramas resultaron similares y los compuestos identificados en los extractos acuosos y etanólicos fueron los mismos. El compuesto mayoritario en ambos casos fue el ácido elágico. Tanto la galoil glucosa como los ácidos gálico y elágico fueron también identificados en la corteza de eucalipto por Santos et al. (2011).

**Tabla 4.6.3** Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de chapa de eucalipto

Pico	COMPUESTO	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	T.R. (min)	Chapa de eucalipto	
				Agua	EtOH
2	Mono, di, tri-galoil glucosa	331,07/481,08/631,09	2,2	IE	IE
3	Ácido gálico	169,01	3,0	IE	IE
7	Ácido elágico	300,99	26,4	IE	IE
9	Quercetina 3-O-rhamnósido	447,10	32,6	IE	IE

T.R.: tiempo de retención

IE: identificado según estándar



**Figura 4.6.3** Cromatograma HPLC de los extractos de chapa de eucalipto obtenidos con agua y EtOH a 50°C

Se determinó también el perfil fenólico de los extractos de involucro de avellana, de madera de acacia y de biomasa forestal con mayores capacidades antioxidantes (apartado 4.1.4). Así, en las tablas 4.6.4, 4.6.5 y 4.6.6 se presentan los compuestos identificados en los extractos de involucro de avellana (In.Av) obtenidos con EtOH 50%, en los de madera de acacia (MAc) extraídos con EtOH y en los de biomasa forestal (BF) obtenidos con MeOH 50%, respectivamente. En la figura 4.6.4 se presentan los cromatogramas para cada extracto.

En los extractos etanólicos de involucro de avellana (Figura 4.6.4 y tabla 4.6.4) se identificaron seis compuestos entre los que se encuentran los ácidos gálico y elálgico y flavonoides como la catequina, la galocatequina, la quercetina 3-β-D-glucósido y quercetina 3-O-rhamnósido. Además, el ácido fenólico protocatéquico se pudo identificar en base a su peso molecular, cuya presencia fue confirmada en análisis elaborados por otros autores (Del Río et al., 2011; Ivanović et al., 2020). En los extractos etanólicos de madera de acacia (Figura 4.6.4 y tabla 4.6.5) se consiguieron identificar cuatro compuestos, entre ellos el ácido elálgico y los tres flavonoides: catequina, epicatequina y quercetina 3-O-rhamnósido. En el caso de los extractos metanólicos de biomasa forestal (Figura 4.6.4 y tabla 4.6.6), se identificaron siete compuestos en base a los compuestos estándar entre los que se encuentran ésteres de glucosa y los ácidos gálico y elálgico y diversos compuestos del grupo de los flavonoides y glucósidos de la quercetina. Además, en base al peso molecular se identificaron los ácidos protocatéquico y clorogénico y la naringenina cuya presencia también fue confirmada en extractos de corteza de eucalipto (Santos et al., 2011), que es un material que forma parte, junto con restos de pino y otras especies de la biomasa forestal analizada.

**Tabla 4.6.4** Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de involucro de avellana

Pico	COMPUESTO	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	T.R. (min)	Involucro de avellana
				EtOH 50%
3	Ácido gálico	169,01	3,0	IE
4	(-)-Galocatequina	305,06	4,7	IE
5	(+)-Catequina	289,07	10,4	IE
7	Ácido elálgico	300,99	26,4	IE
8	Quercetina 3-β-D-glucósido	463,09	27,9	IE
9	Quercetina 3-O-rhamnósido	447,10	32,6	IE
-	Ácido protocatéquico	153,12	-	IMZ

T.R.: tiempo de retención

IE: identificado según estándar

IMZ: identificado según peso molecular

**Tabla 4.6.5** Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de madera de acacia

Pico	COMPUESTO	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	T.R. (min)	Madera de acacia
				EtOH
5	(+)-Catequina	289,06	10,4	IE
6	(-)-Epicatequina	289,06	15,9	IE
7	Ácido elálgico	300,99	26,4	IE
9	Quercetina 3-O-rhamnósido	447,10	32,6	IE

T.R.: tiempo de retención

IE: identificado según estándar

Tabla 4.6.6 Compuestos fenólicos identificados mediante RP-HPLC-ESI-TOF en extractos de biomasa forestal

Pico	COMPUESTO	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	T.R. (min)	Biomasa forestal
				MeOH 50%
2	Mono, di, tri-galoil glucosa	331,07/481,08/631,09	2,2	IE
3	Ácido gálico	169,01	3,0	IE
5	(+)-Catequina	289,06	10,4	IE
6	(-)-Epicatequina	289,06	15,9	IE
7	Ácido elágico	300,99	26,4	IE
8	Quercetina 3-β-D-glucósido	463,09	27,9	IE
9	Quercetina 3-O-rhamnósido	447,10	32,6	IE
-	Ácido protocatéuico	153,12	-	IMZ
-	Ácido clorogénico	353,10	-	IMZ
-	Naringenina	271,26	-	IMZ

T.R.: tiempo de retención

IE: identificado según estándar

IMZ: identificado según peso molecular

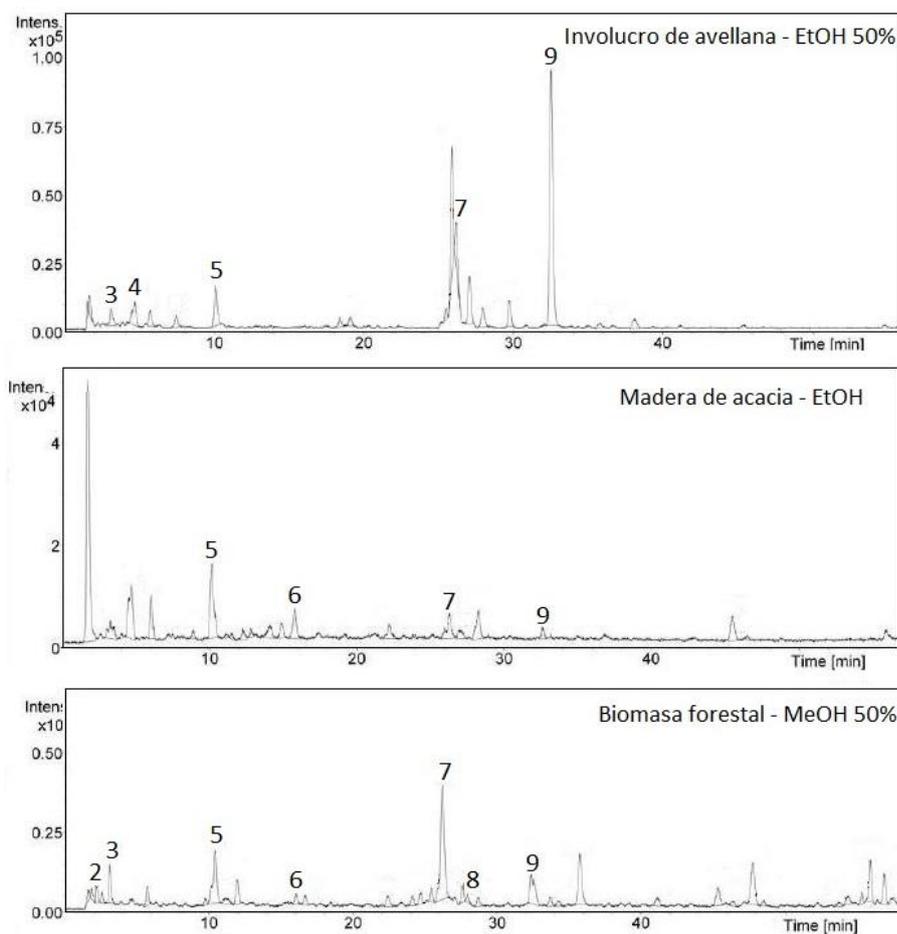


Figura 4.6.4 Cromatograma HPLC de los extractos de involucro de avellana (EtOH 50%), madera de acacia (EtOH) y biomasa forestal (MeOH 50%)

#### 4.6.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS/MS

Una vez identificados los compuestos fenólicos presentes en los extractos de erizo y cáscara de castaña y chapa de eucalipto se realizó su cuantificación mediante la tecnología de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) tal y como se describe en el apartado 3.4.7.2. Los resultados de la cuantificación se muestran en la tabla 4.6.7.

Tabla 4.6.7 Cuantificación de compuestos fenólicos mediante LC-MS/MS

COMPUESTO	m/z	T.R. (min)	ng/mg extracto b.s.					
			EC MeOH 50%	EC EtOH 50%	CC Agua	CC EtOH 50%	ChE Agua	ChE EtOH
Ácido gálico	169,01	5,42	2356,86	2694,74	4944,44	5050,00	72800,00	55641,03
Ácido elágico	300,99	35,52	6117,60	7368,42	952,22	1880,00	14680,00	78974,00
(+)-Catequina hidratada	289,07	18,27	-	-	337,14	439,00	-	-
(-)-Epicatequina	289,07	24,79	-	-	5,50	8,10	-	-
(-)-Epigalocatequina	305,06	9,41	-	-	6,65	9,89	-	-
(-)-Galocatequina	305,06	8,94	-	-	215,00	289,00	-	-
Quercetina	301,04	54,74	124,00	120,77	-	-	-	-

b.s.: base seca; T.R.: tiempo de retención

EC: erizo de castaña; CC: cáscara de castaña; CHE: chapa de eucalipto

En los extractos de erizo de castaña, el compuesto mayoritario resultó ser el ácido elágico (71,2% y 72,4% para los extractos con MeOH 50% y EtOH 50%, respectivamente) seguido del ácido gálico (27,4% para los metanólicos y 26,5% para los etanólicos). En los extractos etanólicos, los compuestos identificados mediante esta técnica resultaron concordantes con los previamente identificados mediante HPLC (Tabla 4.6.1) estando la quercetina 3- $\beta$ -glucósido y la quercetina 3-O-rhamnósido cuantificados como su aglicona quercetina. En el caso de los extractos metanólicos, en los análisis HPLC previos sólo se había detectado el ácido elágico, lo que confirmó la hipótesis de que el resto de compuestos no fueron detectados por el análisis. La composición de los extractos etanólicos y metanólicos fue similar lo que está en concordancia con los resultados de actividad antioxidante previamente determinados.

En el caso de los extractos de cáscara de castaña, los compuestos cuantificados fueron análogos a los previamente identificados (Tabla 4.6.2), aunque en la cuantificación se detectó además la epicatequina en ambos extractos y la epigalocatequina en los extractos acuosos, que no fueron detectados en el análisis HPLC y que se cuantificaron como los compuestos minoritarios en ambos. El compuesto mayoritario es el ácido gálico, que resultó estar en similar proporción en ambos extractos (76,5% en los acuosos y 65,8% en los etanólicos). La presencia de ácido elágico fue mayor en los extractos etanólicos (24,5% respecto al 14,8% en los acuosos).

En los extractos de chapa de eucalipto se cuantificaron según LC-MS/MS dos compuestos, el ácido gálico y el ácido elágico. No se cuantificaron glucósidos de la quercetina que sí fueron identificados mediante HPLC (Tabla 4.6.3). Los extractos acuosos presentaron mayor porcentaje de ácido gálico (83,2%) que los etanólicos (41,3%), mientras que el ácido elágico se encontró en mayor proporción en los etanólicos (58,7%) frente a los acuosos (16,8%). La cantidad cuantificada de estos dos compuestos en los extractos de chapa de eucalipto fue

superior a la cuantificada para los extractos de erizo y cáscara de castaña. La capacidad antioxidante de los extractos de chapa fue también superior a la obtenida para los extractos de los residuos de castaña, lo que demostró la aportación de estos compuestos al potencial antioxidante de los extractos analizados.

#### **4.6.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hoja de nogal mediante cromatografía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS**

Los compuestos presentes en los extractos de hoja de nogal obtenidos en las condiciones óptimas determinadas en el apartado 4.4 (extractos obtenidos con EtOH 50% a 75°C y 120 min) fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de masas UPLC/ESI-QTOF-MS. Esta tecnología presenta ventajas frente a la cromatografía HPLC como la reducción del tiempo de análisis, mayor resolución cromatográfica, así como mayor sensibilidad. En la tabla 4.6.8 se muestra el perfil fenólico determinado para los extractos de hoja de nogal y en la figura 4.6.5 se muestra el cromatograma UPLC obtenido en donde se indican los picos de los compuestos mayoritarios.

Se identificaron y cuantificaron quince compuestos fenólicos en estos extractos siendo el compuesto mayoritario el flavonoide quercetina 3- $\beta$ -D-glucósido (49,4%). Los ácidos hidroxicinámicos, neoclorogénico y clorogénico se detectaron también en alta proporción (29,2% y 18,3%, respectivamente) y el ácido gálico en un 1,4%. El resto de los compuestos se cuantificaron en más bajas proporciones. Entre estos compuestos minoritarios se encontraron otros ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico y el p-cumárico y otros flavonoides como la catequina, galocatequina o la quercetina. La proporción de ácido elágico cuantificada fue muy baja, siendo este compuesto uno de los ácidos fenólicos mayoritarios encontrados en las hojas de *Juglans regia* por encima del ácido clorogénico (Nour et al., 2016). Sin embargo, Masek et al. (2019) no detectó ácido elágico en los extractos de hojas de nogal obtenidos con EtOH 70%, relacionando su ausencia con el tratamiento previo del material al ser en las hojas frescas de nogal donde se detecta este ácido. Otros estudios de la hoja de nogal de la especie *Juglans regia* también referenciaron el ácido clorogénico y la quercetina 3- $\beta$ -D-glucósido como sus compuestos mayoritarios (Pereira et al., 2007; Vieira et al., 2017); sin embargo, el ácido neoclorogénico solo fue detectado por Pereira et al. (2007), siendo uno de los compuestos mayoritarios en la especie híbrida *Juglans major* 209 x *Juglans regia* estudiada en este trabajo.

Tabla 4.6.8 Compuestos fenólicos identificados y cuantificados mediante UPLC/ESI-QTOF-MS en extractos de hoja de nogal

Compuesto	m/z	R.T (min)	ng/mg extracto b.s.
(-)-Galocatequina	305,06	2,4	14,17
(+)-Catequina hidratada	289,07	2,6	55,83
Ácido clorogénico	353,09	2,7	5737,50
Ácido elágico	300,99	4,0	68,92
(-)-Epicatequina	289,07	2,8	12,08
Ácido ferúlico	193,04	3,6	158,58
Ácido gálico	169,01	2,3	432,58
Isorhamnetina	315,05	5,4	3,17
Kaempferol	285,04	5,3	14,25
Ácido neoclorogénico	353,08	2,5	9125,00
Ácido <i>p</i> -cumárico	163,04	3,6	10,83
Procianidina B2	577,14	2,6	45,50
Quercetina	301,04	4,8	163,50
Quercetina 3-β-D-glucósido	463,09	3,8	15441,67
Taxifolina	303,05	3,4	4,50

b.s.: base seca; T.R.: tiempo de retención

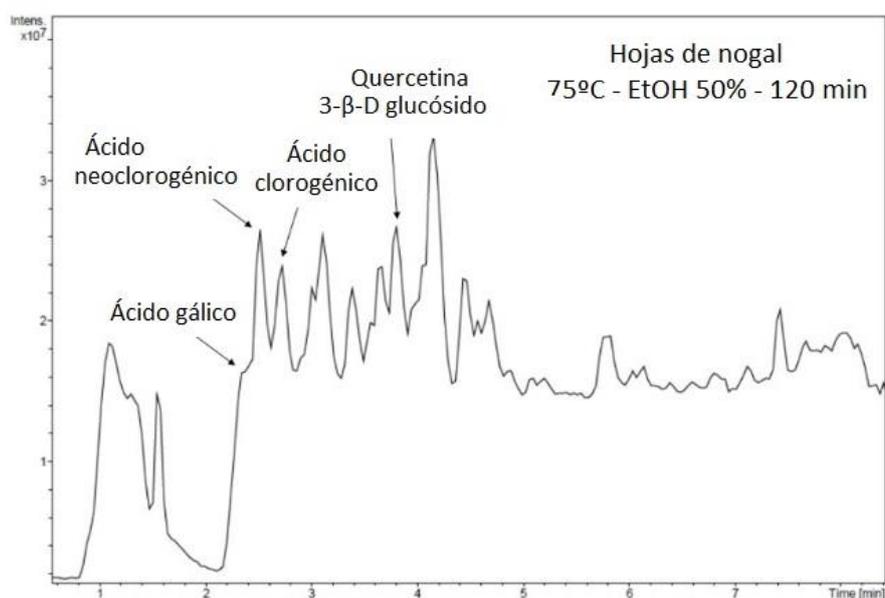


Figura 4.6.5 Cromatograma UPLC de los extractos de hoja de nogal en las condiciones óptimas

#### 4.6.4 Propiedades bioactivas de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos identificados en los extractos mediante RP-HPLC-ESI-TOF, LC-MS/MS y UPLC/ESI-QTOF-MS ha sido ampliamente demostrada. El ácido gálico es un ácido fenólico perteneciente al grupo de los ácidos hidroxibenzoicos, precursor de muchos taninos con actividad antioxidante demostrada al actuar como agente quelante e inhibidor de radicales libres (Balasundram et al., 2006; Carocho y Ferreira, 2013). Otro de los ácidos mayoritarios detectados en los extractos analizados, el ácido elágico es un ácido fenólico precursor de los elagitaninos que está presente en numerosas especies vegetales. Además de capacidad antioxidante, el ácido elágico ha demostrado poseer efecto quimiopreventivo frente a la carcinogénesis de colon y próstata en ensayos en ratas y actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias patogénicas como la *E. coli* y *P. aeruginosa*, así como efecto prebiótico favoreciendo el crecimiento de bifidobacterias (Landete, 2011). Otros compuestos identificados clasificados dentro del grupo de los flavanoles, como la catequina, galocatequina, epicatequina y la epigalocatequina están presentes en alta concentración en numerosas especies vegetales como en el té verde y negro, cacao o cereales (Ofosu et al., 2020) y en frutos del tipo de almendras, anacardos, castañas o cacahuets (Chang et al., 2016) y su potencial está relacionado, además de con su capacidad antioxidante, con su capacidad antimicrobiana y antifúngica, así como su capacidad antiinflamatoria, anticarcinogénica e hipocolesterolémica (Gadkari y Balaraman, 2015). Los compuestos identificados clasificados como flavonoles, la quercetina y sus formas glucosadas, demostraron su actividad antiinflamatoria y de protección frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estando relacionados con la reducción en la generación de especies reactivas del oxígeno (Vieira et al., 2017). Entre ellos, la quercetina 3- $\beta$ -D-glucósido es un compuesto presente en derivados vegetales cuyo potencial está vinculado a sus diversos efectos quimiopreventivos como agente inhibidor de especies reactivas tanto del oxígeno (ROS) como del nitrógeno (RNS), atenuando los posibles daños relacionados con el estrés oxidativo, como potencial agente anticancerígeno al ser capaz de inhibir la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) de los que depende el crecimiento de los tumores, así como a su potencial actividad antidiabética y antialérgica (Valentová et al., 2014). El ácido clorogénico y neoclorogénico identificados en la hoja de nogal se clasifican dentro del grupo de los ácidos cinámicos, los cuales son compuestos presentes en un gran número de especies vegetales que presentan capacidad antioxidante y antiinflamatoria y otros efectos biológicos como propiedades antidiabéticas, anti-hipertensión y propiedades antimicrobianas que los hacen susceptibles de ser usados en preservación de alimentos (Naveed et al., 2018).

Por todo ello, el interés en la valorización de los extractos obtenidos en los diversos residuos y restos vegetales estudiados en este trabajo quedó demostrada al presentar en su composición compuestos fenólicos de gran interés para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.





## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES**



## 5 CONCLUSIONES

Como conclusiones generales de esta tesis doctoral, se ha demostrado que tanto la técnica de extracción empleada como las condiciones de operación (tipo de disolvente, temperatura, tiempo de extracción y relación sólido/líquido) afectan tanto al rendimiento de extracción como a las propiedades de los extractos obtenidos. Además, el comportamiento de cada material es único y, por tanto, es necesario realizar estudios adaptados a las características de cada uno de ellos. En base a los resultados obtenidos, agua y etanol fueron los disolventes seleccionados para la extracción de compuestos con propiedades antioxidantes de los residuos lignocelulósicos estudiados. Las capacidades antioxidante y antimicrobiana de los extractos obtenidos, atribuidas a los compuestos fenólicos presentes en los mismos, confirmaron su potencial para la formulación de antioxidantes con aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica o cosmética y, en consecuencia, el interés de la valorización de los residuos estudiados.

A continuación, se exponen las principales conclusiones derivadas de la discusión de los resultados obtenidos en las distintas etapas de este trabajo.

- Del estudio preliminar de las condiciones de extracción de los materiales analizados se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Tanto el rendimiento de extracción como las propiedades antioxidantes de los extractos resultaron dependientes del disolvente y de las condiciones de extracción.

Para el erizo de la castaña, la extracción con agua a 90°C durante 1 h condujo al mayor rendimiento de extracción junto con los valores más altos de contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos. Los extractos metanólicos y etanólicos, obtenidos mediante extracción Soxhlet durante 15 h, presentaron un elevado contenido en fenoles totales y una buena capacidad antioxidante. Los resultados más bajos se obtuvieron para los extractos de acetona.

Con respecto a las chapas de eucalipto, los extractos con mayor contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante se obtuvieron con las chapas sin moler, empleando etanol a 50°C durante 90 min y relación sólido/líquido 1/10 (g/ml). Tanto el aumento de la temperatura de 50°C a 75°C como la reducción del tamaño de partícula condujeron a un mayor rendimiento de extracción, aunque no a mejores propiedades antioxidantes de los extractos. Del análisis de conglomerados de los extractos obtenidos con la chapa sin moler se obtuvieron tres grupos de semejanza, uno que engloba, a los extractos de mayor capacidad antioxidante (extractos obtenidos con etanol a 50°C), otro que agrupa a los de menor capacidad antioxidante (extractos obtenidos a 75°C) y un tercer grupo que agrupa a los extractos con capacidad antioxidante intermedia (resto de extracciones a 50°C).

Para el pericarpio de nuez la extracción con agua a su temperatura de ebullición proporcionó el mayor rendimiento de extracción y la extracción con etanol al 50% a temperatura ambiente los extractos de mayor capacidad antioxidante. Las mejores condiciones de extracción para las hojas de nogal fueron, con etanol al 50% a 50°C y 60 min, las de menor relación sólido/líquido utilizada (1/10 g/ml).

Para el resto de los residuos analizados, etanol al 50% y metanol al 50% condujeron a los mayores rendimiento de extracción para el involucro de avellana y la madera de acacia respectivamente, mientras que para la biomasa forestal se consiguieron resultados similares con ambos disolventes. Los extractos con mejores propiedades antioxidantes se obtuvieron con etanol al 50%, etanol y metanol al 50% para el involucro de avellana, la madera de acacia y la biomasa forestal, respectivamente.

Para todos los materiales analizados, se encontró una relación lineal entre el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos determinada según los métodos FRAP, DPPH y ABTS lo que demuestra que los compuestos fenólicos contribuyen a las propiedades antioxidantes de los extractos.

- Del estudio del proceso de extracción del erizo y cáscara de castaña se concluyó lo siguiente:

En las extracciones de erizo de castaña con disoluciones acuosas de etanol y metanol, planificadas de acuerdo con un diseño experimental Box-Behnken, se encontró que la temperatura y la concentración de disolvente fueron las variables que más afectaron al proceso. En general, las propiedades antioxidantes de los extractos mejoraron al aumentar la temperatura y disminuir la concentración de disolvente. Las condiciones de extracción seleccionadas como óptimas, en las que se obtuvieron altos rendimientos de extracción junto con altas capacidades antioxidantes de los extractos fueron una temperatura de 75°C empleando disoluciones acuosas de etanol o metanol al 50% y un tiempo de 75 min para las extracciones metanólicas y 30 min para las etanólicas. Los rendimientos obtenidos con ambos disolventes fueron similares, aunque en las extracciones metanólicas se obtuvieron extractos de mayor capacidad antioxidante.

Del estudio comparativo entre los extractos de erizo y de cáscara de castaña se encontró que, tanto la temperatura como el disolvente utilizado, afectaron significativamente al rendimiento de extracción de ambos materiales. No obstante, la temperatura no fue una variable significativa sobre las propiedades antioxidantes de los extractos metanólicos y etanólicos de la cáscara de castaña. Los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron para el erizo, mientras que las propiedades antioxidantes fueron más elevadas en los extractos de cáscara de castaña. Las condiciones óptimas correspondieron a las extracciones a 75 °C con agua y metanol al 50% para la cáscara y el erizo, respectivamente. No obstante, en el caso del erizo puesto que los resultados obtenidos con etanol al 50% resultaron similares a los obtenidos con metanol al 50% se propuso el uso del etanol frente al metanol por ser un disolvente GRAS.

En el estudio de la extracción asistida por microondas del erizo y la cáscara de castaña, se encontró que el empleo de esta tecnología no supuso una mejora frente a la maceración con disolventes en cuanto al rendimiento de extracción, aunque sí mejoraron las propiedades antioxidantes de los extractos metanólicos y etanólicos del erizo reduciéndose el tiempo de extracción a 15 min lo que supuso una clara ventaja frente a la extracción convencional.

Del estudio cinético del proceso de extracción se concluyó que el modelo de Peleg fue apropiado para modelizar la evolución con el tiempo del contenido total en fenoles y la capacidad antioxidante FRAP de los extractos.

- Del estudio del proceso de extracción de la chapa de eucalipto sin moler empleando la extracción asistida por microondas se concluyó lo siguiente:

En los experimentos planificados de acuerdo con un diseño experimental Box-Behnken, se encontró que la temperatura y el tiempo fueron las variables más significativas sobre el rendimiento de extracción, que aumentó al hacerlo ambas variables. Por el contrario, el tiempo fue la variable menos significativa sobre las propiedades antioxidantes de los extractos. Por todo ello, se seleccionaron como condiciones óptimas las correspondientes a 65°C, relación sólido/líquido 1/8,8 g/ml y tiempo de 10 min.

Aunque el uso de la tecnología de microondas no mejoró el rendimiento de extracción y las propiedades de los extractos obtenidos fueron superiores en la extracción convencional, se pudo concluir que, en este caso, la tecnología microondas se presenta como una alternativa prometedora al conseguir extractos con alta capacidad antioxidante, reduciendo el tiempo de extracción de 90 a 10 min y el consumo de disolvente al variar la relación sólido/líquido de 1/10 a 1/8,8 g/ml.

- Del estudio del proceso de extracción de hojas de nogal con disoluciones acuosas de etanol se pudo concluir que:

La temperatura y la concentración del disolvente fueron los factores que más afectaron tanto al rendimiento como a las propiedades de los extractos. El tiempo sólo afectó al rendimiento de extracción y a la capacidad antioxidante ABTS.

Tanto el rendimiento como las capacidades antioxidantes de los extractos aumentaron al hacerlo la temperatura, encontrándose los valores máximos para valores intermedios de concentración de disolvente.

Del análisis de las superficies de respuesta obtenidas se seleccionaron como condiciones óptimas, temperatura de 75°C, tiempo de 120 min y concentración de etanol del 50%. En estas condiciones se obtuvieron altos rendimientos de extracción junto con extractos con alta capacidad antioxidante.

- Del estudio de la capacidad antimicrobiana de los extractos acuosos de erizo y cáscara de castaña, pericarpio de nuez y chapa de eucalipto seleccionados se pudo concluir que:

Los extractos analizados inhibieron el crecimiento tanto de bacterias Gram + como Gram - a excepción de los de pericarpio de nuez que no resultaron efectivos frente a las Gram -. Además, los extractos de chapa de eucalipto fueron capaces de inhibir también el crecimiento de levaduras.

Existe una relación entre las propiedades antioxidantes de los extractos y la capacidad antimicrobiana, al ser los extractos con mayor capacidad antioxidante, los de chapa de eucalipto, los que mostraron una mayor capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados.

- Del análisis del perfil fenólico de los extractos mediante espectrometría de masas se pudo concluir que:

El potencial de los materiales analizados en esta tesis como fuente de compuestos bioactivos quedó confirmado al identificarse en sus extractos compuestos fenólicos con demostradas propiedades antioxidantes.

En los extractos de residuos de castaña y en los de chapa de eucalipto los compuestos mayoritarios fueron el ácido elágico y el ácido gálico. En los extractos de hoja de nogal se cuantificaron como compuestos mayoritarios, la quercetina 3- $\beta$ -D- glucósido y los ácidos neoclorogénico, clorogénico y gálico.

Los extractos de chapa de eucalipto fueron los que presentaron un mayor contenido en ácidos fenólicos, a los que se atribuye la alta capacidad antioxidante de estos extractos.



## **CAPÍTULO 6**

### **BIBLIOGRAFÍA**



## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Akin, M., Arabaci, G., Saki, N., 2013. Total phenols, antioxidant potential and tyrosinase inhibitory activity of walnut (*Juglans regia* L.) leaf, husk and seed. *Asian J. Chem.*, 25, 9337-9340. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.15526>
- Al-Farsi, M., Lee, C.Y., 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chem.*, 108, 977-985. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.009>
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., Battino, M., 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.*, 48(8-9), 2490-2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Aspé, E., Fernández, K., 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Ind. Crop. Prod.*, 34, 838-844. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.00>
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Oliveira, M.B.P.P., Pereira, J.A., 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem.*, 107, 1106-1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>
- Berker, K., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R., 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanidine reagents. *Talanta*, 72 (3), 1157-1165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 2008. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eu. J. Phatmacol.*, 585 (2-3), 325-337. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>
- Brewer, M. S., 2011. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, 10 (4), 221-247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>

- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D., 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food. Eng.*, 81, 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Cabo, S., Aires, A., Carvalho, R., Pascual-Seva, N., Silva, A. P., Gonçalves, B., 2020. *Corylus avellana* L. husks an underutilized waste but a valuable source of polyphenols. *Waste Biomass Valorization*, 1877-2641. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01246-4>
- Carocho, M., Ferreira, I. C., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, 51, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira., 2018. Antioxidants: reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci. Technol.*, 71, 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>
- Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., Silva, B. M., 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 441-447. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.043>
- Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., Martínez-Ávila, G.C.G., 2017. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem.*, 237, 1139-1148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>
- Chang, S. K., Alasalvar, C., Bolling, B. W., Shahidi, F., 2016. Nuts and their co-products: the impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits – A comprehensive review. *J. Funct. Food.*, 26, 88-122. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.029>
- Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G., 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (7), 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M., Ho, C. W., 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Int. Food Res. J.*, 18(4), 1427-1435.
- Choe, E., Min, D. B., 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, 8 (4), 345-358. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x>
- Da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Garipey, Y., Raghavan, V., 2019. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 58, 102234. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234>

- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15 (10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- De la Fuente, S., 2011. Análisis Conglomerados. España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Del Rio, D., Calani, L., Dall'Asta, M., Brighenti, F., 2011. Polyphenolic composition of hazelnut skin. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (18), 9935-9941. <https://doi.org/10.1021/jf202449z>
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food. Chem.*, 57 (5), 1768-1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- EFSA, 2012. Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal*, 10, 2588-2631.
- EFSA, 2018. Safety and efficacy of butylated hydroxyanisole (BHA) as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*, 16, 5215.
- Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Estevinho, L.M., Queiroz, M.J.R.O., 2004. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[*b*]thiophene series: a structure-activity evaluation study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (23), 5831-5833. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.09.038>
- Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarbouï, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., Prieto, M. A., 2021. By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: a review of tannins' biological activities and their potential for valorization. *Foods*, 10, 137. <https://doi.org/10.3390/foods10010137>
- Gadkari, P. V., Balaraman, M., 2015. Catechins: sources, extraction and encapsulation: A review. *Food Bioprod. Process.*, 93, 122-138. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004>
- González, J., Cruz, J.M., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2004. Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chem.*, 84 (2), 243-251. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00208-5)
- González, N., Elissetche, J., Pereira, M., Fernández, K., 2017. Extraction of polyphenols from *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*: Experimental kinetics, modeling and evaluation of their antioxidant and antifungal activities. *Ind. Crops Prod.*, 109, 737-745. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.038>
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.*, 86 (3), 345-391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Gullón, B., Gullón, P., Lú Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G., 2017. Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Ind. Crops Prod.*, 108, 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.014>

- Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., 2020. Value-added compound recovery from invasive forest for biofunctional applications: eucalyptus species as a case study. *Molecules*, 25 (18), 4227. <https://doi.org/10.3390/molecules25184227>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 125-126. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3)
- Harpur, U.S., Genç, Y., Khan N., Saracoglu, I, 2011. Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec. Nat. Prod.*, 5 (2), 100-107.
- Inglett, G. E., Rose, D. J., Chen, D., Stevenson, D. G., Biswas, A., 2010. Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) with or without microwave irradiation. *Food Chem.*, 119 (3), 1216-1219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.041>
- Ivanović, S., Avramović, N., Dojčinović, B., Trifunović, S., Novaković, M., Tešević, V., Novakovic, M., 2020. Chemical composition, total phenols and flavonoids contents and antioxidant activity as nutritive potential of roasted hazelnut skins (*Corylus avellana* L.). *Foods*, 9 (4), 430. <https://doi.org/10.3390/foods9040430>
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., 2010. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech J. Food Sci.*, 28 (3), 206-212. <https://doi.org/10.17221/200/2009-CJFS>
- Kavak, D.D., Altiok, E., Bayraktar, O., Ülkü, S., 2010. *Pistacia terebinthus* extract: as a potential antioxidant, antimicrobial and possible  $\beta$ -glucuronidase inhibitor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 64 (3-4), 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.029>
- Kumari, B., Tiwari, B. K., Hossain, M. B., Rai, D.K., Brunton, N.P., 2017. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from potato peels: profiling and kinetic modelling. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 52 (6), 1432-1439. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13404>
- Landete, J. M., 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Res. Int.*, 44 (5), 1150-1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., Taylor, D. K., 2011. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.*, 129 (2), 570-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.068>
- Liang, N., Kitts, D., 2014. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19 (11), 19180-19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.*, 93, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>

- Luís, Â., Neiva, D., Pereira, H., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A. P., 2014. Stumps of *Eucalyptus globulus* as a source of antioxidant and antimicrobial polyphenols. *Molecules*, 19 (10), 16428-16446. <https://doi.org/10.3390/molecules191016428>
- Maksimović, Z., Malenčić, D., Kovačević, N., 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technol.*, 96 (8), 873-877. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.006>
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Chrzescijanska, E., Podsedek, A., 2019. Polyphenolic profile and antioxidant activity of *Juglans regia* L. leaves and husk extracts. *Forests*, 10 (11), 988. <https://doi.org/10.3390/f10110988>
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, H., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 72 (2), 145-171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
- Mujić, A., Grdović, N., Mujić I., Mihailović M., Živković, J., Poznanović, G., Vidaković, M., 2011. Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut leaves, catkins and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Food Chem.*, 125 (3), 841-849. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.068>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazedeh, D., FanFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z., 2018. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.*, 97, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S., 2016. Optimization of ultrasound-assisted hydroalcoholic extraction of phenolic compounds from walnut leaves using response surface methodology. *Pharm. Biol.*, 54 (10), 2176-2187. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150303>
- Ofosu, F. K., Daliri, E. B., Elahi, F., Chelliah, R., Lee, B., Oh, D., 2020. New insights on the use of polyphenols as natural preservatives and their emerging safety concerns. *Front. Sustain. Food Syst.*, 4, 525810. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.525810>
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A., 2008. Total phenols antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husk. *Food Chem. Toxicol.*, 46 (7), 2326-2331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.017>
- Olszowy, M., 2019. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol. Biochem.*, 144, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>
- Omeroglu, P. Y., Acoglu, B., Özdal, T., Tamer, C. E., Çopur, Ö. U., 2019. Extraction techniques for plant-based bio-active compounds. In *Natural Bio-active Compounds, VOL 2: Chemistry, pharmacology and health care practices*. Springer Nature Singapore, 465-492. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6_18)

- Oreopoulou, A., Goussias, G., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V., 2020. Hydro-alcoholic extraction kinetics of phenolics from oregano: Optimization of the extraction parameters. *Food Bioprod. Process.*, 123, 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.017>
- Oroian, M., Escriche, I., 2015. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.*, 74, 10-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Osorio-Tobón J.F., 2020. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J. Food Sci. Technol.*, 57 (12), 4299-4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>
- Peleg, M., 1988. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.*, 53, 1216-1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13565.x>
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia L.*) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol.*, 45 (11), 2287–2295. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.004>
- Piluzza, G., Bullitta, S., 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol*, 49 (3), 240-247. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem.*, 85 (2), 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.020>
- Piowarska, N., González-Álvarez, J., 2012. Extraction of antioxidants from forestry biomass: kinetics and optimization of extraction conditions. *Biomass Bioenerg.*, 43, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.031>
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53 (10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26 (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez-Jaume, M.J., Mora R., 2001. *Estadística Informática: casos y ejemplos con el SPSS*. España: Universidad de Alicante, Servicio de Publicaciones.
- Santos, S.A.O., Freire, C.S.R, Domingues, M.R.M., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., 2011. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus labill.* bark by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (17), 9386–9393. <https://doi.org/10.1021/jf201801q>

- Shirmohammadli, Y., Efhamisisi, D., Pizzi, A., 2018. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Ind. Crops Prod.*, 126, 316-332. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.034>
- Silva V., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Amaral, J.S., Igrejas, G., Ferreira, I.C.F.R., Poeta, P., 2020. Evaluation of the phenolic profile of *Castanea Sativa* Mill. by-products and their antioxidant and antimicrobial activity against multiresistant bacteria. *Antioxidants*, 9, 87. <https://doi.org/10.3390/antiox9010087>
- Singh, S., Singh, R.P., 2008. In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Rev. Int.*, 24 (4), 392-415. <https://doi.org/10.1080/87559120802304269>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (24), 8533-8538. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.027>
- Sousa, C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Tronchuda cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *costata* DC): scavenger of reactive nitrogen species. *J. Agric. Food. Chem.*, 56 (11), 4205–4211. <https://doi.org/10.1021/jf072740y>
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.*, 81, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Srivastava, N., Shrivastav, A., Singh, R., Abohashrh, M., Srivastava, K.R., Irfan, S., Srivastava, M., Mishra, P.K., Gupta, C.K., Thakur, V.K., 2021. Advances in the structural composition of biomass: fundamental and bioenergy applications. *J. Renew. Mater.*, 9 (4), 615-636. <https://doi.org/10.32604/jrm.2021.014374>
- Suleiman, M. H. A., Brima, E. I., 2020. Phytochemicals, trace element contents, and antioxidant activities of bark of taleh (*Acacia seyal*) and desert rose (*Adenium obesum*). *Biol. Trace Elem. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02428-w>
- Szöllösi, R., Szöllösi-Varga, I., 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*, 46 (3-4), 125-127.
- Takashima, M., Horie, M., Shichiri, M., Hagihara, Y., Yoshida, Y., Niki, E., 2012. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application. *Free Radic. Biol. Med.*, 52 (7), 1242-1252. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.010>
- Tan, J.B.L., Lim, Y. Y., 2015. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chem.*, 172, 814-822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.141>

- Tchabo, W., Ma, Y., Kwaw, E., Ciao, L., Wu, M., Apaliya, M.T., 2018. Impact of extraction parameter and their optimization on the nutraceuticals and antioxidant properties of aqueous extract mulberry leaf. *Int. J. Food Prop.*, 21 (1), 717-732. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1446025>
- Teo, C. C., Chong, W.P.K., Ho, Y. S., 2013. Development and application of microwave-assisted extraction technique in biological sample preparation for small molecule analysis. *Metabolomics*, 9 (5), 1109-1128. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0528-7>
- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., Tan, C. P., 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem.*, 120 (1), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064>
- Tsaltaki, C., Katsouli, M., Kekes, T., Chanioti, S., Tzia, C., 2019. Comparison study for the recovery of bioactive compounds from *Tribulus terrestris*, *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Lepidium meyenii*, *Turnera diffusa* and *Withania somnifera* by using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extraction methods. *Ind. Crops Prod.*, 142, 111875. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111875>
- Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., Křen, V., 2014. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem. Toxicol.*, 68, 267–282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.018>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. B.*, 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vasconcelos, M.C.B.M., Bennett, R.N., Quideau, S., Jacquet, R., Rosa, E.A.S., Ferreira-Cardoso, J.V., 2010. Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Ind. Crops Prod.*, 31 (2), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.008>
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M.S., González-Álvarez, J., Antorrena, G., 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Ind. Crops Prod.*, 28 (3), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.003>
- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J.A.P., Ferreira, O., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Ind. Crops Prod.*, 107, 341-352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.012>
- Wang, L., Weller, C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.*, 17 (6), 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Xavier, L., Freire, M.S., González-Álvarez, J., 2019. Modeling and optimizing the solid–liquid extraction of phenolic compounds from lignocellulosic subproducts. *Biomass Convers. Biorefin.*, 9 (4), 737–747. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00401-9>

- Xu, D., Li, Ya., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J., Li, H., 2017. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sc.*, 18, 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Yildiz, S., Gürgen, A., Can, Z., Tabbouche, S. A., Kiliç, A. O., 2018. Some bioactive properties of *Acacia dealbata* extracts and their potential utilization in wood protection. *Drewno.*, 61 (202), 81-97. <https://doi.org/10.12841/wood.1644-3985.255.03>
- Yuan, B., Lu, M., Eskridge, K. M., Hanna, M. A., 2018. Valorization of hazelnut shells into natural antioxidants by ultrasound-assisted extraction: Process optimization and phenolic composition identification. *J. Food Process Eng.*, 41 (5), e12692. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12692>
- Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Stupar, A., Bulut, G., Senkardes, I., Dogan, A., Seebaluck-Sandoram, R., Rengasamy, K.R.R., Sinan, K.I., Mahomoodally, M.F., 2019. Chemical composition and bio-functional perspectives of *Erica arborea* L. extracts obtained by different extraction techniques: Innovative insights. *Ind. Crops Prod.*, 142, 111843. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111843>
- Živković, J., Zeković, Z., Mujić, I., Vidović, S., Cvetković, D., Lepojević, Z., Nikolić, g., Trutić, N., 2010. Scavenging capacity of superoxide radical and screening of antimicrobial activity of *Castanea sativa* Mill. extracts. *Czech J. Food Sci.*, 28, 61-68. <https://doi.org/10.17221/155/2009-CJFS>



- Gonzalo Vázquez, Adela Fernández-Agulló, Cristina Gómez-Castro, María Sonia Freire, Gervasio Antorrena, Julia González-Álvarez, 2012. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. Ind. Crop. Prod., 35, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.022>

Factor de impacto: 2,468; Posición relativa: 3/12 de la categoría Agricultural Engineering. *El apartado 4.2.1 está basado en esta publicación. Contribución de Adela Fernández Agulló: desarrollo metodológico, análisis formal de los datos mediante la aplicación de técnicas estadísticas y matemáticas, investigación y recopilación de datos y evidencias, planificación de la experimentación, colaboración en la realización de experimentos, preparación del borrador original y colaboración en su revisión para publicación*

*En las publicaciones de la revista Industrial Crops and Products, de la editorial ELSEVIER B.V., se permite el uso a los autores para su inclusión en trabajos de tesis, tal y como se indica en el siguiente enlace: <https://www.elsevier.com/about/policies/copyright>*
- Adela Fernández-Agulló, Eric Pereira, Maria Sonia Freire, Patricia Valentão, Paula B. Andrade, Julia González-Álvarez, José Alberto Pereira, 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. Ind. Crop. Prod., 42, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>

Factor de impacto: 3,208; Posición relativa: 3/12 de la categoría Agricultural Engineering. *Los apartados 4.1.3 y 4.5 están basados en esta publicación. Contribución de Adela Fernández Agulló: análisis formal de los datos mediante la aplicación de técnicas estadísticas y matemáticas, investigación y recopilación de datos y evidencias, realización de experimentos, preparación del borrador original y colaboración en su revisión para publicación.*

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright>
- Adela Fernández Agulló, María Sonia Freire, Gervasio Antorrena, José Alberto Pereira, Julia González-Álvarez, 2014. Effect of the extraction technique and operational conditions on the recovery of bioactive compounds from chestnut (*Castanea sativa*) bur and shell. Sep. Science. Technol., 49, 267-277. <https://doi.org/10.1080/01496395.2013.838264>

Factor de impacto: 1,171; Posición relativa: 76/135 de la categoría Engineering, Chemical *Los apartados 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.4 y 4.6.1 están basados en esta publicación. Contribución de Adela Fernández Agulló: conceptualización de ideas, análisis formal de los datos mediante la aplicación de técnicas estadísticas y matemáticas, investigación y recopilación de datos y evidencias, planificación de la experimentación y realización de experimentos, preparación del borrador original y colaboración en su revisión para publicación.*

*Como autor del artículo original, se permite incluir el manuscrito aceptado en la tesis utilizando el siguiente texto:*

*“This is an Accepted Manuscript of an article published by Taylor & Francis in Journal of Separation Science and Technology on 17 January 2014, available online: <http://tandfonline.com/10.1080/01496395.2013.838264>”*

<https://authorservices.taylorandfrancis.com/publishing-your-research/moving-through-production/copyright-for-journal-authors/>

- Adela Fernández Agulló, María Sonia Freire, Julia González-Álvarez, 2015. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Ind. Crops. Prod.*, 64, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.031>

Factor de impacto: 3,449; Posición relativa: 2/14 de la categoría Agricultural Engineering. *Los apartados 4.1.2, 4.3, 4.5 y 4.6.1 están basados en esta publicación. Contribución de Adela Fernández Agulló: conceptualización de ideas, análisis formal de los datos mediante la aplicación de técnicas estadísticas y matemáticas, investigación y recopilación de datos y evidencias, planificación de la experimentación y realización de experimentos, preparación del borrador original y colaboración en su revisión para publicación.*

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright>

- Adela Fernández-Agulló, Aída Castro-Iglesias, María Sonia Freire, Julia González-Álvarez, 2019. Optimization of the extraction of bioactive compounds from walnut (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*) leaves: antioxidant capacity and phenolic profile. *Antioxidants*, 9, 18. <https://doi.org/10.3390/antiox9010018>

Factor de impacto: 5,014; Posición relativa: 10/139 de la categoría Food Science & Technology.

*Los apartados 4.2.3, 4.4 y 4.6.3 están basados en esta publicación. Contribución de Adela Fernández Agulló: conceptualización de ideas, análisis formal de los datos mediante la aplicación de técnicas estadísticas y matemáticas, investigación y recopilación de datos y evidencias, planificación de la experimentación y colaboración en la realización de experimentos, colaboración en la preparación del borrador y revisión para publicación.*

*En el artículo publicado en la revista Antioxidants, de la editorial MDPI, está permitido su uso para la inclusión en este trabajo de tesis al estar bajo licencia Creative Commons, tal y como se indica en los siguientes enlaces:*

<https://www.mdpi.com/about/terms-and-conditions>;

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

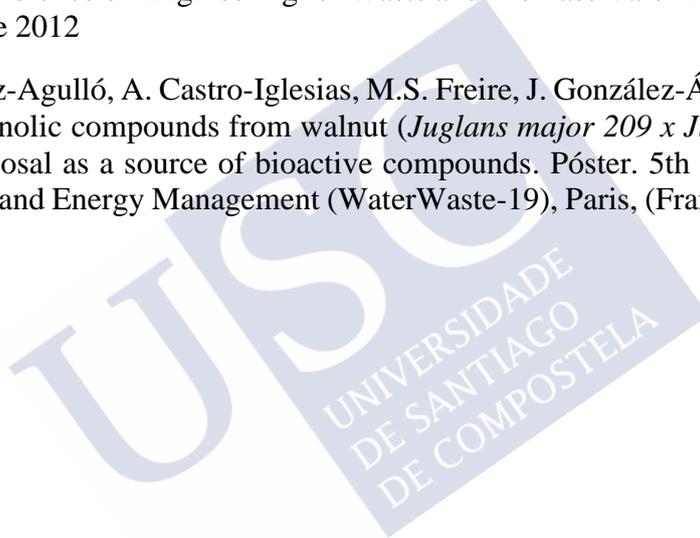
---

A. Fernández-Agulló, C. Gómez-Castro, L. Soto, M.S. Freire, J. González-Álvarez. Study of the antioxidant potential of forestry biomass waste. Presentación Oral. Sixth International Conference on Waste Management and the Environment, New Forest (United Kingdom), 4-6 Julio 2012

A. Fernández-Agulló, M. S. Freire, G. Antorrena, J. González-Álvarez. Extraction of phenolic antioxidants from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) veneer wastes. Póster. XXVI th International Conference on Polyphenols. Florencia (Italia), 23-26 Julio 2012

G. Vázquez, A. Fernández-Agulló, M. S. Freire, G. Antorrena, J. González-Álvarez. Effect of the extraction technique on the antioxidant properties of biomass waste extracts. Póster. 4th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorization. Porto (Portugal), 10-13 Septiembre 2012

A. Fernández-Agulló, A. Castro-Iglesias, M.S. Freire, J. González-Álvarez. Optimizing the extraction of phenolic compounds from walnut (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*) leaves: a valorization proposal as a source of bioactive compounds. Póster. 5th International Congress on Water, Waste and Energy Management (WaterWaste-19), Paris, (Francia), 22-24 Julio 2019





Quisiera comenzar agradeciendo a mis directoras de tesis, las profesoras Julia Álvarez González y M<sup>a</sup> Sonia Freire Leira por su orientación, conocimiento y consejos para la elaboración de este trabajo y haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Gracias por todo el apoyo para sacar adelante este proyecto.

Mi agradecimiento también al profesor José Alberto Pereira, del Centro de Investigação de Montanha del Instituto Politécnico de Bragança por haberme acogido durante una estancia en su grupo de investigación y haberme permitido vivir esa experiencia tan enriquecedora tanto desde el punto de vista académico como personal y por estar siempre disponible. Quiero también agradecer a Ricardo Malherio su acompañamiento y guía durante mi estancia y a Eric Pereira por haber compartido conmigo su experiencia en el mundo de la microbiología. También agradecer a las profesoras Patricia Valentão y Paula Andrade, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Porto por guiarme durante mi breve paso por su laboratorio.

Quisiera agradecer a la Fundación Segundo Gil Dávila por la beca concedida que me permitió realizar este trabajo.

Por todo lo compartido en el laboratorio, mi agradecimiento a Jorge, Olga, Cristina Gómez, Lucía, Omar, Aída, Cristina Galiñanes, Cristina Cambeses, Catarina y a Lidia. Gracias por todo lo que aprendo de vosotros, por las risas, las charlas y los recuerdos que permanecerán siempre.

A los compañeros del IPB con los que tuve la suerte de coincidir, a Ivo, Anabela, Nuno, Hugo, João. A María y a Lara, por abrirme las puertas de su casa, por su amistad y por todo lo vivido juntas.

A los compañeros del departamento, por los buenos momentos en los descansos alrededor de una mesa. A Paula Santos, a Raquel y a Iria por las charlas, cariño y amistad.

A mis amigas Noelia y Rocío, por su empuje y motivación. A los esefeiros y praceiros por formar parte de mi vida.

Gracias también a mi padre y a mis hermanas por su apoyo incondicional. A mis cuñados y sobrinos por hacerme la vida más feliz. A mi suegra por su disponibilidad y ayuda.

Y sobre todo, gracias a Jorge y a mis peques, Andrés y Pablo, porque con vosotros todo es mejor.