



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas
(LIDSA)

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE VINOS
BLANCOS DE GALICIA Y ALTERNATIVAS DE
APROVECHAMIENTO DE LOS SUB-PRODUCTOS DE
VINIFICACIÓN**

Marta Álvarez Casas

Memoria para optar al grado de Doctora

Programa de doctorado: Ciencia y Tecnología Química

Santiago de Compostela, 2014

Las Dras. Dña. Marta Lores Aguín y Dña. Carmen García Jares, ambas del Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

A la Licenciada Dña. **Marta Álvarez Casas** a la presentación del trabajo titulado **“Estudio de la composición polifenólica de vinos blancos de Galicia y alternativas de aprovechamiento de los sub-productos de vinificación”** que se ha realizado bajo nuestra dirección, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, a día 26 de Septiembre de 2014.

Fdo.: Marta Lores Aguín

Fdo.: Carmen García Jares

«Estaba en el sitio adecuado en el momento adecuado. Todo salió perfecto, o así es como lo recuerdo. Los planetas se alinearon y conocí a Marta Lores, a partir de ahí, todo fue rodado. Me sentía como una niña con zapatos nuevos, estaba donde quería y con quien quería. Todo era brillante para mí, hasta el cielo de Santiago de Compostela, cosa que ya auguraba una buena señal...»

(1 de Septiembre del 2010, Santiago de Compostela)



Agradecimientos

No sabía realmente lo que significaba la frase “El tiempo es relativo” hasta que empecé a escribir esta tesis. Volviendo la vista atrás, parece que empecé hace mil años e hice mil cosas y ahora siento como que me falta tiempo y no hice nada.

Sólo me queda el empujón más difícil, el final. Pero por supuesto, todo lo escrito aquí es gracias a la ayuda inestimable de muchas personas. Entre ellas mi familia y en especial Celso que tiene una paciencia infinita. Mis directoras: Marta Lores, que se ha convertido en un referente de mi vida; y Carmen Jares, con quien aprendo algo interesante todos los días. Ellas, junto con el resto del grupo, empezando por el tercer vértice de LIDSA, María Llompart y siguiendo por el resto del equipo: Lucía, Pablo, Gerardo, María C. y por último, pero no por eso menos importante, Marta P., la compañera de laboratorio perfecta. Con ellos, y con otros compañeros que pasaron también por el laboratorio, pasé ratos divertidos, inquietantes y surrealistas. Y, si pudiera repetir, repetiría con todos ellos.

Agradecer también a todos los compañeros del laboratorio de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Vigo en el campus de Orense, toda la ayuda prestada, antes y durante esta tesis; a todas las bodegas, a la Estación Enológica de Ribadumia y al CFEA de Guísamo, por las muestras y el compromiso; y al departamento de Microbiología de la facultad de Farmacia por ayudarme a trabajar con los “bichiños”. A Jorge y a Hugo del Departamento de Ecología y Biología Animal de la Universidad de Vigo, por hacerme ver a las lombrices de una forma diferente.

También tengo que dar las gracias a Susana y Jose M. por la ayuda y por marcarnos el camino. Y por último al equipo de i-Grape: a Juan y Dani, la parte friki-económica del grupo, y a Suso, el único que habla mi “idioma”; gracias a los tres por el esfuerzo y las risas; ¡Pronto brindaremos por la Victoria!

«Todos esos momentos se perderán en el tiempo... como lágrimas en la lluvia»

(Blade Runner, 1982)



Índice

Índice	11
Índice de tablas	19
Índice de figuras	23
I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	29
II. INTRODUCCIÓN	35
II.1. Antioxidantes vs Radicales libres	37
II.2. Compuestos polifenólicos	39
II.3. Clasificación de los polifenoles	41
II.4. Compuestos fenólicos presentes en la uva y el vino blanco	45
II.4.1. Compuestos fenólicos presentes en la uva	46
II.4.2. Compuestos fenólicos presentes en el vino blanco	47
II.5. Polifenoles y salud	48
II.6. Aplicaciones biotecnológicas de los polifenoles	51
II.7. Sostenibilidad y reciclaje en la industria agroalimentaria	52
II.8. Extracción de polifenoles de residuos vitivinícolas a escala industrial	54
II.9. Panorama vitivinícola en Galicia	57
II.9.1. Principales variedades de uva de Galicia. Características	59
II.9.2. Diferentes sistemas de conducción de la vid	61
II.10. Vermicompostaje	64
II.11. Técnicas de extracción de polifenoles en matrices vegetales	67
II.11.1. Extracción con fluidos supercríticos	67
II.11.2. Extracción asistida por Ultrasonidos	69
II.11.3. Extracción por microondas	70
II.11.4. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida	71
II.11.5. Extracción mediante disolventes presurizados	73
II.12. Extracción con disolventes presurizados (PSE) ¹²⁵	75
II.12.1. Consideraciones físico-químicas que justifican la mejora de las extracciones a temperaturas y presiones elevadas	76
II.12.2. Instrumentación	78
II.12.3. Procedimiento de extracción	78
II.12.4. Parámetros que afectan a la eficacia del proceso	81

II.12.4.1.	Influencia de la Temperatura	81
II.12.4.2.	Presión	81
II.12.4.3.	Disolvente	82
II.12.4.4.	Número de ciclos	82
II.12.4.5.	Tiempo de extracción	82
II.12.4.6.	Etapas de limpieza	83
II.13.	Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)	83
II.13.1.	Factores que influyen en la MSPD	87
II.13.1.1.	Agente dispersante	87
II.13.1.2.	Disolvente de elución	88
II.13.1.3.	Modificación de la matriz	88
II.13.1.4.	Etapas de limpieza	88
III.	PARTE EXPERIMENTAL	91
III.1.	Instrumentación	93
III.2.	Material	94
III.3.	Reactivos	95
III.3.1.	Reactivos, disolventes y dispersantes	95
III.3.2.	Patrones	96
III.4.	Métodos espectrofotométricos	98
III.4.1.	Índice de Polifenoles Totales (IPT)	98
III.4.2.	Actividad Antioxidante (AA): método DPPH e IC ₅₀	98
III.4.3.	Determinación de Flavanoles Totales (TF: <i>Total Flavanoles</i>)	99
III.4.4.	Determinación de Hidroxicinamatos Totales (THC: <i>Total Hydroxycinnamates</i>)	100
III.4.5.	Determinación de Flavonoides Totales (TFC: <i>Total Flavonoids content</i>)	100
III.5.	Preparación de disoluciones patrón y rectas de calibrado	101
III.6.	Métodos cromatográficos	102
III.6.1.	Preparación de las fases móviles	102
III.6.2.	Método cromatográfico en: HPLC-DAD	103
III.6.2.1.	Condiciones del análisis	103
III.6.3.	Métodos cromatográfico en LC-MS/MS	104
III.6.3.1.	Método cromatográfico en LC-MS/MS (Universidad de Vigo)	104
III.6.3.1.1.	Condiciones del análisis	104
III.6.3.2.	Método cromatográfico utilizado en el equipo LC-MS/MS (equipo propio)	105
III.6.3.2.1.	Condiciones del análisis cromatográfico	106
III.7.	Identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos	106
III.8.	Análisis estadístico	107
III.9.	Muestras	108
III.9.1.	Muestras de bagazo	112
III.9.1.1.	Recogida, almacenamiento y conservación de las muestras de bagazo	113

III.9.2.	Muestras de vino	114
III.9.2.1.	Recogida, almacenamiento y conservación de las muestras de vino	114
III.9.2.2.	Muestras de vino blanco para control de fraude	114
III.10.	Metodología aplicada a las muestras de bagazo	115
III.10.1.	Homogeneización de las muestras	115
III.10.2.	Cálculo de la humedad de las muestras	115
III.10.3.	Procedimiento de extracción de polifenoles mediante PSE	115
III.10.3.1.	Optimización del método de extracción	116
III.10.3.2.	Limpieza de extractos	116
III.10.3.3.	Determinación del número de ciclos de extracción	117
III.10.3.4.	Diseño de Cribado	117
III.10.3.5.	Diseño de Superficie de Respuesta	118
III.10.4.	Procedimiento general de extracción de polifenoles mediante MSPD	119
III.10.4.1.	Optimización del método de extracción	120
III.10.4.2.	Elección del dispersante	120
III.10.4.3.	Elección del disolvente de extracción	120
III.10.4.4.	Optimización del volumen de elución y % de MeOH en el disolvente de extracción	121
III.10.5.	Concentración de los extractos obtenidos por PSE y MSPD	122
III.10.6.	Extracción a escala industrial de polifenoles del bagazo	122
III.10.6.1.	Proceso general de la extracción	123
III.10.6.2.	Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia del tipo de disolvente	124
III.10.6.3.	Protocolo particular utilizado en el estudio del origen de la arena	124
III.10.6.4.	Protocolo particular utilizado en el estudio del tamaño de partícula de la arena	124
III.10.6.5.	Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia de la maceración y la utilización de una bomba	124
III.10.6.6.	Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia del tamaño de muestra	125
III.10.6.7.	Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia de la recirculación	125
III.10.6.8.	Protocolo particular utilizado en el estudio de otras variedades y otra matriz polifenólica: semillas de uva	126
III.10.6.9.	Protocolo particular utilizado en los diseños experimentales de Cribado y Superficie de Respuesta.	126
III.10.6.10.	Protocolo de extracción utilizado con la columna de tamaño industrial	129
III.11.	Metodología aplicada en la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos	130
III.11.1.	Valoración cualitativa de la actividad antibacteriana mediante Halos de Inhibición	130
III.11.1.1.	Protocolo pruebas de difusión disco/pocillo	131
III.11.2.	Valoración cuantitativa de la Actividad Antibacteriana: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	131
III.11.2.1.	Protocolo para el cálculo de la CMI y pruebas preliminares	132
III.11.2.2.	CMI en bacterias Gram positivas del extracto polifenólico	133
III.12.	Estudio de estabilidad del extracto polifenólico obtenido en la columna industrial	133
III.13.	Proceso de vermicompostaje del bagazo de uva	134
III.13.1.	Muestras de seguimiento del proceso de vermicompostaje	136
III.14.	Estudio de degradación del vino	138
III.14.1.	Test de Foto-degradación	138

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 143

IV.1. Identificación y cuantificación de polifenoles 145

EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE BAGAZO 155

IV.2. Optimización de la PSE 157

IV.2.1. Experimentos preliminares 157

IV.2.1.1. Limpieza de extractos 157

IV.2.1.2. Determinación del número de ciclos de extracción 158

IV.2.2. Diseños experimentales 159

IV.2.2.1. Cribado 159

IV.2.2.2. Superficie de Respuesta 163

IV.2.3. Parámetros analíticos de calidad del método 167

IV.2.4. Cálculo de las recuperaciones 168

IV.2.4.1. Linealidad, precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método 168

IV.3. Optimización del proceso de extracción por MSPD 170

IV.3.1. Elección del dispersante 170

IV.3.2. Elección del disolvente 171

IV.3.3. Optimización final de las condiciones de extracción 172

IV.3.4. Estudio de la precisión de la MSPD 174

IV.3.5. Conclusiones 175

IV.4. Estudio comparativo de diferentes sistemas de conducción utilizando diferentes métodos de extracción (MSPD y PSE) 175

IV.4.1. Estudio llevado a cabo mediante MSPD 177

IV.4.2. Estudio llevado a cabo mediante PSE 179

IV.4.3. Comparación entre métodos de extracción 181

IV.4.4. Influencia de las distintas técnicas de conducción sobre el vino 182

IV.5. Bagazo de variedades autóctonas 184

IV.5.1. Estudio de la influencia del factor "Año de cosecha" 185

IV.5.2. Estudio del perfil polifenólico de las variedades autóctonas gallegas 186

IV.5.3. Correlación con la actividad antioxidante 196

IV.5.4. Diferencias de las variedades autóctonas en función de su perfil polifenólico 197

IV.6. Diferenciación de los bagazos de albariño en función de la subzona de producción 200

IV.6.1. Análisis del perfil polifenólico de las diferentes subzonas. 202

IV.6.2. Diferenciación de bagazos de albariño en función de la subzona de producción 208

IV.7. Variedades no autóctonas cultivadas experimentalmente en Galicia 210

IV.7.1. Estudio de la composición polifenólica de variedades experimentales 210

IV.7.2. Diferenciación de bagazos de variedades experimentales cultivadas en Galicia: análisis discriminante 217

IV.7.3. Comparación de las variedades experimentales con las variedades gallegas 218

EXTRACCIÓN INDUSTRIAL DE POLIFENOLES	223
IV.8. Desarrollo de la metodología para la producción de un extracto polifenólico a escala industrial	225
IV.8.1. Pruebas preliminares. Influencia de diferentes factores en la extracción	225
IV.8.1.1. Influencia del disolvente	226
IV.8.1.2. Influencia del origen de la arena	227
IV.8.1.3. Influencia del tamaño de partícula	227
IV.8.1.4. Estudio de la maceración y la utilización de una bomba	227
IV.8.1.5. Influencia del tamaño de muestra.	228
IV.8.1.6. Influencia de la recirculación	228
IV.8.1.7. Estudio de los bagazos de otras variedades y de otra matriz polifenólica: semillas de uva	229
IV.8.1.8. Conclusiones previas a la optimización final del proceso industrial	230
IV.8.2. Optimización de las condiciones finales de extracción	230
IV.8.2.1. Diseño de Cribado	231
IV.8.2.2. Diseño de Superficie de Respuesta	232
IV.8.2.3. Condiciones finales optimizadas	234
IV.8.3. Escalado y adaptación del proceso a un tamaño industrial	235
IV.8.3.1. Caracterización del extracto	238
IV.8.3.2. Evaluación de la robustez del proceso	238
IV.8.4. Estudio de la actividad antibacteriana del extracto	239
IV.8.4.1. Valoración cualitativa de la actividad antibacteriana	239
IV.8.4.2. Valoración cuantitativa de la actividad antibacteriana	241
IV.8.5. Estudio de la estabilidad del extracto	242
IV.8.5.1. Conclusiones al estudio de estabilidad	249
IV.8.6. Comparación de la AA del extracto con otros antioxidantes comerciales	249
IV.8.7. Datos de la Patente	251
IV.8.8. Spin-off: i-Grape Laboratory S.L.	251
Otras alternativas de REUTILIZACIÓN de los SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN	253
IV.9. Otras alternativas de reutilización de los subproductos de vinificación	255
IV.9.1. Evolución del IPT y polifenoles en el bagazo de uva y semillas a lo largo del proceso de vermicompostaje	257
IV.9.2. Evolución del IPT en el vermicompost base	261
VINO BLANCO	265
IV.10. Estudio de vinos blancos gallegos de variedades autóctonas	267
IV.10.1. Estudio de la influencia del factor "Año de cosecha"	269
IV.10.2. Análisis del perfil polifenólico de los vinos blancos gallegos	269
IV.10.3. Correlación entre la composición polifenólica y la AA	276
IV.11. Diferenciación de los vinos monovarietales gallegos	277
IV.12. Diferenciación de los vinos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas	280
IV.13. Estudio de los vinos procedentes de variedades experimentales no autóctonas cultivadas en Galicia	286
IV.13.1. Comparación de 4 vinos de variedades autóctonas y de variedades experimentales.	294

IV.14.	Correlación entre el vino y su bagazo de partida	296
IV.15.	Contribución al estudio evolutivo de los polifenoles en función de diferentes técnicas de vinificación y conservación	298
IV.15.1.	Diferencias en el perfil polifenólico de un vino sometido a maceración	298
IV.15.2.	Degradación de los polifenoles en vino blanco	301
IV.15.2.1.	Influencia del oxígeno en la evolución de los vinos blancos	303
IV.15.2.2.	Estudio de la foto-degradación de los patrones de los ácidos caftarico y cafeico	307
IV.15.3.	Evolución de las características del vino blanco frente a la termo y foto-degradación	310
IV.15.4.	Conclusiones al estudio de degradación del vino blanco	317
V.	CONCLUSIONES	319
VI.	ANEXOS	329
VI.1.	Anexo I. Datos adicionales del proceso de escalado industrial	331
VI.1.1.	Datos de otras variedades y otras matrices en el escalado	331
VI.1.2.	Datos de diseños en la optimización del escalado	332
VI.1.3.	Datos de la robustez del proceso optimizado en el escalado	333
VI.1.4.	Datos del estudio de estabilidad del extracto	334
VI.2.	Anexo II. Publicaciones	339
VI.3.	Anexo III. Patentes de invención	340
VI.3.1.	Documentos de la Patente (P201231152)	340
VI.3.2.	Documentos de la Patente (PCT/ES2013/070526)	344
VI.3.3.	Documentos de la Patente (P201300935)	349
VI.4.	Anexo IV. I+D+i	352
VI.4.1.	Proyecto ARGOS	352
VI.4.2.	Resumen ejecutivo i-Grape	352
	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	359
	BIBLIOGRAFÍA	367

Índice de tablas

Tabla 1 Principales ventajas e inconvenientes de los antioxidantes sintéticos y naturales.....	39
Tabla 2. Compuestos polifenólicos en algunas frutas y vegetales ¹³	40
Tabla 3 Ejemplos de alimentos que presentan compuestos polifenólicos ¹⁵⁻¹⁷	41
Tabla 4. Clasificación de compuestos fenólicos ¹⁸	43
Tabla 5. Comparación de la concentración de polifenoles totales (mg GAE/g peso seco) de diferentes matrices.....	47
Tabla 6 Reactivos, disolventes y dispersantes	95
Tabla 7 Patrones.....	96
Tabla 8 (Continuación Tabla 7) Patrones	97
Tabla 9. Rangos de concentraciones de los patrones de polifenoles.....	101
Tabla 10 Condiciones cromatográficas y espectrofotométricas en HPLC-DAD	103
Tabla 11 Condiciones cromatográficas y espectrofotométricas en LC-MS/MS	105
Tabla 12 Condiciones cromatográficas y espectrométricas en LC-MS/MS.....	106
Tabla 13 Origen de las muestras de bagazo y de vino (D.O. Rías Baixas)	110
Tabla 14 (Continuación Tabla 13) Origen de las muestras de bagazo y de vino (D.O. Rías Baixas)	111
Tabla 15 Origen de las muestras de bagazo y de vino (otras D.O.).....	111
Tabla 16 Distribución de muestras de bagazo por cosecha y variedad	112
Tabla 17 Distribución de muestras de vino por cosecha y variedad	114
Tabla 18. Características del diseño experimental de Cribado (PSE).....	117
Tabla 19. Matriz de experimentos del diseño experimental de Cribado (PSE)	118
Tabla 20. Características del diseño de Superficie de Respuesta (PSE)	118
Tabla 21. Matriz de experimentos del diseño de Superficie de Respuesta (PSE)	119
Tabla 22 Características del diseño de Superficie de Respuesta (MSPD).....	121
Tabla 23 Matriz de experimentos del diseño de Superficie de Respuesta (MSPD)	122
Tabla 24 Características de las columnas utilizadas en el escalado del proceso de extracción	123
Tabla 25 Características del diseño de Cribado (Escalado)	126
Tabla 26 Matriz experimental del diseño de Cribado (Escalado)	127
Tabla 27 Características del diseño de Superficie de Respuesta (Escalado)	128
Tabla 28 Matriz experimental del diseño Superficie de Respuesta (Escalado).....	128
Tabla 29 Datos del origen de los vinos utilizados en los test de degradación	138
Tabla 30 Parámetros experimentales en LC-MS/MS para cada compuesto polifenólico	145
Tabla 31. Rectas de calibrado de polifenoles analizados mediante HPLC-DAD.....	148
Tabla 32. Precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método de HPLC-DAD	149
Tabla 33 Parámetros experimentales para cada compuesto en LC-MS/MS	150
Tabla 34 Rectas de calibrado de polifenoles seleccionados analizados por LC-MS/MS	151
Tabla 35 Precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método de LC-MS/MS	152
Tabla 36. Valores de F y p obtenidos mediante ANOVA para los 6 factores analizados (PSE) (se han resaltado con un asterisco y en negrita los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%).	160
Tabla 37. Valores de F y p obtenidos mediante ANOVA para los 2 factores analizados (PSE) (se han resaltado con un asterisco los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%).	164
Tabla 38. Resumen de los valores de los factores optimizadas en las extracciones por PSE.....	167
Tabla 39. Recuperación, linealidad, precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto (cuantificación por HPLC-DAD).	169

Tabla 40 Recuperación, precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto (cuantificación por LC-MS/MS).....	170
Tabla 41 Resultados del ANOVA en la optimización de la extracción por MSPD de los polifenoles del bagazo. (Se han resaltado con un asterisco los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%)	173
Tabla 42 Características del método de MSPD optimizado.....	174
Tabla 43 Parámetros de validación del método de MSPD.....	175
Tabla 44 Valores promedio de IPT, TF, TFC y THC en el estudio comparativo de sistemas de conducción de la vid	177
Tabla 45 Resultados del ANOVA en el estudio de comparación de sistemas de conducción de la vid	177
Tabla 46 Valores promedio de las variables medidas en función de los diferentes sistemas de conducción de la vid	179
Tabla 47 Valores promedio de las variables para los diferentes sistemas de conducción de la vid en vino	182
Tabla 48. Valores promedio de IPT, AA y concentraciones de polifenoles individuales de los bagazos de variedades autóctonas. Grupos homogéneos	190
Tabla 49 Datos polifenólicos de diferentes matrices obtenidos por otros autores	195
Tabla 50 Correlación entre la concentración de polifenoles y la AA.....	197
Tabla 51 Tabla de clasificación de los bagazos por variedades autóctonas.....	199
Tabla 52 Probabilidad de confusión de variedades poco estudiadas	199
Tabla 53 Valores promedio de AA, IPT y concentraciones de polifenoles individuales de los bagazos albariños de la subzonas de la D.O. Rías Baixas. Grupos homogéneos.....	204
Tabla 54 Tabla de clasificación de los bagazos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas	208
Tabla 55 Tabla de clasificación de los bagazos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas (excluida la Ribera del Ulla).....	209
Tabla 56 Valores promedio de IPT, AA y concentraciones de polifenoles individuales de los bagazos experimentales. Grupos homogéneos	213
Tabla 57 Tabla de clasificación de los bagazos experimentales.....	217
Tabla 58 Tabla de probabilidades de confusión de las variedades experimentales con las variedades autóctonas.....	219
Tabla 59 Influencia de los factores estudiados en el proceso de escalado en el valor del IPT.....	226
Tabla 60 Datos optimizados para el diseño de "Superficie de Respuesta" (Escalado)	234
Tabla 61 Condiciones finales optimizadas a escala de laboratorio en el proceso de escalado	235
Tabla 62 Características del extracto final	238
Tabla 63 Evaluación de la robustez del proceso industrial	239
Tabla 64 Datos estadísticos del estudio de estabilidad del extracto polifenólico.....	243
Tabla 65 Datos polifenólicos de diferentes variedades de vino blanco obtenidos por otros autores.....	268
Tabla 66 Valores promedio de AA, IPT y concentraciones de polifenoles individuales de los vinos blancos gallegos. Grupos homogéneos	273
Tabla 67 Correlación entre la concentración de polifenoles y AA en los vinos blancos gallegos.....	277
Tabla 68 Tabla de clasificación de los vinos monovarietales blancos gallegos	278
Tabla 69 Probabilidad de confusión entre vinos de distintas variedades	279
Tabla 70 Valores promedio de AA, IPT y concentraciones de polifenoles individuales de los vinos de la variedad albariño de la subzonas de la D.O. Rías Baixas. Grupos homogéneos	282
Tabla 71 Tabla de clasificación de los vinos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas"	286
Tabla 72 Valores promedio de IPT, AA y concentraciones de polifenoles individuales de los vinos experimentales. Grupos homogéneos.....	289
Tabla 73 Tabla de clasificación de los vinos experimentales.....	293

<i>Tabla 74 Probabilidad de confusión de las variedades experimentales con las variedades autóctonas..</i>	<i>296</i>
<i>Tabla 75 Correlación entre los vinos y su bagazo de partida</i>	<i>297</i>
<i>Tabla 76 Comparación del perfil polifenólico de un vino blanco sometido o no a maceración</i>	<i>300</i>
<i>Tabla 77 Características iniciales de los vinos utilizados en los test de degradación</i>	<i>302</i>
<i>Tabla 78 Condiciones experimentales de los experimentos realizados en las columnas x20</i>	<i>331</i>
<i>Tabla 79 Valores de IPT y AA en los extractos de las diferentes variedades de bagazo y semillas obtenidas en la columna x20.....</i>	<i>331</i>
<i>Tabla 80 Resultados de IPT y AA en el diseño de Cribado (Escalado).....</i>	<i>332</i>
<i>Tabla 81 Resultados de IPT y AA en el diseño de Superficie de Respuesta (Escalado).....</i>	<i>332</i>
<i>Tabla 82 Resultados de IPT y AA en el estudio de robustez del proceso de escalado.....</i>	<i>333</i>
<i>Tabla 83 Valores de los polifenoles en el estudio de robustez del proceso de escalado.....</i>	<i>333</i>
<i>Tabla 84 Valores del estudio de estabilidad del extracto</i>	<i>334</i>
<i>Tabla 85 Continuación (Tabla 84) Valores del estudio de estabilidad de extracto.....</i>	<i>335</i>
<i>Tabla 86 Valores de absorbancia durante el estudio de estabilidad del extracto.....</i>	<i>336</i>
<i>Tabla 87 (Continuación Tabla 86) Valores de absorbancia durante el estudio de estabilidad del extracto</i>	<i>337</i>
<i>Tabla 88 Valores de AA del ácido ascórbico durante el estudio de estabilidad.....</i>	<i>338</i>



Índice de figuras

Figura 1 Mecanismo de ataque de los radicales libres	37
Figura 2 Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes	38
Figura 3. Estructura Básica de los Flavonoides.....	44
Figura 4 Mecanismo antioxidante de los flavonoides	45
Figura 5. Acumulación de residuos del proceso de vinificación en una bodega gallega	55
Figura 6 Mapa de las 5 D.O. de Galicia	58
Figura 7 Morfología de la cepa de vid	61
Figura 8 Sistema de conducción Arqueado.....	62
Figura 9 Sistema de conducción GDC (Geneva Double Curtain).....	62
Figura 10 Sistema de conducción SH (Scott Henry)	63
Figura 11 Sistema de conducción Espaldera.....	63
Figura 12 Sistema de conducción Parra.....	64
Figura 13 Efectos positivos (+) y negativos (-) de las lombrices de tierra sobre los microorganismos	65
Figura 14 Lombriz de tierra de la especie Eisenia andrei.....	66
Figura 15. Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante la PSE	76
Figura 16. Esquema de la instrumentación de PSE.....	78
Figura 17. Etapas en la extracción por PSE.....	79
Figura 18 Representación esquemática del proceso de MSPD. Adaptado de: Tesis Doctoral “Estudio del comportamiento fotoquímico y determinación de compuestos fitosanitarios en matrices medioambientales y agroalimentarias mediante técnicas avanzadas de extracción y microextracción” Fernández-Alvarez, M. (2009)	86
Figura 19 Distribución por variedades de las muestras de bagazo	113
Figura 20 Esquema del protocolo de extracción mediante PSE	116
Figura 21 Esquema del proceso de extracción mediante MSPD.....	120
Figura 22 Columna de extracción (X20).....	123
Figura 23 Columna industrial	129
Figura 24 Esquema del protocolo del estudio de estabilidad	134
Figura 25 Vermirreactor continuo de descarga vertical	136
Figura 26 Esquema del proceso de vermicompostaje del bagazo de uva	137
Figura 27 Representación del test de foto-degradación	139
Figura 28 Representación del test de termo-degradación	139
Figura 29. Comparación de los espectros de los ácidos gálico, cafeico y caftárico; los flavonoles catequina y epicatequina y los flavanoles quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y quercetina.....	146
Figura 30 Cromatogramas tipo de HPLC-DAD de una muestra de un vino loureiro (color negro) y de bagazo albariño extraído mediante PSE (color rosa)	147
Figura 31 Cromatograma (TIC: de ion total) de un extracto de bagazo y de un vino albariño	151
Figura 32. Comparación de los extractos de PSE, con y sin ciclos previos de limpieza	158
Figura 33. Comparación de los extractos de PSE obtenidos con 1, 2 y 5 ciclos de extracción ($\lambda = 280\text{nm}$)	159
Figura 34. Comparación de los extractos de PSE obtenidos con 1, 2 y 5 ciclos de extracción ($\lambda = 350\text{nm}$)	159
Figura 35 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño de Cribado (PSE) Variables cromatográficas	161

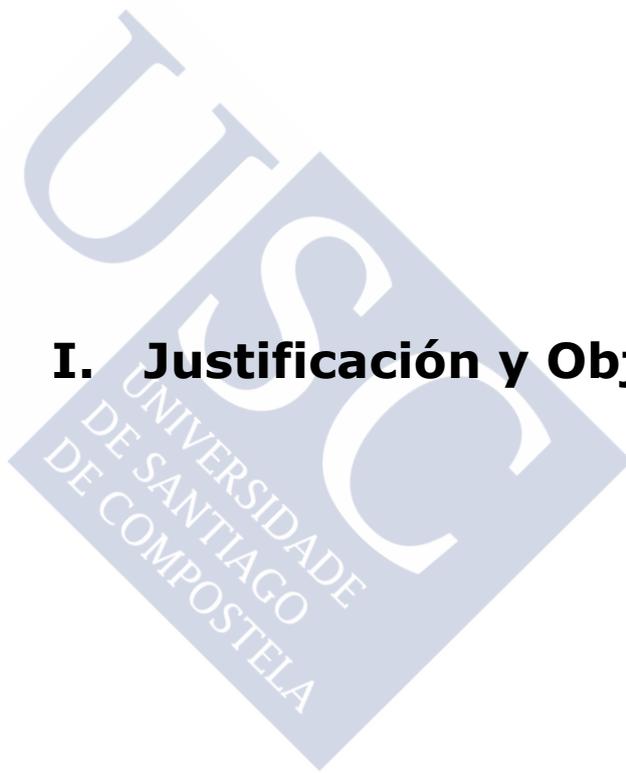
Figura 36 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño de Cribado (PSE) Variables espectrofotométricas.....	162
Figura 37 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño “Superficie de Respuesta” (PSE) Variables espectrofotométricas.....	165
Figura 38 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño “Superficie de Respuesta” (PSE) Variables cromatográficas	166
Figura 39 Comparación de los diferentes dispersantes en la extracción de polifenoles de bagazo mediante MSPD.....	171
Figura 40 Comparación de los diferentes disolventes en la extracción de polifenoles de bagazo mediante MSPD	172
Figura 41 Gráficas de efectos principales para IPT, TF, TFC y THC en la optimización de la extracción por MSPD.....	174
Figura 42 Sistema de conducción de tipo Espaldera con doble Guyot	176
Figura 43 Gráficos de medias y grupos homogéneos de los sistemas de conducción (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double courtain; P: parra; SH: Scott Henry)	178
Figura 44 Valores promedio acumulados de los polifenoles en las diferentes técnicas de conducción (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double courtain; P: parra; SH: Scott Henry).....	180
Figura 45 Comparación de IPT y AA en los diferentes sistemas de conducción (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double courtain; P: parra; SH: Scott Henry).....	180
Figura 46 Valores promedios acumulados de los polifenoles en vinos en las diferentes técnicas de conducción (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double courtain; P: parra; SH: Scott Henry)	183
Figura 47 Comparación de IPT y AA en función de los diferentes sistemas de conducción en vino (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double courtain; P: parra; SH: Scott Henry).....	184
Figura 48 Datos de producción de uva en la D.O. Rías Baixas.....	186
Figura 49 Valores promedio de los polifenoles de las variedades de bagazo autóctonas gallegas	187
Figura 50 Comparación de los valores de IPT y AA de las variedades de bagazo autóctonas gallegas ...	188
Figura 51 Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de las variedades autóctonas de bagazo	191
Figura 52 (continuación de la Figura 51) Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de las variedades autóctonas de bagazo.....	192
Figura 53 Valores de IC ₅₀ para los polifenoles estudiados.....	194
Figura 54 Representación gráfica de las funciones de discriminación por variedades autóctonas.....	198
Figura 55 Comparación de la distribución de la producción de albariño y el muestreo en la D.O. Rías Baixas	201
Figura 56 Mapa de las subzonas de la D.O. Rías Baixas.....	202
Figura 57 Valores promedio de los polifenoles de los bagazos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas	203
Figura 58 Comparación de los valores de IPT y AA de los bagazos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas	204
Figura 59 Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos de las subzonas de la D.O. Rías Baixas	206
Figura 60 (Continuación Figura 59) Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos de las subzonas de la D.O. Rías Baixas.....	207
Figura 61 Representación gráfica de las funciones de discriminación por subzonas de la D.O. Rías Baixas de los bagazos de la variedad albariño	208
Figura 62 Representación gráfica de las funciones de discriminación por subzonas de la D.O. Rías Baixas de los bagazos de la variedad albariño (excluida la subzona de la Ribeira do Ulla).....	209
Figura 63 Valores promedio de los polifenoles de las variedades de bagazos experimentales.....	211
Figura 64 Comparación de los valores de IPT y AA de las variedades de bagazos experimentales.....	212
Figura 65 Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos experimentales	215

Figura 66 (Continuación Figura 65) Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos experimentales	216
Figura 67 Representación gráfica de las funciones de discriminación por variedades experimentales ...	217
Figura 68 Comparación de la suma de polifenoles de los bagazos de las variedades autóctonas y experimentales	219
Figura 69 Representación gráfica de las funciones de discriminación de las variedades de bagazo autóctonas y experimentales	220
Figura 70 Valores de IPT de las variedades alternativas de bagazo blanco y semillas.....	229
Figura 71 Valores de AA de las variedades alternativas de bagazo blanco y semillas	230
Figura 72 Cartas Pareto del diseño experimental de Cribado (Escalado).....	232
Figura 73 Cartas Pareto y efectos principales en el diseño de "Superficie de Respuesta" (Escalado)	233
Figura 74 Comparación de los valores de IPT en las extracciones del diseño experimental a escala de laboratorio y a escala industrial	236
Figura 75 Comparación de los valores de AA en las primeras extracciones con la columna industrial....	236
Figura 76 Comparación visual de los extractos filtrados y sin filtrar	237
Figura 77 Uvariño®	237
Figura 78 Prueba del estudio de inhibición del extracto polifenólico en la bacteria <i>S. aureus</i>	240
Figura 79 Estudio de la actividad antibacteriana del extracto en <i>Bacillus spp.</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. acnes</i>	240
Figura 80 Estudio de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto polifenólico para <i>S. aureus</i> y <i>Bacillus spp.</i>	242
Figura 81 Evolución del color en el extracto polifenólico durante el estudio de estabilidad	244
Figura 82 Estructura de la epicatequina-3-galato y la epigallocatequina-3-galato.....	245
Figura 83 Evolución del IPT y AA del extracto polifenólico en el estudio de estabilidad	246
Figura 84 Evolución de la concentración del ác. gálico, catequina, epicatequina y suma de quercetinas del extracto polifenólico durante el estudio de estabilidad.....	247
Figura 85 Evolución de la AA de la disolución de ácido ascórbico durante el estudio de estabilidad	249
Figura 86 Comparación del IC ₅₀ del extracto polifenólico, el ác. ascórbico y los antioxidantes sintéticos BHT y BHA.....	250
Figura 87 Evolución del IPT del bagazo y de las semillas en el proceso de vermicompostaje	257
Figura 88 Evolución del ác. gálico, catequina y epicatequina en las semillas durante el proceso de vermicompost.....	260
Figura 89 Evolución del IPT en el vermicompost base durante el proceso de vermicompost.....	261
Figura 90 Valores promedio de los polifenoles de vinos blancos monovarietales de Galicia	270
Figura 91 Gráficos de los valores promedio de las variedades autóctonas gallegas de vino blanco	274
Figura 92 (continuación Figura 91) Gráficos de los valores promedio de las variedades autóctonas gallegas de vino blanco	275
Figura 93 Representación gráfica de las funciones de discriminación de los vinos monovarietales blancos gallegos	278
Figura 94 Valores promedio de los polifenoles de los vinos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas.....	281
Figura 95 Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas	283
Figura 96 (Continuación Figura 95) Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas.....	284
Figura 97 Representación gráfica de las funciones de discriminación para las subzonas de la D.O. Rías Baixas de los vinos de la variedad albariño	286
Figura 98 Valores promedio de los polifenoles de las variedades experimentales de vino	288
Figura 99 Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos experimentales	291
Figura 100 (Continuación Figura 99).Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos experimentales	292

Figura 101 Representación gráfica de las funciones de discriminación para los vinos experimentales ...	293
Figura 102 Comparación de la suma de polifenoles de los vinos de las variedades autóctonas y experimentales	294
Figura 103 Comparación de la AA e IPT de los vinos de las variedades autóctonas y experimentales	295
Figura 104 Comparación del perfil polifenólico de un vino macerado y sin macerar	299
Figura 105 Reacción de hidrólisis del ácido caftárico en ácido cafeico y ácido tartárico	300
Figura 106 Diferencia de la Abs a 420nm del vino en el test de termo-degradación, en presencia o no de oxígeno	304
Figura 107 Aspecto del vino albariño después de la termo-degradación con y sin oxígeno	304
Figura 108 Variación del IPT durante la termo-degradación en presencia o no de oxígeno	305
Figura 109 Variación de la AA después de la termo-degradación en presencia o no de oxígeno	305
Figura 110 Variación del ácido caftárico y ácido cafeico después de la termo-degradación en presencia o no de oxígeno	306
Figura 111 Evolución del patrón de ácido caftárico durante la foto-degradación de un patrón puro (25 mg/L)	308
Figura 112 Evolución del patrón de ácido cafeico durante la foto-degradación	309
Figura 113 Evolución de la AA del ácido caftárico y del ácido cafeico durante la foto-degradación	309
Figura 114 Evolución de la AA y del Pardeamiento (Abs. a 420 nm) durante los experimentos de la foto y termo-degradación de los vinos	311
Figura 115 Comparación visual de la evolución del pardeamiento de los vinos en el test de termo-degradación	313
Figura 116 Evolución de los ácidos caftárico, cafeico y gálico durante los experimentos de la foto y termo-degradación de los vinos	314
Figura 117 Estructura del ácido clorogénico	316



I. Justificación y Objetivos



En la industria alimentaria en general y en la del vino en particular se generan grandes cantidades de desechos (bagazo, raspones, lías etc.). Estos materiales crean problemas ambientales y de espacio debido principalmente a su almacenamiento, en muchos casos, prolongado. La cantidad de residuos acumulados en estas industrias podría reducirse significativamente mediante su reutilización.

Por otro lado, en la industria vitivinícola los subproductos contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos, cuya naturaleza química y concentración dependen de multitud de factores; como es el caso de la variedad de uva, la composición mayoritaria del residuo (piel, semillas, etc.), las condiciones edafo-climáticas, o su origen geográfico.

Estos residuos de la industria vitivinícola podrían utilizarse también como abono, ya que contienen nutrientes importantes para el desarrollo de cultivos, sin embargo la presencia de altas concentraciones de polifenoles supone un problema, puesto que pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de las raíces de las plantas.

Se sabe que los compuestos polifenólicos presentan actividad antioxidante entre otras características beneficiosas para la salud, por ello pueden ser utilizados para diversos fines en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Sin embargo, hay una falta significativa de estudios de viabilidad sobre la explotación adecuada de los residuos de la vinificación en blanco. Los escasos estudios que existen sobre la extracción de polifenoles de bagazo, están realizados fundamentalmente sobre variedades tintas.

Además, aunque en Galicia la mayoría de la producción vitivinícola es procedente de la variedad albariño, existen otras variedades de uva blanca autóctona menos conocidas y estudiadas, pero de gran calidad y muy apreciadas por los viticultores. Estas variedades aportan al vino características

distintivas que los hacen únicos, sin embargo no existen estudios, a día de hoy que aporten información sobre su perfil polifenólico o características antioxidantes. Por otra parte, se necesita que estos estudios sean sistemáticos durante varias cosechas para que los datos puedan ser representativos.

Este proyecto de tesis se centrará en los bagazos de uva y el vino blanco monovarietal, ya que en Galicia, el 80% de la producción de uva (≈ 62.000 Tm/año) procedente de las cinco Denominaciones de Origen (D.O.) corresponde a variedades blancas.

Por ello, los objetivos principales se centrarán en la identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos presentes en muestras de diferentes variedades autóctonas de bagazo y vino blanco, procedentes de las 5 D.O. de Galicia y, dentro de la D.O. Rías Baixas, de sus cinco subzonas. Con ello se pretende conseguir:

La caracterización polifenólica de las muestras de bagazo y vino blanco, mediante la identificación y cuantificación de sus polifenoles individuales (HPLC-DAD y LC-MS/MS) y mediante índices espectrofotométricos: IPT, TF, TFC y THC; además del análisis de su capacidad antioxidante. Esto permitirá:

- Comparar las muestras de bagazo y vino blanco para buscar posibles diferencias entre ellas, según la variedad, sistema de cultivo, zona geográfica y año de cosecha. Asimismo se incluirán en el estudio algunas variedades no autóctonas, pero cultivadas en Galicia, de forma experimental.
- Realizar un estudio de optimización y escalado de un proceso de extracción de polifenoles de bagazo de uva, para poder aplicarlo al sector industrial de los productores de ingredientes para cosmética.
- Contribuir al estudio de la evolución oxidativa del vino blanco por causas ambientales; para lo que se llevarán a cabo dos procesos diferentes de degradación del vino, con el fin de valorar los cambios con el tiempo de su aspecto visual, su actividad

antioxidante y su perfil polifenólico; y para conocer la influencia que tienen tanto la luz como la temperatura en la conservación vino.

- Contribuir al desarrollo de un proceso de vermicompostaje del bagazo de uva, para obtener un vermicompost estable y maduro; así como un método de separación mecánica adecuado para la evaluación y obtención de polifenoles de una manera rápida y eficaz.

Para ello se procederá a:

- Optimizar 3 procedimientos de extracción diferentes de los polifenoles de bagazos de uvas blancas basados en PSE, MSPD y a escala industrial, con criterios de la “Química verde” y utilizando para ello estrategias de diseño experimental (Cribado y RSM).
- Optimizar métodos cromatográficos con HPLC-DAD y LC-MS/MS para la separación y detección de compuestos polifenólicos en los extractos de bagazo y en las muestras de vino.



II. Introducción

II.1. Antioxidantes vs Radicales libres

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de radicales libres que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario; o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono, y ciertos medicamentos^{1,2}.

Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado, pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media^{2,3}.

Aunque para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres, los organismos aerobios han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa, el llamado sistema de defensa antioxidante, cuando nuestro organismo se ve desbordado por un exceso de radicales libres, prácticamente cualquier estructura biológica que lo integra (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y resultar dañada. Este fenómeno se conoce con el nombre de “estrés oxidativo”^{2,4}. El daño causado puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función enzimática, incremento de la permeabilidad celular y en ocasiones muerte celular por necrosis o apoptosis^{5,6}.

El mecanismo de ataque de los radicales libres se inicia cuando el radical libre le sustrae un átomo de hidrógeno o, alternativamente un electrón, a la molécula diana, lo que convertirá al electrón desapareado del radical en un par de electrones más estable (Figura 1).

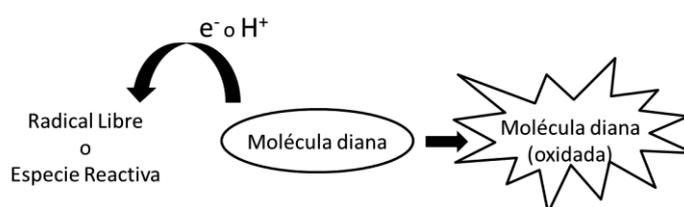


Figura 1 Mecanismo de ataque de los radicales libres

Los antioxidantes son sustancias capaces de contrarrestar las reacciones que provocan este estrés oxidativo². Según B. Halliwell⁵ un antioxidante es “cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana”. Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción, pero para que tenga actividad anti-radicalaria debe cumplir una característica básica, que es generar un radical más estable y menos dañino después de reaccionar con la especie radical⁷. Esta reacción se basa en una reacción redox en la que está implicada la donación de un electrón (o átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria. Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad⁸ (Figura 2).

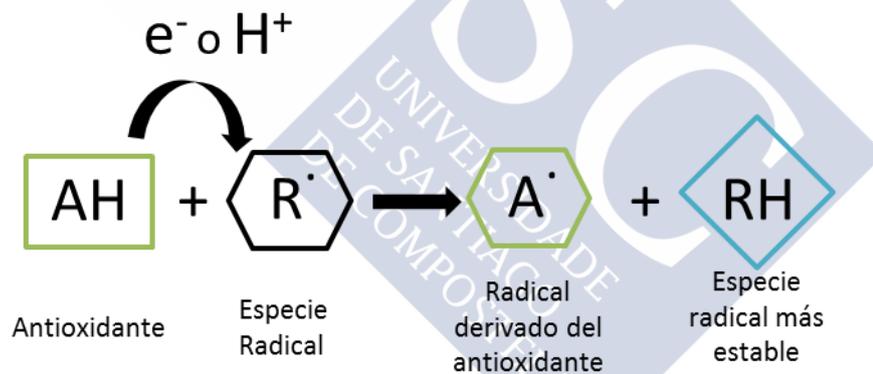


Figura 2 Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes

Hay dos categorías de antioxidantes en función de su origen: sintéticos y naturales. Los antioxidantes sintéticos se han aplicado en muchos productos, incluyendo fármacos, cosméticos y alimentos de consumo humano y animal. Los más populares son aquellos derivados de estructuras fenólicas o que tienen una configuración fenólica en su estructura molecular. Dos antioxidantes sintéticos muy utilizados en la industria son el BHA (Butilhidroxianisol) y el BHT (Butilhidroxitolueno).

Aunque los mecanismos de actuación son los mismos, existe una tendencia a evitar o minimizar el uso de sustancias sintéticas debido, entre otras cosas, a la conciencia de los consumidores respecto a cuestiones de seguridad y toxicidad, en relación a sus implicaciones en la salud por las acciones biológicas que desempeñan; a su menor solubilidad en agua y en emulsiones; y además, por la controversia basada en estudios recientes sobre la posible toxicidad del BHA y BHT, que hace que se considere el empleo de ciertos antioxidantes sintéticos con precaución. Las principales ventajas e inconvenientes de los antioxidantes sintéticos y naturales se encuentra resumidas en la Tabla 1⁹.

Tabla 1 Principales ventajas e inconvenientes de los antioxidantes sintéticos y naturales

Antioxidante sintético	Antioxidante natural
Económico	Mayor coste
Aplicaciones diversas	Uso restringido a algunos productos
Media a alta actividad antioxidante	Amplio intervalo de actividad antioxidante
Creciente preocupación por la seguridad	Percibidas como sustancias inocuas
Uso prohibido en algún alimento	Uso creciente y aplicaciones en expansión
Baja solubilidad en agua	Amplio intervalo de solubilidades
Interés decreciente	Interés creciente

En los últimos años, se está dedicando un gran esfuerzo a la identificación de sustancias de origen natural con capacidad antioxidante, con la finalidad de minimizar el consumo de los antioxidantes de origen sintético. El ácido ascórbico y los tocoferoles son los antioxidantes naturales más empleados comercialmente. Los carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos y proteínas son otros constituyentes del reino vegetal y animal, con actividad antioxidante^{2,10,11}

II.2. Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios, biosintetizados en el reino vegetal y por ello encontrados en

alimentos derivados de fuentes vegetales. Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con, por lo menos, un grupo hidroxilo¹².

En la siguiente tabla (Tabla 2) se puede ver el contenido en polifenoles totales encontrado en determinadas frutas y vegetales.

Tabla 2. Compuestos polifenólicos en algunas frutas y vegetales¹³

PRODUCTO	Polifenoles totales (mg/100g)
Plátano	150
Dátil	500
Cereza	360
Guinda	200
Manzana	1160
Mora	4180
Uva blanca	350
Uva tinta	950
Cebolla roja	10548
Raíz de Equinácea	3841

Los polifenoles son importantes para la fisiología de las plantas pues contribuyen a su resistencia a microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a factores ambientales estresantes (adversos), incluyendo radiaciones ultravioleta y altas temperaturas^{12,14}.

Muchos alimentos contienen polifenoles, incluyendo cereales y legumbres (cebada, maíz, nueces, avena, arroz, sorgo, trigo), semillas oleaginosas (colza, linaza, semillas de aceituna), frutas, vegetales y bebidas (zumos de frutas, té, café, cacao, cerveza y vino)¹³.

En la Tabla 3 se muestran diversos alimentos y uno de sus componentes polifenólicos más característico.

Tabla 3 Ejemplos de alimentos que presentan compuestos polifenólicos¹⁵⁻¹⁷

	Compuesto representativo	Fuentes en la dieta
Ác. Fenólicos		
Ácido Benzoico	Ácido gálico	
Ácido Cinámico	Ácido cafeico	
Flavonoides		
Flavonas	Apigenina	
Flavonoles	Quercetina	
Flavanonas	Naringenina	
Isoflavonas	Genisteína	
Flavanoles	Catequina	
Antocianinas	Cianidina	

II.3. Clasificación de los polifenoles

Los fenoles se clasifican en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico (Tabla 4).

Los fenoles simples se caracterizan por la presencia de un esqueleto fenólico: un anillo aromático con un grupo hidroxilo.

Introducción

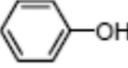
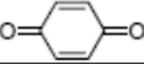
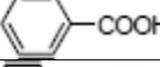
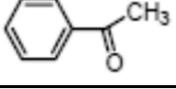
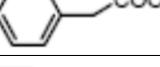
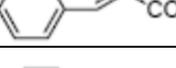
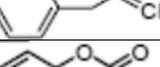
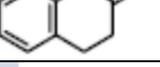
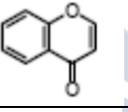
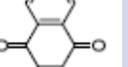
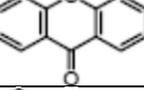
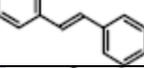
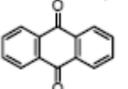
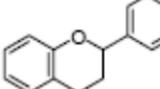
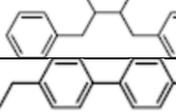
Los ácidos fenólicos, como por ejemplo los compuestos de tipo C6-C1 son los derivados del ácido benzoico, como el ácido gálico¹². De menor abundancia son los compuestos de tipo C6-C2, derivados del ácido fenilacético. El grupo de ácidos fenólicos simples más extenso es el C6-C3, que constituyen los derivados del ácido cinámico. Estos compuestos, junto con los de tipo C6-C1 y C6-C2, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal, como las glándulas productoras de aceites esenciales. Dentro de este grupo, los C6-C3, se encuentran también las cumarinas que son compuestos de tipo bicíclico y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, de las que se han aislado más de 1000 estructuras diferentes^{12,15}.

Los compuestos fenólicos pueden presentar actividad antioxidante en virtud, entre otros factores, de su capacidad donadora de electrones, es decir de su carácter reductor. La actividad reductora de los fenoles se debe a la presencia de los grupos hidroxilo en el anillo aromático, y su capacidad para deslocalizar los electrones del radical fenólico¹¹.

Dentro de los fenoles complejos se encuentran los estilbenos (C6-C2-C6). La forma molecular más extendida de este grupo es el resveratrol, muy característico de las familias Pinaceae como el pino; y Vitaceae como la vid. En esta última familia, a diferencia de la mayoría de vegetales, concretamente en el género *Vitis*, el resveratrol se encuentra en tejidos vivos que forman parte de diferentes órganos como las hojas o los frutos. Por ejemplo, en la uva el resveratrol se acumula principalmente en la epidermis, y por ello, las uvas y el vino constituyen una fuente casi exclusiva de resveratrol en la dieta humana. El resveratrol se ha convertido en el abanderado y más conocido de los polifenoles por el consumidor debido a un marketing muy agresivo en estos últimos años. Sin embargo, tenemos que tener en cuenta que otros compuestos polifenólicos presentan características antioxidantes semejantes o incluso mejores pero que son menos conocidos en el mercado.

Fenoles complejos son también los flavonoides e isoflavonoides, grupo que comprende más de 4000 estructuras químicas ampliamente representadas en la mayoría de las plantas superiores.

Tabla 4. Clasificación de compuestos fenólicos¹⁸

Nº carbonos	Categoría	Estructura básica
C6	Fenoles simples	
	Benzoquinonas	
C6-C1	Ácido Benzoico	
C6-C2	Acetofenonas	
	Ácido fenilacético	
C6-C3	Ácido cinámico	
	Fenilpropeno	
	Cumarinas	
	Cromonas	
C6-C4	Naftoquinonas	
C6-C1-C6	Xantonas	
C6-C2-C6	Estilbenos	
	Antraquinonas	
C6-C3-C6	Flavonoides	
(C6-C3) ²	Lignan, neolignan	
(C6-C1) ⁿ	Taninos hidrolizables	Polímeros heterogéneos= Ácidos fenólicos + azúcares simples
(C6-C3) ⁿ	Ligninas	Polímeros aromáticos muy enlazados

Introducción

Los flavonoides son un grupo de polifenoles caracterizados por el esqueleto carbonado C6-C3-C6. La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, los cuales normalmente condensan para formar un anillo pirano, y menos comúnmente un anillo furano¹¹.

Estos compuestos, están principalmente unidos a azúcares, aunque también se pueden encontrar sus formas libres. La presencia de muchos de ellos es fácilmente reconocible como pigmentos de flores y frutos. En la mayoría de los flavonoides la cadena carbonada que une los anillos A y B se cicla por acción de una isomerasa creando el núcleo del flavano (C). (Figura 3)

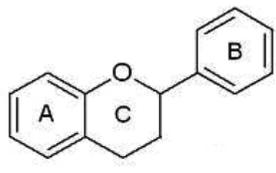


Figura 3. Estructura Básica de los Flavonoides

Se clasifican en función del grado de oxidación del anillo central (C), así se subdividen en flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianinas, en función de sus características¹⁹. Las flavonas, con 650 estructuras químicas, y los flavonoles, con más de 1000, son las formas moleculares más frecuentes. Este grupo también incluye las proantocianidinas que pueden formar polímeros, que son las catequinas o taninos condensados, pero estos compuestos a diferencia de los polímeros del ácido gálico, no experimentan hidrólisis²⁰.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en muchos vegetales y frutas en forma de glicósidos, en los cuales un azúcar sustituye al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo. Además pueden encontrarse conjugados con un ácido orgánico mediante un grupo éster, siendo

especialmente frecuente la esterificación con el ácido gálico. La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes, por cesión de un electrón o un hidrógeno, depende directamente del potencial de reducción y de la reactividad de los grupos hidroxilo^{15,21} (Figura 4).

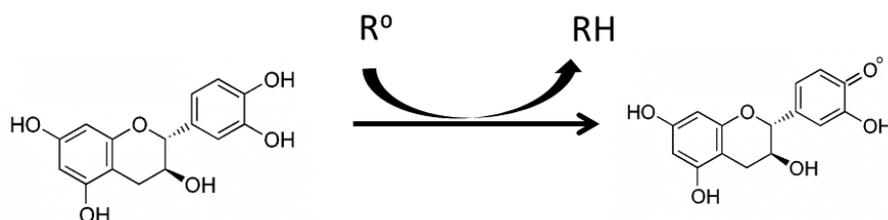


Figura 4 Mecanismo antioxidante de los flavonoides

II.4. Compuestos fenólicos presentes en la uva y el vino blanco

Los compuestos polifenólicos tienen un papel muy importante en la enología. Son los responsables de muchas de las diferencias entre un vino tinto y uno blanco, especialmente del color y del sabor. Han despertado un gran interés por sus propiedades saludables responsables de la “Paradoja francesa”*. Tienen propiedades antioxidantes, bactericidas y protegen de las enfermedades cardiovasculares.²²

La composición fenólica de las uvas y del vino es muy compleja. Depende de multitud de factores que hacen que el contenido polifenólico final varíe. En primer lugar hay factores que afectan a la uva como pueden ser: factores varietales, climatológicos y geográficos, entre otros. Estos factores influirán a su vez en el contenido polifenólico final del vino, además de otros, como las diferentes prácticas enológicas, técnicas de vinificación, crianza, almacenamiento, etc.²³⁻²⁷

* “Paradoja francesa”: Refleja el hecho de que en Francia, la incidencia de enfermedades cardiovasculares según la OMS es menor que en Estados Unidos, pese a que en Francia el consumo de grasas saturadas por habitante es mucho mayor. El secreto de esta contradicción desvela que el consumo moderado de vino a diario (un hábito muy común por parte de la mayoría de la población francesa), previene eficazmente de lesiones cardíacas, debido a sus múltiples propiedades antioxidantes.

II.4.1. Compuestos fenólicos presentes en la uva

Los compuestos polifenólicos presentes en la uva y en los productos derivados de la uva (zumo y vino) se pueden dividir en dos grupos:

Los ácidos fenólicos y compuestos relacionados: Los ácidos fenólicos más comunes en la uva incluyen ácidos cinámicos (por ejemplo, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico) y los ácidos benzoicos (ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido vanílico, ácido gálico)²⁸.

Los flavonoides: como los flavanoles (por ejemplo, catequina, epicatequina, sus polímeros y sus formas éster), flavanonas (la más común es la quercetina) y antocianinas, aunque sólo en el caso de uvas tintas¹³.

Los compuestos polifenólicos están heterogéneamente distribuidos dentro de las diferentes partes de la uva. La concentración polifenólica se distribuye entre la pulpa (10%), la piel (28-35%) y las semillas (60-70%)¹³.

Entre los compuestos fenólicos presentes en las semillas de uva se incluyen varios flavonoides, tales como 3-flavanoles monoméricos: (+)catequina, (-) epicatequina y epicatequin-3-galato, dímeros, trímeros, tetrameros y polímeros de hasta 15-16 unidades (procianidinas poliméricas) y ácidos fenólicos (gálico y elágico)²⁹.

La siguiente tabla (Tabla 5) es una comparación del índice de polifenoles totales (IPT) obtenido por diversos autores de diferentes partes de la uva.

Tabla 5. Comparación de la concentración de polifenoles totales (mg GAE/g peso seco) de diferentes matrices

POLIFENOLES TOTALES				
		mg GAE/g materia seca	Extracción	referencia
Uva	Blanca	4	-	Shi et al. 2005 ¹³
	Tinta	10	-	
Semillas uva		88	Ultrasonidos	Xu, et al. 2010 ³⁰
	Tinta	86	Agitación	Negro et al., 2003 ³¹
		103	Maceración/agitación	
	Blanca	111	Maceración/agitación	Makris, et al. 2007 ³²
Piel uva	Blanca	10	Maceración/agitación	
	Tinta	36	Maceración/agitación	
		33	Agitación	Negro et al., 2003 ³¹
Bagazo uva	Blanca	48	Maceración/agitación	Makris, et al. 2007 ³²
	Tinta	54	Maceración/agitación	
		42	Agitación	Negro et al., 2003 ³¹
		40	Maceración	Ky et al., 2014 ²⁸

II.4.2. Compuestos fenólicos presentes en el vino blanco

El vino blanco es el resultado de la fermentación alcohólica del zumo de la uva (mosto). Al contrario que en los vinos tintos, las partes sólidas de la uva sólo permanecen en contacto con el mosto durante la maceración, este proceso, cuando se lleva a cabo, ocurre antes de la fermentación y dura unas pocas horas. Por lo tanto, la cantidad de compuestos fenólicos que pueden ser extraídos es muy pequeña en comparación con lo que sucede en la vinificación de un vino tinto²².

El vino blanco contiene ácidos cinámicos, p-cumárico, ácido cafeico y trazas de ferúlico. Estos ácidos están presentes en sus formas libres y en combinación con ácido tartárico (ácido cutárico y caftárico)³³. Estos compuestos están relacionados con el pardeamiento del mosto de uva blanca. Los ácidos fenólicos son incoloros en una disolución diluida de etanol, pero una vez oxidados su color es amarillo. Organolépticamente no presentan ningún olor ni sabor, sin embargo son precursores de compuestos volátiles que aportan a los vinos aromas y sabores característicos²².

Los vinos blancos también contienen determinados flavonoides, como derivados de la quercetina, catequinas y procianidinas. Estos compuestos son pigmentos amarillos de mayor o menor intensidad. Flavonoles como la quercetina y el kaempferol, en su forma libre, también se han encontrado en vinos blancos³⁴. Las concentraciones más comunes están entre 1 y 3 mg/L aunque como estos compuestos están presentes sobre todo en la piel de la uva, la maceración produce un aumento muy significativo en su concentración final²².

II.5. Polifenoles y salud

La sociedad actual de los países desarrollados se caracteriza por tener hábitos alimenticios poco saludables, siendo esta una de las principales causas de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, derrames cerebrales y varios tipos de cáncer.

Según la OMS (Organización mundial de la salud) al menos un 80% de las muertes prematuras por cardiopatía y accidentes vasculares cerebrales podrían evitarse con una dieta saludable, consumiendo una dieta rica en frutas y verduras, actividad física regular y abandono del consumo del tabaco.³⁵

Estudios epidemiológicos han demostrado una clara asociación positiva y significativa entre la ingesta de estos productos alimenticios naturales, consumidos regularmente como parte de la dieta mediterránea, y la disminución en la tasa de enfermedades cardíacas, tipos frecuentes de cáncer y otras enfermedades degenerativas, así como el envejecimiento. Por lo tanto, es vital determinar la composición y el valor nutricional de estos productos¹⁸.

La protección que proporcionan las frutas y las verduras en contra de estas enfermedades se ha atribuido a la presencia de varios antioxidantes, especialmente a las vitaminas antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico

(vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) y β -caroteno (provitamina A). Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que sustancias (poli) fenólicas son los principales fitoquímicos con propiedades antioxidantes encontrados en las plantas superiores.

El análisis de estas sustancias ha sido de interés creciente en los últimos años, ya que la ingesta de estos compuestos es un factor importante para la protección de la salud. Los efectos beneficiosos de los polifenoles se han atribuido a su actividad antioxidante, es decir, a su capacidad para eliminar los radicales de oxígeno y otras especies reactivas³⁶.

Se sabe que los radicales libres causan daños en el cuerpo humano, y desempeñan un papel en enfermedades tales como cardiopatías, artritis, cáncer, arterioesclerosis, Alzheimer y cataratas, entre otras muchas. Se generan por el metabolismo normal del oxígeno dentro del cuerpo, y por el contacto con contaminantes ambientales, la radiación, la luz solar, las drogas, el humo del tabaco, ciertos productos químicos, bacterias, virus y parásitos. Los polifenoles actúan contra la oxidación de las LDL (*“Low density lipoproteins”*); además de poseer actividad anti-ulcerosa, anti-cancerígena y anti-mutagénica. El poder antioxidante de los polifenoles es la causa de estas actividades, que son capaces de contrarrestar a los radicales libres¹³.

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con una mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen además de actividad anti-cancerígena, antiviral, anti-inflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria³⁷.

Introducción

También proporcionan protección y regeneración de otros antioxidantes de la dieta como la vitamina E, además de ser quelantes de iones metálicos pro-oxidantes. Estudios experimentales en animales y líneas celulares humanas han demostrado que los polifenoles pueden desempeñar un importante papel en la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas cuando se toman a diario en cantidades adecuadas¹⁸.

Los efectos de los polifenoles sobre la salud dependen tanto de sus respectivas ingestas como de su biodisponibilidad, que puede variar mucho³⁶. Además el tipo y la concentración de compuestos fenólicos varían drásticamente entre plantas, y sus diferentes estructuras químicas o concentraciones pueden tener diferentes propiedades funcionales¹⁸. Así los distintos polifenoles tienen cada uno actividades particulares. Por ejemplo, se ha observado que el consumo de catequina y quercetina preservan la actividad de la paraoxonasa, enzima asociada a las HDL (*"High density lipoproteins"*³⁸).

Las catequinas, han demostrado ser potentes antioxidantes y eficaces compuestos en la prevención del cáncer, mientras que los taninos ejercen otros efectos fisiológicos como por ejemplo reducir la presión arterial.¹⁸

Catequina, epicatequina y galato-epicatequina son las principales catequinas, con importancia en la dieta para la salud humana. En los últimos años, las catequinas se han utilizado como antioxidante natural en los aceites y grasas contra la oxidación de lípidos; como suplemento para la alimentación animal, tanto para mejorar la salud de los animales como para proteger los productos de origen animal; como agentes antimicrobianos en los alimentos y como ingredientes funcionales para la salud en diversos alimentos y suplementos dietéticos³⁹.

Otra función de la catequina es que retrasa la oxidación del α -tocoferol y del β -caroteno⁴⁰. Por otra parte el ácido gálico posee actividad anti-radical peróxido, anti-fúngica y antioxidante en el rango de pH del estómago⁴¹.

Sanchez-Moreno et al⁴². comprobaron como el ácido gálico presentaba una inhibición de la peroxidación lipídica mayor que el antioxidante sintético BHA o el D-L- α -tocoferol.

Los hidroxycinamatos, como por ejemplo el ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido dimetoxicinámico, se consideran beneficiosos para la salud humana. Estos compuestos muestran una amplia variedad de funciones biológicas, como actividad antioxidante, propiedades anti-inflamatorias, anti-radicales libres y anti-cancerígena⁴³.

Todas estas características hacen de los polifenoles un material de posible interés para el desarrollo de alimentos funcionales o posible terapia para la prevención de algunas enfermedades³⁶.

II.6. Aplicaciones biotecnológicas de los polifenoles

El incremento de la resistencia de microorganismos patógenos aislados de humanos y animales, en combinación con la creciente preocupación de los consumidores por la utilización de productos químicos sintéticos como agentes conservantes, ha hecho que en los últimos años se evalúe el empleo de nuevos productos antimicrobianos y antioxidantes eficientes, de origen natural y sin efectos colaterales para la salud.

Los compuestos polifenólicos presentes en la uva y en otros materiales vegetales tienen numerosas aplicaciones en la industria debido a sus diferentes propiedades, como su carácter antioxidante o antimicrobiano entre otros^{44,45}. Estas aplicaciones pueden ser de utilidad en diferentes sectores, como por ejemplo:

Sector alimentario: En las empresas de alimentación pueden ser utilizados como suplemento alimenticio⁴⁶ para incrementar la ingesta de estos compuestos en la dieta, ya que su carácter antioxidante protege de determinadas enfermedades cardiovasculares⁴⁷. Por otra parte también pueden utilizarse como protectores del deterioro de determinados alimentos, como pueden ser vegetales, carne^{48,49} o pescado⁵⁰. Incluso presentan aplicación

como aditivos antimicrobianos en enología, ya que tienen relación con la inhibición de ciertas bacterias lácticas⁵¹ o como ingredientes funcionales en el queso⁵².

Sector cosmético: Por su elevada actividad antioxidante, son capaces de contrarrestar los radicales libres que dañan nuestras células y provocan el envejecimiento prematuro de la piel, además pueden ser utilizados como agentes protectores contra los efectos cancerígenos de la luz UV⁵³. Por otra parte, su actividad antibacteriana también supone un efecto conservante de los productos cosméticos en sí mismos, de este modo se reduciría el consumo de antioxidantes sintéticos poco apreciados por el consumidor.

Sector farmacéutico: pueden ser utilizado en productos antiacné ya que se ha comprobado su elevada eficacia eliminando bacterias relacionadas con esta patología, como puede ser *Staphylococcus aureus*⁵⁴. También se ha comprobado su eficacia contra la bacteria *Campylobacter jejuni*, que es el principal patógeno asociado a infecciones del intestino en todo el mundo y contra *Helicobacter pylorides* uno de los principales agentes etiológicos de la gastritis crónica y la úlcera duodenal⁵⁵. Incluso contra *Escherichia coli*⁵⁶ y *Candida albicans*⁵⁷. Incluso podrían ser utilizados para combatir enfermedades orales como la caries dental, ya que como demostraron Thimothe et al.⁵⁸ presentan actividad bacteriostática contra *Streptococcus mutans* bacteria asociada a esta patología.

II.7.Sostenibilidad y reciclaje en la industria agroalimentaria

Los recursos naturales son limitados y su demanda es cada vez mayor. La sociedad actual empieza a ser consciente de esta realidad y se muestra cada vez más abierta a toda actividad relacionada con el reciclaje y el aprovechamiento de los recursos. En los últimos años, ciencia e industria han unificado esfuerzos para aprovechar completamente los recursos naturales, con el objetivo de maximizar el rendimiento económico y minimizar el impacto medioambiental. Buena parte de este esfuerzo se ha centrado en la conservación de los bosques, el uso racional de la madera y de los residuos de

la agricultura, así como en encontrar nuevas aplicaciones para los productos de desecho^{59,60}.

Las industrias agrícola y forestal producen cada año un gran volumen de residuos, tanto sólidos como líquidos, resultado de los procesos de producción, preparación y consumo de sus productos. Estos desechos, además de un potencial riesgo medioambiental (asociado al exceso de biomasa), representan un problema económico debido al poco rendimiento que se extrae de ellos y al coste adicional que implica su eliminación⁶¹. Se necesita hacer sostenible la explotación de los recursos, por este motivo dichas industrias están centrando su interés en recuperar, reciclar, aumentar la calidad y, sobre todo, encontrar nuevas aplicaciones a estos residuos con el fin de sacar el mayor rendimiento posible de ellos. Si se dispone de la tecnología adecuada (y de procesos de extracción económicamente viables), estas sustancias residuales pueden ser convertidas en nuevos productos o ser recicladas para usarse como materia prima en procesos secundarios, en otras industrias o incluso como combustible alternativo. Estos desechos y subproductos a los que se les encuentran nuevas utilidades y que pueden ser reaprovechados, es lo que se conoce como productos de alto valor añadido y su obtención supone una nueva fuente de ingresos para la industria.

Los residuos vegetales de la industria agroalimentaria contienen considerables cantidades de compuestos potencialmente interesantes, pero el valor de los productos obtenidos debe compensar el coste de su recuperación. Por este motivo es necesario mejorar, por un lado, los procesos de extracción y, por el otro, corroborar la potencial utilidad y los requisitos de seguridad de los nuevos productos⁶².

En muchos procesos agroindustriales y forestales, como la elaboración de zumos y vinos y la producción de madera, se generan subproductos y residuos ricos en polifenoles. Estas sustancias, como ya se ha mencionado, han despertado el interés tanto de científicos como de la industria por el reconocimiento de sus propiedades antioxidantes y su probable papel en la

prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas⁶³. La extracción de polifenoles antioxidantes es un ejemplo del esfuerzo realizado para el aprovechamiento integral de los productos agrarios y forestales. Por ejemplo, los subproductos derivados del prensado de la uva (semillas, pieles, etc) o residuos de la industria de frutas o verduras son fuente de fibra dietética y antioxidantes que combina las ventajas de la fibra dietética con los polifenoles^{32,64}. Extractos parecidos se extraen de la corteza de pino y de la corteza de cacahuete^{32,65,66}.

II.8.Extracción de polifenoles de residuos vitivinícolas a escala industrial

La industria vitivinícola produce gran cantidad de residuos que representan un problema tanto económico como ecológico ya que su eliminación crea serios problemas ambientales.

Según datos de la FAO se produjeron mundialmente, en el año 2012 alrededor de 63 millones de toneladas al año de uva en el mundo y aproximadamente, el bagazo, las lías y los raspones, representan el 30% (m/m) de las uvas utilizadas. En la Figura 5 se puede ver la acumulación de estos residuos en una bodega de Galicia. En función de la variedad de uva, del tejido (piel, semillas, etc) y de las condiciones ambientales, estos subproductos pueden contener una concentración considerable de compuestos fenólicos⁶⁷.



Figura 5. Acumulación de residuos del proceso de vinificación en una bodega gallega

La carga de residuos en estas industrias puede reducirse significativamente mediante la reutilización⁶⁷. Con este objetivo, se están desarrollando procesos que pretenden convertir estos residuos en biocombustibles, ingredientes en alimentos, así como fuentes para la extracción de productos químicos de alto valor añadido⁶⁸.

Actualmente, el bagazo se utiliza principalmente para extraer ácido tartárico o para producir etanol, y el último uso de este residuo es como fertilizante. Pero el alto contenido en compuestos polifenólicos constituye un problema asociado a este uso, ya que pueden inhibir la germinación de las plantas^{69†}.

La explotación de estos subproductos de la industria del vino es muy importante, no sólo por la extracción de compuestos fenólicos con propiedades beneficiosas para la salud sino también desde el punto de vista medioambiental (debido a la gran acumulación de residuos)⁷⁰ y económico: las bodegas no sólo se deshacen del residuo, sino que idealmente éste se convierte en una fuente adicional de ingresos. Por todo ello, los residuos de la industria

[†] Para gestionar este problema, se ha desarrollado un procedimiento, que finalmente fue patentado (P201300935), cuyo título es: "Procedimiento para la obtención y aislamiento de un fertilizante orgánico y de semillas de uva a partir de residuos de uva", en el que se colaboró activamente analizando la evolución de la concentración polifenólica durante el proceso de vermicompost. (Anexo II. Apartado VI.3.3)

del vino han sido objeto de estudios^{44,69}. Sin embargo, la explotación de forma industrial de estos residuos se ha visto limitado por la falta de procedimientos documentados para la extracción de estos valiosos fitoconstituyentes. Por este motivo, es necesaria la optimización y estandarización de los procesos de extracción⁶⁷.

La mayoría de los estudios de extracción de polifenoles de bagazo de uva existentes, están realizados en variedades tintas ^{31,32,71-79}. Las variedades blancas están menos estudiadas y se han analizado prácticamente solo usando técnicas convencionales de extracción^{67,72,78,80-85}. Como ya se ha comentado, sólomente Gonzalez-Centeno et al.²⁴ y este mismo trabajo, han utilizado PSE como método de extracción en variedades blancas.

Por tanto, se requieren de métodos de extracción sencillos, rentables y fácilmente escalables para poder recuperar los polifenoles y valorizar así los residuos.

Algunos de los métodos de extracción anteriormente explicados, como son la PSE (Extracción mediante disolventes presurizados) y SFE (Extracción con fluidos supercríticos) presentan muy buenas recuperaciones para este tipo de compuestos, pero el problema principal es su coste y su difícil escalado⁸⁶. Un ejemplo es el estudio desarrollado por Cavero et al.⁸⁷, donde estudiaron la posibilidad de extracción de compuestos antioxidantes a partir de las hojas de orégano, utilizando SFE a escala piloto con 316 celdas de 285mL cada una.

Hasta la fecha se han estudiado diferentes métodos de extracción con capacidad para adecuarse a la industria. Autores como Viroth et al.⁸⁸ desarrollaron un método a escala piloto para la extracción de polifenoles a partir de los residuos de manzana, empleando ultrasonidos como técnica de extracción y etanol:agua como disolvente. El método consiste básicamente en someter a la mezcla del residuo de manzana y disolvente, durante 45 minutos a un baño de ultrasonidos con capacidad para 3 L de carga. Este método, según sus autores, presenta mejores recuperaciones que los métodos convencionales y disminuye considerablemente su coste, debido, entre otros factores, a la disminución del tiempo de extracción. Por otra parte, un

inconveniente es que requiere una etapa final de filtrado, para separar la matriz del extracto polifenólico.

Sanchez et al.⁸⁹ estudiaron también la posibilidad de extraer compuestos polifenólicos del bagazo de uva de la variedad albariño con un método a escala piloto que se basa en la extracción mediante una columna de cristal termostaticada de 10cm de diámetro a 50°C, utilizando aproximadamente 400g de muestra por extracción. El disolvente de extracción utilizado consistió en agua 100%, que fue introducida a contracorriente durante 180min. El principal inconveniente de este método es la necesidad de fraccionamiento del eluato, ya que el volumen inicial y final en la extracción se desecha. Así las diferentes fracciones presentarán diferentes compuestos polifenólicos dependiendo de su polaridad. Este tipo de extracción frecuentemente utilizada⁸⁰ es poco operativa para conseguir un método sencillo y eficiente de extracción a nivel industrial.

Aunque, como se ha expuesto, existen diversas técnicas para la extracción de polifenoles a partir de residuos vitivinícolas, existe todavía una necesidad de proporcionar un método sencillo, eficaz y fácilmente industrializable.

II.9. Panorama vitivinícola en Galicia

En Galicia actualmente existen 5 denominaciones de origen (D.O.) reconocidas (Figura 6): Rías Baixas, Riberia Sacra, Ribeiro, Valdeorras y Monterrei. Las variedades blancas representan el 90,1 % de la producción total, siendo el albariño la más cultivada.

Introducción

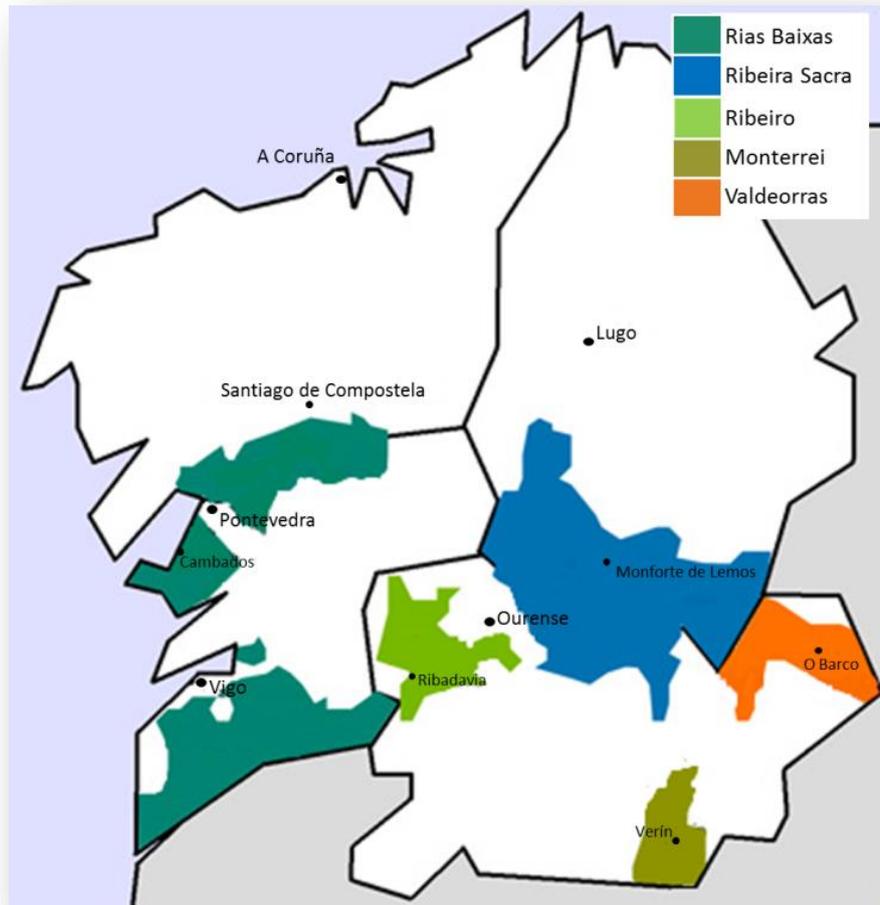


Figura 6 Mapa de las 5 D.O. de Galicia

Rías Baixas: Dentro de la D.O. Rías Baixas se pueden encontrar 5 subzonas que hacen referencia a 5 comarcas: Salnés (donde se concentra la mayor parte de los viñedos, representa el 60% de la producción de esta DO), Rosal, Condado de Tea, Soutomaior, todas en la provincia de Pontevedra, y Ribeira do Ulla en la provincia de A Coruña. La variedad albariño representa el 96% de la producción total de uva en esta D.O.

Ribeira Sacra: Esta D.O. se encuentra situada en el sur de la provincia de Lugo y en el norte de la de Ourense, en las riberas de los ríos Sil, Miño y sus afluentes. Dentro de esta denominación existen 5 subzonas (Chantada, Quiroga-Bibei, Ribeiras do Miño, Amandi y Ribeiras do Sil) con microclimas

diferentes. Las variedades blancas predominantes son godello, treixadura, albariño y loureiro.

Ribeiro: La D.O. Ribeiro está situada en la Galicia meridional, en el borde noroccidental de la provincia de Ourense, en las confluencias de los valles formados por los ríos Miño, Avia, Arnoia y Barbantiño. La variedad de uva blanca preferente es la Treixadura.

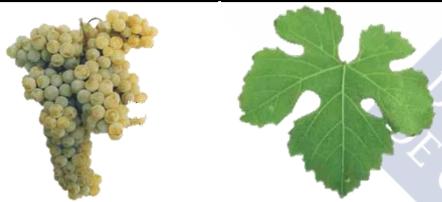
Monterrei: La D.O. Monterrei se extiende por los ayuntamientos de Castrelo do Val, Monterrei, Oímbra y Verín, en la parte oriental de la provincia de Ourense, extremo sureste de Galicia, en la frontera con Portugal, ocupando las laderas de los montes y los valles regados por el río Támega y sus afluentes. Las variedades blancas preferentes son; godello con el 70% de la producción de uva blanca, seguido de la treixadura que representa el 25%.

Valdeorras: La D.O. Valdeorras se encuentra al nor-este de la provincia de Ourense. Está constituida por los ayuntamientos de O Barco de Valdeorras, O Bolo, Carballeda de Valdeorras, Larouco, Petín y Vilamartín de Valdeorras. La variedad blanca preferente es el godello.

II.9.1. Principales variedades de uva de Galicia. Características

A continuación están esquematizadas las principales características de las siete variedades de uva blanca más utilizadas en Galicia. La información detallada procede de la EVEGA (Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia).

Introducción

Variedad	Descripción
ALBARIÑO 	Brotación temprana, de poca producción, racimo pequeño, resistente a Botrytis, sensible al oídio. Produce vinos de graduación alcohólica media-alta con acidez también elevada, muy aromáticos y equilibrados.
GODELLO 	Brotación temprana, de producción media, racimo pequeño, sensible a la Botrytis, maduración temprana. Produce vinos de graduación alcohólica alta, muy estructurados con mucho cuerpo, con aromas frutales y acidez media.
TREIXADURA 	Brotación tardía, producción media, racimo medio, resistente a Botrytis pero menos que albariño, maduración tardía. Produce vinos de graduación alcohólica media-alta, con acidez elevada, aromáticos y equilibrados.
LOUREIRO 	Brotación temprana y maduración tardía de racimo grande y producción alta, resiste a Botrytis. Produce vinos de acidez elevada, graduación alcohólica baja, muy aromáticos.
CAÍÑO BLANCO 	Variedad de vigor medio, brotación temprana y maduración tardía, producción media sensible a botrytis. Produce vinos aromáticos de graduación alcohólica media equilibrados en acidez.
TORRONTÉS 	Brotación temprana, de ciclo medio, de vigor alto, racimo grande, poco sensible a Botrytis. Su producción es alta. Produce vinos de graduación alcohólica y acidez media, de aromas finos.
BLANCA LEXÍTIMA 	Variedad de brotación y maduración muy temprana de racimo pequeño, buena resistencia a Botrytis. Produce vinos de graduación alta, equilibrados en acidez, muy aromáticos.

II.9.2. Diferentes sistemas de conducción de la vid

Los sistemas de conducción de la vid son el conjunto de técnicas escogidas por el viticultor para el establecimiento de su viñedo y posterior control de su desarrollo.

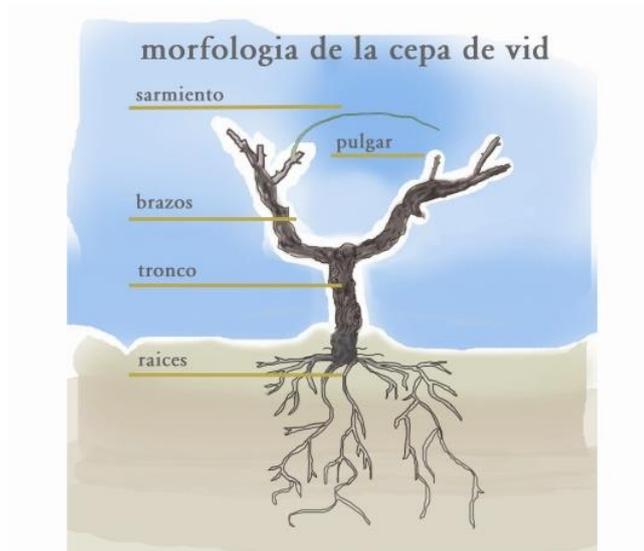


Figura 7 Morfología de la cepa de vid

La elección de un sistema u otro influye en factores fisiológicos como la eficacia fotosintética de la planta o el cuajado de las inflorescencias; y en factores microclimáticos como puede ser la insolación y la aireación. La variación en estos factores pueden influir entre otras en variables como el rendimiento de la planta (número de racimos y peso de cada racimo) y composición de la uva y el mosto.⁹⁰

Algunos de los sistemas más utilizados en Galicia son los siguientes:

- **Arqueado.** Se trata de una espaldera convencional con un marco de plantación de 3x2 metros, en la cual se usa como sistema de poda un arqueado doble al estilo de la Alsacia (Figura 8).

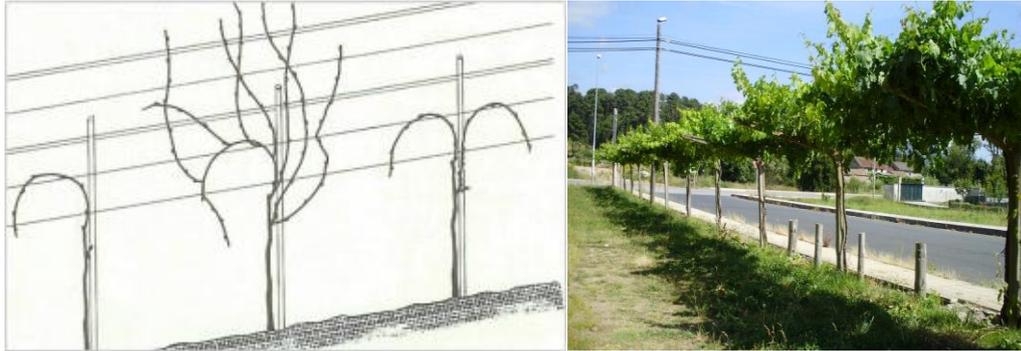


Figura 8 Sistema de conducción Arqueado

- **G.D.C.** Son las siglas de Geneva Double Curtain (Cortina Doble Descendiente). El marco de plantación es de 3x2 metros . Las plantas se forman también a 1,7m. El sistema de poda empleado es la pulgar y vara, y las varas se atan en dos alambres separados un metro, de forma que se crean dos planos de vegetación independientes en cada fila de plantas, que se conducen de forma descendente (Figura 9).



Figura 9 Sistema de conducción GDC (Geneva Double Curtain)

- **S.H.** Son las siglas de Scott Henry. Se trata de un sistema desarrollado en Australia y que consiste en crear dos planos de vegetación, uno ascendente y otro descendente. El marco de

Introducción

plantación es de 2,5x2 metros y en cada planta se dejan cuatro varas, dos en cada plano de vegetación (Figura 10).

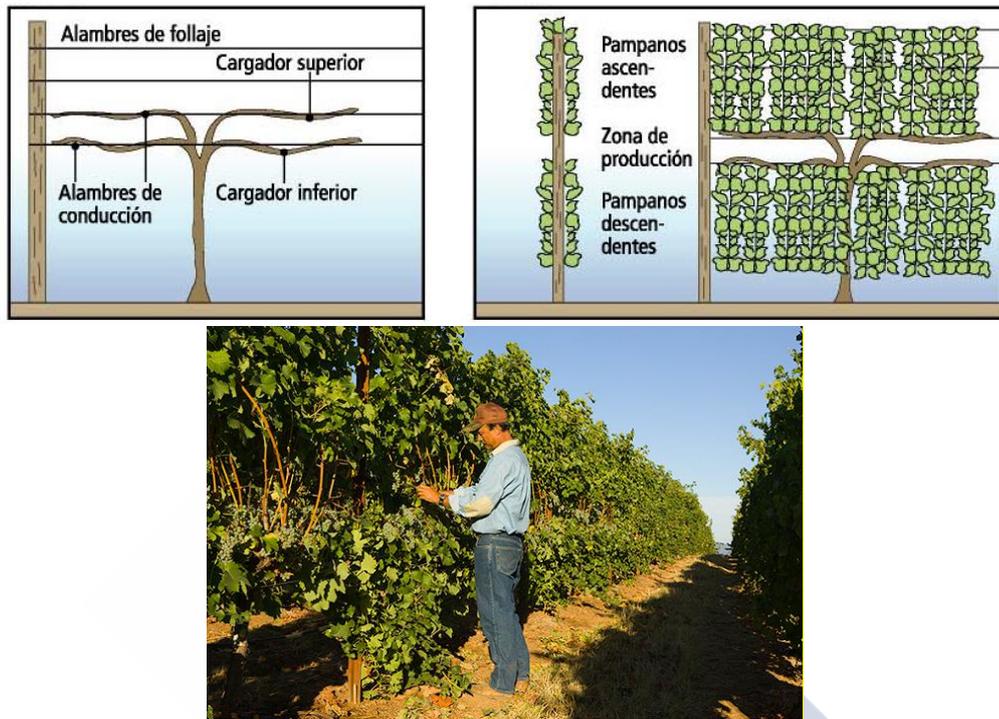


Figura 10 Sistema de conducción SH (Scott Henry)

- **Espaldera.** Es una espaldera convencional pero con calles estrechas con marco de plantación de 1,5x2 metros. El sistema de poda empleado es el doble Guyot (Figura 11).

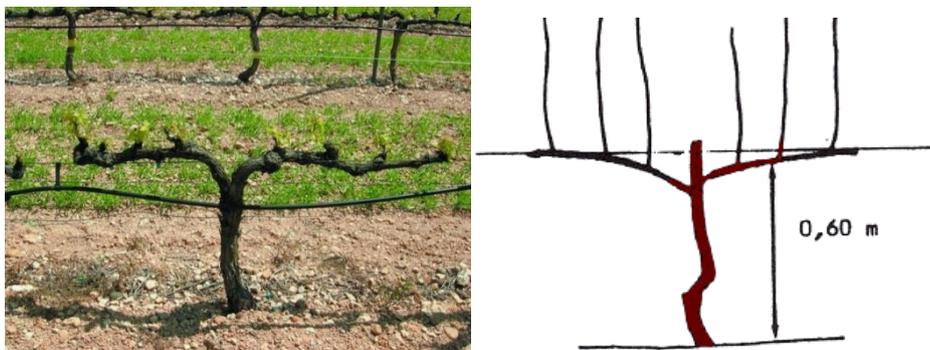


Figura 11 Sistema de conducción Espaldera

- **Parra.** Sistema de conducción tradicional con marco de plantación de 3x5 metros, con dos plantas en cada poste. La altura de formación es de 1,7 metros y el sistema de poda empleado es el pulgar y vara (Figura 12).



Figura 12 Sistema de conducción Parra

II.10. Vermicompostaje

Los sistemas de vermicompostaje sostienen una compleja cadena trófica donde las lombrices de tierra detritívoras interactúan de forma intensa con los microorganismos y demás fauna dentro de la comunidad descomponedora, acelerando así la estabilización de la materia orgánica y modificando sus propiedades físicas y bioquímicas⁹¹(Figura 13).

Introducción

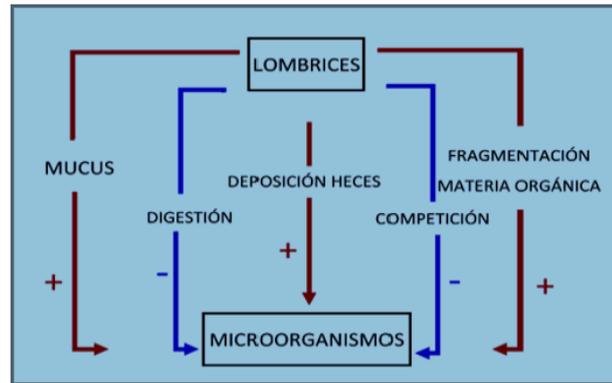


Figura 13 Efectos positivos (+) y negativos (-) de las lombrices de tierra sobre los microorganismos

Es un proceso de biooxidación, degradación y estabilización de los sustratos orgánicos que se desarrolla en dos fases que se pueden resumir en:

a) Una fase inicial o activa, en la cual las lombrices acondicionan y fragmentan el sustrato modificando sus propiedades físicas y biológicas, incrementando así la superficie disponible para el ataque de los microorganismos⁹¹.

b) Una fase de maduración en la cual los microorganismos asumen el control y degradan compuestos más complejos como la celulosa o lignina⁹¹. La duración de esta etapa está condicionada por la composición del material de partida y la eficacia de la fase activa que depende de la especie y densidad de lombrices, así como de sus tasas de ingestión y procesado de la materia orgánica⁹².

Las lombrices de tierra son anélidos oligoquetos macroscópicos que viven en el suelo. Son hermafroditas simultáneos que se reproducen repetidas veces a lo largo de su vida y cuyo crecimiento es indeterminado (Figura 14).



Figura 14 Lombriz de tierra de la especie *Eisenia andrei*

Las lombrices participan en el proceso de vermicompostaje realizando diferentes acciones:

- La fragmentación física del sustrato orgánico que aumenta la superficie de ataque para los microorganismos al fragmentarlo y su aireación a través de las actividades de excavación y deyección⁹³.

- La modificación, transporte e inóculo de la microflora presente en el residuo^{94,95}.

La descomposición de la materia orgánica tiene lugar mediante procesos asociados al paso de la misma a través de su aparato digestivo. Las lombrices son, por lo tanto, aceleradores del proceso de descomposición de la materia orgánica por medio del vermicompostaje⁹⁶; promoviendo así una separación mecánica del sustrato y transformando las partes mejor asimilables en el producto final, que es un vermicompost ya estabilizado, maduro, homogéneo, rico en nutrientes y de granulometría fina⁹⁷. El vermicompost maduro y estabilizado tiene valor como enmienda orgánica del suelo, con una baja relación C/N, una porosidad alta y una elevada capacidad de retención de agua. Su adición al suelo aumenta la porosidad, la retención de humedad, la disponibilidad de nutrientes para las plantas y reduce la acción de patógenos oportunistas⁹⁸.

En la actualidad, el vermicompostaje, y junto con el compostaje, constituye un método muy eficiente para el tratamiento de residuos orgánicos sólidos,

desde la eliminación del potencial contaminante hasta la conversión de estos residuos en biofertilizantes y bioplaguicidas y en un producto maduro y estabilizado.

II.11. Técnicas de extracción de polifenoles en matrices vegetales

La extracción de polifenoles de materiales vegetales ha sido llevada a cabo por métodos tradicionales de extracción sólido-líquido o líquido-líquido^{32,99}. Estos métodos conllevan el consumo de grandes cantidades de disolventes, largos tiempos de extracción y un riesgo de degradación de compuestos termolábiles. La extracción Soxhlet ha sido el más utilizado de los métodos tradicionales a pesar de que requiere un tiempo de extracción muy elevado (24 horas o más) y gran consumo de energía¹⁸.

Hoy en día se buscan procedimientos alternativos de extracción de polifenoles basados en técnicas que reduzcan el tiempo de extracción, el consumo de disolventes y que aumenten los rendimientos y la recuperación de los analitos.¹⁸ A continuación se explicarán brevemente algunas de ellas.

II.11.1. Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos (SFE, "Supercritical fluid extraction") es una técnica que emplea un disolvente en condiciones supercríticas. Los fluidos supercríticos presentan propiedades intermedias entre un gas y un líquido que favorecen su penetración en diferentes matrices y, por tanto, la solubilización de los solutos.

El término supercrítico se utiliza para describir cualquier fluido cuya temperatura y presión se encuentran por encima de su punto crítico. Es un fluido comprimible que se comporta como un gas (llena y toma la forma de su contenedor) pero tiene la densidad de un líquido (0,1-1 g.ml⁻¹) y su poder disolvente.

Introducción

El disolvente más utilizado es el CO₂ debido a sus características físicas, ya que posee tanto una temperatura crítica (31 °C) como una presión crítica (73 atm) bajas. Esta técnica utiliza altas presiones, por lo que la extracción se lleva a cabo a temperaturas más bajas, que preservan la calidad de los extractos.

Según los estudios llevados a cabo por Ghafoor et al.¹⁰⁰, que optimizaron la extracción por SFE de polifenoles en la piel de uva, esta técnica se puede utilizar como una alternativa a los métodos convencionales de extracción con disolventes orgánicos. La extracción se vio afectada significativamente por la temperatura, la presión de extracción y por el contrario, el efecto de la concentración de modificador no fue significativo. Este estudio también revela que la piel de la uva es una buena fuente de compuestos fenólicos.

Un estudio para la optimización de la extracción de polifenoles a partir de semillas de uva mediante SFE, puso de manifiesto que las variables más significativas en la recuperación de polifenoles en esta matriz fueron la temperatura, la presión y la cantidad de disolvente utilizado.¹³

Si se comparan las ventajas y las limitaciones de la SFE frente a otras técnicas convencionales de preparación de muestra, como la extracción Soxhlet o la utilización de los ultrasonidos, se puede concluir que:

- generalmente se utiliza CO₂ como disolvente extractante que no es tóxico ni inflamable,
- las recuperaciones obtenidas en las condiciones óptimas de trabajo pueden ser superiores a las obtenidas con los métodos convencionales. Esto se debe al poder disolvente, polaridad, alta difusividad y temperatura del fluido supercrítico, que contribuye a que se complete la extracción ¹⁰¹
- requiere menores tiempos de extracción y existe la posibilidad de extraer compuestos termolábiles.

Como limitaciones de la SFE pueden considerarse:

- la dificultad para extraer compuestos polares e iónicos. Muchos compuestos activos de plantas como los fenoles, alcaloides y los

compuestos glicosídicos son poco solubles en CO₂ y por lo tanto no son extraíbles¹⁰² y

- tiene mayor complejidad técnica que los métodos convencionales.

Así, la extracción con fluidos supercríticos es una alternativa para la extracción de componentes biológicamente activos de plantas¹⁰²⁻¹⁰⁴ especialmente lípidos¹⁰⁵ y aceites esenciales¹⁰⁶.

Puede considerarse que la implantación de fluidos supercríticos en la industria alimentaria es relativamente baja, teniendo en cuenta las ventajas que presentan. Esto es debido, en parte, al elevado coste de los equipos, hecho que ha provocado que los fluidos supercríticos sólo se empleen habitualmente para obtener productos de alto valor añadido.

II.11.2. Extracción asistida por Ultrasonidos

La tecnología de ultrasonidos (UAE, "*Ultrasound-assisted extraction*") se ha utilizado clásicamente para la limpieza del material de vidrio, formación de emulsiones, para acelerar determinadas reacciones y más recientemente, para la extracción de determinados compuestos a partir de muestras de alimentos.

Esta técnica utiliza ondas de ultrasonidos para agitar la muestra sumergida en el disolvente orgánico. Después de la extracción, se separa por centrifugación y/o filtración el disolvente orgánico con los compuestos extraídos.

Con esta técnica se acorta el tiempo de extracción debido a que se produce un incremento en la presión, que favorece la penetración y el transporte de los compuestos, y un incremento de la temperatura que aumenta la solubilidad y favorece la difusividad. Como la temperatura que se alcanza no es muy elevada, la sonicación es adecuada para extraer compuestos termolábiles que se alteran en las condiciones de extracción típicas del Soxhlet¹⁰⁷.

La técnica de ultrasonidos es interesante para las extracciones, ya que es relativamente barato en comparación con otros métodos como por ejemplo, MAE (*"Microwave-assisted extraction"*) o SFE debido a sus bajos requerimientos instrumentales.

En el caso de tejidos vegetales los ultrasonidos producen la ruptura de las paredes celulares lo que facilita la liberación de los compuestos de interés además de potenciar el transporte de disolvente en las células vegetales¹⁰⁸.

En el caso de subproductos de vinificación, autores como Yilmaz y Toledo⁴¹ usaron ultrasonidos para extraer catequina, epicatequina y ácido gálico de pieles y semillas de uva. Encontraron que en general la concentración de estos analitos era mayor en las semillas que en las pieles, y que esta concentración depende del origen geográfico de las diferentes variedades.

Por otro lado, también se ha investigado la extracción de polifenoles de otras matrices vegetales mediante UAE como es el caso de Xu et al.³⁰ que compararon la extracción mediante agitación mecánica y mediante ultrasonidos, de compuestos polifenólicos presentes en semillas de aceitunas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que al utilizar ultrasonidos se mejora la extracción de estos compuestos además de reducir el tiempo utilizado.

II.11.3. Extracción por microondas

La extracción por microondas (MAE *"Microwave-assisted extraction"*) combina la extracción tradicional mediante disolventes con la radiación de microondas. La extracción asistida por microondas es el proceso por el cual la energía microondas se usa para calentar los disolventes polares que se encuentran en contacto con las muestras sólidas que contienen los compuestos de interés, reduciendo tanto el tiempo de extracción como el consumo de disolvente en comparación con técnicas tradicionales de extracción.¹³

Un ejemplo de extracción mediante MAE de polifenoles a partir de subproductos de la vinificación ha sido la investigación llevada a cabo por Perez-Serradilla y Luque de Castro et al.⁷⁰ que optimizaron la extracción de compuestos fenólicos de lías de vino mediante microondas. Según sus resultados, la extracción mediante MAE es superior y más rápida (17 minutos frente 2 horas) comparada con una extracción tradicional (agitación).

En otras matrices vegetales también se ha ensayado la extracción de polifenoles mediante esta técnica, es el caso de Ballard et al.¹⁰⁹ que estudió la eficacia de la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes de la piel del cacahuete mediante MAE y comparó los resultados con una técnica tradicional (extracción sólido-líquido). Según los resultados MAE fue capaz de extraer una cantidad mayor de compuestos fenólicos en un menor tiempo, consumiendo menor cantidad de disolvente que la extracción sólido-líquido.

La extracción asistida por microondas también se ha demostrado eficiente para la extracción de polifenoles bioactivos de diferentes plantas ^{110,111}.

II.11.4. Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida

En 1989, Barker y colaboradores introdujeron un nuevo método para la disrupción y extracción de muestras sólidas: la dispersión de matriz en fase sólida (*matrix solid-phase dispersion*, MSPD)¹¹². Este procedimiento combina aspectos de varias técnicas para la disrupción de la muestra y, al mismo tiempo, genera un material que posee un carácter cromatográfico único para la extracción de los compuestos de interés de una muestra dada.

En su concepción original, la MSPD implicaba la mezcla de una muestra viscosa, sólida o semisólida con un soporte sólido de sílica previamente derivatizado para producir en su superficie una fase orgánica enlazada, como por ejemplo octadecilsilil (C₁₈). Este soporte sólido tiene la misma utilidad que la arena cuando ésta se utiliza como abrasivo: las fuerzas cortantes que surgen de la mezcla entre la muestra y el soporte sólido con un mortero y un pistilo (u

otro dispositivo mecánico) perturban la arquitectura bruta de la muestra, rompiendo el material en pedazos de menor tamaño. Además, la presencia de una fase orgánica enlazada proporciona una dimensión adicional al proceso: los componentes de la muestra se disuelven y dispersan en la fase orgánica enlazada sobre la superficie de las partículas del soporte sólido, conduciendo a la disrupción completa de la muestra y a su dispersión sobre dicha superficie. Así, a través de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los diferentes componentes de la muestra sobre la superficie de la fase enlazada, se produce una fase con características únicas para llevar a cabo el aislamiento del analito de interés¹¹³.

La MSPD conlleva una serie de ventajas sobre los procedimientos clásicos de tratamiento de muestra:

- el procedimiento analítico se simplifica y acorta drásticamente;
- se elimina la posibilidad de formación de emulsiones;
- el consumo de disolventes se reduce sustancialmente;
- se mejora la eficacia de la extracción de los analitos puesto que toda la muestra se expone al extractante¹¹⁴.

Además, en comparación con otras técnicas como PSE (extracción con disolventes presurizados), en la MSPD se utilizan condiciones de extracción moderadas (temperatura ambiente, presión atmosférica) lo que, junto con la combinación adecuada de agente dispersante y disolvente de elución, normalmente conduce a recuperaciones aceptables y a una selectividad media. Otras ventajas adicionales de esta técnica son su bajo coste y la posibilidad de llevar a cabo, simultáneamente, las etapas de extracción y limpieza^{115,116}.

En principio, la MSPD se aplicó a la extracción de polifenoles fueron en el campo de las plantas medicinales, específicamente ácidos fenólicos¹¹⁷ e isoflavonoides¹¹⁸. Más tarde, Manhita et al.¹¹⁹ la aplicaron a la extracción de

antocianinas de muestras vegetales, en la que parece ser la primera aplicación de esta técnica en *Vitis vinifera* (uvas tintas).

Dopico-García et al.¹²⁰ compararon la extracción de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos de uvas blancas mediante MSPD y una extracción clásica sólido-líquido (SL-SPE). Observaron que la técnica de MSPD era más rápida y sencilla, pero que no podía ser usada para la extracción completa de los analitos estudiados, en especial para los ácidos orgánicos, cuyas recuperaciones fueron superiores utilizando extracción sólido-líquido. Sin embargo, en estas técnicas clásicas son necesarias varias etapas como la preparación de la muestra, extracción, y fraccionamiento, mientras que MSPD permite combinar todos estos pasos en uno solo.

Recientemente se ha utilizado MSPD para el aislamiento de una amplia gama de medicamentos, plaguicidas, componentes de origen natural y otros compuestos de origen vegetal y animal proporcionando, en muchos casos, resultados equivalentes o superiores a los métodos oficiales llevados a cabo por las clásicas técnicas de extracción.

II.11.5. Extracción mediante disolventes presurizados

La extracción mediante disolventes presurizados (PSE "*pressurized solvent extraction*"), también conocida como extracción acelerada con disolventes (PLE o ASE), es una técnica para la extracción de muestras sólidas y semisólidas con disolventes líquidos. Esta técnica puede utilizar temperaturas (50-200°C) y presiones (1500-3000psi) altas para acelerar el proceso de extracción. Cuanto mayor sea la temperatura utilizada aumentará la cinética de extracción, mientras que el aumento de la presión permite trabajar por encima del punto de ebullición del disolvente. Esto mejora en gran medida la eficiencia de la solvatación y también la eficiencia del proceso de extracción.¹¹⁷

Las altas temperaturas utilizadas en PSE disminuyen la viscosidad y la tensión superficial de los disolventes. Esto facilita el acceso del disolvente a la muestra aumentando así la extracción. PSE puede ser considerada como una

técnica respetuosa con el medio ambiente ya que utiliza volúmenes menores de disolvente que las técnicas convencionales.¹³ Por otro lado, las altas temperaturas también pueden degradar los compuestos de interés. De este modo, Palma et al.¹²¹ analizaron la estabilidad a altas temperaturas de determinados compuestos fenólicos, durante la extracción por PSE, y observaron la diferente estabilidad a la temperatura entre unos compuestos y otros presentes en las semillas de uva.

Esta técnica, también fue utilizada por Monrad et al.⁷³; en su estudio determinaron antocianinas a partir de bagazo tinto liofilizado. Los valores optimizados consistieron en un 70% de etanol en agua como disolvente de extracción y una temperatura de 103°C.

Rockenbach et al.¹²² también demuestran la idoneidad de este método para la extracción de flavanoles de semillas de uva tinta utilizando una mezcla de acetona y agua. Estos autores, a diferencia del resto utilizan temperaturas menores de 80°C para la extracción.

Estos trabajos mencionados, utilizan generalmente disolventes orgánicos para la extracción, sin embargo existen otros trabajos, como el de García-Marino et al.¹²³, que utilizaron agua en condiciones subcríticas (SWE: "*Subcritical water extraction*"), utilizando temperaturas entre 50 y 150°C; consiguieron extraer con éxito polifenoles de semillas de uva, con mejores resultados que una extracción convencional.

Por otro lado, esta técnica sí que ha sido utilizada en la extracción de polifenoles de otras matrices, como es el caso de Winjgaard et al.⁸⁶, que estudiaron la optimización de la extracción de compuestos antioxidantes y polifenólicos de la pulpa de manzana mediante PSE. Observaron que utilizando esta técnica, la actividad antioxidante de los extractos obtenidos fue 2,4 veces mayor que utilizando la tradicional extracción sólido-líquido.

Esta técnica también fue utilizada por Hossain et al.¹²⁴, que estudiaron la extracción de polifenoles totales y la maximización de la actividad antioxidante en determinadas especies de la familia Lamiaceae (salvia,

albahaca y tomillo). En este estudio utilizaron un Dionex ASE-200, y demostraron que con un aumento de la temperatura, tanto los valores de polifenoles totales como la actividad antioxidante se incrementaron significativamente en los extractos obtenidos. También compararon la técnica PSE con una extracción convencional sólido-líquido y demostraron que la extracción de compuestos polifenólicos era significativamente mayor utilizando PSE.

En el desarrollo de este proyecto de tesis, se utilizó PSE y MSPD para la obtención de compuestos polifenólicos a partir del bagazo generado como subproducto en la vinificación de vino blanco, por ello, a continuación se describirán más detalladamente estas técnicas.

II.12. Extracción con disolventes presurizados (PSE)¹²⁵

Como ya se ha adelantado, en PSE la extracción se lleva a cabo a temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente, lo que implica que la presión en el interior de la celda debe ser lo suficientemente alta como para mantener al disolvente en estado líquido.

Los procesos que controlan el transporte de los analitos desde la matriz hasta el seno del disolvente durante la extracción son los siguientes (Figura 15):

Desorción desde una partícula sólida, (A→B)

Difusión a través del disolvente localizado en el interior del poro de la partícula, (B→C)

Trasferencia hacia el seno del flujo de disolvente (Solubilización). (C→D)

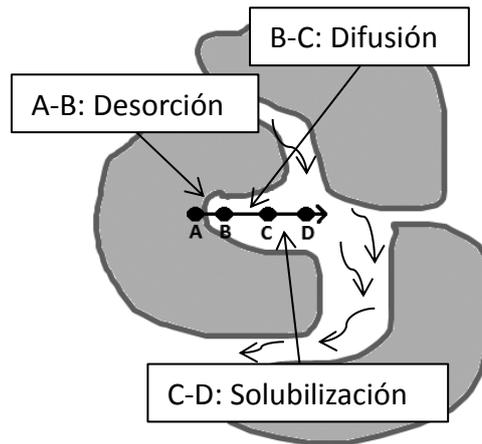


Figura 15. Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante la PSE

II.12.1. Consideraciones físico-químicas que justifican la mejora de las extracciones a temperaturas y presiones elevadas

Existen dos razones fundamentales por las que el uso de disolventes a elevadas presiones y temperaturas conduce a extracciones más eficaces que aquellas llevadas a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica:

1. **Efectos sobre la solubilidad y la transferencia de masa:** con temperaturas más altas se incrementa la capacidad de los disolventes para solubilizar a los analitos. También se incrementan las velocidades de difusión: Si durante la etapa de extracción estática se introduce disolvente nuevo, se incrementa el gradiente de concentración entre la disolución presente en la celda de extracción y la superficie de la matriz de la muestra, se mejora la transferencia de masa y, por tanto, se puede incrementar la velocidad de extracción.
2. **Disrupción de los equilibrios superficiales entre analito y matriz:** puesto que tanto la temperatura como la presión juegan un papel importante, ambos parámetros se discutirán por separado:

- Efectos de la temperatura:

Como consecuencia de un incremento en la temperatura se pueden romper las fuertes interacciones soluto-matriz originadas por enlaces de Van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones dipolares entre las moléculas de soluto y los sitios activos de la matriz.

Además, las temperaturas elevadas pueden disminuir la viscosidad de los disolventes, permitiendo una mejor penetración de los mismos en las partículas de la matriz y, por tanto, mejorando la extracción.

- Efectos de la presión:

Si durante las extracciones se ejerce una presión suficiente sobre el disolvente, se pueden emplear temperaturas por encima de su punto de ebullición (a presión atmosférica). El uso de temperaturas elevadas y las ventajas asociadas no sería posible si no se trabajara a presiones lo suficientemente elevadas como para mantener los disolventes en estado líquido.

El uso de presiones elevadas facilita las extracciones de muestras en las que los analitos han quedado atrapados en los poros de la matriz. Al aplicar presión, se fuerza al disolvente hacia zonas de las matrices que, de otra manera (trabajando a presión atmosférica), no entrarían en contacto con los disolventes.

Los flujos presurizados también ayudan en la solubilización de burbujas de aire, de manera que el disolvente puede entrar en contacto más rápidamente con la matriz de la muestra. Es decir, si una burbuja de aire tuviera sellada la entrada a un poro, los disolventes no se pondrían en contacto con los analitos y no se realizaría la extracción. Sin embargo, al utilizar presiones elevadas, se fuerza al disolvente a penetrar en dichos poros e interaccionar con los analitos.

II.12.2. Instrumentación

En la Figura 16 se muestra un esquema de un instrumento de PSE.

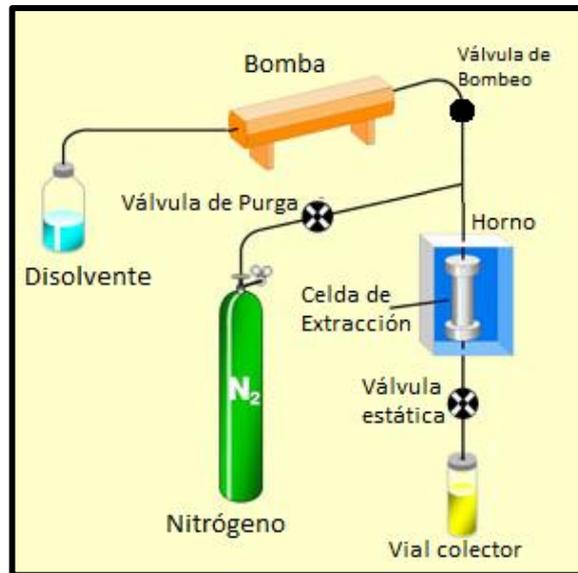


Figura 16. Esquema de la instrumentación de PSE

En este trabajo se utilizó un equipo comercializado por Dionex (ASE 150) que permite trabajar a temperaturas de hasta 200°C y a presiones de hasta 1500 psi, en la celda de extracción de 1, 5, 10, 22, 34, 66 ó 100mL. Dispone también de un vial (de 60 ó 250mL) para la recogida de los extractos. Además, hay un vial adicional para recoger los residuos.

II.12.3. Procedimiento de extracción

Una extracción por PSE consta de una serie de etapas (Figura 17) que se explican con detalle a continuación:

Introducción

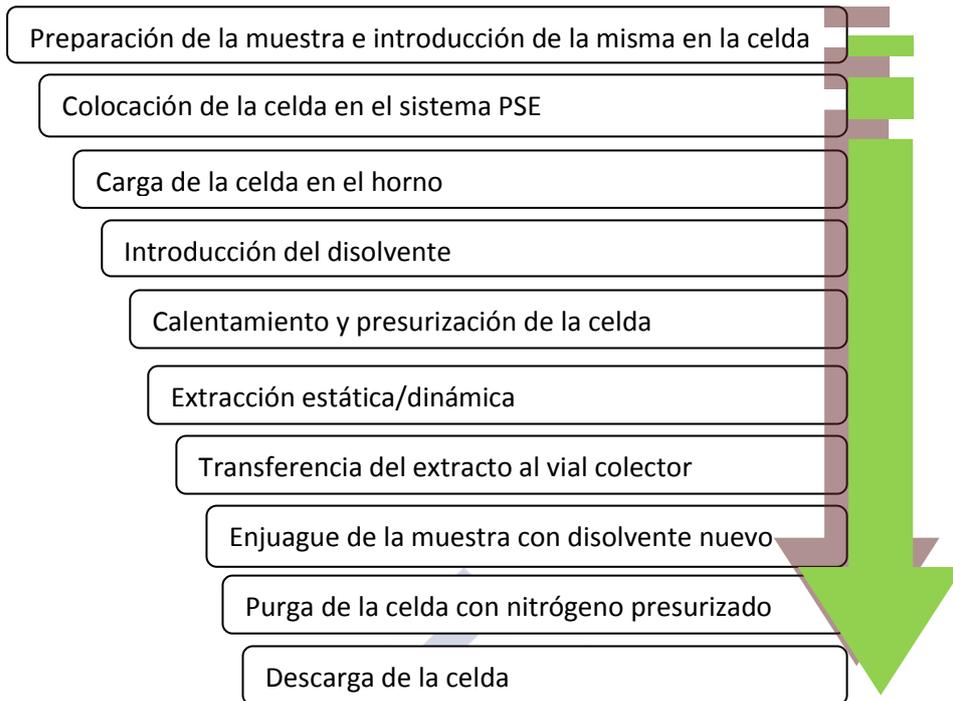


Figura 17. Etapas en la extracción por PSE

Antes de introducir la muestra en la celda de extracción, a menudo es necesario someterla a un pretratamiento consistente en la homogeneización, molienda, tamizado y secado de la misma. La difusión de los analitos desde la muestra hacia el disolvente se puede incrementar considerablemente disminuyendo el tamaño de partícula. El secado es especialmente importante cuando se trabaja con disolventes no-polares, y habitualmente se recurre a la adición de un agente desecante (sulfato sódico anhidro o tierra de diatomeas) en la celda de extracción. En ocasiones, estas sustancias también se emplean para reducir el volumen muerto de la celda, aunque también es habitual utilizar arena para este fin. Otra alternativa que también se utiliza con frecuencia para el secado de las muestras es la liofilización, aunque esta opción no es recomendable cuando el objetivo es extraer analitos volátiles. El uso de disolventes más polares (acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, etc.) o de mezclas de disolventes (hexano/acetona, hexano/acetonitrilo, etc.) son buenas opciones para la extracción de muestras húmedas, haciendo que la etapa de secado de la muestra no sea crucial. Sin embargo, aún cuando se elija correctamente el agente desecante, en ocasiones se puede co-extraer cierta

cantidad de agua que pudiera interferir en las siguientes etapas (limpieza, concentración del extracto, análisis directo). En este caso, algunos autores han recurrido a la adición directa de sulfato sódico anhidro al extracto.

La agregación de las partículas de muestra también puede perjudicar a la eficacia de la extracción, por eso a menudo es necesaria la dispersión de la muestra con un material inerte (p.ej. tierra de diatomeas, arena).

Una vez pesada, la muestra se coloca en la celda de extracción. Para evitar que se atasquen las fritas metálicas presentes en ambos extremos de las celdas de extracción, éstas pueden cubrirse con filtros de celulosa o de fibra de vidrio. Como ya se adelantó antes, también es recomendable rellenar el volumen muerto de la celda con matrices inertes.

Se puede operar en dos modos: pre-calentamiento (preheat) o pre-llenado (prefill). En el primer caso, el horno se calienta hasta la temperatura apropiada y, a continuación, la celda se carga en el horno. Transcurrido el tiempo pertinente, el disolvente se introduce en la celda y el proceso de extracción comienza. En el segundo caso, la celda se llena con el disolvente y sólo después se carga en el horno. El modo de pre-llenado permite la eliminación de aire intersticial y evita la degradación de compuestos fácilmente oxidables. Por este motivo, también se aconseja desgasificar los disolventes antes de la extracción. Este modo de pre-llenado es recomendable para la extracción de compuestos termolábiles.

El proceso de extracción puede realizarse en modo estático o en modo dinámico. El modo estático comienza calentando la celda con la muestra hasta una temperatura apropiada durante un tiempo de equilibrio (aproximadamente 5 min) y viene seguido del proceso de extracción estático. Este proceso se puede repetir varias veces si en una sola etapa se obtienen bajas recuperaciones. El modo dinámico se puede asimilar a la HPLC llevada a cabo a temperaturas elevadas, en donde el empaquetamiento de la columna se reemplaza por la muestra. Aunque de esta manera se mejora la transferencia de masa, este tipo de extracción apenas se utiliza, principalmente debido al elevado consumo de disolvente en comparación con el modo estático.

Tras la extracción, el extracto se transfiere al vial colector y la muestra y los tubos conectores se enjuagan con varias porciones de disolvente nuevo (flush). A continuación todo el sistema se purga con nitrógeno presurizado (1-2 min). El objetivo de estos dos pasos es, por una parte, el de eliminar en la medida de lo posible todos los residuos de la muestra para así mejorar la recuperación del analito y, por otra parte, el de preparar al sistema para el siguiente proceso de extracción.

II.12.4. Parámetros que afectan a la eficacia del proceso

II.12.4.1. Influencia de la Temperatura

La temperatura es el parámetro más importante de los utilizados en PSE. Su efecto ya se ha explicado con profundidad en la sección anterior. Cuando se desarrolla un nuevo método, se suele comenzar trabajando a 100 °C o, si los analitos tienen un punto de degradación térmica conocido, se suele comenzar a 20 °C por debajo de dicho nivel. La mayoría de las aplicaciones de PSE operan en el rango de 75 a 125 °C.

II.12.4.2. Presión

Como ya se ha explicado antes, el principal motivo de trabajar a presiones elevadas es el de mantener los disolventes en estado líquido cuando se encuentran a temperaturas por encima de sus puntos de ebullición y el de hacer que los fluidos se muevan rápidamente a través del sistema. En general, los cambios en la presión de trabajo tienen un impacto muy pequeño en las recuperaciones y, por tanto, no se considera un parámetro experimental crítico. La mayoría de las extracciones se llevan a cabo a presiones entre 1000 psi (7 MPa) y 2000 psi (14 MPa), siendo 1500 psi (10 MPa) la presión estándar. En nuestro caso la presión es de 1500psi y su valor no es regulable. Este valor es adecuado ya que en aplicaciones con muestras húmedas o matrices muy adsorbentes una presión alta puede mejorar la eficacia de la PSE forzando la entrada del disolvente orgánico en los poros de la matriz.

II.12.4.3. Disolvente

Para conseguir una extracción eficiente, lo ideal es que el disolvente solubilice a los analitos dejando intacta la matriz de la muestra. Para ello, la polaridad del disolvente de extracción debe ser similar a la de los compuestos a extraer. Cuando se quiere extraer un amplio rango de clases de compuestos se suele recurrir a la mezcla de disolventes de diferente polaridad. Además, se debe tener en cuenta la compatibilidad con las técnicas analíticas posteriores a la extracción, la necesidad de la concentración del extracto (volatilidad del disolvente), así como el coste del disolvente. En PSE se pueden utilizar una gran variedad de disolventes, excepto aquellos con una temperatura de auto ignición entre 40-200°C (p.ej. disulfuro de carbono, éter dietílico, 1,4-dioxano). Además, las bases y los ácidos fuertes también se deben evitar puesto que son corrosivos. En general, la transferencia de las condiciones de extracción desde los métodos convencionales a PSE no requiere del cambio de disolvente; es más, PSE permite incluso el uso de disolventes que no son efectivos en los métodos convencionales.

II.12.4.4. Número de ciclos

El uso de ciclos estáticos se desarrolló para introducir disolvente nuevo durante el proceso de extracción, lo cual ayuda a mantener un equilibrio de extracción favorable. Se ha comprobado que las extracciones de varios ciclos son especialmente útiles para muestras con una elevada concentración de los analitos o para matrices de difícil penetración.

II.12.4.5. Tiempo de extracción

Los tiempos de extracción en PSE son muy cortos en comparación con los de las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido. A menudo 5 min son suficientes. En ciertas matrices, los analitos pueden estar retenidos dentro de los poros u otras estructuras. En estos casos, el incremento del tiempo de extracción puede permitir la difusión de estos compuestos hacia el disolvente de extracción. El efecto del tiempo de extracción siempre se debe evaluar en

conjunción con el número de ciclos, con el objetivo de conseguir una extracción completa de la forma más eficiente posible.

II.12.4.6. Etapas de limpieza

Aun cuando se lleve a cabo una buena optimización de los parámetros de extracción con el objetivo de conseguir un método de PSE selectivo, otros componentes de la matriz de elevado peso molecular (lípidos, pigmentos, resinas, etc.) pueden estar presentes en el extracto. Estos componentes deben ser eliminados antes del análisis final, para así minimizar los efectos adversos en la detección de los compuestos de interés. Para la eliminación de dichos compuestos interferentes se han desarrollado diferentes procedimientos de limpieza. A menudo, estas interferencias se eliminan en etapas de limpieza posteriores a la extracción, siendo los procedimientos más comunes aquellos que incluyen el uso de columnas de adsorción o de cromatografía de permeación en gel (GPC). Con el objetivo de evitar la limpieza exhaustiva de los extractos previa al análisis y de incrementar las posibilidades de automatización, también se han desarrollado procedimientos de limpieza "in situ". En estos casos, la selectividad de la PSE se puede mejorar añadiendo un adsorbente apropiado a la celda de extracción, para llevar así a cabo una etapa simultánea de limpieza. Cuando el objetivo es la extracción de especies polares, otra manera de minimizar la co-elución de interferencias de la matriz consiste en la aplicación de una PSE previa con un disolvente no-polar para así eliminar los compuestos hidrofóbicos presentes en la muestra (grasas, resinas, aceites, clorofilas, etc.) antes de la extracción de los compuestos de interés.¹²⁶

II.13. Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

El procedimiento de la MSPD comprende los siguientes pasos (Figura 18)^{113,115}:

1. Una muestra líquida, semisólida o sólida se añade a un mortero (vidrio, porcelana, ágata) y se mezcla con un agente dispersante

Introducción

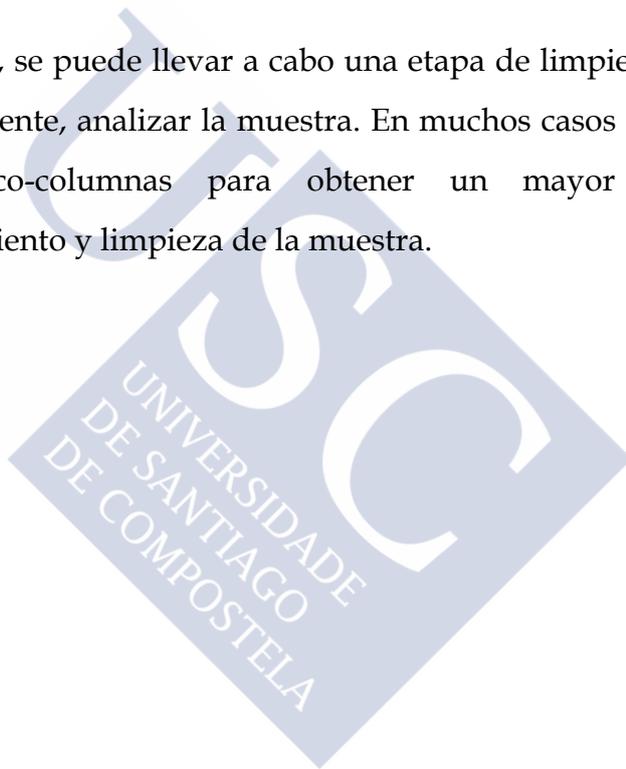
utilizando un pistilo, con el objetivo de conseguir la completa disrupción y dispersión de la muestra sobre dicho dispersante. Se suele trabajar con tamaños pequeños de muestra (alrededor de 0.5 g). En algunos procedimientos se han utilizado abrasivos que también poseen propiedades de agente de secado, como sílica o sulfato sódico anhidro, conduciendo a la formación de un material finamente dividido pero también lo suficientemente seco para la posterior extracción¹¹⁴.

2. Cuando se ha completado la etapa de disrupción y dispersión de la muestra, la mezcla resultante se empaqueta en una columna vacía o sobre un absorbente de SPE (extracción en fase sólida). La columna es a menudo un cuerpo de jeringa vacío o un cartucho con una frita de acero inoxidable o polipropileno, un filtro de celulosa o un tapón de lana de vidrio silanizada en su parte inferior. Muy a menudo se coloca una segunda frita o tapón sobre la mezcla para después llevar a cabo la compresión de la misma con el émbolo de una jeringa. En este punto, se deben tener en cuenta los principios de una buena cromatografía: evitar la formación de canales en la columna y no compactar demasiado el material.
3. En cuanto a la etapa de elución, hay dos posibilidades:
 - a) los analitos se quedan retenidos en la columna y las interferencias se eluyen en una etapa de lavado y, a continuación, los analitos se eluyen con un disolvente diferente; o,
 - b) las interferencias de la matriz se retienen selectivamente en la columna y los analitos se eluyen directamente.

En cualquier caso, la adición del disolvente de elución debe estar precedida por el uso de parte o todo el disolvente resultante del enjuague del

mortero y del pistilo. Puesto que toda la muestra está presente en la columna, también es posible llevar a cabo eluciones múltiples o secuenciales de dicha muestra. Esta propiedad permite el aislamiento de un único compuesto, de una clase de compuestos o incluso de varias clases de compuestos de una misma muestra. La mayoría de las eluciones se llevan a cabo por gravedad aunque, en algunos casos, el flujo se inicia aplicando presión en cabeza de columna o colocando las columnas en un sistema a vacío (*vacuum box*) y aplicando succión. De modo similar, otros métodos han empleado sistemas a vacío para controlar el flujo de varios disolventes de elución.

4. Finalmente, se puede llevar a cabo una etapa de limpieza adicional o, directamente, analizar la muestra. En muchos casos se recurre al uso de co-columnas para obtener un mayor grado de fraccionamiento y limpieza de la muestra.



Introducción

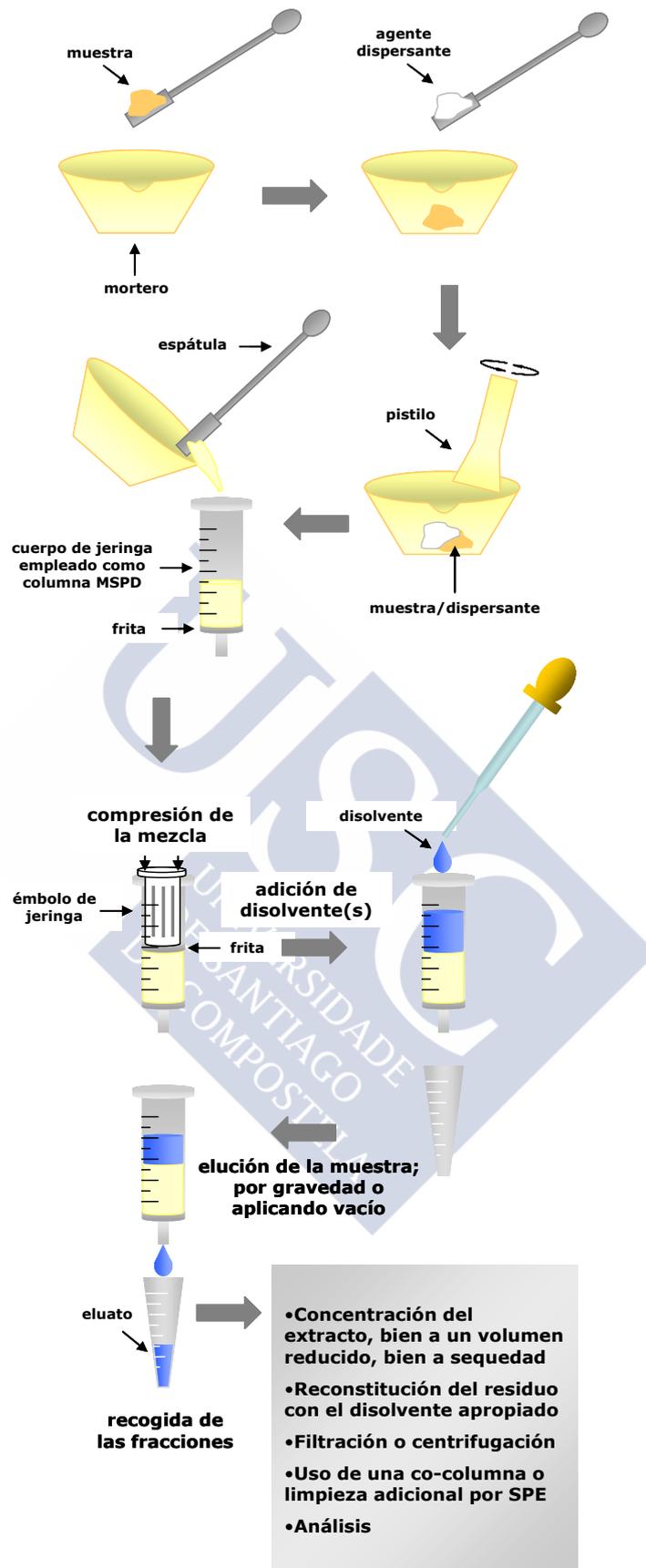


Figura 18 Representación esquemática del proceso de MSPD. Adaptado de: Tesis Doctoral "Estudio del comportamiento fotoquímico y determinación de compuestos fitosanitarios en matrices medioambientales y agroalimentarias mediante técnicas avanzadas de extracción y microextracción" Fernández-Alvarez, M. (2009)

II.13.1. Factores que influyen en la MSPD

II.13.1.1. Agente dispersante

Como ya se mencionó antes, la MSPD tal y como la definió Barker implica el uso de agentes dispersantes con una base de sílica. Un aspecto positivo del uso de estos materiales reside en la presencia de grupos silanol sin derivatizar tanto en la superficie como en los poros de dichos materiales. Estos grupos silanol pueden jugar un papel importante a la hora de proporcionar una muestra más seca a la que se obtendría si se utilizase un material que careciese de grupos funcionales capaces de formar enlaces puentes de hidrógeno¹¹³. En lo que se refiere a la fase enlazada, la mayoría de las aplicaciones utilizan un material de fase-reversa, especialmente C_{18} ¹²⁷⁻¹²⁹ y C_8 ^{130,131}.

Sin embargo, muchos autores han adoptado el acrónimo MSPD a pesar de haber utilizado otros materiales alternativos a los dispersantes de sílica enlazada. Así, en los últimos años, la selectividad de la MSPD se ha mejorado mediante la introducción de materiales no-enlazados, como son sílica gel¹³², Florisil¹³³ o alúmina¹³⁴. Estos materiales interactúan con los componentes de la muestra sólo por adsorción y, obviamente, no son capaces de disolver la matriz de la muestra.

En algunas aplicaciones también se han utilizado soportes inertes como tierra de diatomeas¹³⁵ o arena¹¹⁹, principalmente para permitir la elución temprana de interferencias que no serían retenidas por ningún adsorbente durante la elución de los analitos. Se trata de métodos más baratos, pero a expensas de una selectividad limitada, ya que solo está controlada por la solubilidad de los diferentes componentes de la muestra en el disolvente de elución.

El tamaño de poro del agente dispersante no es un factor demasiado importante. No obstante, el tamaño de partícula sí que es un parámetro a tener en cuenta. El uso de partículas de 3-20 μm de diámetro conduce a flujos bajos o, incluso, inexistentes. La mayoría de las aplicaciones de MSPD han utilizado partículas de 40 μm de diámetro. También se ha observado que un tamaño de partícula no uniforme, pero comprendido entre 40 y 100 μm , funciona bien¹¹³.

Las relaciones muestra/dispersante están habitualmente comprendidas entre 1:1 y 1:4, pero esta ratio depende de cada aplicación en particular y es una variable que se debe examinar durante el desarrollo del método¹¹⁵.

II.13.1.2. Disolvente de elución

La selección de los disolventes de elución a utilizar en combinación con dispersantes de fase normal es función de la polaridad del analito¹¹⁶. Las sustancias no-polares se pueden recuperar utilizando disolventes apolares, como son hexano¹³⁶ o diclorometano¹³¹. Cuando los compuestos tienen una polaridad media o alta, las opciones más empleadas son acetonitrilo¹³⁷, acetona¹³⁸, acetato de etilo¹³⁹, o mezclas de agua con etanol¹⁴⁰ o metanol¹⁴¹.

No obstante, también se debe tener en cuenta la retención y elución de los componentes de la matriz de la muestra. Es decir, la secuencia y diseño de un perfil de elución debe retener a la muestra lo más posible en la columna, y eluir a los analitos con un elevado grado de especificidad¹¹³.

II.13.1.3. Modificación de la matriz

A veces es necesario alterar el estado de ionización de los componentes de la muestra para asegurar que tienen lugar ciertas interacciones con la fase enlazada del soporte sólido y/o el disolvente de elución. Esto se puede llevar a cabo mediante la adición de ácidos, bases, sales, agentes quelatantes o desquelatantes, antioxidantes, etc. durante la etapa de mezclado de la muestra y/o como aditivo en el disolvente de elución¹¹³.

II.13.1.4. Etapas de limpieza

Aunque a veces los extractos obtenidos mediante MSPD son lo suficientemente limpios como para ser analizados directamente, a menudo se requiere una etapa de limpieza. En algunos casos, previamente a la elución de los analitos, se recurre al lavado de la columna con un disolvente adecuado. Por ejemplo, cuando los analitos son polares es habitual utilizar un disolvente apolar (p.ej. hexano, diclorometano) para eliminar los componentes menos polares de la matriz (p.ej. lípidos)¹⁴². Evidentemente, cuando las etapas de

Introducción

lavado y elución se llevan a cabo con disolventes inmiscibles, el cartucho de MSPD se debe secar con una corriente de nitrógeno entre ambas etapas¹¹⁶.



III. Parte experimental



III.1. Instrumentación

- **LC-MS/MS (Cromatógrafo de Líquidos acoplado a espectrómetro de masas en tándem)** Thermo Scientific. Equipo con inyector automático Accela Open AS refrigerado y bucle de 20 μ L y bomba Accela 1250, horno de columna, columna Thermo Scientific Hipersil GOLD Aq 2,1 x 100 mm, 1,9 μ m. y detector de espectrometría de masas TSQ Quantum ultra equipado con una fuente HESI-II (Heated Electrospray Ionization). Software Trace Finder 3.0 para la adquisición y el procesamiento de los datos.
- **LC-MS/MS (Cromatógrafo de Líquidos acoplado a espectrómetro de masas en tándem)** Thermo Fisher Scientific. El equipo de cromatografía de líquidos es un HPLC Finnigan Surveyor™, equipado con inyector automático TSP AS3000, bucle de 20 μ L, bomba LC Pump Plus, horno de columna, columna Waters Nova-Pak C₁₈ 3,9 x 150mm; 4 μ m; 60Å y acoplado a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum Discovery de Thermo Fisher Scientific. Software Xcalibur™ para la adquisición y el procesamiento de los datos.
- **LC-DAD (Cromatógrafo de Líquidos con detector de red de diodos)** Varian Prostar. Equipado con inyector automático con bucle de 100 μ L, horno de columna, columna Waters Nova-Pak C₁₈ 3,9 x 150 mm; 4 μ m; 60Å y detector de red de diodos (DAD). Software Star 6.4, para la adquisición y procesamiento de los datos.
- **Extractor con disolventes presurizados ASE 150** Dionex
- **Espectrofotómetro** Ultravioleta-Visible; UVmini-1240 Shimadzu
- **Evaporador** VLM EC1
- **Ultrasonidos** Selecta. Empleado para disolver y homogeneizar disoluciones patrón
- **Balanza analítica** con cuatro decimales de precisión, Sartorius BP12S; empleada para la preparación de patrones.
- **Granatario:** con 3 decimales de precisión, Sartorius; empleado para pesar los reactivos y las muestras.

- **Bomba de membrana ILMVAC, GmbH** empleada en la elución de los extractos en el escalado de la extracción de compuestos polifenólicos.

III.2. Material

- **Micropipetas de precisión:** con volúmenes variables de entre 20-200 μL , 100-1000 μL y 1000-5000 μL (EPPENDORF); empleadas en los índices espectrofotométricos y para la preparación de los patrones.
- **Filtros de 0,22 μm , Simplepure:** utilizados para filtrar los extractos.
- **Filtros de celulosa:** utilizados en las celdas de PSE.
- **Filtros de papel:** utilizados en columna industrial.
- **Mortero de vidrio.**
- **Molinillo de café, Moulinex (180W):** utilizado en la homogeneización de las muestras.
- **Vaso americano, Moulinex:** para homogeneización del bagazo.
- **Tubos de ensayo de vidrio** cónicos graduados: donde se evaporaron los extractos
- **Tubos de ensayo de plástico:** utilizados en los índices espectrofotométricos.
- **Cubeta de cuarzo** de 1 cm de longitud y 3mL de capacidad de Hellma.
- **Cubetas de plástico** de 1 cm de longitud y 3mL de capacidad.
- **Viales de 2, 10 y 20 mL de vidrio.**
- **Septa y cápsulas** de aluminio para el sellado de los viales (Supelco).
- **Insertos** de 250 μL de Supelco.
- **Jeringas** de plástico desechables de 1 mL.
- **Columnas** Isolute SPE para MSPD.
- **Fritas**, Isolute SPE accessories, para MSPD.

- **Otro material** de uso común en el laboratorio.

III.3. Reactivos

III.3.1. Reactivos, disolventes y dispersantes

Tabla 6 Reactivos, disolventes y dispersantes

	Compuesto	Marca comercial
Reactivos	Reactivo Folin & Ciocalteu	Sigma
	DPPH(2,2-Difenil-1-picrilhidracilo)	Sigma
	p-(Dimetilamino)cinamaldehido (DMACA)	Sigma
	Nitrito Sódico (NaNO ₂)	PRO-BVS
	Tricloruro de Aluminio (AlCl ₃)	Merck
	Hidróxido Sódico (NaOH)	Merck
	Carbonato Sódico (Na ₂ CO ₃)	Panreac
	Ácido Fórmico (98%)	Merck
	Ácido Clorhídrico (35%)	BDH, Aristar
	BHT (Butilhidroxitolueno)	Sigma
BHA (Butilhidroxianisol)	Sigma	
Disolventes	Metanol	Panreac (grado HPLC) Fluka (grado LC-MS)
	Etanol	Merck (Darmstadt, Germany (grado analítico)
	Acetato de etilo	Merck (Darmstadt, Germany (grado analítico)
	1,3-butanodiol (99%)	Sigma aldrich
	Acetonitrilo	Fluka (grado HPLC)
	Agua ultrapura	Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
	Agua	Fluka (grado LC-MS)
	Arena 200-300 μm	Scharlau
Arena filtro	QP, S.A.	
Dispersantes	C ₁₈ 9-12% carbón	Aldrich
	Florisil (60-100 mesh)	Supelco
	Alúmina (50-70 mesh)	Sigma Aldrich
	Sílica Gel 60 (230-240 mesh)	Merk KGaA

III.3.2. Patrones

Tabla 7 Patrones

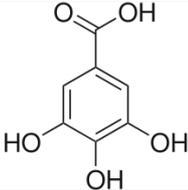
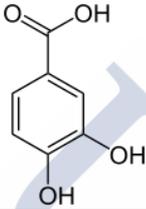
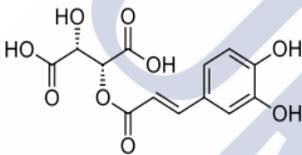
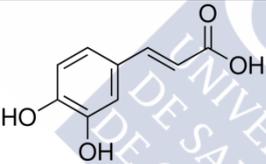
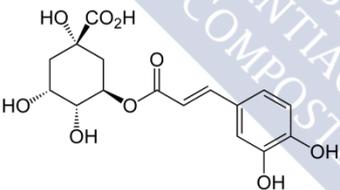
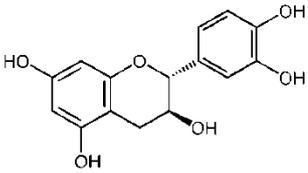
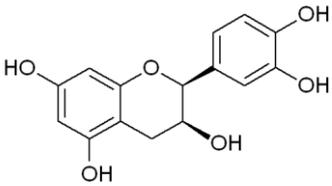
Compuesto (%pureza)	PATRONES		
	Estructura	CAS	Marca comercial
Ác. gálico (99%)		149-91-7	Sigma-Aldrich
Ác. protocatéquico (>98%)		121-33-5	HWI ANALYTIC GmbH
Ác. caftárico (>98%)		67879-58-7	Fluka
Ác. cafeico (>98%)		331-39-5	Fluka
Ácido clorogénico (98%)		327-97-9	Fluka
Catequina (99%)		154-23-4	Fluka
Epicatequina (97%)		490-46-0	HWI ANALYTIC GmbH

Tabla 8 (Continuación Tabla 7) Patrones

Compuesto (%pureza)	PATRONES		
	Estructura	CAS	Marca comercial
Epicatequina- galato (>98%)		1257-08-5	Fluka
Procianidina B1 (>98%)		20315-25-7	Fluka
Procianidina B2 (>98%)		29106-49-8	Fluka
Quercetina-3- rutinosido (98%)		153-18-4	Fluka
Quercetina-3- glucurónido (98%)		22688-79-5	HWI ANALYTIC GmbH
Quercetina-3- glucósido (98%)		482-35-9	Fluka
Quercetina (98%)		117-39-5	Fluka

III.4. Métodos espectrofotométricos

III.4.1. Índice de Polifenoles Totales (IPT)

La determinación de polifenoles totales se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito anteriormente por Singleton et al.¹⁴³. En un tubo de ensayo se introdujeron 5 mL de la muestra diluída en agua milli-Q, 100 μ L del reactivo Folin & Ciocalteu y 1 mL de una disolución de carbonato sódico (20 % Na_2CO_3 en H_2O Milli-Q) previamente preparada. Se agitó en vortex y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, tiempo suficiente para reducir el reactivo Folin & Ciocalteu por los compuestos fenólicos en condiciones alcalinas, desarrollando color azul.

La medida espectrofotométrica se realizó a 760 nm. Se utilizó agua milli-Q como blanco de la medida.

La concentración de los polifenoles totales se calculó mediante una curva de calibrado de ácido gálico, cuyo rango de concentraciones fue (3-20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GAE).

Las concentraciones de los extractos finales se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de bagazo seco ($\text{mg gálico/g peso seco}$).

III.4.2. Actividad Antioxidante (AA): método DPPH e IC_{50}

La actividad antioxidante de los extractos se determinó con 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH) frente a Trolox®, mediante el método de Brand-Williams et al.¹⁴⁴. Se preparó una disolución de DPPH 0.1 mM en 100% metanol. En un tubo de centrífuga, se pipetea 0,1mL del extracto de bagazo y se le añaden 3,9 mL de la disolución metanólica de DPPH. La mezcla se agita vigorosamente y se deja reposar en oscuridad durante 30 minutos. La disminución de la absorbancia de la disolución resultante se monitoriza a 515 nm a los 30 min. La actividad antioxidante (AA) se determina mediante regresión lineal después de representar la Abs a 515 nm de disoluciones

conocidas de Trolox (0,1-1 mM). Se utiliza metanol 100% para el blanco de la medida. La AA de los extractos se expresa en μM Trolox/g de bagazo (peso seco) y μM Trolox para el vino. La disolución stock radicalica fue preparada diariamente.

Mediante una adaptación del ensayo anterior se determinó la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) como medida de la capacidad del extracto para la eliminación de radicales libres, utilizando también el radical estable 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH). Para ello se midió el porcentaje de inhibición (PI) de diferentes concentraciones de cada compuesto o extracto. Este valor se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{PI} = [(A_{(0)} - A_{(30)}) / (A_{(0)})] \times 100$$

Donde $A_{(0)}$ es la absorbancia a tiempo 0 minutos y $A_{(30)}$ es la absorbancia a 30 minutos.

A continuación se extrapola el valor de IC_{50} , que es la concentración que se corresponde con un 50% de PI.

III.4.3. Determinación de Flavanoles Totales (TF: *Total Flavanols*)

La determinación de flavanoles totales se calculó mediante una adaptación del método de Psarra et al.¹⁴⁵. Se introdujo directamente en la cubeta una alícuota de 0,4 mL del extracto previamente diluido en metanol. A continuación se agregaron 2mL del reactivo DMACA (0,1 % en 1 M de HCl en metanol) preparado anteriormente. La mezcla se agito en vortex, y se siguió la cinética de la reacción en el espectrofotómetro a 640nm. El máximo de absorbancia se consigue a un tiempo de alrededor de 3 minutos. Se utilizó metanol como blanco.

La cuantificación de los flavanoles totales se calculó mediante una curva de calibrado de catequina, cuyo rango de concentraciones fue (1-16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CTE).

Las concentraciones de los extractos finales se expresaron como mg de catequina por gramo de bagazo seco ($\text{mg catequina/g peso seco}$).

III.4.4. Determinación de Hidroxicinamatos Totales (THC: *Total Hydroxycinnamates*)

A partir del método adaptado de Psarra et al.¹⁴⁵ se llevó a cabo la determinación de hidroxicinamatos. Se diluye la muestra en metanol y se realiza la medida espectrofotométrica a una longitud de onda de 320 nm en cubeta de cuarzo. Para la medida del blanco se utilizó metanol.

La cuantificación de hidroxicinamatos totales se calculó mediante una curva de calibrado de ácido clorogénico, cuyo rango de concentraciones fue (5-30 mg.L⁻¹). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido clorogénico (mg. L⁻¹ CGAE).

Las concentraciones de los extractos finales se expresaron como mg de ácido clorogénico por gramo de bagazo seco (mg GCA/g peso seco).

III.4.5. Determinación de Flavonoides Totales (TFC: *Total Flavonoids content*)

Siguiendo el método colorimétrico propuesto por Kim et al.¹⁴⁶ se determinaron los flavonoides totales. En un matraz de 10mL, que contiene previamente 4 mL de agua, se añade 1 mL de la muestra diluida en agua y 0,3 mL de una disolución acuosa de NaNO₂ al 5%. Al cabo de 5 minutos se le añaden 0,3 mL de AlCl₃ al 10%, y un minuto después se añade 2mL de NaOH 1 M. Se enrasa con agua y se agita. Por último se mide la absorbancia a una longitud de onda de 510nm. Se utilizó agua como blanco para la corrección de la medida.

La cuantificación de flavonoides totales se calculó mediante una curva de calibrado de catequina, cuyo rango de concentraciones fue (5-200 mg.L⁻¹). Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina (mg. L⁻¹ CTE).

Las concentraciones de los extractos finales se expresaron como mg de catequina por gramo de bagazo seco (mg catequina/g peso seco).

III.5. Preparación de disoluciones patrón y rectas de calibrado

A partir de los polifenoles comerciales se prepararon disoluciones patrón madre de entre 1000-10000 mg/L dependiendo del compuesto seleccionado. Se utilizó metanol como disolvente. Estas disoluciones madre sirvieron de base para la preparación de las disoluciones de trabajo y para los estándares de calibración. El disolvente empleado para la dilución de los patrones en los análisis cromatográficos y para el análisis espectrofotométrico del IPT y TFC fue agua Milli-Q y se utilizó metanol para los análisis de la AA, THC y TF.

El intervalo de concentraciones para cada uno de los compuestos se recoge en la Tabla 9.

Tabla 9. Rangos de concentraciones de los patrones de polifenoles

Patrón	Disolución madre mg/L	Análisis espectrofotométrico mg/L	CALIBRADO	
			HPLC-DAD mg/L	LC-MS/MS µg/L
Ác. gálico	4008	3-20	1-200	25-5000
Ác. protocatéquico	10000	-	-	5-1000
Ác. caftárico	2000	-	1-150	25-5000
Ác. cafeico	10030	-	1-30	50-5000
Ác. clorogénico	-	5-40	-	-
Catequina	4340	1-16; 5-200	5-700	50-5000
Epicatequina	7510	-	25-500	50-5000
Epicatequina-galato	7510	-	-	50-2000
Procianidina B1	1000	-	-	100-5000
Procianidina B2	1000	-	-	50-5000
Quercetina-3-glucurónido	4340	-	-	5-5000
Quercetina-3-glucósido	7510	-	14-295	125-5000
Quercetina-3-rutinósido	2644	-	-	5-2000
Quercetina	2040	-	-	500-2000

III.6. Métodos cromatográficos

Se han utilizado tres equipos de cromatografía de líquidos para el análisis de los eluatos obtenidos a partir de bagazo y para los vinos blancos estudiados: un equipo de HPLC-DAD y dos de LC-MS/MS.

En una primera etapa de esta tesis se realizó la identificación positiva de compuestos polifenólicos mayoritarios de los extractos obtenidos por PSE y presentes en el vino blanco mediante un LC-MS/MS perteneciente al grupo de investigación AA1 del Departamento de Química Analítica y Alimentaria del área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Vigo, debido a que en ese momento no se contaba todavía con un equipo de esas características.

El equipo de HPLC-DAD se ha utilizado para la identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos mayoritarios de los extractos de bagazo y de los vinos blancos en todas las muestras de las tres cosechas consecutivas.

En la etapa final de esta tesis, se contó con un equipo propio de LC-MS/MS, gracias al cual se pudo aumentar el número de polifenoles identificados en las muestras. Así, se analizaron de nuevo todas las muestras pertenecientes a los extractos de PSE y de vino blanco utilizadas en la caracterización de las diferentes variedades. Por este motivo sólo se expondrán los datos relativos a estas muestras analizados mediante esta técnica cromatográfica. Los datos duplicados por HPLC-DAD se utilizaron como factor de comprobación, para garantizar la estabilidad de las muestras almacenadas.

III.6.1. Preparación de las fases móviles

Los disolventes utilizados en la composición de la fase móvil empleada en esta técnica fueron siempre de grado adecuado para cada equipo y se prepararon siempre de modo individual.

Se utilizó un 0,1% de ácido fórmico para la acidificación de cada componente de la fase móvil.

III.6.2. Método cromatográfico en: HPLC-DAD

Todos los eluatos obtenidos por PSE que han sido analizados por esta técnica fueron concentrados previamente como se indica en el apartado III.10.5, los vinos analizados fueron simplemente filtrados por filtros de 0,22 μm . El equipo se trata de un cromatógrafo de líquidos utilizando un HPLC Varian Prostar, con detector de red de diodos (DAD) y una columna Waters Nova-Pak C₁₈ 3,9 x 150 mm; 4 μm ; 60 Å.

III.6.2.1. Condiciones del análisis

En la siguiente tabla (Tabla 10) se resumen las condiciones cromatográficas utilizadas así como el gradiente empleado, tanto para la inyección de patrones como para la de los extractos de bagazo y vino en esta técnica.

Tabla 10 Condiciones cromatográficas y espectrofotométricas en HPLC-DAD

Parámetro			
Fase Móvil	(A)Agua (1 % HCOOH): (B) Metanol (1 % HCOOH)		
Flujo	1 mL/min		
Columna	Waters Nova-Pak C18 3,9 x 150 mm; 4 μm ; 60 Å		
Tª columna	50 °C		
Gradiente	min	%A	%B
	0	95	5
	20	80	20
	25	0	100
	30	95	5
	35	95	5
Rango de λ	220-450 nm		
λ cuantificación	280 nm y 350 nm		

III.6.3. Métodos cromatográfico en LC-MS/MS

Se utilizaron dos equipos de LC-MS/MS para la identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos. En los siguientes apartados están detalladas las características de ambos métodos.

III.6.3.1. Método cromatográfico en LC-MS/MS (Universidad de Vigo)

Para identificar tres de los polifenoles presentes en los extractos de bagazo se ha utilizado un LC-MS/MS (Cromatógrafo de Líquidos acoplado a espectrómetro de masas en tándem) Thermo Fisher Scientific. El equipo de cromatografía de líquidos fue un HPLC Finnigan Surveyor™. Equipado con inyector automático TSP AS3000, bucle de 20 μ L, bomba LC Pump Plus, horno de columna, columna Waters Nova-Pak C₁₈ 3,9 x 150 mm; 4 μ m; 60 Å y acoplado a un detector de espectrometría de masas TSQ Quantum Discovery de triple cuadrupolo de Thermo Fisher Scientific. Software Xcalibur™ para la adquisición y el procesado de los datos.

Todas las muestras y patrones fueron previamente filtrados por filtros de 0,22 μ m y diluidos apropiadamente.

III.6.3.1.1. Condiciones del análisis

En la siguiente tabla (Tabla 11) se resumen las condiciones cromatográficas y de la fuente de iones utilizadas, tanto para la inyección de patrones como para la de los extractos de bagazo y vino.

Tabla 11 Condiciones cromatográficas y espectrofotométricas en LC-MS/MS

Parámetro	Unidades	Condiciones cromatográficas		
Fase móvil		(A) Agua (1 % HCOOH): (B) Metanol (1 % HCOOH)		
Flujo	mL/min	1		
Volumen de inyección	µL	20		
Columna		Waters Nova-Pak C ₁₈ 3,9 x 150 mm; 4 µm; 60 Å		
Tª columna	°C	50		
Gradiente		min	%A	%B
		0	95	5
		20	80	20
		25	0	100
Condiciones de la fuente de iones				
Tª del capilar	°C	270		
Tª vaporización	°C	350		
Gas auxiliar	psi	10		
Sheath Gas	psi	40		
Gas de colisión	psi	30		
Rango de masas	m/z	100-600		
Voltaje del spray	V	-3000		

III.6.3.2. Método cromatográfico utilizado en el equipo LC-MS/MS (equipo propio)

Los extractos se analizaron por LC-MS/MS (Cromatógrafo de Líquidos acoplado a espectrómetro de masas en tándem) para identificar y cuantificar los principales polifenoles presentes en las muestras. El equipo de LC-MS/MS utilizado es de (Thermo Scientific), con inyector automático Accela Open AS refrigerado y bucle de 20 µL y bomba Accela 1250, horno de columna, columna Thermo Scientific Hipersil GOLD Aq 2,1 mm x 100 mm, 1,9 µm y detector TSQ Quantum ultra equipado con una fuente HESI-II (heated electrospray ionization). Se ha utilizado el software Trace Finder 3.0 para la adquisición y el procesamiento de los datos.

Todas las muestras y patrones fueron previamente filtrados por filtros de 0,22µm y diluídos apropiadamente para su análisis.

III.6.3.2.1. Condiciones del análisis cromatográfico

En la siguiente tabla (Tabla 12) se resumen las condiciones cromatográficas y de la fuente de iones utilizadas, tanto para la inyección de patrones como de los extractos de bagazo y vino.

Tabla 12 Condiciones cromatográficas y espectrométricas en LC-MS/MS

Parámetro	Unidades	Condiciones cromatográficas
Fase móvil		(A)Agua (0,1 % HCOOH): (B) Metanol (0,1 % HCOOH)
Flujo	μL/min	300
Volumen de inyección	μL	10
Columna		Thermo Scientific Hipersil GOLD Aq 2.1mm x 100mm, 1,9μm
Tª columna	°C	30
Gradiente		min %A %B
		0 95 5
		4,5 70 30
		8 63 37
		9 50 50
		11 10 90
	14 0 100	
Condiciones de la fuente		
Tª del capilar	°C	320
Tª de vaporización	°C	350
Gas auxiliar	psi	10
Sheath Gas	psi	35
Voltaje del spray	V	+3500
		-2500

III.7. Identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos

La identificación positiva por medio de LC-MS/MS de los compuestos polifenólicos presentes en las muestras, se llevó a cabo mediante un screening previo de las muestras, inyectando en modo "Full scan" una muestra de cada matriz (extracto de bagazo y vino), buscando así posibles coincidencias de

masas de compuestos polifenólicos potencialmente presentes, encontrados en la bibliografía existente después de una búsqueda exhaustiva. A continuación se inyectaron los patrones de estos compuestos en modo SRM (Selected Reaction Monitoring), es decir seleccionando y optimizando sólo los fragmentos más específicos de cada compuesto. Por último se volvieron a inyectar las muestras en las mismas condiciones de los patrones, comprobando así de forma positiva la presencia de estos compuestos polifenólicos en las mismas y confirmándola además con sus tiempos de retención.

Para la identificación de los polifenoles en las muestras de bagazo y de vino por medio de HPLC-DAD se creó una biblioteca de espectros UV con una selección de patrones comerciales y se compararon posteriormente, tanto los espectros como los tiempos de retención de dichos patrones con los de los picos cromatográficos obtenidos en la inyección de los extractos de bagazo y vino blanco.

La concentración de cada compuesto polifenólico identificado, se determinó a través de las rectas de calibrado de los patrones correspondientes, calculadas mediante análisis de regresión de las concentraciones especificadas en la Tabla 9, frente a las áreas de los picos. Los resultados para los extractos de bagazo se expresaron en $\mu\text{g/g}$ bagazo seco, y para los vinos en $\mu\text{g/L}$.

III.8. Análisis estadístico

Se realizaron diseños experimentales de tipo Cribado y Superficie de Respuesta, para la optimización de la extracción de compuestos polifenólicos por PSE y para la optimización del escalado a nivel industrial del proceso de extracción alternativo.

Se ha llevado a cabo un análisis discriminante para la clasificación de las muestras tanto de bagazo como de vino, utilizando en ambos casos “la variedad” y “el área geográfica de cultivo” como factores de discriminación.

Además se realizó ANOVA (análisis de la varianza) para comparar las diferencias de concentración de cada uno de los compuestos. En un análisis de varianza (ANOVA) se distribuye la variabilidad de la respuesta obtenida para cada compuesto estudiado entre cada uno de los factores. La contribución de cada factor se mide teniendo en cuenta el efecto de los demás factores, y la significación estadística de cada uno de ellos se comprueba comparando la media cuadrática frente al error experimental estimado. En una tabla de ANOVA se recogen, entre otros parámetros, los valores de la proporción F (F-ratio) y el valor p para esta proporción. La proporción F mide la contribución de cada factor o interacción en la varianza de la respuesta. Por su parte, el valor de p evalúa la significación estadística de cada factor o interacción. Así, para un nivel de confianza del 95%, un valor de $p < 0,05$ implica que dicho factor o interacción es estadísticamente significativo.

El programa utilizado para todos estos análisis estadísticos fue Statgraphics Centurion XV, versión 15.1.02.

III.9. Muestras

Todas las muestras, tanto las de bagazo como las de vino blanco, fueron recogidas en diferentes zonas de Galicia en cada una de las 5 Denominaciones de Origen que existen en esta comunidad. La bodegas colaboradoras son las siguientes: Adega Valdés, Mar de Frades, Adega Eidos, Adega Dosán, Martín Prieto, Martín Códax, Viña Blanca do Salnés, Terras Gauda, Bodegas La Val, Adegas Luz, Marqués de Vizhoja, Adega Rubén, Adega A Portela, Bodegas Godeval, Bodegas Valdesil, Adegas Gargalo, Adegas Moure, Adega Dominio de Bibei, Adega Algueira, dos bodegas de vino autor, y por último los centros de investigación de la Estación Enológica de Leiro-Ribadumia y el Centro de Formación y Experimentación Agroforestal de Guísamo

En las siguientes tablas (Tablas 13, 14 y 15) se puede ver el origen de cada muestra de bagazo y vino utilizada en este trabajo, el código de la bodega a la

que pertenece y la denominación y subzona en la que fue cultivada la uva de origen y elaborado el vino correspondiente.

Se ha hecho un importante esfuerzo conjunto entre investigadores y bodegueros para procurar una correspondencia total entre el vino monovarietal y su bagazo correspondiente, aunque esto no siempre ha sido posible.

En los siguientes apartados se analizarán más detalladamente las características de las muestras.



Tabla 13 Origen de las muestras de bagazo y de vino (D.O. Rías Baixas)

<i>D.O.</i>	<i>Subzona</i>	<i>Bodega</i>	<i>variedad</i>	<i>BAGAZO</i>	<i>VINO</i>
				<i>código</i>	<i>código</i>
Rías Baixas	Ribeira do Ulla	B01	Albariño	AL01	V-AL01
	Val do Salnés	B02	Albariño	AL02	V-AL02
			Albariño		V-AL02M2
			Albariño		V-AL-02SM
		B07	Albariño	AL-07	v-AL07
			G-traminer	X01	V-X01
			Pinot Gris	X02	V-X02
			Chardonnay	X03	V-X03
			Riesling	X04	V-X04
			Blanca lexítima	X05	V-X05
			Sauvignon blanc	X06	V-X06
			Pinot Blanc	X07	V-X07
			Treixadura	TR-02	V-TR-02
			Torrontés	TO-01	V-TO-01
			Caíño blanco	CA-O1	V-CA-O1
			Loureiro	LO-01	V-LO-01
			B23	Blanca lexítima	BL01
		B04	Albariño	AL-04	V-AL-04
		B16	Albariño	AL-16	V-AL16
		B05	Albariño	AL-05	V-AL-05
		B12	Albariño	AL-12-a	V-AL-12-a
			Albariño	AL-12-b	V-AL-12-b
			Albariño	AL-12-c	V-AL-12-c
			Albariño	AL-12-d	V-AL-12-d
	Albariño		AL-12-e	V-AL-12-e	
	Albariño		AL-12-G		
	Caíño blanco		CA-O3		
	B06	Loureiro	LO-03	V-LO-03	
		Albariño	AL-06	V-AL-06	
			AL-06-M1		
AL-06-T			V-AL-06-T		
AL-06-Q			V-AL-06		

Tabla 14 (Continuación Tabla 13) Origen de las muestras de bagazo y de vino (D.O. Rías Baixas)

<i>D.O.</i>	<i>Subzona</i>	<i>Bodega</i>	<i>variedad</i>	<i>BAGAZO</i>	<i>VINO</i>	
				<i>código</i>	<i>código</i>	
<i>Rías Baixas</i>	O Rosal	B11	Albariño	AL-11	V-AL-11	
			Loureiro	LO-02	V-LO-02	
			Caíño blanco		V-CA-02b	
			Caíño blanco	CA-02	V-CA-02	
		B15	Caíño blanco	CA-04		
			Loureiro	LO-04		
			Caíño blanco		v-CA04	
	Condado de Tea		B12	Albariño	AL-12-f	V-AL-12-f
			B10	Albariño	AL-10	V-AL-10
			B09	Albariño	AL-09	V-AL-09
			B17	Albariño	AL17	V-AL17
				Albariño	AL17B	
			B03	Albariño	AL-03	V-AL-03

Tabla 15 Origen de las muestras de bagazo y de vino (otras D.O.)

<i>D.O.</i>	<i>Bodega</i>	<i>variedad</i>	<i>BAGAZO</i>	<i>VINO</i>
			<i>código</i>	<i>código</i>
Ribeiro	B18	Treixadura	TR-01	V-TR-01
	B19	Treixadura	TR-05	V-TR-05
Valdeorras	B20	Godello	GO-02	V-GO-02
	B21	Godello	GO-03	V-GO03
Monterrei	B22	Treixadura	TR-03	
		Mezcla (TR+AL)	TR-04	V-TR-04
		Godello	GO-01	V-GO-01
Ribeira Sacra	B08	Albariño	AL-08	V-AL-08
	B13	Godello	GO-04	V-GO-04
		Albariño	AL-13	V-AL-13
	B14	Godello	GO05	V-GO05
		Treixadura	TR-06	
Albariño		AL-14		

III.9.1. Muestras de bagazo

En este estudio se analizaron 7 variedades gallegas de bagazo blanco: albariño, caíño, loureiro, treixadura, godello, blanca lexítima y tarrantés. Además de estas variedades autóctonas gallegas, también se han analizado 6 variedades foráneas de uva pero cultivadas en la denominación de origen Rías Baixas en la subzona del Salnés, en la Estación Enológica de Ribadumia, que al igual que las bodegas ha colaborado desinteresadamente en la adquisición de muestras para este trabajo de tesis. A estas variedades les hemos denominado “experimentales”, porque se cultivan y vinifican con fines de estudio y experimentación <producción a pequeña escala>, y son: Gewurztraminer (g-traminer), pinot Gris, chardonnay, riesling, sauvignon blanc y pinot blanc.

En total se han obtenido 100 muestras (115 si contamos las variedades experimentales) de 23 bodegas diferentes, de 3 cosechas consecutivas (2010, 2011 y 2012); distribuidas de la forma que muestra la siguiente tabla (Tabla 16):

Tabla 16 Distribución de muestras de bagazo por cosecha y variedad

	BAGAZOS			
	año 2010	año 2011	año 2012	Total
Albariño	17	20	18	55
Treixadura	4	5	5	14
Tarrantés	1	1	1	3
Caíño blanco	3	2	1	6
Loureiro	3	3	2	8
Godello	2	4	4	10
Blanca lexítima	1	2	1	4
Experimentales	7	3	5	15
TOTAL	38	40	37	115

III.9.1.1. Recogida, almacenamiento y conservación de las muestras de bagazo

Para que el muestreo fuera representativo del mapa vitivinícola gallego se tuvo en cuenta el tanto por ciento total que representa cada variedad en la producción total de uva blanca en Galicia. Como la mayor cantidad, la representa la variedad de uva albariño, aproximadamente el 50% de las muestras recogidas fueron de esta variedad. En la Figura 19, se ve con más claridad la distribución de las muestras de las diferentes variedades.

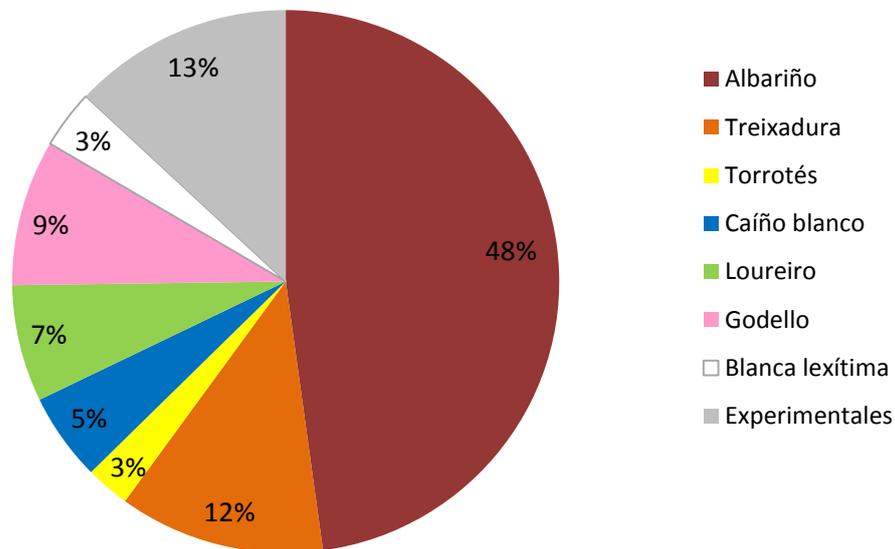


Figura 19 Distribución por variedades de las muestras de bagazo

Una vez se prensó la uva en la bodega, se recogieron en diferentes puntos de la prensa muestras de bagazo (para realizar un muestreo lo más representativo posible) y se introdujeron en bolsas de plástico (20x20cm) con cierre zip. Las muestras se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio, donde se procedió a su inmediata congelación (-20°C), minimizando así posibles degradaciones. Las muestras de bagazo se mantuvieron en estas condiciones hasta el momento de su análisis.

III.9.2. Muestras de vino

Se analizaron 7 vinos blancos gallegos monovarietales: albariño, caíño, loureiro, treixadura, godello, blanca lexítima y tarrantés. Se obtuvieron un total de 90 muestras (99 si contamos las variedades experimentales) de 23 bodegas diferentes (incluyendo a la Estación Enológica) de 3 cosechas consecutivas (2010, 2011 y 2012). Distribuidas de la siguiente forma (Tabla 17):

Tabla 17 Distribución de muestras de vino por cosecha y variedad

	VINOS			
	año 2010	año 2011	año 2012	Total
Albariño	16	20	16	52
Treixadura	3	4	2	9
Tarrantés	1	1	-	2
Caíño blanco	1	3	2	6
Loureiro	2	1	3	6
Godello	2	5	4	11
Blanca lexítima	2	1	1	4
Experimentales	6	2	1	9
TOTAL	33	37	29	99

III.9.2.1. Recogida, almacenamiento y conservación de las muestras de vino

La recogida se llevó a cabo en las semanas posteriores al embotellado de los vinos. Cada bodega colaboradora nos proporcionó una botella de vino que se mantuvo a temperatura de refrigeración hasta llegar al laboratorio. Ya en el laboratorio, el contenido de cada botella fue distribuido en viales de 120mL y conservado a congelación (-20°C) para inhibir la evolución de los polifenoles, hasta el momento de su análisis.

III.9.2.2. Muestras de vino blanco para control de fraude

Se adquirieron dos botellas de vino blanco de diferente marca comercial y cuya cosecha era de una de las estudiadas en este trabajo (2010, 2011 o 2012). Ambas botellas de vino son de la variedad albariño y se pueden adquirir en el

mercado por menos de 3 euros. La conservación de las muestras fue idéntica a las cedidas por las bodegas colaboradoras.

III.10. Metodología aplicada a las muestras de bagazo

III.10.1. Homogeneización de las muestras

Para la homogeneización de las muestras de bagazo utilizadas tanto en las extracciones por PSE como por MSPD, se eliminaron previamente los raspones (de las muestras sin despallillar) y el resto (hollejo, restos de pulpa y semillas) se trituró con un molinillo para café.

III.10.2. Cálculo de la humedad de las muestras

Para calcular la humedad contenida en las muestras de bagazo se secaron en una estufa 3g de bagazo a 105°C. Se pesó la muestra antes y después de la etapa de secado. Esta operación se llevó a cabo por triplicado.

III.10.3. Procedimiento de extracción de polifenoles mediante PSE

La extracción de las muestras se llevó a cabo por medio de la técnica PSE (Pressurized solvent extraction), explicada detalladamente en la introducción/apartado II.12.

La extracción de polifenoles de las muestras de bagazo se llevó a cabo con un equipo de PSE de la marca ASE 150 Dionex mediante el protocolo general que se describe a continuación.

Se molieron en un mortero el bagazo y el dispersante (en una proporción 1:2) para favorecer la ruptura de los tejidos y la posterior extracción de los compuestos fenólicos. Antes de introducir la muestra en la celda se le añade un gramo de arena en el fondo. A continuación se introduce en la celda de PSE la mezcla molida (muestra + dispersante). Por último se rellena la celda con arena para evitar volúmenes muertos. Se introduce en el sistema de PSE y se

extrae con un determinado porcentaje de disolvente orgánico en agua en función del experimento realizado. (Figura 20)



Figura 20 Esquema del protocolo de extracción mediante PSE

Los eluatos obtenidos en la extracción se enrasaron a 25 mL con metanol, se filtraron mediante filtros de 0,22 μm y se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

III.10.3.1. Optimización del método de extracción

En este apartado se detallarán los experimentos llevados a cabo a lo largo de la optimización del proceso de extracción por PSE. Todas estas experiencias se realizaron con muestras de bagazo albariño de bodegas “Terras Gauda” (código: AL-11).

III.10.3.2. Limpieza de extractos

En un primer momento se estudió la posibilidad de limpiar los extractos y conseguir unos cromatogramas con menos interferencias, producidas potencialmente por compuestos poco polares. Para ello, se llevó a cabo una serie de pruebas con una etapa previa de limpieza.

La etapa de limpieza pre-extracción consistió en utilizar una mezcla de n-hexano: acetona (1:1) durante 1 ó 3 ciclos de 5 min; y a continuación se llevó a cabo la extracción de los polifenoles con metanol en agua al 80%.

III.10.3.3. Determinación del número de ciclos de extracción

Para la determinación del número adecuado de ciclos de extracción se procedió a evaluar su influencia en la extracción de polifenoles. Para ello se realizaron pruebas en las que las extracciones fueron de 1, 2 ó 5 ciclos.

III.10.3.4. Diseño de Cribado

Se llevó a cabo un diseño experimental previo de Cribado con el objetivo de encontrar las variables más influyentes en el proceso de extracción y simultáneamente, optimizar algunas de ellas, minimizando así el número de experimentos en el diseño final de ajuste fino de los parámetros de optimización. El diseño seleccionado fue un Plackett-Burman de 6 factores a 2 niveles $2^{6*3}/16$, realizado en un solo bloque de experimentos.

Los factores estudiados: tipo de dispersante, tipo de disolvente, temperatura, proporción de disolvente orgánico, tiempo de cada ciclo y gramos de la muestra; y sus correspondientes niveles se muestran en la Tabla 18 y la matriz de experimentos, que consta de 12 experiencias, está detallada en la Tabla 19.

Se estudiaron los cuatro índices espectrofotométricos (IPT, TF, TFC y THC) y las áreas de los tres polifenoles mayoritarios identificados (ácido gálico, catequina y epicatequina).

Tabla 18. Características del diseño experimental de Cribado (PSE)

Clase diseño		Cribado		
Nombre diseño		Plackett-Burman	$2^{6*3}/16$	
Código	Factor	Nivel bajo	Nivel alto	Continuo
A	Tipo de dispersante	C18	Arena	no
B	Tipo de disolvente	Metanol	ACN	no
C	Temperatura (°C)	90	110	si
D	Proporción disolvente (%)	30	90	si
E	Tiempo (min)	5	15	si
F	Gramos de muestra	0,5	2	si

Tabla 19. Matriz de experimentos del diseño experimental de Cribado (PSE)

Experiencia	Dispersante	Disolvente	Temperatura (°C)	% Disolvente orgánico	Tiempo (min)	Gramos muestra
1	C18	ACN	60	30	5	0,5
2	C18	Metanol	60	90	15	2
3	Arena	Metanol	60	30	15	2
4	C18	Metanol	110	90	15	2
5	Arena	Metanol	110	90	5	2
6	C18	ACN	110	90	5	2
7	Arena	ACN	60	90	15	0,5
8	Arena	ACN	60	90	5	0,5
9	C18	Metanol	60	30	5	0,5
10	Arena	Metanol	110	30	5	0,5
11	C18	ACN	110	30	15	2
12	Arena	ACN	110	30	15	0

III.10.3.5. Diseño de Superficie de Respuesta

Se llevó a cabo un diseño experimental de tipo “Superficie de Respuesta” con las dos variables continuas más influyentes: la proporción de disolvente orgánico en la mezcla de elución y la temperatura. En la tabla siguiente (Tabla 20) se pueden ver las características del diseño y los factores estudiados.

Tabla 20. Características del diseño de Superficie de Respuesta (PSE)

Clase de diseño	Superficie de Respuesta				
Nombre del diseño	Diseño compuesto central 2^2				
Características de diseño	Centrado en las caras				
Dispersante	Arena				
Número de ciclos	2				
Tiempo/ciclo	5 min				
Tamaño de muestra	1g				
Código	Factor	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Continuo
A	Proporción metanol	10	50	90	si
B	Temperatura	60	90	120	si

La matriz de experimentos se muestra en la Tabla 21. Este diseño consta de 10 experiencias y permite estudiar las interacciones entre factores.

Tabla 21. Matriz de experimentos del diseño de Superficie de Respuesta (PSE)

Experiencia	% Metanol	Temperatura (°C)
1	10	120
2	90	120
3	90	60
4	90	90
5	50	90
6	10	60
7	50	120
8	50	90
9	10	90
10	50	60

III.10.4. Procedimiento general de extracción de polifenoles mediante MSPD

El procedimiento general en la extracción llevada a cabo mediante el método de MSPD se describe a continuación:

Se molieron en un mortero el bagazo y el dispersante (en una proporción 1:2) para favorecer la ruptura de los tejidos y la posterior extracción de los compuestos fenólicos. A continuación, la mezcla se introdujo en la columna de MSPD, la cual tendrá una frita en la parte inferior y otra en la parte superior. La muestra de la columna fue compactada para un mayor contacto de la muestra y el eluyente; posteriormente, se añadió el disolvente de extracción y se recogió el extracto en tubos de ensayo. Se tuvo especial cuidado en que el flujo de elución fuese constante en todas las pruebas, para asegurarnos una extracción correcta y reproducible.

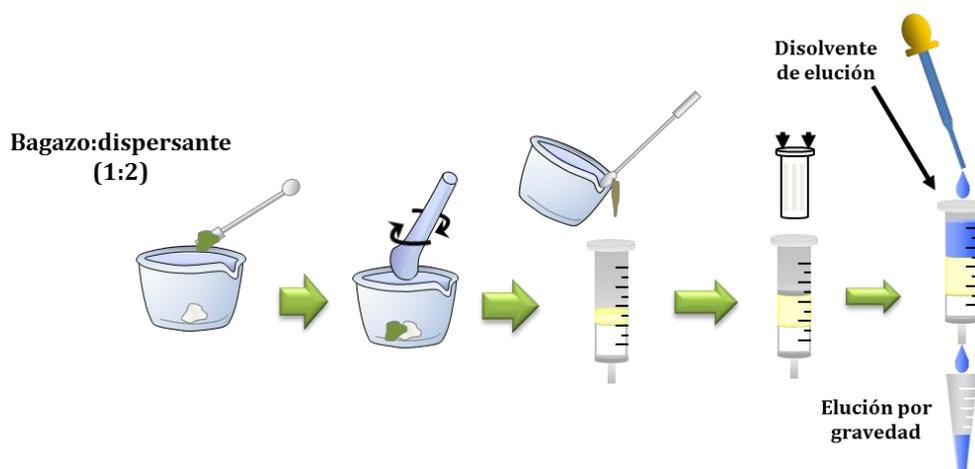


Figura 21 Esquema del proceso de extracción mediante MSPD

III.10.4.1. Optimización del método de extracción

Para el desarrollo de esta optimización se utilizó la muestra de bagazo albariño de la bodega Martín Codax (AL12-e) de la cosecha del 2010.

III.10.4.2. Elección del dispersante

Para la elección del tipo de dispersante en la extracción por MSPD, se llevaron a cabo extracciones siguiendo el protocolo explicado en el apartado III.10.4, con 5 dispersantes diferentes: arena, sílica, florisil, C₁₈ y alúmina.

El disolvente utilizado en estas pruebas fue (0,1% HCl:MeOH) (70:30). Las pruebas se realizaron por duplicado y los extractos se recogieron en dos fracciones diferentes, una primera de 10mL y una segunda de 5mL, para comprobar que la extracción era suficiente. Por último se midió el IPT de todas las extracciones.

III.10.4.3. Elección del disolvente de extracción

Para la elección del tipo de disolvente se llevaron a cabo extracciones siguiendo el protocolo explicado en el apartado III.10.4, utilizando varios tipos y mezclas de disolventes: acetato de etilo, etanol, MeOH:H₂O (80:20) a pH=1,

MeOH:H₂O (80:20) a pH=2,5, MeOH:H₂O (80:20), MeOH:H₂O (50:50) a pH=1, MeOH:H₂O (20:80) a pH=1, (0,1% HCl:MeOH) (70:30).

Las pruebas se realizaron por duplicado y se utilizó arena como dispersante en todas ellas. Los extractos se recogieron en dos fracciones diferentes, una primera de 10 mL y una segunda de 5mL, para comprobar si la extracción era exhaustiva. Por último se midió el IPT de todas las extracciones.

III.10.4.4. Optimización del volumen de elución y % de MeOH en el disolvente de extracción

Para la optimización del volumen de elución y del % de metanol en el disolvente extractante (siempre a pH 1), se llevó a cabo un diseño experimental de tipo Superficie de Respuesta (RSM; response surface methodology), permitiendo así el ajuste fino de los factores. Estas extracciones se llevaron a cabo mediante el protocolo detallado en el apartado III.10.4 y utilizando arena como dispersante. Las características más importantes del diseño se pueden ver en la Tabla 22 y la matriz experimental está representada en la Tabla 23.

Tabla 22 Características del diseño de Superficie de Respuesta (MSPD)

Tipo de diseño	Superficie de Respuesta			
Nombre	diseño compuesto central 2 ² +principal (centrado en las caras)			
Nº de factores experimentales	2			
Nº de bloques	1			
Nº de respuestas	4			
Nº de experiencias/por bloque	10, incluyendo 2 puntos centrales			
Grados de libertad	4			
Factores	factor	bajo	alto	continuo
	% MeOH	20	80	si
	Volumen elución (mL)	10	20	si
Variables respuesta	IPT, THC, TF y TFC			

Tabla 23 Matriz de experimentos del diseño de Superficie de Respuesta (MSPD)

	% MeOH	Volumen elución (mL)
1	20	20
2	50	10
3	50	15
4	50	15
5	80	15
6	80	20
7	80	10
8	20	15
9	20	10
10	50	20

III.10.5. Concentración de los extractos obtenidos por PSE y MSPD

Los extractos obtenidos mediante PSE y MSPD, fueron concentrados diez veces para su posterior análisis por HPLC-DAD o LC/MS-MS. Para ello, una alícuota de 5ml fue concentrada en el evaporador con N₂ hasta un volumen final de 0,5mL, manteniendo el extracto a una temperatura de 40°C. Por último, el extracto concentrado se filtró a través de filtros de 0,22 µm. Los extractos concentrados que no se analizaron inmediatamente fueron almacenados a temperatura de congelación (-20 °C).

III.10.6. Extracción a escala industrial de polifenoles del bagazo

A lo largo de este apartado se detallarán los procesos llevados a cabo en el escalado de un proceso alternativo a la PSE, hasta llegar a un proceso optimizado de extracción a escala industrial de los polifenoles del bagazo. El bagazo utilizado en estos experimentos fue de la variedad albariño cuyo código es el AL02. En la siguiente tabla (Tabla 24) están algunas de las características de los tipos de columna utilizados en este nuevo proceso de extracción.

Tabla 24 Características de las columnas utilizadas en el escalado del proceso de extracción

código	Nivel a pequeña y mediana escala				
	x1	X10	X20	X40	x100
Bagazo (g)	1	10	20	40	100
Altura (cm)*	2	15	30	6	15
Diámetro (cm)	1,5	1,5	1,5	5	5

*Altura que ocupa el bagazo

III.10.6.1. Proceso general de la extracción

El proceso general para la obtención de extractos antioxidantes y antibacterianos a partir de residuos de uva blanca se lleva a cabo en una columna con una frita en su parte inferior y otra en su parte superior. La relación dispersante: muestra es 2:1 y la mezcla se tritura en un mortero. La mezcla se vierte en la columna y se compacta ligeramente para un mayor contacto con el eluyente. A continuación se hace pasar el disolvente de elución a temperatura ambiente y presión atmosférica, procurando una elución constante, y se recoge el eluato.



Figura 22 Columna de extracción (X20)

III.10.6.2. Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia del tipo de disolvente

Para estos estudios en particular se utilizó la extracción en la columna (x20), es decir: una muestra de 20 g mezclada con 40 g de arena y triturada, se introduce en la columna de vidrio, estrecha y alargada (1,5 cm de diámetro x 30 cm de largo) (Figura 22) y se compacta ligeramente. El volumen de disolvente eluído fue de 50 mL.

III.10.6.3. Protocolo particular utilizado en el estudio del origen de la arena

En este estudio se comparó la extracción de polifenoles utilizando un tipo de arena comercial o arena natural recogida en la playa. En este caso el procedimiento fue el mismo que el utilizado en el apartado III.10.6.2 pero utilizando también la arena natural.

III.10.6.4. Protocolo particular utilizado en el estudio del tamaño de partícula de la arena

Se estudió la influencia del tamaño de partícula de la arena. Para ello se tamizó la arena en 3 rangos de tamaños diferentes: < 0,320 mm, 0,320 - 0,250 mm, < 0,250 mm. Y para la extracción se utilizó el protocolo llevado a cabo en el apartado III.10.6.2, pero realizando el estudio con los diferentes tamaños de partícula de la arena.

III.10.6.5. Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia de la maceración y la utilización de una bomba

En este apartado se ha estudiado la influencia en la extracción de polifenoles del bagazo de una etapa de maceración, de la utilización de una bomba y de ambos factores, simultáneamente.

La maceración se estudió introduciendo el disolvente en la columna sin eluirlo directamente, para así mantener en contacto el disolvente con la mezcla bagazo:arena. El tiempo de maceración fue de tres horas. Para el estudio de la influencia en la extracción de polifenoles de la utilización de una bomba para

acelerar el proceso de elución, se utilizó una bomba con un caudal máximo de 7 L/min. La extracción se llevó a cabo según se describe en el apartado III.10.6.2 pero macerando y/o utilizando la bomba para la elución.

III.10.6.6. Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia del tamaño de muestra

El protocolo utilizado es el proceso general anteriormente detallado (apartado III.10.6.1.). Es decir se lleva a cabo en una columna con una frita en su parte inferior y otra en su parte superior. La relación dispersante: muestra es 2:1 y se tritura en un mortero. La mezcla se vierte en la columna y se compacta ligeramente para un mayor contacto con el eluyente. A continuación se hace pasar el disolvente de elución, procurando una elución constante, y se recoge el eluato.

Para estudiar la influencia del tamaño de muestra se utilizaron diferentes cantidades de muestra, de modo que se compararon 3 diferentes conformaciones de columna todas ellas con el mismo diámetro: X1, X10 y X20, cuyas especificaciones y medidas vienen explicadas en la Tabla 24.

El volumen de disolvente eluído en el caso de la columna X1 fue de 15mL, volumen optimizado en el estudio realizado por Lores et al.¹⁴⁷ y para el resto fueron 50mL, volumen suficiente para extraer los compuestos polifenólicos.

III.10.6.7. Protocolo particular utilizado en el estudio de la influencia de la recirculación

El protocolo utilizado es el proceso general (apartado III.10.6.1), pero empleando la columna X100, una columna de 5 cm de diámetro x 15 cm de alto, donde se introdujeron 100g de bagazo (Tabla 24). Además, el disolvente de elución en este caso fue una mezcla EtOH: H₂O 50:50, y se eluyeron 500mL. El volumen eluído se recirculó 3 veces, es decir se hizo pasar 3 veces a través de la columna para intentar extraer una concentración de polifenoles mayor.

III.10.6.8. Protocolo particular utilizado en el estudio de otras variedades y otra matriz polifenólica: semillas de uva

En estos estudios se comparó la extracción de polifenoles utilizando diferentes tipos de variedades de bagazo y semillas de uva de la variedad albariño. En este caso el procedimiento fue el mismo que el utilizado en el apartado III.10.6.2 pero utilizando las diferentes variedades y semillas.

III.10.6.9. Protocolo particular utilizado en los diseños experimentales de Cribado y Superficie de Respuesta.

-Diseño de Cribado

En estos diseños experimentales se utilizó el protocolo descrito en el apartado III.10.6.2, empleando la bomba en la elución y variando los 4 factores que afectan al proceso. Estos factores están recogidos en la siguiente tabla (Tabla 25):

Tabla 25 Características del diseño de Cribado (Escalado)

Clase de diseño	de Cribado			
Nombre	Factorial en 2 bloques	2 ⁴		
Nº de factores experimentales	4			
Nº de bloques	2			
Nº de respuestas	6			
Nº de experiencias/por bloque	20, incluyendo 2 puntos centrales			
Grados de libertad	8			
Factores	factor	bajo	alto	continuo
	g arena	10	40	si
	% glicol	0	80	si
	Tpo (min) maceración	0	30	si
	Temperatura (Cº)	20	80	si
Variables respuesta	IPT, AA, ác. gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-glucósido			

La matriz experimental fue la siguiente (Tabla 26):

Tabla 26 Matriz experimental del diseño de Cribado (Escalado)

		Arena	Glicol	Tpo. maceración	temperatura
Bloque	Nº exp	g	%	min	°C
1	1	40	0	0	20
	2	40	80	0	80
	3	25	40	15	50
	4	40	80	30	20
	5	10	80	30	80
	6	10	0	0	80
	7	40	0	30	80
	8	10	80	0	20
	9	10	0	30	20
	10	25	40	15	50
2	1	40	0	0	80
	2	40	80	30	80
	3	10	0	30	80
	4	10	80	0	80
	5	40	80	0	20
	6	25	40	15	50
	7	40	0	30	20
	8	25	40	15	50
	9	10	80	30	20
	10	10	0	0	20

-Diseño de Superficie de Respuesta

Este diseño se ha llevado a cabo utilizando el protocolo anteriormente descrito en el apartado III.10.6.2 empleando la bomba en la elución y modificado los 2 factores como se describe a continuación (Tabla 27):

Tabla 27 Características del diseño de Superficie de Respuesta (Escalado)

Clase de diseño	Superficie de Respuesta			
Nombre	Diseño central compuesto: 2 ² + estrella			
Nº de factores experimentales	2			
bloques	1			
Nº de respuestas	6			
Nº de experimentos/por bloque	11, incluyendo 3 puntos centrales			
Grados de libertad	5			
Factores	factor	bajo	alto	continuo
	g arena	10	40	si
	% glicol	10	90	si
VARIABLES RESPUESTA	IPT, AA, ác. gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-glucósido			

La matriz experimental es la siguiente (Tabla 28):

Tabla 28 Matriz experimental del diseño Superficie de Respuesta (Escalado)

Nº exp	Arena (g)	% glicol
1	25	10
2	25	50
3	40	10
4	40	50
5	10	50
6	25	90
7	25	50
8	10	10
9	25	50
10	40	90
11	10	90

III.10.6.10. Protocolo de extracción utilizado con la columna de tamaño industrial

El escalado final del proceso de extracción se lleva a cabo en una columna de dimensiones industriales, se trata de un columna de acero (Figura 23) que está siendo utilizada actualmente en una empresa del sector cosmético especializada en la obtención y comercialización de ingredientes de origen natural para la elaboración de productos cosméticos, colaboradora en este proyecto.



Figura 23 Columna industrial

Debido a las limitaciones de caudal de la bomba de extracción del laboratorio, los experimentos en esta columna no pudieron hacerse a carga completa. Es decir la mezcla bagazo-arena sólo ocupaba el 60% de su capacidad. Debido a que para el llenado de la mezcla bagazo-arena la columna debe rotar 180° y una vez llena vuelve a girar de nuevo, se ideó un sistema para mantener la mezcla prensada en todo momento. Este sistema está compuesto por un tubo de PVC y un filtro de acero con un diámetro tal que entrara justo en la columna y con perforaciones equidistantes.

El protocolo general de extracción es el siguiente: el bagazo una vez triturado, se mezcla con la cantidad de arena correspondiente. Esta mezcla se vierte en la columna y a continuación se introduce el disolvente de elución. Por último se eluye el disolvente que variará en función del disolvente y de la relación bagazo:arena.

III.11. Metodología aplicada en la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos

Para estudiar la capacidad antibacteriana del extracto producido en la columna industrial mediante el proceso optimizado, contra tres bacterias Gram + (*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus spp.* y *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)) se llevaron a cabo dos tipos de valoración: una cualitativa, utilizando halos de inhibición y otra cuantitativa, calculando su CMI (concentración mínima inhibitoria). En los siguientes apartados se explican detalladamente estos dos procedimientos.

Medios de cultivo:

- a. Medios de cultivo empleados para *S. aureus* y *Bacillus spp.*

Medio TSB: caldo de soja y triptona

Medio Luria Broth (LB): 1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extracto de levadura.

- b. Medio de cultivo empleado para *P. acnes*: medio para bacterias anaerobias: 3% triptona, 2% extracto de levadura, 0,05% L-cisteína clorhidrato, 0,5% glucosa. Autoclavar durante 30 minutos a 110 °C y añadir 2,5% v/v de solución de hemina previamente esterilizada por filtración. Solución de hemina (para 100 mL): 0,1 g de hemina, 4mL de trietanolamina y 96 mL de agua destilada.

Los medios de cultivo fueron suplementados con un 2% de agar-agar en el caso de requerirse sólidos.

III.11.1. Valoración cualitativa de la actividad antibacteriana mediante Halos de Inhibición

Se ha estudiado la actividad antimicrobiana del extracto frente a bacterias Gram +. Para testar la capacidad antimicrobiana de los extractos polifenólicos de bagazo se empleó una variación de la técnica de difusión estándar descrita por Fattouch et al.¹⁴⁸. Las pruebas de difusión en disco/pocillo se basan en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando

un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene la sustancia antimicrobiana se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado, en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco/pocillo de inhibición del crecimiento. Esta área, al ser proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI) permitirá la distinción de cepas sensibles, resistentes o intermedias.

III.11.1.1. Protocolo pruebas de difusión disco/pocillo

Se partió de una suspensión bacteriana de *S. aureus* crecida en un medio de cultivo TSB, ajustada a una turbidez correspondiente a 0,5 en la escala de McFarland (108 UFC/ml). Se inoculó, superficialmente y con la ayuda de un asa de Digalsky, una placa agar de medio mínimo M9, con 100 µL de la suspensión bacteriana anterior, con el fin de obtener un césped microbiano. A continuación se hicieron pocillos equidistantes en el agar en los que se pipetearon volúmenes de 100 µL del extracto. Se utilizó cloranfenicol (1000 µg/mL) como control positivo y el mismo disolvente del extracto como control negativo. Después de 24h de incubación se midió el tamaño del halo de inhibición usando una regla con una precisión de 0,5mm.

A continuación se realizó este ensayo en las tres bacterias seleccionadas (*S. aureus*, *Bacillus spp* y *P. acnes*) pero esta vez se partió de una suspensión bacteriana crecida en un caldo de cultivo LB, excepto para *P. acnes* (El ensayo realizado con la bacteria *P. acnes*, se llevó a cabo respetando las peculiaridades del cultivo de esta bacteria anaerobia facultativa).

III.11.2. Valoración cuantitativa de la Actividad Antibacteriana: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Condiciones de cultivo:

Las bacterias fueron cultivadas en medio LB a 37 °C. Los cultivos líquidos fueron incubados en un agitador orbital a 200 rpm. En el caso de *P. acnes*, por

tratarse de una bacteria anaerobia facultativa, los cultivos fueron introducidos en una jarra de anaerobiosis con sobres Anaerocult ®A (Merck). La jarra de anaerobiosis fue fijada a un agitador orbital y *P. acnes* fue incubada con agitación suave en medio líquido para asegurar la distribución homogénea del extracto a ensayar, ya que este tiene tendencia a precipitar cuando se añade.

III.11.2.1. Protocolo para el cálculo de la CMI y pruebas preliminares

Para determinar la concentración mínima inhibitoria y la influencia del vehículo (butilenglicol) sobre la inhibición del crecimiento, se prepararon matraces erlenmeyer conteniendo 18mL de medio de cultivo líquido a los cuales se añadieron diferentes volúmenes del extracto (desde 20 µL hasta 2 mL), añadiendo la cantidad de vehículo necesaria para conseguir un volumen final de 20mL en los matraces erlenmeyer.

De esta manera, la concentración de butilenglicol fue del 6,5% en todos los casos y la concentración del extracto se testó entre el 0,1 y el 10% v/v.

Estos matraces fueron inoculados con 100 µL de un cultivo del microorganismo a ensayar en fase estacionaria.

En cada caso se realizaron los siguientes controles:

Control positivo: microorganismo en medio de cultivo sin extracto ni vehículo

Control de la influencia del vehículo: microorganismo en medio de cultivo con 2mL de vehículo (butilenglicol:agua 65:35)

Control de contaminación del vehículo: medio de cultivo con 2 mL del vehículo

Control de contaminación del extracto: medio de cultivo con 2 mL del extracto

Los cultivos se incubaron durante toda la noche (aprox. entre 14 y 16 horas) en las condiciones anteriormente mencionadas. Una vez completada la incubación se realizaron diluciones seriadas a partir de ellos en tubos conteniendo solución salina. De las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se tomaron 20 µL

de muestra que fueron sembrados por extensión en placas de Petri con el correspondiente medio de cultivo sólido e incubados durante 24 horas a la temperatura adecuada.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los resultados se valoraron por el método de recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) en placa.

III.11.2.2. CMI en bacterias Gram positivas del extracto polifenólico

Una vez realizadas las pruebas preliminares y comprobada la no influencia del vehículo en la inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas, se procedió a ajustar con más exactitud la CMI para *S. aureus*, *Bacillus spp* y *P. acnes*, utilizando como referencia los valores obtenidos en el estudio anterior. Así se ensayaron diversas concentraciones del extracto entre el 1 y el 3% v/v en matraces erlenmeyer conteniendo 20 mL del medio de cultivo correspondiente. El procedimiento de incubación y siembra en placa fue idéntico al anteriormente descrito.

III.12. Estudio de estabilidad del extracto polifenólico obtenido en la columna industrial

Se ha estudiado la estabilidad del extracto obtenido en la columna industrial: a lo largo de un año, en diferentes condiciones de almacenamiento y empleando una disolución de ácido ascórbico al 1% en 65% de glicol como control. Estas pruebas se han realizado por duplicado y las condiciones de almacenamiento que se han estudiado son las siguientes:

- T^a de almacenamiento (con N₂ en espacio de cabeza y oscuridad): Se compararon 3 temperaturas diferentes de almacenamiento: T^a ambiente (25°C); Congelación (-20°C); Refrigeración (4°C). A todos los viales almacenados se les eliminó el oxígeno en su espacio de cabeza mediante la introducción de nitrógeno y además se protegieron de la luz.

- Presencia oxígeno (oscuridad y 25°C): Se comparó este factor almacenando a temperatura ambiente un vial con el extracto con O₂ en espacio de cabeza y protegiéndolo de la luz y otro en las mismas condiciones pero eliminando el oxígeno mediante la introducción de nitrógeno.
- Exposición a la Luz (N₂ en espacio de cabeza y 25°C): Se comparó este factor almacenando un vial con extracto sin ninguna protección frente a la luz a temperatura ambiente y sin oxígeno en su espacio de cabeza y otro en las mismas condiciones pero protegiéndolo de la luz.

A lo largo del año de almacenamiento se realizaron 10 controles en los días 0, 2, 8, 20, 34, 62, 100, 181, 320 y 365. Las variables medidas en estos controles han sido el IPT, la AA, la medida de la absorbancia a $\lambda = 420, 520$ y 620 nm; y la concentración de 5 polifenoles individuales (ácido gálico, catequina, epicatequina y la suma de tres quercetinas (quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y quercetina), identificados mediante el análisis cromatográfico.



Figura 24 Esquema del protocolo del estudio de estabilidad

III.13. Proceso de vermicompostaje del bagazo de uva

Se ha estudiado la aplicación de un proceso de vermicompostaje al bagazo de uva, el cual podría constituir además de un método viable para el crecimiento y desarrollo de lombrices de tierra, un proceso rápido para

obtener un vermicompost estable y maduro; así como un método de separación mecánica adecuado para la evaluación y obtención de polifenoles de una manera rápida y eficaz.

El procesamiento del bagazo tuvo lugar en un vermirreactor de descarga vertical de una superficie de 6 m² (1,5 x 4 m) (Figura 25) área mínima representativa de las condiciones de un sistema a escala industrial. El vermirreactor está alojado en un invernadero de 104 m² y 2,5 m de altura libre, con frentes cerrados, ventilación cenital, cubierta de plástico, sin control de temperatura y con una población ya presente de lombrices de tierra *Eisenia andrei* de 214 ± 26 individuos/ m².

El vermirreactor está formado por un vaso o contenedor elevado que cumple la función de alojar el residuo durante el proceso de vermicompostaje y proporcionar las condiciones ambientales adecuadas para que este se lleve a cabo con éxito (Figura 25). Los elementos que componen el vaso se pueden resumir en:

- Estructura portante: Realiza una doble función; por un lado eleva el vaso, permitiendo la descarga del vermicompost procesado en la parte inferior; y por otra parte debe permitir solicitaciones mecánicas derivadas de su propio peso y mecanismos de carga y descarga.

- Paneles laterales: Los paneles laterales del vaso soportan la presión del residuo, proporcionan aislamiento térmico y actúan de superficie impermeable minimizando las pérdidas de agua y humedad.

- Suelo perforado: El suelo del vaso sostiene la masa del residuo en proceso y permite la descarga vertical del material ya tratado.

En la siguiente figura están detalladas cada una de las etapas del proceso llevado a cabo (Figura 26).

III.13.1. Muestras de seguimiento del proceso de vermicompostaje

En el estudio de la evolución de los polifenoles del bagazo durante el proceso de vermicompostaje se utilizó la variedad de bagazo albariño perteneciente a la bodega Mar de Frades (AL02).

Las muestras se recogieron de manera aleatoria (Figura 25) y cada 7 días, 5 muestras de 10 gramos de *bagazo de uva*, 5 muestras de 10 gramos de *vermicompost base* y 1 muestra de 10 gramos de *semillas* durante todo el proceso de vermicompostaje. Todas las muestras de los diferentes sustratos (*bagazo*, *vermicompost base* y *semillas*) se almacenaron en bolsas de plástico dentro del congelador a una temperatura de - 20 °C hasta el momento de la realización de los análisis.

Las *muestras de bagazo* incluyen el bagazo inicial con el que se cargó el vermirreactor (día 0) y las muestras de seguimiento de su evolución y transformación semanal en el fertilizante orgánico o vermicompost que será el producto final del proceso. Por otra parte, cabe mencionar que el reactor tiene antes de cada carga una pequeña capa de *vermicompost base* que se utiliza para mantener vivas a las lombrices de tierra que, junto con los microorganismos asociados, llevarán a cabo el proceso de vermicompostaje. Este *vermicompost base* se ha muestreado también semanalmente para garantizar que la disminución de polifenoles observada en las muestras de bagazo vermicompostado no se debe a pérdidas de carga hacia la base del vermirreactor. El último bloque de muestras lo constituyen las *semillas*, obtenidas también semanalmente.

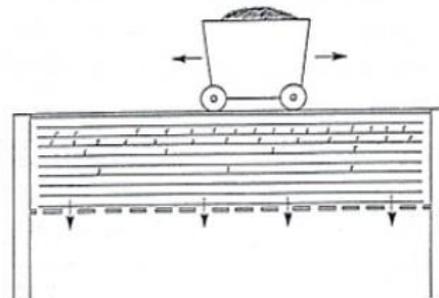


Figura 25 Vermirreactor continuo de descarga vertical

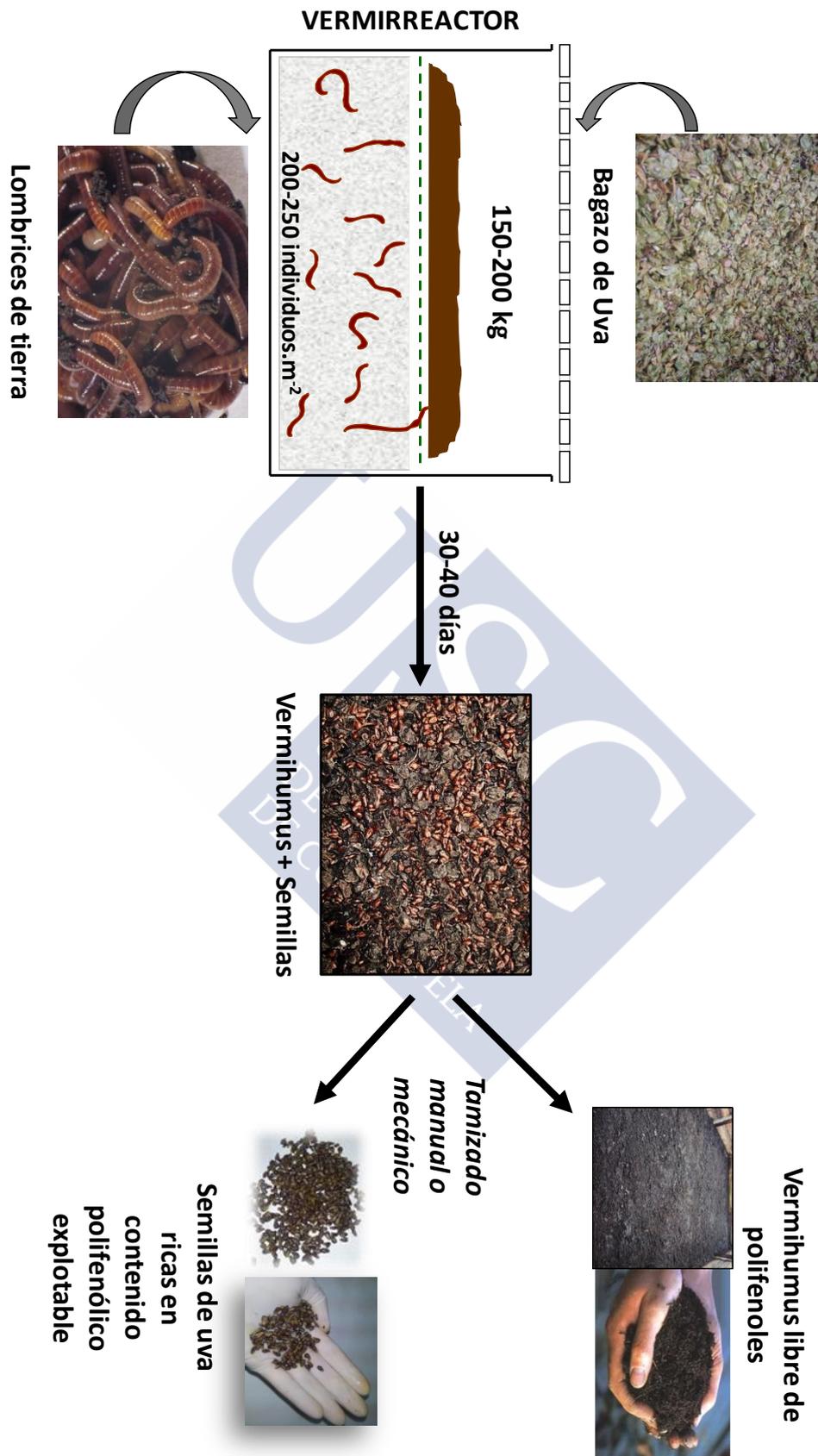


Figura 26 Esquema del proceso de vermicompostaje del bagazo de uva

III.14. Estudio de degradación del vino

Se han llevado a cabo dos test de degradación del vino blanco: uno de ellos utilizando la influencia de la radiación UV como factor de degradación y otro utilizando altas temperaturas. Se eligieron tres vinos muy diferentes en su perfil polifenólico para estudiar los posibles cambios durante los test. A continuación se muestran los datos del origen de los tres vinos (Tabla 29).

Tabla 29 Datos del origen de los vinos utilizados en los test de degradación

D.O.	Subzona	Variedad	Año	Código
R. Baixas	Salnés	Albariño	2010	AL04
R. Baixas	O Rosal	Caíño	2010	CA02
Monterrei	-	Godello	2010	GO01

Se controlaron 5 variables durante los test:

- Actividad antioxidante: por medio del método del DPPH
- Pardeamiento: medida de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 420nm.
- Concentración de 3 polifenoles: ác. gálico, ác. caftárico, ác. cafeico.

III.14.1. Test de Foto-degradación

Para este test, se introdujeron 3,5 mL de vino o patrón (en 12% de disolución hidro-etanólica) en una cubeta de cuarzo (10mm de camino óptico) tapada. A continuación, la cubeta se introdujo en un foto-reactor, donde se le aplicó radiación UV por mediación de dos lámparas de 8 y 10 W, respectivamente. El test se realizó siempre por triplicado, introduciendo siempre 3 cubetas a la vez en la cámara.

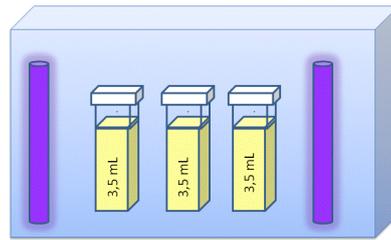


Figura 27 Representación del test de foto-degradación

El tiempo total del test fue de 300 min y los controles fueron realizados a tiempo 0, 150 min y 300 min (además, en el vino albariño los controles fueron realizados cada 50 min para comprobar la tendencia de la curva de degradación). En cada control se midió la AA, el pardeamiento (la medida fue realizada cada 50 min), y la concentración de los 5 polifenoles indicados anteriormente.

III.14.2. Test de Termo-degradación

Este test consistió en la exposición de 10mL de cada uno de los vinos a una temperatura de 55 °C. Para ello, se introdujeron en viales (de 22 mL) los 10 mL de vino, protegidos de la luz y encapsulados, en un horno a una temperatura constante de 55 °C. El test se realizó siempre por triplicado, introduciendo siempre 3 viales a la vez en el horno.

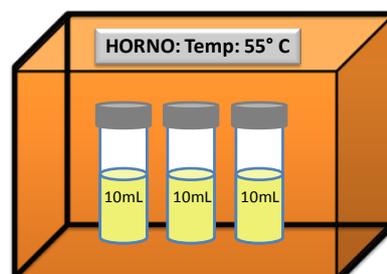


Figura 28 Representación del test de termo-degradación

El tiempo total del test fue de 9 días y los controles realizados fueron en los días 0, 2, 5, 6 y 9 (hubo algunas excepciones por problemas con las muestras). En cada control se midió la AA, el pardeamiento (la medida fue realizada todos los días) y la concentración de los 5 polifenoles indicados anteriormente.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



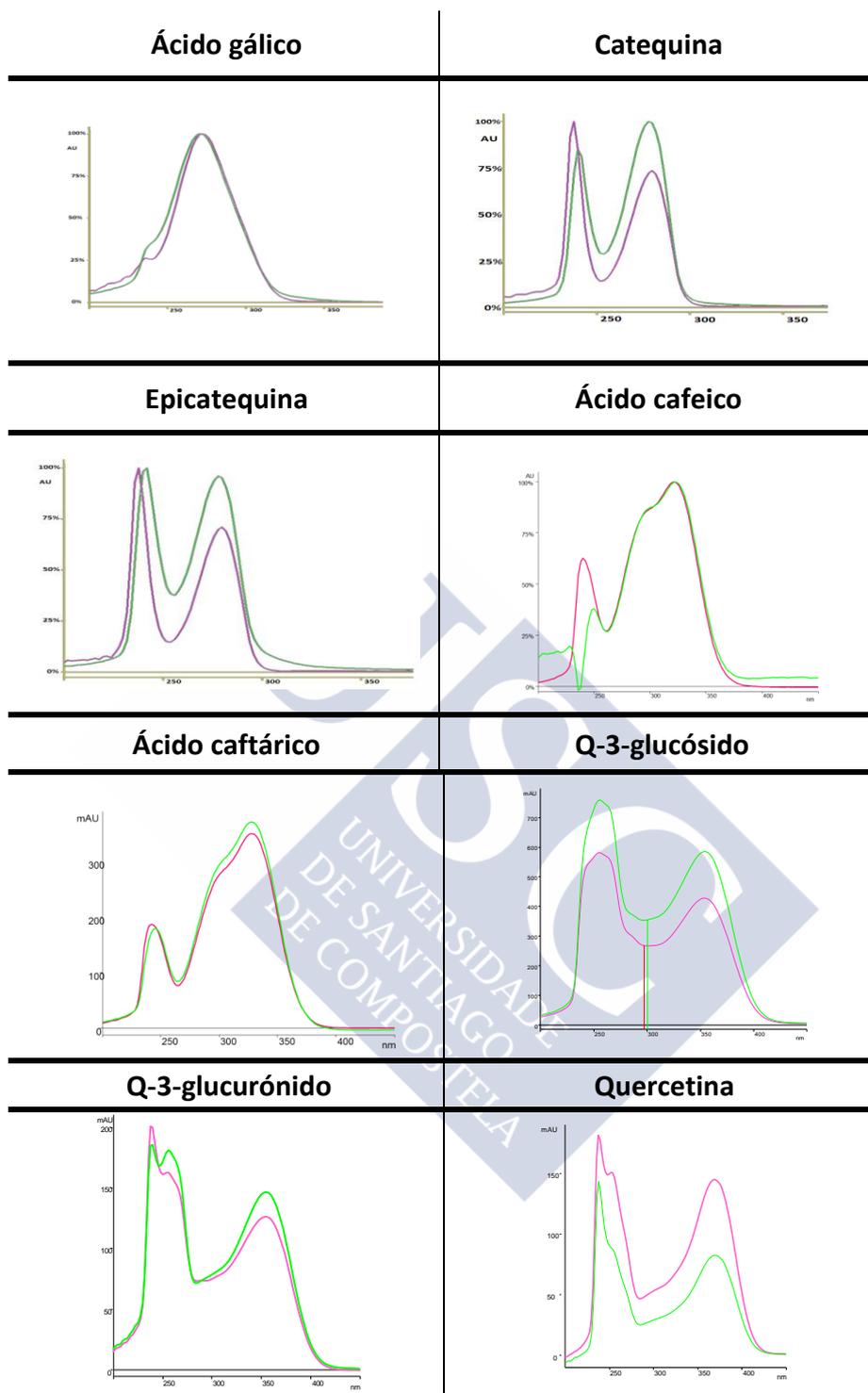
IV.1. Identificación y cuantificación de polifenoles

En una primera etapa de la tesis se identificaron de forma positiva 8 compuestos polifenólicos, primero mediante HPLC-DAD; a partir de la biblioteca de espectros de polifenoles que se creó a tal efecto con los patrones disponibles. Así, se identificaron 8 compuestos mayoritarios (6 en los extractos de bagazo: ácido gálico, catequina, epicatequina y quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y quercetina, y 3 en los vinos blancos: ác. gálico, ác. cafeico y ác. caftárico), comparando tanto los espectros como los tiempos de retención de los picos que aparecen en los cromatogramas registrados a 280 nm y 350nm. A continuación, estos compuestos se identificaron positivamente por LC-MS/MS, mediante el método detallado en el apartado III.6.3.1, y las condiciones de cada compuesto están en la siguiente tabla (Tabla 30). Los compuestos polifenólicos q-3-glucósido, q-3-glucurónido y quercetina, no aparecen en la tabla porque fueron identificados solamente mediante HPLC-DAD.

Tabla 30 Parámetros experimentales en LC-MS/MS para cada compuesto polifenólico

Compuesto	tr (min)	Ion Precursor (m/z)	Fragmentos	E colisión (eV)
Ác. gálico	2,1	169,1 [M-H] ⁻	125	20
Ác. caftárico	5,9	310,9 [M-H] ⁻	179/149	20/20
(+)Catequina	6,5	289,0 [M-H] ⁻	205/245	16/20
Ác. cafeico	7,5	179 [M-H] ⁻	135	16
(-)Epicatequina	8,4	289,0 [M-H] ⁻	205/245	16/20

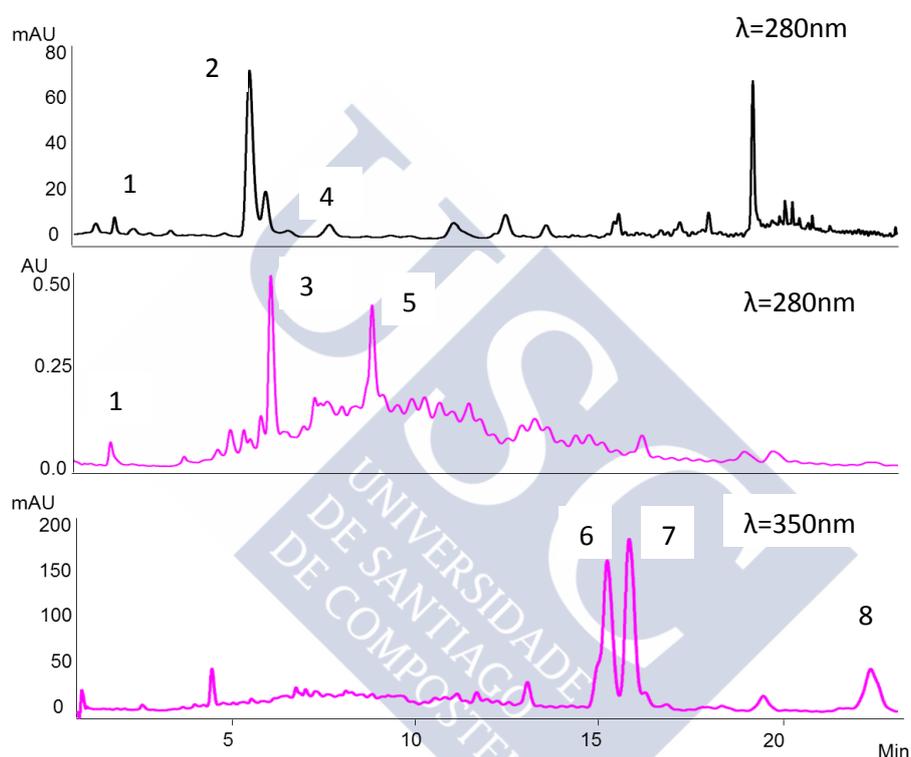
La comparación de los espectros de los picos cromatográficos de los extractos obtenidos mediante HPLC-DAD con los de los patrones puros de los 8 polifenoles pueden verse en la siguiente figura (Figura 29).



espectro verde: muestra
espectro rosa: patrón

Figura 29. Comparación de los espectros de los ácidos gálico, cafeico y caftárico; los flavonoles catequina y epicatequina y los flavanoles quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y quercetina

En la Figura 30 se puede ver un cromatograma tipo de un vino de la variedad loureiro (280nm) y una muestra de bagazo albariño extraída mediante PSE, a las dos longitudes de onda: 280 y 350 nm. En estos cromatogramas se pueden ver los 8 polifenoles identificados.



1: Ácido gálico; 2:Ácido caftarico; 3:Catequina; 4: Ácido cafeico; 5: Epicatequina; 6: Q-3-glucurónido; 7: Q-3-glucurónido; 8: Qurecetina. 6, 7 y 8 (cuantificadas y identificadas solamente en el estudio de escalado)

Figura 30 Cromatogramas tipo de HPLC-DAD de una muestra de un vino loureiro (color negro) y de bagazo albariño extraída mediante PSE (color rosa)

Las características optimizadas del método cromatográfico HPLC-DAD están detalladas en el apartado III.6.2.

La concentración de estos 8 polifenoles identificados, se determinó a través de las rectas de calibrado realizadas con los patrones correspondientes

(exceptuando los compuestos q-3-glucurónico y quercetina; cuya concentración se calculó como q-3-glucósido), calculadas mediante análisis de regresión de las concentraciones especificadas en la Tabla 31, frente a las áreas de los picos. En dicha tabla se pueden ver tanto las ecuaciones de las rectas de calibrado junto con su R², como el rango de concentraciones utilizado. La linealidad en la respuesta se comprobó para los 6 analitos identificados, obteniéndose coeficientes de correlación (R²) por encima de 0,99 en todos los casos.

Tabla 31. Rectas de calibrado de polifenoles analizados mediante HPLC-DAD

Compuesto	tr(min)	Ecuación	R ²	Rango de concentraciones
Ácido Gálico	2,1	$y = 400234x + 1E+06$	0,9978	1-200 mg.L ⁻¹
Catequina	6,5	$y = 122747x - 133849$	0,9988	5-700 mg.L ⁻¹
Epicatequina	8,4	$y = 112672x + 71773$	0,9961	25-500 mg.L ⁻¹
Ác. caftárico	5,9	$y = 661652x + 586873$	0,9995	1-150 mg.L ⁻¹
Ác. cafeico	7,5	$y = 628327x + 245360$	0,9967	1-30 mg.L ⁻¹
Q-3-glucuronido	15,3	-	-	-
Q-3-glucósido	16	$y = 318503x - 213157$	0,9903	14-295 mg.L ⁻¹
Quercetina	22,2	-	-	-

La precisión del método se evaluó en un mismo día (repetibilidad) y entre varios días (reproducibilidad). Los resultados se muestran en la Tabla 32, en la que también se recogen los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) para el método propuesto. Existen diversos modos de calcular los LODs y LOQs. En este trabajo se han calculado como la concentración correspondiente a una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. Estos límites se estimaron considerando los cromatogramas obtenidos para los niveles de concentración más bajos de los patrones, en los que el ruido de fondo se calculó integrando picos de ruido en zonas de los cromatogramas próximas a cada uno de los picos de los analitos estudiados y promediando después las áreas obtenidas para esos picos de ruido.

Tabla 32. Precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método de HPLC-DAD

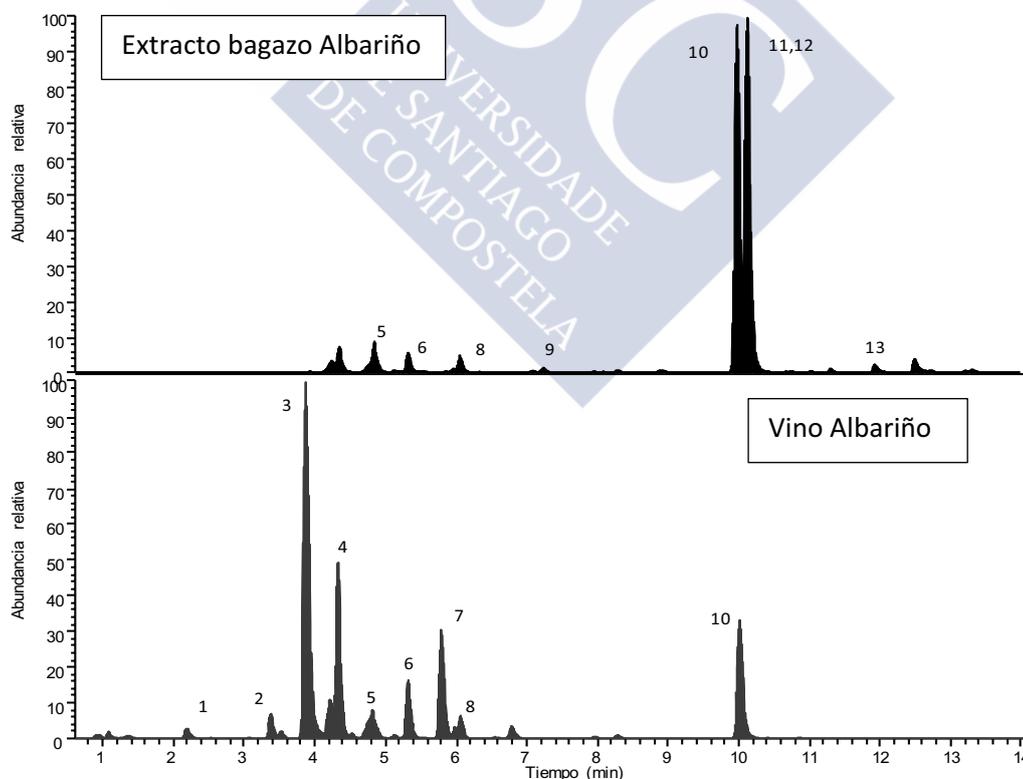
	CV (%)		LOD	LOQ
	Reproducibilidad	Repetibilidad		
	n=3	n=3		
Ác. Gálico	5	1,5	0,1	0,5
Ác. Caftárico	10	1,9	0,2	0,7
Ác. Cafeico	8,4	1,1	0,03	0,1
Catequina	9	0,7	0,5	1,6
Epicatequina	8	2	0,9	3
Q-3-glucósido	12	1,4	0,1	0,3

En una segunda etapa de la tesis, se contó con un LC-MS/MS de las características ya explicadas en el apartado III.6.3.2. Con ayuda de este equipo se aumentó el número de compuestos polifenólicos identificados tanto en bagazo como en vino. Para ello, en un primer momento se realizó un screening de las muestras en modo “fullscan” (rango de masas: 100-1000) para buscar así posibles coincidencias de masas de compuestos polifenólicos potencialmente presentes, encontrados en la bibliografía. Se identificaron 13 polifenoles en total, la mayoría presentes tanto en los extractos de bagazo como en vino blanco.

A continuación, se inyectaron los patrones de estos compuestos optimizando sus condiciones en modo SRM (Select Reaction Monitoring). Por último, se volvieron a inyectar las muestras en las mismas condiciones de los patrones, comprobando así de forma positiva la presencia de estos compuestos polifenólicos en las mismas, comparando además con sus tiempos de retención. En la Tabla 33 se detallan las condiciones optimizadas en las que se inyectaron las muestras. Las condiciones cromatográficas se encuentran especificadas en el apartado III.6.3.2.1. En la Figura 31 se puede ver un cromatograma tipo de un extracto de bagazo albariño obtenido mediante PSE y de un vino albariño.

Tabla 33 Parámetros experimentales para cada compuesto en LC-MS/MS

Compuesto	tr(min)	Ion Precursor (m/z)	Fragmentos	E colisión (eV)
Ác. gálico	2,21	169,0 [M-H] ⁻	125	26
Ác. protocatéuico	3,5	152,9 [M-H] ⁻	108/109	26/17
Ác. caftárico	3,89	310,9 [M-H] ⁻	148,9/174,9/178,9	30/19/26
Ác. cafeico	5,8	178,9 [M-H] ⁻	134/135	28/19
Procianidina b1	4,34	577,0 [M-H] ⁻	288,9/407/424,9	26
(+)Catequina	4,83	289,0 [M-H] ⁻	203,1/245	26/15
Procianidina b2	5,35	577,0 [M-H] ⁻	288,9/407,0/424,9	26
(-)Epicatequina	6,03	289,0 [M-H] ⁻	203,1/245	26/15
(-)Epicatequina-galato	7,2	441,0 [M-H] ⁻	125/169/289	26
Quercetina-3-glucurónido	10,05	479,0 [M+H] ⁺	302,9/461,5	18/14
Quercetina-3-glucósido	10,15	465,0 [M+H] ⁺	256,9/302,9	41/14
Quercetina-3-rutinósido	10,18	609,1 [M-H] ⁻	178,8/270,9/300	44/56/37
Quercetina	11,9	303,1 [M+H] ⁺	153,0/229,1	33/28



1:ác. gálico; 2:ác. protocatéuico; 3: ác. caftárico; 4: PB1; 5:Catequina; 6:PB2;
 7: ác. cafeico; 8:Epicatequina; 9:Epicatequina-galato; 10: Q-3-glucurónido
 11:Q-3-glucósido; 12: Q-3-rutinósido; 13:Quercetina

Figura 31 Cromatograma (TIC: de ion total) de un extracto de bagazo y de un vino albariño

El cálculo de la concentración de cada compuesto polifenólico identificado, se determinó a través de las rectas de calibrado de los patrones correspondientes (Tabla 34), calculadas mediante análisis de regresión de las concentraciones especificadas en la tabla, frente a las áreas de los picos. Los resultados para los extractos de bagazo se expresaron en $\mu\text{g/g}$ bagazo seco, y para los vinos en $\mu\text{g/L}$.

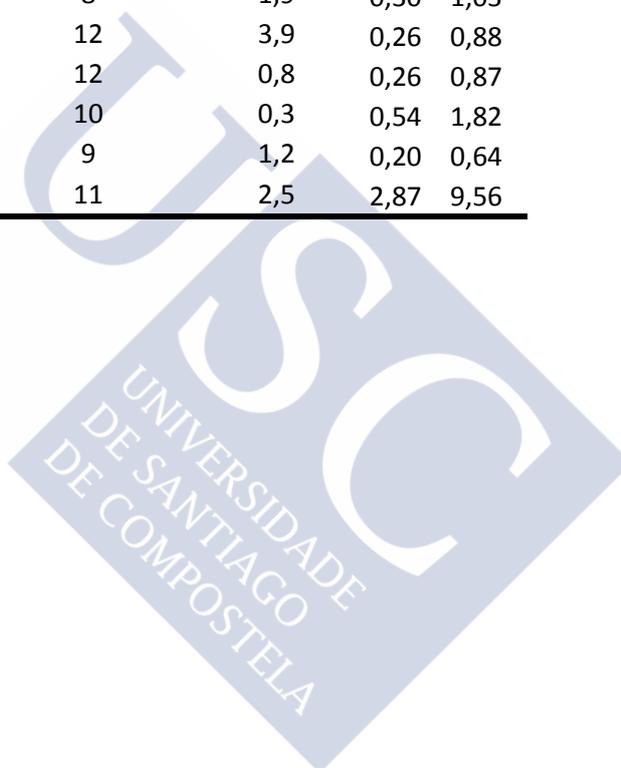
Tabla 34 Rectas de calibrado de polifenoles seleccionados analizados por LC-MS/MS

Compuesto	Recta calibrado	R ²	Rango de Concentraciones (ppb)
Ác. gálico	$y = 750,74x + 4370,8$	0,9991	25-5000
Ác. protocatéquico	$y = 4433,1x + 10234$	0,9982	5-1000
Ác. caftárico	$y = 3220,5x - 35171$	0,9998	25-5000
Ác. cafeico	$y = 3324,6x + 2989$	0,9983	50-5000
Procianidina b1	$y = 2140,1x - 160353$	0,9985	100-5000
(+)Catequina	$y = 878,87x + 30831$	0,9982	50-5000
Procianidina b2	$y = 2590,5x - 459908$	0,9976	50-5000
(-)Epicatequina	$y = 915,67x + 89603$	0,9962	50-5000
(-)Epicatequina-galato	$y = 2870,4x - 86502$	0,9993	50-2000
Quercetina-3-glucurónido	$y = 56553x + 3E+06$	0,9989	5-5000
Quercetina-3-glucósido	$y = 49989x + 1E+07$	0,9945	125-5000
Quercetina-3-rutinósido	$y = 9778,4x + 171323$	0,9993	5-2000
Quercetina	$y = 1368,6x - 2E+06$	0,9961	500-2000

En la Tabla 35 se muestran los de precisión del método, y los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) para el método de LC-MS/MS.

Tabla 35 Precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método de LC-MS/MS

	CV (%)		LOD	LOQ µg/L
	Reproducibilidad	Repetibilidad		
	n=3	n=3		
Ác. Gálico	4	3	1,50	4,90
Ác. Protocatéquico	7	0,9	1,03	3,24
Ác. Caftárico	12	1,5	0,51	1,80
Ác. Cafeico	5	0,1	1,02	3,49
Catequina	2	1,6	0,22	0,74
Epicatequina	4	1,7	0,10	0,42
Epicatequina-galato	4	0,4	0,15	0,49
PB1	8	1,9	0,30	1,03
PB2	12	3,9	0,26	0,88
Q-3-glucósido	12	0,8	0,26	0,87
Q-3-glucurónido	10	0,3	0,54	1,82
Q-3-rutinósido	9	1,2	0,20	0,64
Quercetina	11	2,5	2,87	9,56



EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE BAGAZO



IV.2. Optimización de la PSE

Existen numerosos parámetros que pueden influir potencialmente en la eficacia de la extracción con disolventes presurizados: variables específicas de PSE, como la temperatura y la presión de la extracción, el volumen de enjuague (flush), los tiempos de extracción y purga, o el número de ciclos; y, por otro lado, variables comunes a los procesos de extracción sólido-líquido convencionales: naturaleza del disolvente, tamaño de muestra, etapas de limpieza y tipo de dispersante/adsorbente.

Como ya se ha comentado en el apartado II.12.4.2 en general la presión tiene un efecto poco destacado en la eficacia de la extracción; de hecho, el equipo usado en este trabajo (ASE-150) utiliza una presión constante de 1500 psi. Asimismo, el volumen de enjuague (flush) y el tiempo de purga se fijaron en 60% y 100 segundos respectivamente; valores comunes en muchas de las aplicaciones llevadas a cabo con esta técnica.

La influencia de las restantes variables se evaluó tal y como se describirá en los siguientes apartados. Los experimentos llevados a cabo a lo largo de la optimización del método se realizaron con muestras de bagazo albariño de una bodega de O Rosal (código: AL-11). Como todas las muestras, fue triturada y molida previamente en un mortero con el dispersante para su correcta homogeneización. Además, para evitar el volumen muerto en las celdas de PSE se utilizó arena lavada en todos los experimentos realizados.

IV.2.1. Experimentos preliminares

IV.2.1.1. Limpieza de extractos

Autores como Papagiannopoulos et al.¹⁴⁹ observaron mejoras en la línea base de sus cromatogramas al utilizar en PSE una etapa de limpieza con disolventes poco polares como el pentano, para extraer a continuación polifenoles del lúpulo.

En este trabajo, se estudió la posibilidad de limpiar los extractos y conseguir unos cromatogramas con menos interferencias producidas por

compuestos poco polares. Para ello, se llevaron a cabo una serie de pruebas con una etapa previa de limpieza. El protocolo elegido está descrito en el apartado III.10.3.

En la Figura 32 se pueden ver los cromatogramas donde se comparan una extracción sin ciclos de limpieza previa y con limpieza previa; como puede observarse estos no produjeron ninguna mejora adicional, incluso la respuesta disminuyó ligeramente.

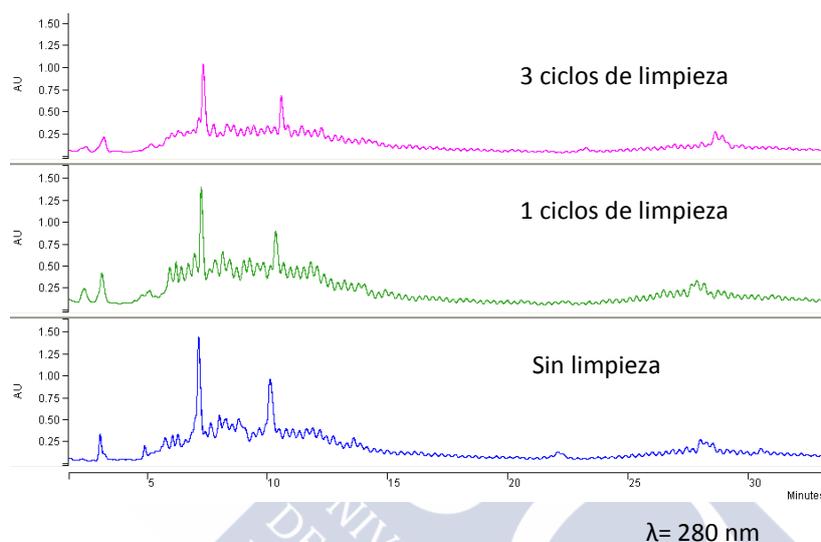


Figura 32. Comparación de los extractos de PSE, con y sin ciclos previos de limpieza

IV.2.1.2. Determinación del número de ciclos de extracción

Una vez comprobado que no es necesaria una etapa de limpieza previa, se procedió a evaluar el efecto del número de ciclos de extracción. Para ello se realizaron pruebas en las que las extracciones fueron de 1, 2 ó 5 ciclos. En las Figuras 33 y 34 se comparan estas extracciones y, como se puede ver, la eficacia de la extracción no se vio mejorada significativamente al aumentar el número de ciclos. Esto concuerda con los resultados de Luthria et al.¹⁵⁰, que optimizaron la extracción de polifenoles en perejil, y comprobaron que ya en el primer ciclo de extracción con 70% de metanol en agua como disolvente de extracción, se extraía más del 80% de los polifenoles totales y con el segundo ciclo más del 95%.

Por este motivo, para los sucesivos análisis se utilizarán 2 ciclos de extracción, minimizando así el tiempo de las extracciones de bagazo.

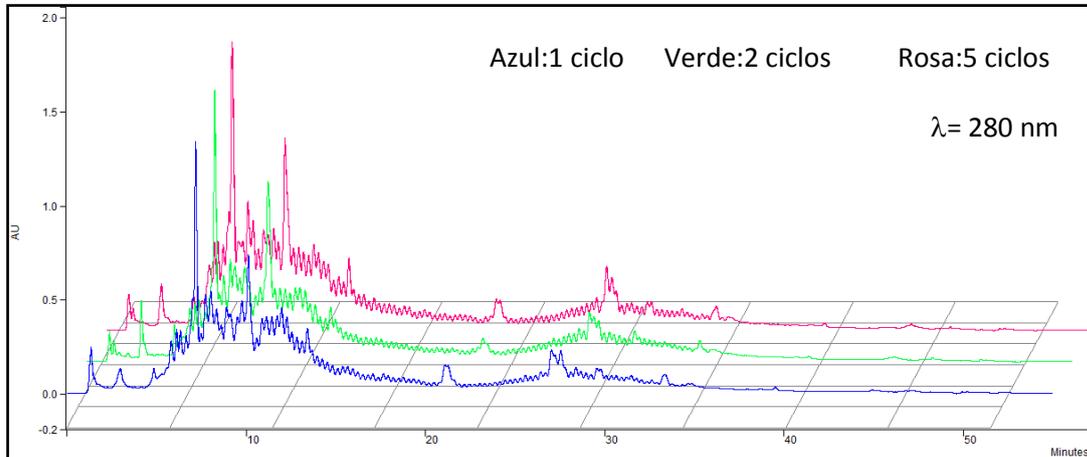


Figura 33. Comparación de los extractos de PSE obtenidos con 1, 2 y 5 ciclos de extracción ($\lambda = 280\text{nm}$)

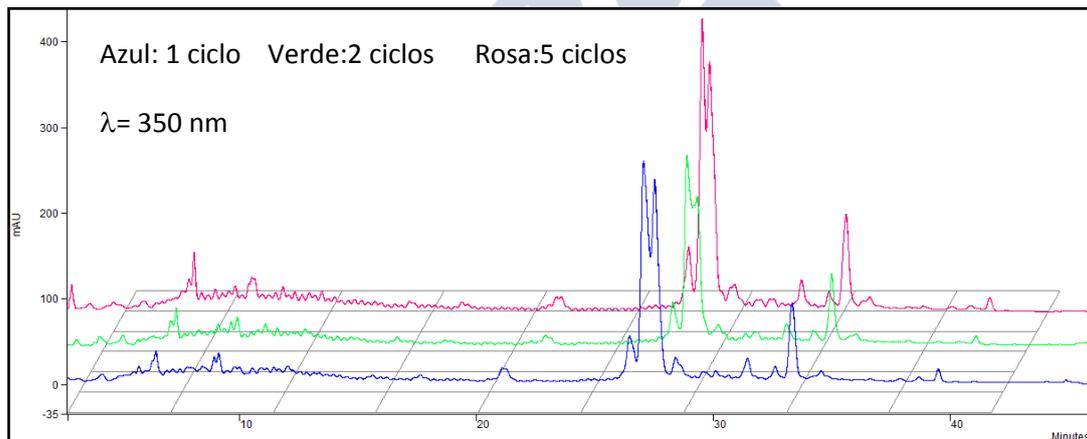


Figura 34. Comparación de los extractos de PSE obtenidos con 1, 2 y 5 ciclos de extracción ($\lambda = 350\text{nm}$)

IV.2.2. Diseños experimentales

IV.2.2.1. Cribado

Se llevó a cabo un diseño experimental previo de Cribado con el objetivo de encontrar las variables más influyentes en el proceso de extracción y simultáneamente, optimizar algunas de ellas, minimizando así el número de experimentos en el diseño final de ajuste fino de los parámetros de

optimización. Las características del diseño se encuentran detalladas en el apartado III.10.3.4.

En este diseño Plackett-Burman no se pueden estudiar las interacciones entre los factores, pero tampoco es lo que se pretende en esta aproximación inicial.

En la Tabla 36 están detallados los valores de F y p obtenidos mediante ANOVA para los 6 factores estudiados (se han resaltado con asterisco y en negrita los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%). A continuación se pueden ver en las Figuras 35 y 36 los gráficos pareto y los efectos principales.

Tabla 36. Valores de F y p obtenidos mediante ANOVA para los 6 factores analizados (PSE) (se han resaltado con un asterisco y en negrita los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%).

	FACTORES											
	A		B		C		D		E		F	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Ácido gálico	0,03	0,87	0,39	0,56	8,85	0,03*	1,89	0,23	3,1	0,14	4,89	0,08
Catequina	0,13	0,74	0,47	0,52	8,96	0,03*	0,03	0,87	2,27	0,19	5,1	0,07
Epicatequina	0,81	0,41	3	0,14	12,91	0,01*	1,2	0,32	2,53	0,17	5,01	0,07
IPT	0,11	0,75	0,28	0,62	5,39	0,07	7,03	0,04*	0,26	0,63	0,01	0,94
TF	1,29	0,31	0	0,99	8,24	0,03*	3,3	0,13	0,29	0,61	0,61	0,47
TFC	0,1	0,77	0,49	0,51	1,88	0,23	2,78	0,16	0,75	0,42	0,02	0,88
THC	0,18	0,69	2,33	0,19	10,65	0,02*	10,31	0,02*	2,66	0,16	0,02	0,88

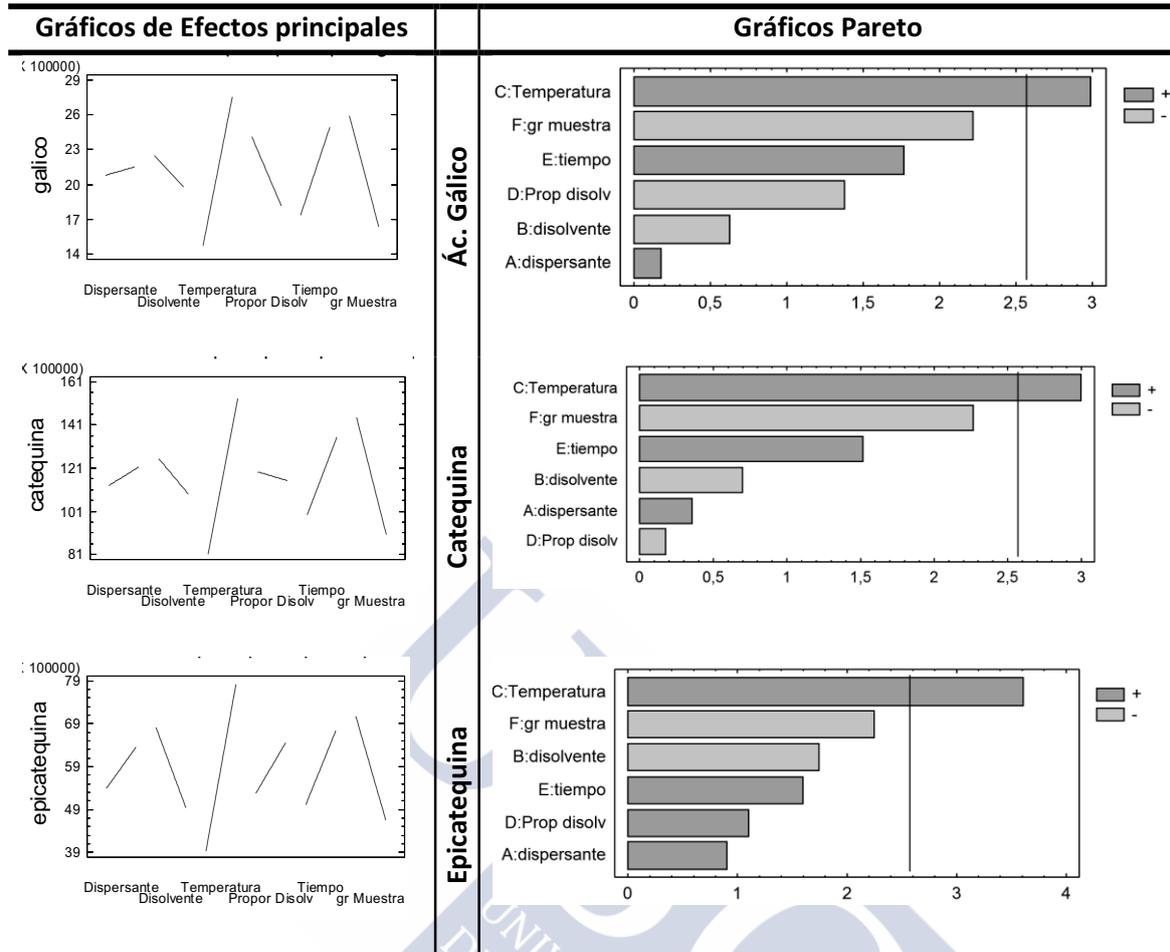


Figura 35 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño de Cribado (PSE) Variables cromatográficas

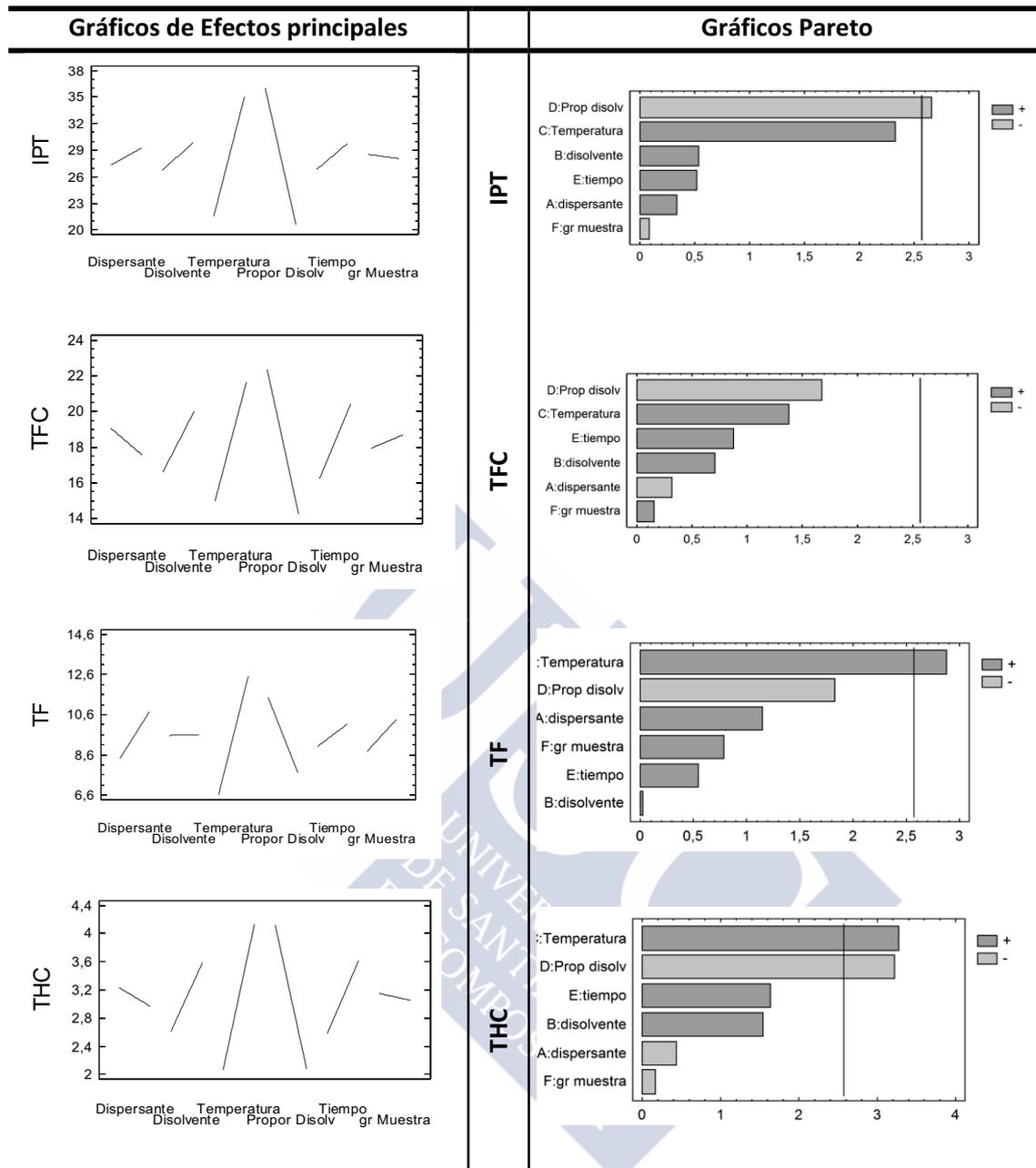


Figura 36 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño de Cribado (PSE) Variables espectrofotométricas

Analizando los datos de significación de la Tabla 36 y los gráficos se llegó a la conclusión de que:

El tipo de dispersante (A), el tipo de disolvente (B) y el tiempo de cada ciclo (E), no producen efectos significativos en la extracción de los polifenoles. Por este motivo se utilizarán sólo 5 minutos para cada ciclo. Siendo la arena y el metanol más económicos, además de la dificultad creciente que tiene la obtención comercial de acetonitrilo, se seleccionarán éstos para las siguientes

pruebas de optimización. Por otro lado el metanol forma parte de la fase móvil en los análisis por HPLC y es por lo tanto un disolvente más compatible.

La cantidad de muestra (F) no resultó ser significativa para ninguna de las variables estudiadas. Dado que para las variables cromatográficas el efecto es que al aumentar los gramos de muestra utilizada disminuye la respuesta, se ha optado por una solución de compromiso con el valor intermedio del parámetro (1 gramo) que se consideró una cantidad adecuada para las pruebas, más manejable y representativa. Una cantidad mayor dificultaría la introducción de la mezcla dispersante-muestra en las celdas. Y una cantidad menor podría no ser representativa.

Las variables más influyentes y significativas que son la temperatura y la proporción de disolvente orgánico, son las que requieren un ajuste fino en la búsqueda de sus óptimos, mediante un diseño experimental de tipo “Superficie de Respuesta”, explicado a continuación.

IV.2.2.2. Superficie de Respuesta

Se llevó a cabo un diseño experimental de tipo “Superficie de Respuesta” con las dos variables continuas más influyentes: la proporción de disolvente orgánico en la mezcla de elución y la temperatura. En el apartado III.10.3.5, están detalladas las características del diseño.

La temperatura es un parámetro importante que, en general, favorece las extracciones por PSE. Sin embargo, el uso de temperaturas demasiado altas también puede conllevar una serie de problemas relacionados con la pérdida de selectividad, y/o la degradación de determinados compuestos. Según Palma et al.¹²¹ una extracción con temperaturas altas mejora la recuperación de los polifenoles, pero si la temperatura es demasiado alta (150 °C) provoca la degradación de algunos de ellos, como es el caso de la catequina y la epicatequina. De manera que el factor temperatura se evaluó a 3 niveles: 60, 90 y 120°C.

La elección de la proporción de disolvente orgánico en la mezcla extractiva es otro aspecto fundamental en el desarrollo de los métodos de extracción. Este factor se estudió aquí a 3 niveles: 10, 50 y 90% metanol.

En la Tabla 37 se resumen los valores de F y de p generados por la evaluación de este diseño para las variables consideradas en el estudio.

Tabla 37. Valores de F y p obtenidos mediante ANOVA para los 2 factores analizados (PSE) (se han resaltado con un asterisco los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%).

	FACTORES			
	% Disolvente		Temperatura (°C)	
	F	p	F	p
Ácido gálico	10,86	0,03*	2,4	0,20
Catequina	0,03	0,87	13,74	0,021*
Epicatequina	1,39	0,30	2,16	0,216
IPT	0	0,96	30,76	0,005*
TF	0,01	0,93	50,9	0,002*
TFC	2,18	0,21	56,86	0,002*
THC	0,19	0,69	3,62	0,13

Ninguna de las interacciones entre los factores fue significativa, por ello no se describen en la tabla anterior. Hay que resaltar la significación de la interacción del factor “% de disolvente” (A) consigo mismo (Figuras 37 y 38). Esta interacción se produce por el comportamiento cuadrático del factor. En los efectos principales se ve gráficamente ese comportamiento en forma de parábola. Así el máximo del factor no se produce en los extremos analizados sino que está en algún valor intermedio.

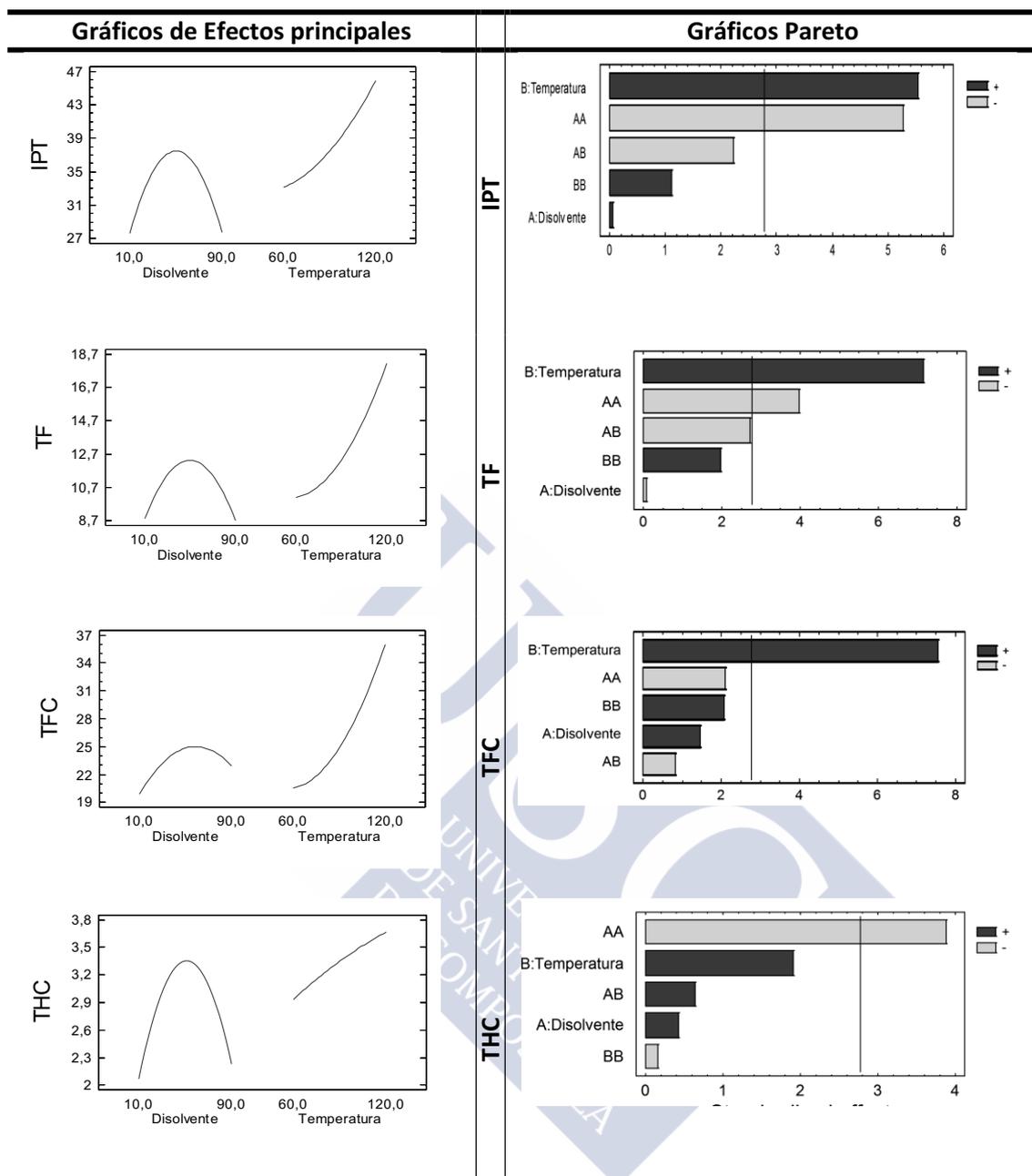


Figura 37 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño "Superficie de Respuesta" (PSE) Variables espectrofotométricas

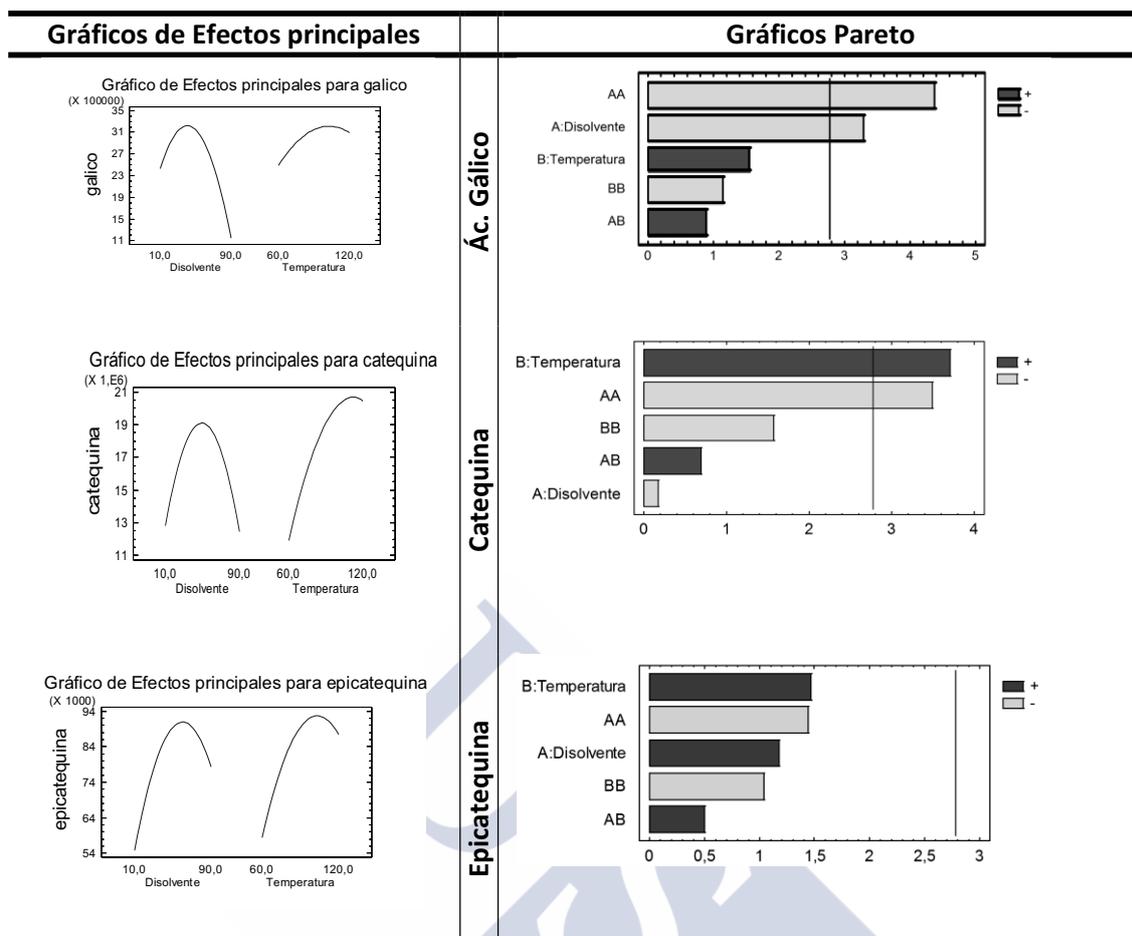


Figura 38 Gráficos de efectos principales y Pareto del diseño “Superficie de Respuesta” (PSE) Variables cromatográficas

Como el objetivo de este diseño era la optimización de los parámetros seleccionados para la extracción de polifenoles, sobre la base de distintas variables de respuesta, se llevó a cabo, en primer lugar, una “optimización de respuesta múltiple”. Teniendo en cuenta los 4 índices espectrofotométricos, los valores óptimos obtenidos fueron una temperatura de 120°C y un 47% de metanol. Así, si lo que se pretende es obtener un extracto útil para la evaluación de las distintas familias de polifenoles exploradas, o bien, para la determinación de polifenoles totales espectrofotométricamente (IPT) estas son las condiciones idóneas.

Por otro lado, al estudiar las gráficas de efectos principales para los polifenoles identificados (ácido gálico, catequina y epicatequina), se observa una disminución de la concentración extraída cuando sobrepasamos una

determinada temperatura (factor cuadrático), comportamiento ya observado por Palma et al.¹²¹; por ello hemos decidido optimizar la respuesta teniendo en cuenta sólo la concentración de estos tres polifenoles identificados, pues serán los componentes mayoritarios en los extractos obtenidos y además los de mayor actividad biológica (antibacteriana, antioxidante y antifúngica). En este caso los valores óptimos calculados fueron los siguientes:

-Temperatura: 105°C

- % Metanol: 63%

En la siguiente tabla (Tabla 38) se resumen tanto los valores de las diferentes variables utilizadas en PSE para los experimentos preliminares y los diseños experimentales, como los valores optimizados utilizados para la extracción de las muestras.

Tabla 38. Resumen de los valores de los factores optimizadas en las extracciones por PSE

	Experimentos preliminares	DISEÑO		Condiciones óptimas
		Cribado	Superficie de Respuesta	
Temperatura (°C)	80	60 - 110	60 - 120	105
Presión (psi)	1500			
Número Ciclos	1 - 5	2	2	2
Tiempo (min)/Ciclo extracción	5	5-15	5	5
Volumen de lavado	60%			
Tiempo de purga	100 segundos			
Dispersante	C18	C18/Arena	Arena	Arena
Gramos muestra	1	0,5 - 2	1	1
Disolvente extracción	Metanol	ACN o Metanol	Metanol	Metanol
Proporción disolvente extracción (%)	80	30 - 90	10 - 90	63
Disolvente limpieza	n-Hexano:Acetona (1:1)	-	-	-
Ciclos limpieza	1	-	-	-

IV.2.3. Parámetros analíticos de calidad del método

Se estimaron los parámetros de calidad con el objetivo de verificar que el método de PSE optimizado es adecuado para la determinación cuantitativa de polifenoles. Los datos obtenidos están resumidos en los siguientes apartados.

IV.2.4. Cálculo de las recuperaciones

Se calculó la recuperación de los polifenoles identificados en los extractos de bagazo. Para ello se introdujeron 5 gramos de bagazo molido en un vaso de precipitados, a continuación se realizó una adición de 10 mL de una mezcla de patrones del triple de concentración que presenta la muestra, en acetona, para facilitar la evaporación del disolvente. Se mantuvo en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente el tiempo necesario para la completa eliminación del disolvente (20min aproximadamente) bajo una corriente de nitrógeno. A continuación se realizó la extracción del bagazo utilizando los parámetros optimizados del método de PSE; se evaporó (sólo en el caso de inyectarlo mediante HPLC-DAD), se filtró mediante filtros de 0,22 μm y se analizó mediante HPLC-DAD y por LC-MS/MS de igual forma que para las demás muestras, como se describe en el apartado III.6.2 y en el apartado III.6.3.2 de la parte experimental. Por último se cuantificaron las concentraciones de los polifenoles añadidos. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Paralelamente se realizó un blanco del proceso realizando la misma operación pero sin adicionar la mezcla de patrones, para poder restar la cantidad de polifenoles que ya contiene de por sí el bagazo utilizado.

Los valores de recuperación se pueden ver en la Tabla 39 para los 3 polifenoles identificados inicialmente, y en la Tabla 40, las recuperaciones de todos los polifenoles identificados por LC-MS/MS. Como se aprecia en las tablas, todas ellas son cuantitativas.

IV.2.4.1. Linealidad, precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método

Los LODs y LOQs, en este trabajo se han calculado como la concentración correspondiente a una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. Estos límites se estimaron considerando los cromatogramas obtenidos para los

niveles de concentración más bajos de los patrones, en los que el ruido de fondo se calculó integrando picos de ruido en zonas de los cromatogramas próximas a cada uno de los picos de los analitos estudiados y promediando después las áreas obtenidas para esos picos de ruido. A continuación se comentan los resultados obtenidos a partir de las medidas mediante HPLC-DAD y LC-MS/MS.

HPLC-DAD:

La linealidad en la respuesta se comprobó para los 3 analitos identificados, obteniéndose coeficientes de correlación (R^2) por encima de 0,996. También se calculó para cada uno de los índices, siendo superior a 0,995.

La precisión del método se evaluó en un mismo día (repetibilidad) y entre varios días (reproducibilidad). Para los índices espectrofotométricos los valores no sobrepasaron el 8% de CV y para los polifenoles identificados sus valores fueron ≤ 18 % de CV.

En la Tabla 39 también se recogen los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) para el método propuesto.

Tabla 39. Recuperación, linealidad, precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto (cuantificación por HPLC-DAD).

	Recuperación %	Linealidad R^2	CV (%)		LOD mg/L	LOQ $\mu\text{g/L}$
			Reproducibilidad n=3	Repetibilidad n=3		
Ác. Gálico	95	0,9978	2	8	0,1	0,5
Catequina	83	0,9988	18	15	0,5	1,6
Epicatequina	102	0,9961	5	17	0,9	3
IPT	-	0,9982	4	6	-	-
TFC	-	0,9950	7	8	-	-
TFC	-	0,9991	4	5	-	-
THC	-	0,9968	5	5	-	-

LC-MS/MS:

En la etapa posterior donde se analizaron las muestras por LC-MS-MS se llevó a cabo el estudio de la recuperación del resto de los analitos y se calcularon los parámetros de calidad del método (Tabla 40).

Tabla 40 Recuperación, precisión y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto (cuantificación por LC-MS/MS).

	Recuperación %	CV (%)		LOD µg/L	LOQ µg/L
		Reproducibilidad n=3	Repetibilidad n=3		
Ác. Gálico	96	5	4	1,50	4,90
Ác. Protocatéquico	119	7	3	1,03	3,24
Ác. Caftárico	100	15	15	0,51	1,80
Catequina	91	3	2	0,22	0,74
Epicatequina	103	17	7	0,10	0,42
Epi-galato	85	15	16	0,15	0,49
PB1	101	4	5	0,30	1,03
PB2	103	4	6	0,26	0,88
Q-3-glucurónido	93	12	9	0,54	1,82
Q-3-glucósido	95	13	15	0,26	0,87
Q-3-rutinósido	95	9	10	0,20	0,64
Quercetina	49	13	12	2,87	9,56

IV.3. Optimización del proceso de extracción por MSPD

Como ya se ha comentado en el apartado II.13.1, existen varios parámetros que afectan a la extracción mediante MSPD, como pueden ser el disolvente de extracción y el tipo de dispersante. En los siguientes apartados se detallan los resultados obtenidos en la optimización del proceso de extracción por MSPD de los polifenoles del bagazo de uva. Para estas pruebas se utilizó el bagazo albariño de una bodega del Salnés (AL12-e).

IV.3.1. Elección del dispersante

Para llevar a cabo la elección del dispersante en el proceso de extracción mediante MSPD, se estudiaron 5 tipos de dispersantes: arena, florisil, C₁₈, alúmina y sílica gel. El protocolo utilizado en la extracción está detallado en el apartado III.10.4.2. En la Figura 39 se resumen los resultados obtenidos en

estas pruebas, y como se puede ver, tanto la arena como la sílica gel generaron los mejores resultados. Las diferencias entre estos dispersantes no fueron significativas ($P_{0.05} = 0,2347$). Finalmente se optó por utilizar arena como dispersante para las siguientes pruebas ya que su coste es mucho menor que el de sílica gel.

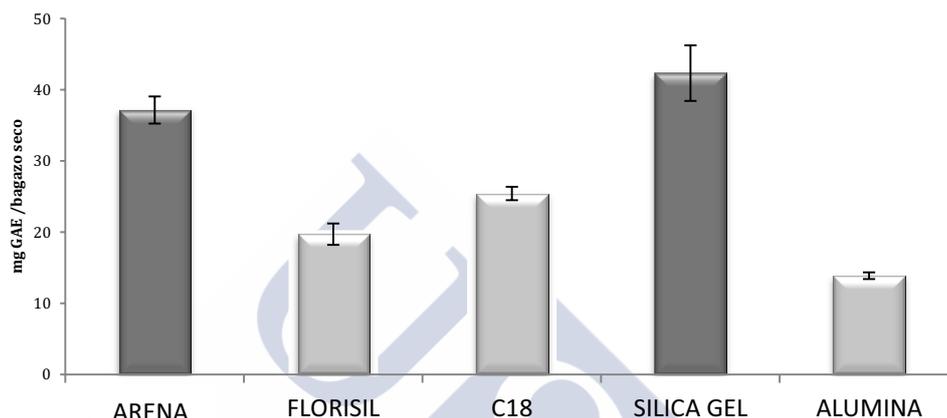


Figura 39 Comparación de los diferentes dispersantes en la extracción de polifenoles de bagazo mediante MSPD

IV.3.2. Elección del disolvente

Una vez seleccionado el dispersante, se hicieron las pruebas para preseleccionar el disolvente de extracción más adecuado. Normalmente, para extraer compuestos polifenólicos se utilizan mezclas hidro-alcohólicas en proporciones diferentes, acidificadas o no ^{67,83,117}. Por este motivo se optó por estudiar diferentes mezclas de metanol y agua, además del etanol y el acetato de etilo, como eluyentes de extracción. Los detalles del protocolo utilizado en estas pruebas están recogidos en el apartado III.10.4.3.

En la Figura 40 se resumen los resultados obtenidos que permiten descartar claramente el acetato de etilo. Utilizando la mezcla metanol-agua a pH 1 se obtienen los mejores resultados, aunque se observan diferencias en función del porcentaje de disolvente orgánico en la mezcla extractante. Por lo tanto se decidió utilizar metanol como disolvente orgánico y optimizar su %

en la mezcla mediante un diseño del tipo Superficie de Respuesta. Los detalles de este proceso de extracción están en el siguiente apartado.

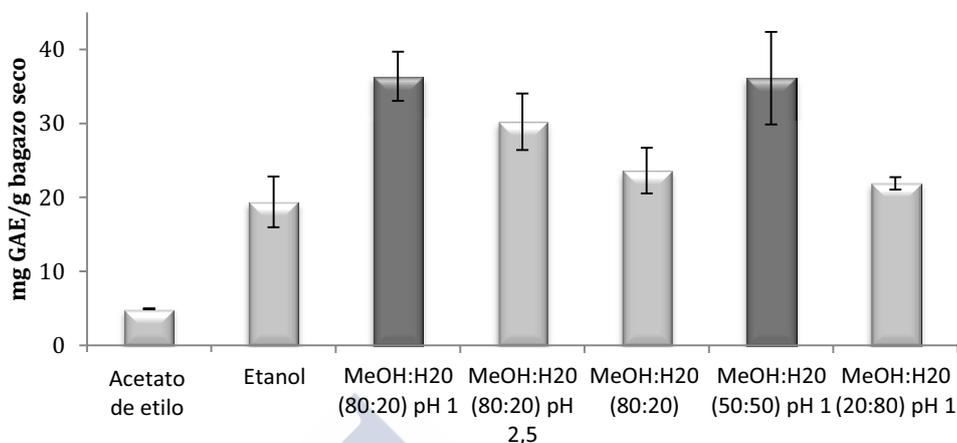


Figura 40 Comparación de los diferentes disolventes en la extracción de polifenoles de bagazo mediante MSPD

IV.3.3. Optimización final de las condiciones de extracción

Con los resultados obtenidos en los apartados anteriores se determinaron algunos de los parámetros para la realización de la MSPD, pero también quedó patente que para otros parámetros, como el volumen de elución o el % de metanol en el disolvente de extracción, son necesarios más datos para establecer los valores óptimos

Por este motivo, se llevó a cabo un diseño estadístico del tipo Superficie de Respuesta cuyas características más importantes están detalladas en el apartado III.10.4.4.

En la Tabla 41 se resumen los resultados del ANOVA. Como se puede observar el porcentaje de metanol es el factor que más afecta a la eficiencia de la extracción. Este factor presenta diferencias significativas en cada una de las variables dependientes ($p < 0,05$). Por otro lado ni las interacciones entre los dos factores ni el volumen de elución presentan en ningún caso diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla 41 Resultados del ANOVA en la optimización de la extracción por MSPD de los polifenoles del bagazo. (Se han resaltado con un asterisco los efectos significativos para un nivel de confianza del 95%)

Variables	Factores				Interacciones	
	A: MeOH (%)		B: Volumen (mL)		AB	
	F	p	F	p	F	p
IPT	164.00	0.0002*	5.06	0.0877	2.37	0.1982
TF	66.36	0.0012*	0.08	0.7860	0.83	0.4129
THC	69.32	0.0011*	0.93	0.3902	0.20	0.6807
TFC	12.35	0.0246*	0.01	0.9255	0.19	0.6886

Para elegir los valores óptimos de cada factor, se observaron los gráficos de efectos principales (Figura 41).

Con respecto al primer factor (el porcentaje de metanol en la mezcla eluyente): su efecto fue positivo para todas las variables, es decir, cuanto mayor porcentaje de metanol, mayor es el valor de cada variable dependiente. Por ello se eligió 80% como porcentaje óptimo para el disolvente. No se llevó el porcentaje de metanol hasta el 100% porque la ausencia de agua en la mezcla extractante provocaría una baja recuperación de los compuestos polifenólicos más polares.

Por otra parte, el volumen de elución no fue significativo en ningún caso, por este motivo se eligió el valor intermedio de 15 mL, que garantiza disponer de un volumen suficiente para todas las determinaciones analíticas.

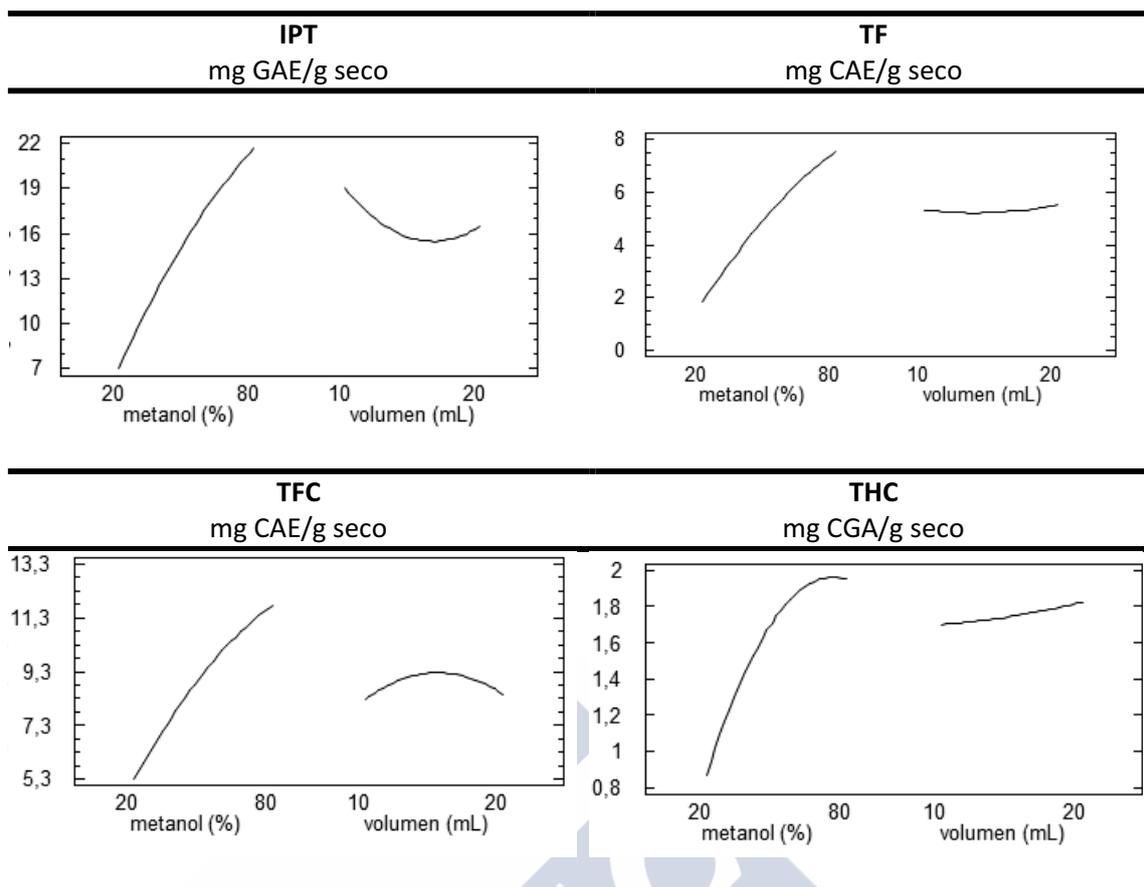


Figura 41 Gráficas de efectos principales para IPT, TF, TFC y THC en la optimización de la extracción por MSPD

A partir del diseño y las pruebas preliminares se concluye que los valores óptimos de los parámetros para realizar la extracción mediante MSPD son: arena como dispersante, MeOH:H₂O (80:20) a pH=1 como disolvente de extracción y un volumen de elución de 15 mL (Tabla 42).

Tabla 42 Características del método de MSPD optimizado

Peso de bagazo	1 g
Dispersante	arena(2 g)
Disolvente	MeOH:H ₂ O (80:20) pH 1
Volumen disolvente	15 mL

IV.3.4. Estudio de la precisión de la MSPD

Se llevaron a cabo extracciones (n=3) en un mismo día y extracciones en tres días diferentes, utilizando los parámetros optimizados, para calcular la repetibilidad y reproducibilidad de la MSPD, obteniéndose en ambos casos valores del CV ≤10 (ver Tabla 43)

Tabla 43 Parámetros de validación del método de MSPD

	Repetibilidad	Reproducibilidad
	(n=3)	(n=3)
	CV (%)	CV (%)
IPT	6	7
TF	9	9
THC	10	10
TFC	4	4

IV.3.5. Conclusiones

La finalidad del método de MSPD propuesto para la extracción de polifenoles del bagazo de la uva blanca, era conseguir una metodología que pudiera ser aplicada fácilmente en cualquier laboratorio de análisis ubicado en la propia bodega. El método propuesto no necesita reactivos caros y sólo requiere de un espectrofotómetro, el cual está disponible en cualquier laboratorio o es de fácil adquisición.

Por otra parte, este método permite a los técnicos de las bodegas evaluar los resultados de cualquier experimento, basado en una determinación de índices espectrofotométricos a partir de extractos obtenidos rápidamente (15 minutos de media) y de una forma muy económica (0,3 € por extracto).

IV.4. Estudio comparativo de diferentes sistemas de conducción utilizando diferentes métodos de extracción (MSPD y PSE)

Diversos estudios, muestran cómo las diferencias en las prácticas enológicas y los diferentes sistemas de conducción de la vid, influyen en el contenido final de compuestos polifenólicos y compuestos volátiles y en otros aspectos relacionados con la propia planta como el número de racimos y el peso de las uvas. Estas diferencias se encuentran tanto en la uva como en el vino resultante¹⁵¹. Autores como Fragasso et al.¹⁵² han demostrado la influencia que tiene el sistema de conducción de la vid en las características de

compuestos volátiles encontrados en la uva. Coletta et al.¹⁵³ también encontraron diferencias en la uva tinta cultivada en dos diferentes sistemas de conducción: espaldera con la poda Guyot y espaldera con la poda doble Guyot. Estas diferencias fueron en el IPT, flavonoles totales, número de racimos y peso del racimo; en todos los casos el doble Guyot obtuvo los valores más elevados. Por otro lado no observaron diferencias significativas en las antocianinas totales.

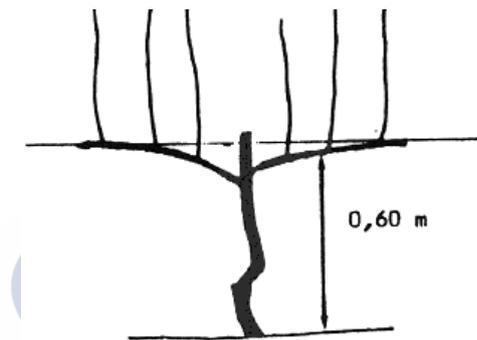


Figura 42 Sistema de conducción de tipo Espaldera con doble Guyot

Estas diferencias también se encuentran en el vino; autores como Pérez-Lamela et al.¹⁵⁴; estudiando diferentes variedades de vino tinto resultantes de vides que fueron sometidas a 4 sistemas de conducción diferentes, y pudieron comprobar, entre otras cosas, que la elección del sistema de conducción óptimo, depende entre otros, de factores como la variedad de uva. Así, los valores de IPT sólo fueron significativamente diferentes para determinadas variedades.

Con el objetivo de estudiar las posibles diferencias que se puedan producir en la uva, a causa de la aplicación de un determinado sistema de conducción de la vid, se ha llevado a cabo un estudio comparativo aplicando los métodos diferentes desarrollados previamente basados en PSE y MSPD, para la extracción de los compuestos polifenólicos. Las características de estos métodos se pueden ver en los apartados IV.2 y IV.3.5, respectivamente.

Para estas pruebas se utilizaron muestras de bagazo de uva de la variedad albariño de la cosecha del 2010, proporcionada por una bodega del Salnés, que

fueron cultivadas mediante 5 tipos de conducción diferentes: Parra (P), Arqueado (A), Scott-Henry (SH), Geneva double curtain (GDC) y Espaldera (E). Las características de cada uno de estos sistemas de conducción están detalladas en la introducción en el apartado II.9.2., los resultados obtenidos fueron evaluados mediante ANOVA.

IV.4.1. Estudio llevado a cabo mediante MSPD

Los valores promedios de las medidas de cada variable están recogidos en la Tabla 44. Los valores de F y p correspondientes, indican que los diferentes sistemas de conducción afectan significativamente al contenido de polifenoles totales y a cada una de las familias de compuestos analizadas ($p < 0,05$) (Tabla 45).

Tabla 44 Valores promedio de IPT, TF, TFC y THC en el estudio comparativo de sistemas de conducción de la vid

	IPT	TF	TFC	THC
Arqueado	27,2 ± 2,7	9,89 ± 1,90	15,6 ± 2,6	2,53 ± 0,20
GDC	28,6 ± 1,1	8,47 ± 1,21	18,4 ± 1,5	2,66 ± 0,14
S.H.	30,7 ± 2,6	9,40 ± 1,47	18,1 ± 1,2	2,66 ± 0,02
Espaldera	25,2 ± 0,3	7,83 ± 0,93	12,5 ± 0,7	2,37 ± 0,03
Parra	22,7 ± 1,3	6,56 ± 0,61	12,3 ± 0,3	1,94 ± 0,11

IPT: (mg GAE/g bagazo seco)

TF; TFC: (mg catequina/g bagazo seco)

THC: (mg ácido clorogénico/g bagazo seco)

Tabla 45 Resultados del ANOVA en el estudio de comparación de sistemas de conducción de la vid

Índice	Tipo de conducción	
	F	p
IPT	10,56	0,0003
TF	3,51	0,0327
TFC	15,61	0,0000
THC	34,11	0,0000

A continuación, se muestran los gráficos de medias para cada índice y se utilizó, para una mejor interpretación, el contraste múltiple de rangos para

conocer los grupos homogéneos existentes (distintas letras corresponden a diferencias significativas con un 95% de confianza) (Figura 43).

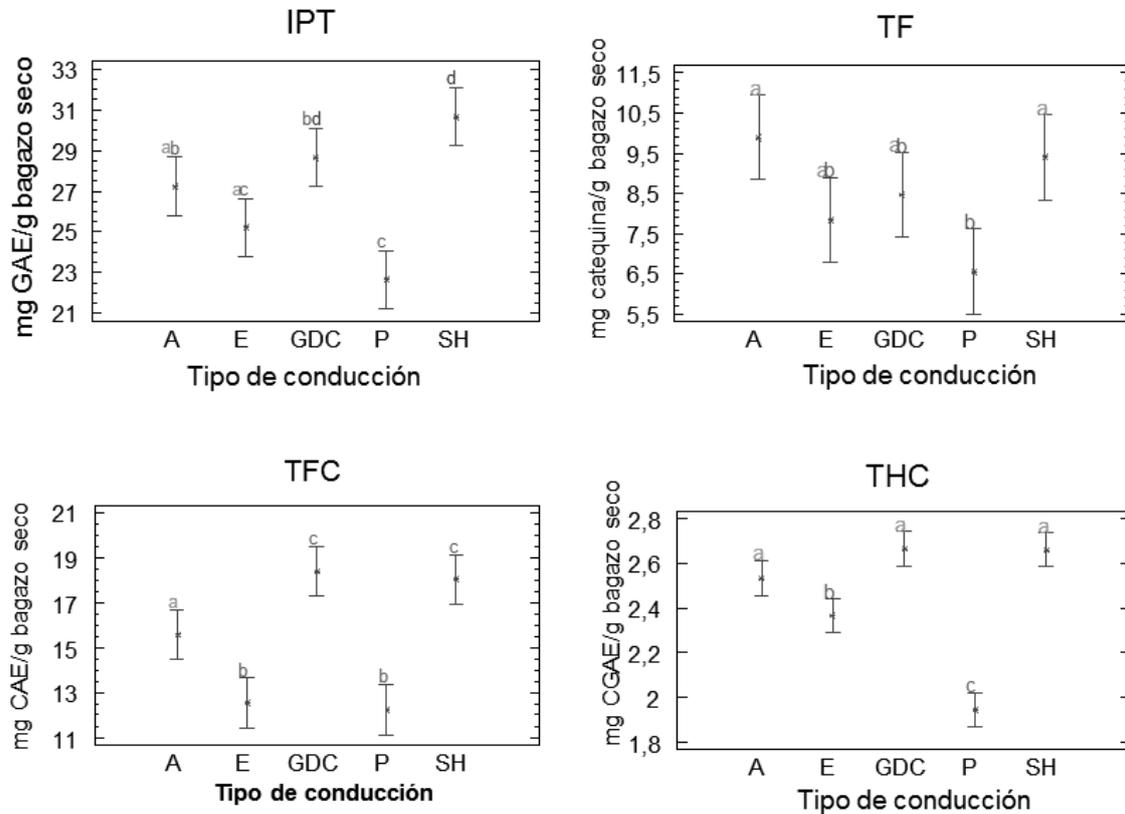


Figura 43 Gráficos de medias y grupos homogéneos de los sistemas de conducción (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double curtain; P: parra; SH: Scott Henry)

Se observa que, para todos los parámetros evaluados, las técnicas de conducción que se relacionan con valores más elevados de los mismos son Arqueado, GDC y SH.

En el caso del índice de polifenoles totales (IPT) y de los flavonoides totales (TFC), las técnicas GDC y SH generan los valores más elevados, y dichas técnicas se encuentran en el grupo que presenta los mayores resultados tanto para TF como para THC.

La técnica de conducción que en general presenta los menores valores para todos los casos es la Parra (P), seguida de Espaldera (E). El sistema Arqueado (A) presenta unos valores medios-altos para IPT y flavanoles (TFC),

y del mismo orden que GDC y SH para flavonoides (TF) e hidroxycinamatos totales (THC).

IV.4.2. Estudio llevado a cabo mediante PSE

En la Tabla 46 y en las Figuras 44 y 45 se presentan las medias de las variables estudiadas. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante ANOVA y los valores de F y p obtenidos, indican que los diferentes sistemas de conducción afectan al contenido de polifenoles totales, a la AA y a cada uno de los polifenoles individuales estudiados ($p < 0,05$).

En la tabla de medias (Tabla 46) están representados además, mediante letras, los grupos homogéneos (distintas letras corresponden a diferencias significativas con un 95% de confianza).

Tabla 46 Valores promedio de las variables medidas en función de los diferentes sistemas de conducción de la vid

	Arqueado	Espaldera	GDC	Parra	SH
IPT	41,4 ^d ± 1,2	44,5 ^c ± 1,4	61,2 ^a ± 2,8	37,0 ^e ± 3,2	49,5 ^b ± 2,3
AA	0,41 ^b ± 0,03	0,32 ^b ± 0,02	0,43 ^a ± 0,01	0,31 ^b ± 0,02	0,42 ^b ± 0,02
Ác. Gálico	68,3 ^c ± 4,1	89,5 ^b ± 5	97,6 ^a ± 8	73,1 ^c ± 6	71,2 ^c ± 3,9
Ác. Caftárico	13,1 ^b ± 1,3	11,6 ^b ± 2	19,6 ^a ± 2	12,4 ^b ± 1	18,4 ^a ± 1,1
Catequina	3114 ^c ± 175	3706 ^b ± 184	4077 ^a ± 542	3316 ^c ± 223	3184 ^c ± 177
Epicatequina	657 ^b ± 81	1122 ^a ± 38	1122 ^a ± 110	1053 ^a ± 138	627 ^b ± 99
Epi-gal	68,2 ^{bc} ± 3,2	75,2 ^{bc} ± 4	115 ^a ± 23	64,3 ^d ± 6	78,4 ^b ± 6,1
PB1	598 ^a ± 116	307 ^c ± 9	636 ^a ± 76	266,9 ^c ± 12	400 ^b ± 40
PB2	463 ^a ± 85	284 ^c ± 8	355 ^b ± 42	250,4 ^c ± 31	274 ^c ± 15
Ác. Protocatéquico	2,9 ^c ± 0,8	5,2 ^a ± 1,0	4,7 ^{ab} ± 1,1	5,2 ^a ± 1,2	4,1 ^b ± 0,9
Q-3-glucósido	418 ^c ± 52	295 ^d ± 14	1093 ^a ± 73	159,1 ^e ± 28	510 ^b ± 37
Q-3-glucurónido	404 ^c ± 25	359 ^d ± 7	862 ^a ± 27	204,3 ^e ± 27	538 ^b ± 31
Q	595 ^{bc} ± 23	574 ^c ± 19	642 ^a ± 22	578,1 ^c ± 26	602 ^b ± 8
Q-3-rutinósido	61,1 ^c ± 3,2	56,7 ^c ± 5	172 ^a ± 10	22,7 ^d ± 1	98,0 ^b ± 5,2

Unidades: IPT: mg GAE/g seco ; AA: μmol trolox/g seco; polifenoles: $\mu\text{g/g}$ seco
(GDC:geneva double courtain; SH:Scott Henry)

Resultados y discusión. Extracción de polifenoles del bagazo

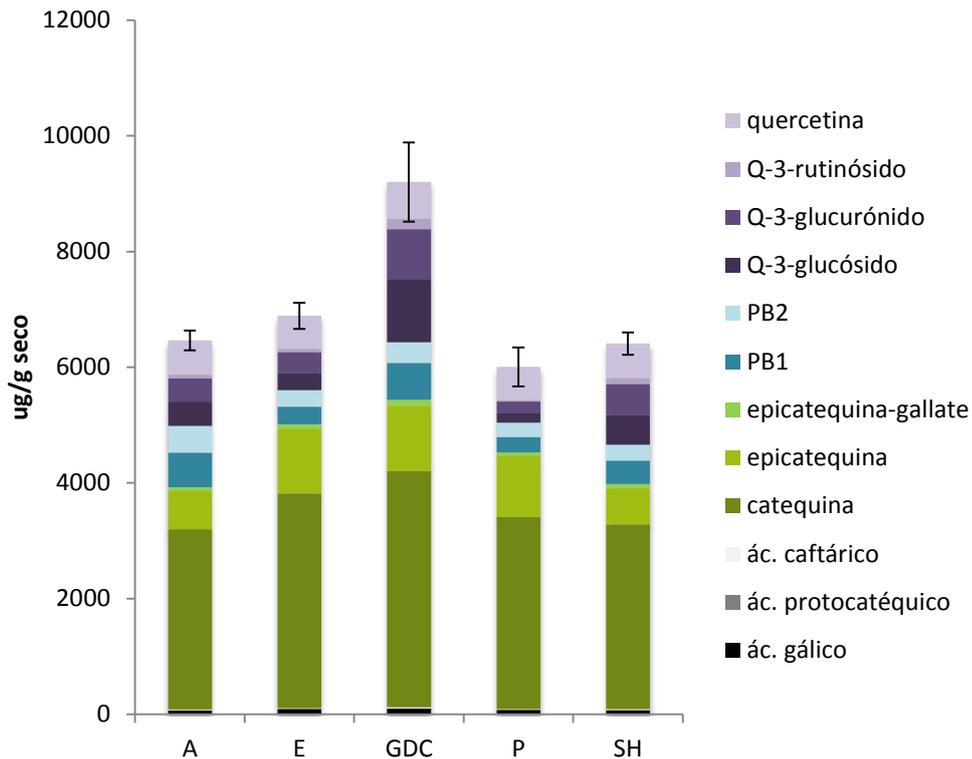


Figura 44 Valores promedio acumulados de los polifenoles en las diferentes técnicas de conducción (A: arqueado; E: espadera; GDC: Geneva double curtain; P: parra; SH: Scott Henry)

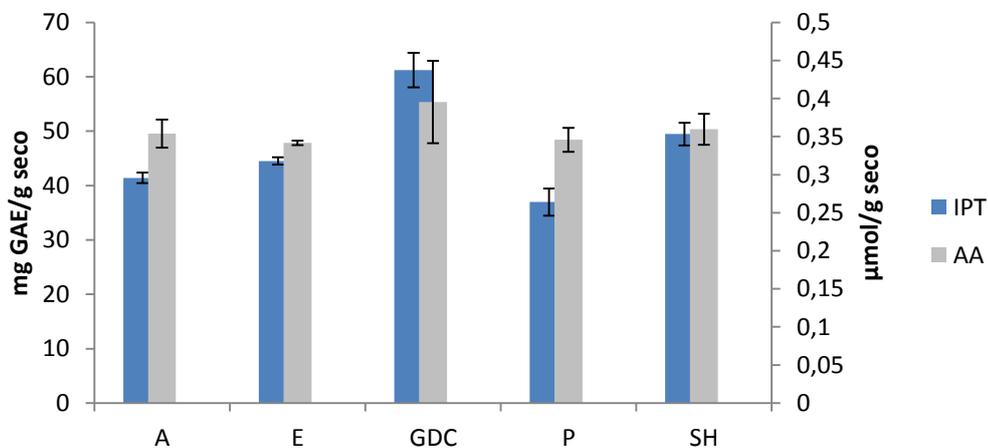


Figura 45 Comparación de IPT y AA en los diferentes sistemas de conducción (A: arqueado; E: espadera; GDC: Geneva double curtain; P: parra; SH: Scott Henry)

El sistema de conducción que, en general, presenta los resultados significativamente mayores es el GDC. Esto sucede para la mayoría de las variables, como el IPT, AA y los cuatro flavanoles (quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido y quercetina). GDC

presenta también ese comportamiento para flavanoles como la catequina y la epicatequina-galato; además de estar en el grupo que presenta los mayores valores de la epicatequina. Además, el sistema GDC presenta los valores significativamente más elevados para el ác. gálico junto con SH; y para los ácidos caftárico y protocatéuico junto con Parra y Espaldera.

Por otra parte, el sistema de Parra es con el que se obtienen los menores resultados, exceptuando como ya se comentó con la epicatequina.

IV.4.3. Comparación entre métodos de extracción

En primer lugar, hay que destacar la diferencia significativa en la eficacia de la extracción de compuestos polifenólicos por los dos métodos. Si comparamos el IPT obtenido en ambos métodos, que nos da el valor de los mg de polifenoles extraídos de la matriz en un gramo de bagazo seco, observamos que el valor es aproximadamente el doble para el método de PSE con respecto al de MSPD. Por lo tanto, en este sentido el método de PSE es más eficaz que el método de MSPD. En principio, esto confirma la hipótesis de partida, puesto que la eficacia extractiva a altas temperaturas y presiones es, a priori, mucho mayor que a temperatura ambiente y presión atmosférica, manteniendo el resto de las condiciones experimentales equivalentes.

La conclusión a la que se llega por ambos métodos es similar; aunque con matices: mediante el método de MSPD se concluye que no existen diferencias significativas entre el sistema de conducción GDC y SH, en cambio con los datos obtenidos con el método de PSE, no hay ninguna duda de que con el sistema GDC se obtienen los valores más elevados de prácticamente todas las variables.

Por otra parte, la finalidad del método desarrollado por MSPD era conseguir el método más económico y sencillo de aplicar en un laboratorio de bodega. En este sentido, el método MSPD resulta más conveniente que el de PSE, debido a que MSPD es una técnica mucho más barata, pues no es necesario un equipo tan sofisticado.

IV.4.4. Influencia de las distintas técnicas de conducción sobre el vino

Para completar este estudio sobre la influencia de los diferentes sistemas de conducción de la vid sobre la composición polifenólica, se han estudiado también los perfiles polifenólicos y las AA de cada vino resultante de la vinificación de las uvas estudiadas en el apartado anterior. Para ello el vino se vinificó exactamente de la misma forma en los 5 casos, minimizando así la variabilidad resultante de las prácticas enológicas en el contenido final del vino. Estas vinificaciones se realizaron en el laboratorio de la bodega colaboradora (en este caso, del Salnés) con los mismos criterios enotécnicos de las vinificaciones habituales llevadas a cabo en la misma.

En la Tabla 47, se pueden ver los resultados del análisis de los diferentes vinos y los grupos homogéneos (diferentes letras implican diferencias significativas). Como se aprecia especialmente en la Figura 46, el sistema GDC es la técnica de conducción que proporciona vinos con los mayores valores para la mayoría de los parámetros estudiados, sobre todo para los flavonoles y procianidinas. Por otra parte estos vinos presentan la concentración más baja de ác. cafeico.

Tabla 47 Valores promedio de las variables para los diferentes sistemas de conducción de la vid en vino

	Arqueado		Espaldera		GDC		Parra		SH	
IPT	829 ^b	± 7	730 ^a	± 7	773 ^{ab}	± 13	760 ^{ab}	± 9	661 ^c	± 18
AA	223 ^a	± 5	236 ^c	± 6	232 ^b	± 7	231 ^b	± 4	208 ^d	± 4
Ác. gálico	2778 ^a	± 133	1629 ^c	± 110	2463 ^b	± 111	1880 ^c	± 76	2647 ^{ab}	± 312
Ác. caftárico	31291 ^b	± 565	23906 ^e	± 655	35854 ^a	± 621	26265 ^c	± 629	35118 ^a	± 993
Ác. cafeico	2108 ^b	± 69	2068 ^b	± 23	1940 ^c	± 51	1881 ^c	± 15	2611 ^a	± 76
Catequina	3832 ^a	± 104	2115 ^c	± 42	3888 ^a	± 73	2799 ^b	± 183	3779 ^a	± 293
Epicatequina	2138 ^a	± 74	1614 ^b	± 118	2103 ^a	± 165	2152 ^a	± 86	1767 ^b	± 49
PB1	2993 ^b	± 182	2018 ^d	± 86	3834 ^a	± 124	3764 ^a	± 69	2455 ^c	± 86
PB2	1056 ^b	± 23	798 ^c	± 45	1178 ^a	± 101	1241 ^a	± 54	961 ^b	± 53
Ác. Protocaté	321 ^b	± 12	202 ^d	± 7	254 ^c	± 2	207 ^d	± 4	352 ^a	± 17

Unidades: IPT: mg GAE/L; AA: μ mol trolox; polifenoles: μ g/L
(GDC:geneva double courtain; SH:Scott Henry)

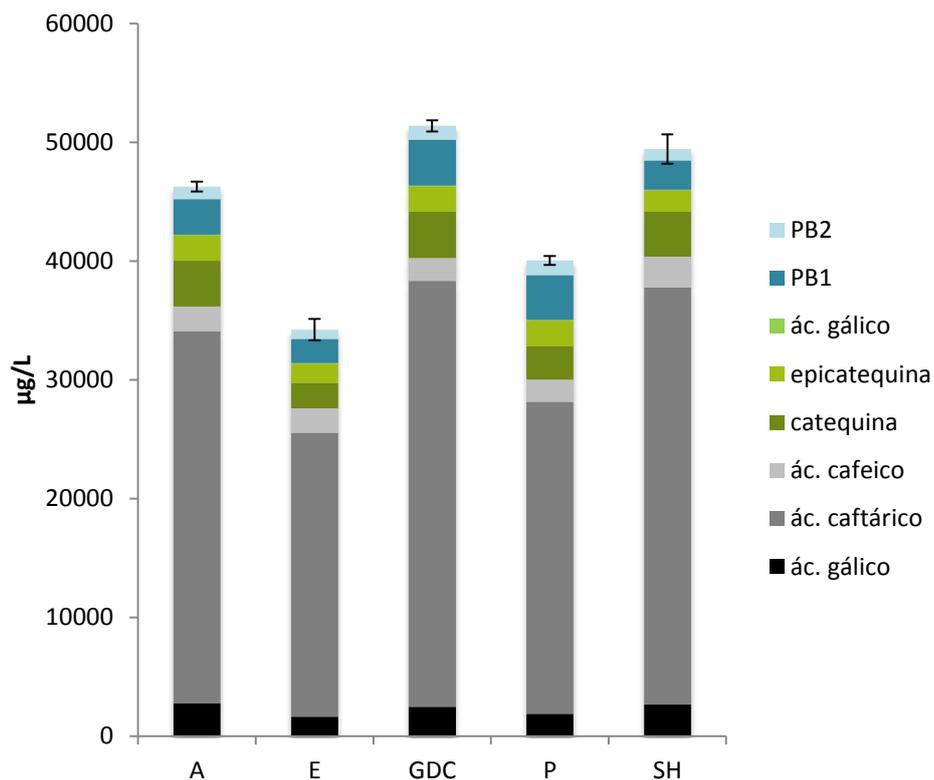


Figura 46 Valores promedio acumulados de los polifenoles en vinos en las diferentes técnicas de conducción (A: arqueado; E: espaldera; GDC: Geneva double curtain; P: parra; SH: Scott Henry)

La Espaldera es el sistema de conducción que, en general, da lugar a vinos con las concentraciones más bajas de los compuestos individuales; pero en cambio, pertenece al grupo que presenta los mayores valores de IPT, junto con GDC y parra (Figura 47).

Si nos fijamos en la AA, el sistema de conducción Arqueado es el que origina vinos con mayor AA y por el contrario, SH es el sistema que proporciona el dato de AA más bajo.

Resultados y discusión. Extracción de polifenoles del bagazo

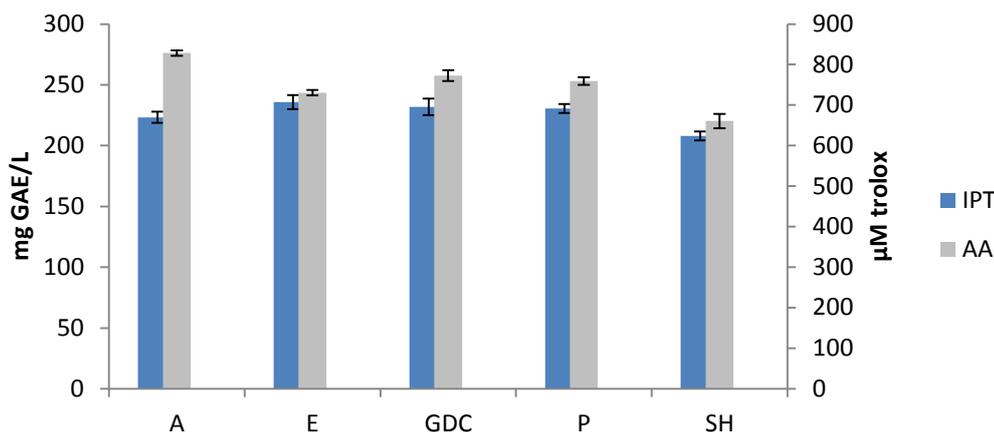


Figura 47 Comparación de IPT y AA en función de los diferentes sistemas de conducción en vino (A: arqueado; E: espadera; GDC: Geneva double curtain; P: parra; SH: Scott Henry)

Si comparamos los resultados obtenidos en bagazo y en vino, vemos que en ambos casos el sistema GDC presenta, en general, los mayores valores de polifenoles. Probablemente por la mayor carga polifenólica conseguida en la uva de partida. Para el resto de los sistemas no hay un comportamiento similar en uva y vino. Mientras que en bagazo el sistema de parra presenta los menores resultados para la mayoría de los compuestos, en vino por el contrario es espaldera, si bien las diferencias en este caso son menos notables.

IV.5. Bagazo de variedades autóctonas

En los siguientes apartados se analizarán los bagazos de las 7 variedades gallegas a estudio; albariño, godello, treixadura, caíño blanco, loureiro, torrontés y blanca lexítima. Se han utilizado 100 muestras de bagazo en total (Tabla 16). La variedad albariño como representación de la D.O. Rías Baixas. La variedad godello como representación de las denominaciones de origen, Valdeorras, Monterrei y Ribeira Sacra ya que es la variedad blanca más cultivada en esas zonas. La variedad treixadura como representante de la denominación de origen Ribeiro. También se han incluido muestras de las variedades caíño blanco y loureiro de la D.O. Rías Baixas y se eligieron por ser variedades autóctonas muy apreciadas, y que se utilizan normalmente para la obtención de vinos multivarietales, mezclándolos en pequeñas proporciones.

Si bien, hay dos bodegas concretas que obtienen monovarietales de caíño blanco y loureiro. Por último, las variedades tarrantés y blanca lexítima no se han incluido en el siguiente estudio de la influencia del año de la cosecha debido a que no se consiguieron muestras representativas en los tres años de cosecha evaluados.

IV.5.1. Estudio de la influencia del factor “Año de cosecha”

Para este análisis se llevó a cabo ANOVA de un factor (para un nivel de confianza del 95%), utilizando como tal el “año de la cosecha”.

El estudio abarca 3 cosechas; 2010, 2011 y 2012. Para poder comparar los datos obtenidos hay que tener en cuenta la variabilidad propia de estos tres años, muy diferentes en cuanto a su climatología.

En general la cosecha de 2012 resultó tener una concentración significativamente mayor ($p < 0,05$) que las de 2011 y 2010, tanto para la suma de los polifenoles individuales identificados y cuantificados como para la AA.

Pero por el contrario no hay diferencias significativas según el parámetro espectrofotométrico IPT ($p > 0,05$) en las tres cosechas. Este hecho puede ser debido a que la suma de polifenoles que no estamos analizando individualmente disminuyó en el año 2012, por lo tanto la suma total a la que se refiere el IPT no varió significativamente.

En cambio la AA aumentó significativamente en el 2012, debido a que la suma de estos polifenoles no analizados individualmente no presenta una AA remarcable que pudiera influir significativamente en este valor.

Además de otros, uno de los factores determinantes en la variación de la cosecha del 2012 con respecto a las anteriores en la concentración de polifenoles, fue la gran diferencia en la producción de uva que hubo en el año 2012 (Figura 48), con respecto a 2010 y 2011. En este año se produjo menos de la mitad de uva que el año 2011, y cerca de la mitad si lo comparamos con el año del 2010¹⁵⁵.

Estas diferencias en las cosechas, sobre todo la cosecha del año 2012, puede tener como causa más probable las diferencias en la climatología

registradas en Galicia durante esos años. En el año 2011 hubo una temperatura media en Galicia superior y precipitaciones medias inferiores a la de los años 2010 y 2012¹⁵⁶. Estos valores pueden explicar la variabilidad en los datos entre cosechas.

Por todo ello, no se podrán sacar conclusiones generales basándose en datos de cosechas particulares.

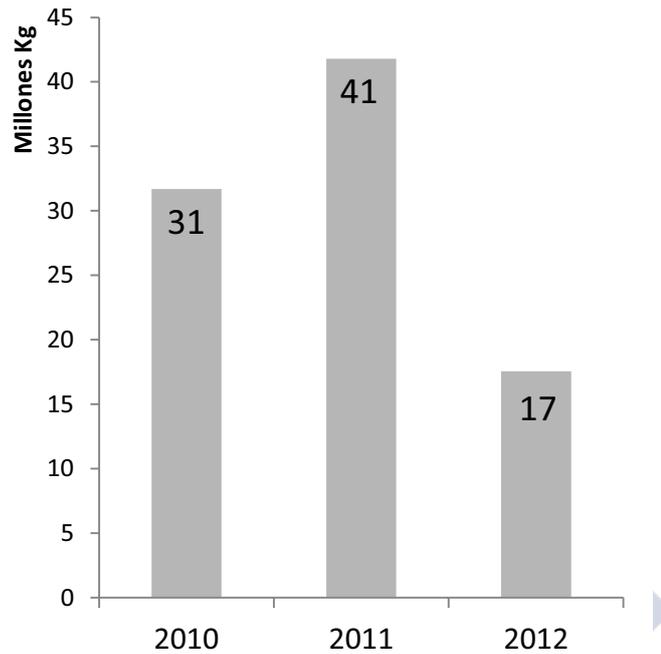


Figura 48 Datos de producción de uva en la D.O. Rías Baixas

IV.5.2. Estudio del perfil polifenólico de las variedades autóctonas gallegas

Para este análisis se llevó a cabo ANOVA, utilizando como factor la “variedad”, en todos los casos para un nivel de confianza del 95%.

Se han considerado en este estudio, las 7 variedades autóctonas seleccionadas.

En la siguiente gráfica (Figura 49) se ve la media de la concentración de los polifenoles individuales de los bagazos estudiados y como se puede observar, la catequina es el polifenol que se encuentra en mayor concentración seguido por la epicatequina y las procianidinas. Esta relación también fue observada

por diversos autores ^{24,32,157}. La excepción es el torrentés cuyo polifenol más abundante es la quercetina.

Los compuestos estudiados que se encuentran en menor concentración son los ácidos fenólicos (gálico, caftárico y protocatéuico). Rodríguez-Montealegre²⁶ obtuvo también esta relación en sus análisis de pieles y semillas de uva.

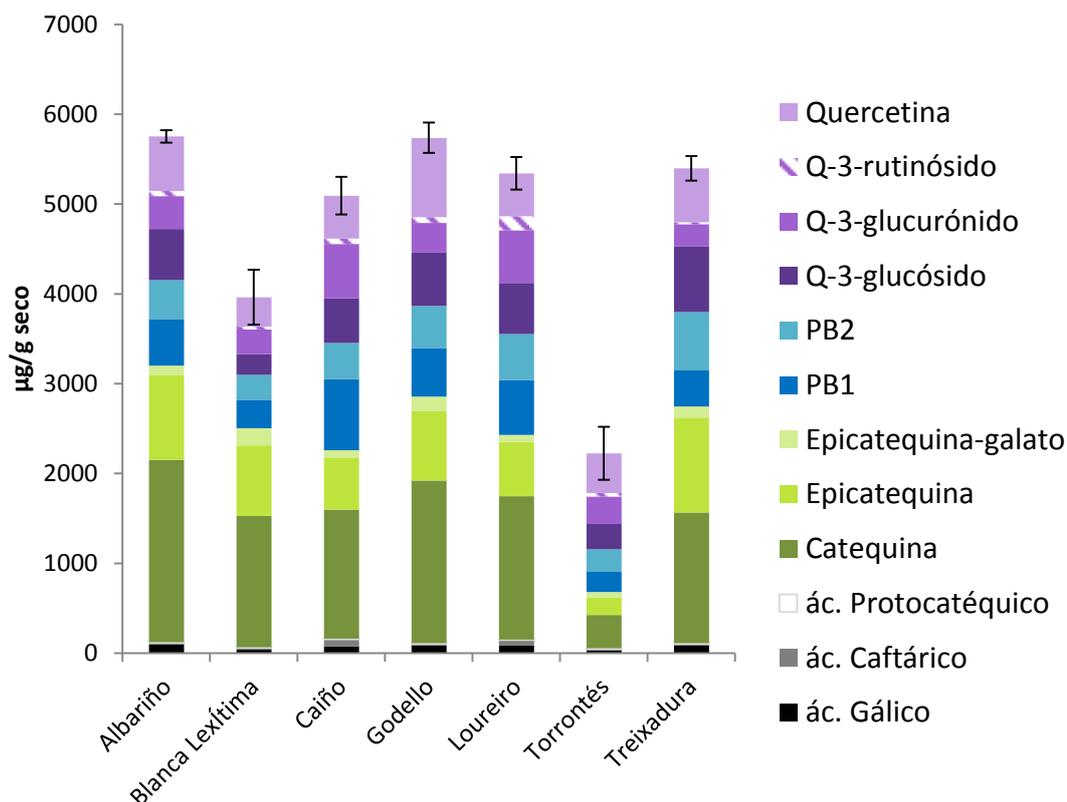


Figura 49 Valores promedio de los polifenoles de las variedades de bagazo autóctonas gallegas

En la Figura 50 se puede ver que existe una gran correlación entre el IPT y la actividad antioxidante. Esto indica que la AA de los extractos es en su mayor parte originada por los compuestos polifenólicos presentes en las muestras.

Resultados y discusión. Extracción de polifenoles del bagazo

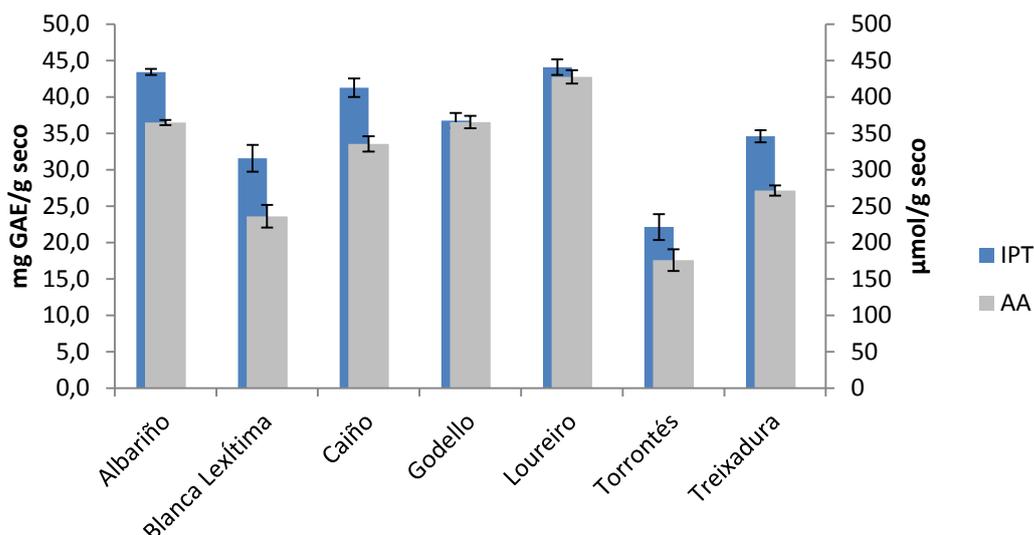


Figura 50 Comparación de los valores de IPT y AA de las variedades de bagazo autóctonas gallegas

La Tabla 48 resume los valores promedios de todas las variedades estudiadas en el análisis de muestras de bagazo de las 7 variedades autóctonas, estableciendo también qué muestras se pueden considerar similares entre sí, en relación con el contenido de determinados polifenoles individuales o en relación con el contenido total en polifenoles o la AA de los extractos. Letras iguales denotan muestras similares.

Las Figuras 51 y 52 resumen gráficamente esta misma información. En ellas se puede observar que la variedad loureiro es la variedad con el mayor valor de AA, y también de IPT junto con las variedades albariño y caíño. Por otro lado, la variedad torrontés y blanca lexítima destacan por presentar los valores más bajos de IPT y AA.

Con respecto al contenido de los polifenoles estudiados individualmente y en cuanto al resto de variedades, las diferencias significativas que existen son las siguientes:

Las variedades con un mayor contenido en ácido caftárico son el caíño y el loureiro, para el resto de variedades no existen grandes diferencias.

La distribución de las catequinas es bastante homogénea, destacando los valores más bajos en la variedad torrontés para la catequina y la epicatequina; y valores por encima de la media del resto de las variedades para la

epicatequina galato en las variedades blanca lexítima y godello. El bagazo de la variedad albariño presenta valores superiores al resto para la catequina.

En relación al ácido gálico, destacan valores inferiores al promedio varietal para la blanca lexítima y el tarrantés; variedades que presentan también los valores más pequeños para las procianidinas, la q-3-glucurónido y, en el caso de la blanca lexítima, para el ácido protocatéquico.

En el caso de la quercetina, el mayor valor lo presenta el godello y destaca el elevado valor de q-3-rutinósido en la variedad loureiro.

Por último, la variedad treixadura presenta los mayores valores para la epicatequina, la PB2 y q-3-glucósido.

En el mismo trabajo mencionando anteriormente de Rodríguez-Montealegre²⁶ se obtuvieron perfiles polifenólicos varietales semejantes.



Tabla 48. Valores promedio de IPT, AA y concentraciones de polifenoles individuales de los bagazos de variedades autóctonas. Grupos homogéneos

	Albariño	B. Lexítima	Caño	Godello	Loureiro	Torrontés	Treixadura
AA	365 ^b ± 4	236 ^e ± 15	335 ^c ± 10	365 ^b ± 9	427 ^a ± 9	176 ^f ± 15	271 ^d ± 7
IPT	43,1 ^a ± 0,4	32,0 ^c ± 1,8	41,1 ^a ± 1,3	37,2 ^b ± 1,0	44,3 ^a ± 1,1	22,1 ^d ± 2	35,0 ^{bc} ± 0,8
Ác. Gálico	95,3 ^a ± 1,7	40,1 ^d ± 7,4	80,2 ^c ± 5,1	88,4 ^{bc} ± 4,1	87,3 ^{bc} ± 4,4	33,7 ^d ± 7,1	85,2 ^c ± 3,3
Ác. Cafotárico	24,2 ^c ± 0,7	26,5 ^{cd} ± 3,3	79,2 ^a ± 2,2	19,3 ^d ± 1,8	62,4 ^b ± 1,9	19,3 ^{cd} ± 3,2	23 ^{cd} ± 1,5
Ác. Protocatequico	4,3 ^c ± 0,1	3,3 ^d ± 0,4	5,1 ^{ab} ± 0,3	5,7 ^a ± 0,2	5,2 ^{ab} ± 0,2	4 ^{bc} ± 0,4	5,4 ^a ± 0,2
Catequina	2032 ^a ± 31	1459 ^c ± 137	1436 ^c ± 94	1812 ^b ± 75	1595 ^{bc} ± 81	373 ^d ± 132	1456 ^c ± 61
Epicatequina	945 ^b ± 21	787 ^{bcd} ± 94	573 ^d ± 64	768 ^c ± 51	605 ^d ± 55	196 ^e ± 90	1053 ^a ± 41
Epicatequina-galato	101 ^d ± 2	189 ^a ± 9	89,5 ^{de} ± 6,4	167 ^b ± 5	79,4 ^{ef} ± 5,5	60,2 ^f ± 9,1	126 ^c ± 4
PB1	519 ^c ± 8	316 ^e ± 36	793 ^a ± 25	540 ^c ± 20	611 ^b ± 21	223 ^e ± 35	400 ^d ± 16
PB2	433 ^{cd} ± 8	279 ^e ± 37	400 ^d ± 25	468 ^{bc} ± 20	511 ^b ± 22	252 ^e ± 36	652 ^a ± 17
Q-3-glucósido	570 ^b ± 17	229 ^c ± 75	501 ^b ± 51	594 ^b ± 41	566 ^b ± 44	280 ^c ± 72	731 ^a ± 33
Q-3-glucurónido	367 ^b ± 9	276 ^{cd} ± 39	604 ^a ± 27	328 ^{bc} ± 22	586 ^a ± 24	305 ^{bcd} ± 38	247 ^d ± 18
Q-3-rutinósido	55,2 ^{bc} ± 2,3	29,3 ^d ± 10,0	59 ^{bc} ± 6,9	66 ^b ± 5,5	157 ^a ± 5,9	41 ^{cd} ± 10	20 ^d ± 4,5
Quercetina	608 ^b ± 13	329 ^d ± 59	476 ^c ± 41	882 ^a ± 32	479 ^c ± 34	441 ^{cd} ± 57	599 ^b ± 26
Suma polifenoles	5753 ^a ± 69	3963 ^d ± 307	5093 ^c ± 210	5738 ^{ab} ± 169	5344 ^{bc} ± 181	2226 ^e ± 295	5398 ^{bc} ± 137

Unidades: IPT: mg GAE/g seco ; AA: µmol trolox/g seco; polifenoles: µg/g seco

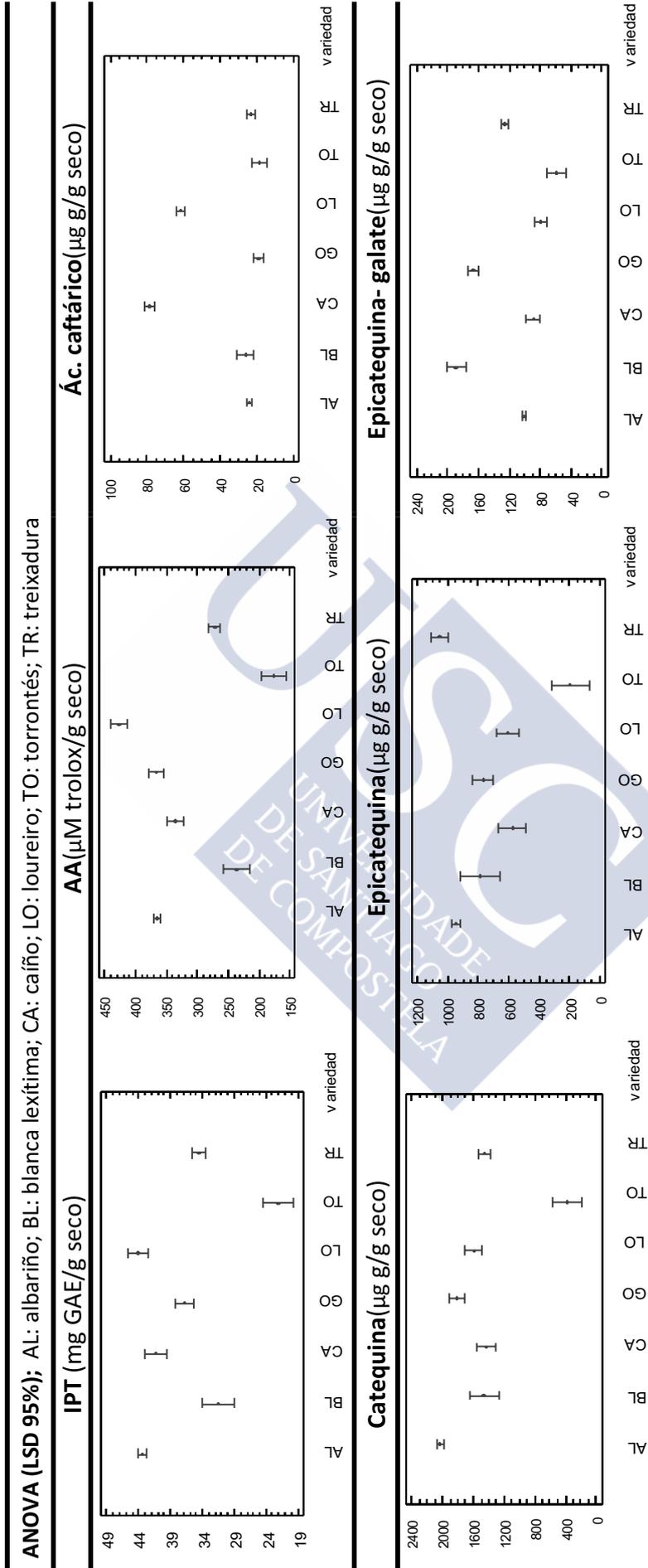
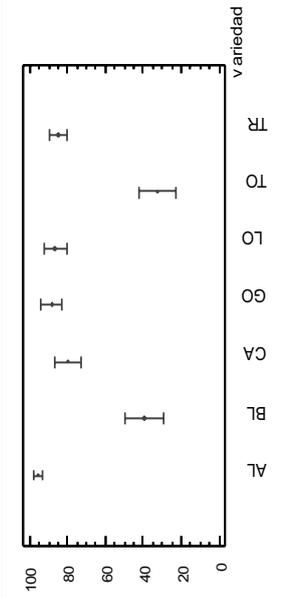


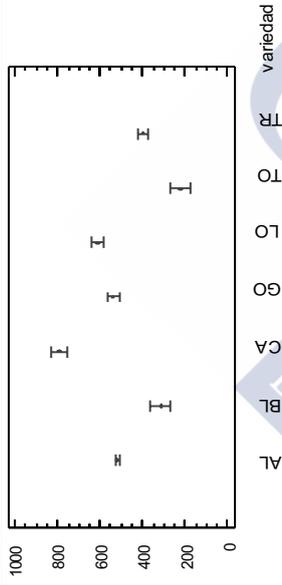
Figura 51 Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de las variedades autóctonas de bagazo

ANOVA (LSD 95%); AL: albariño; BL: blanca lexítima; CA: caíño; LO: loureiro; TO: torrонтés; TR: treixadura

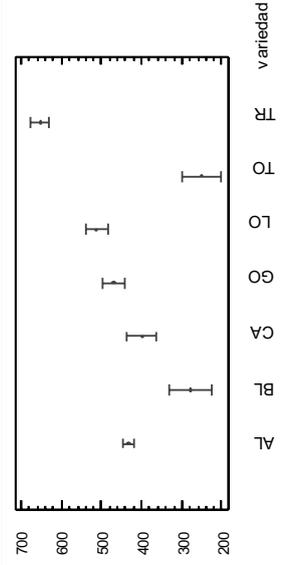
Ác. gálico (µg g/g seco)



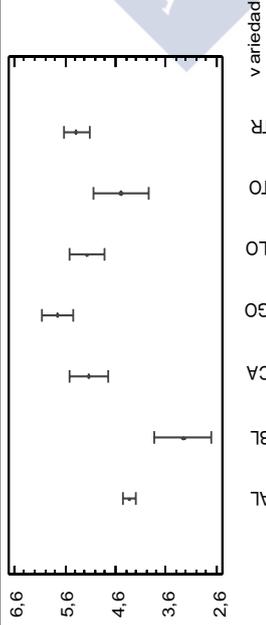
PB1 (µg g/g seco)



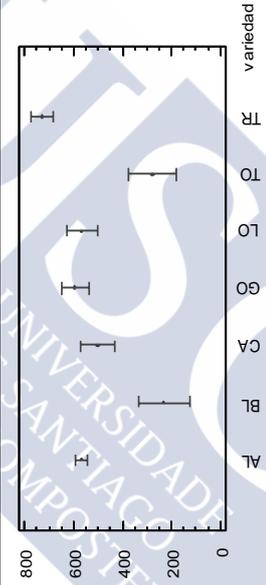
PB2 (µg g/g seco)



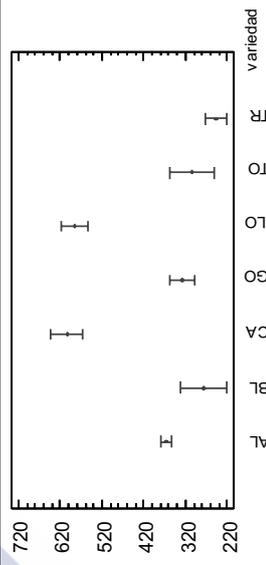
Ác. protocatéquico (µg g/g seco)



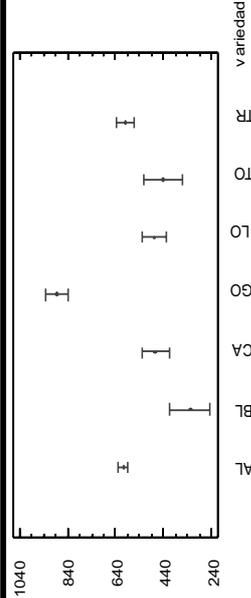
Q-3-glucósido (µg g/g seco)



Q-3-glucurónido (µg g/g seco)



Quercetina (µg g/g seco)



Q-3-rutinósido (µg g/g seco)

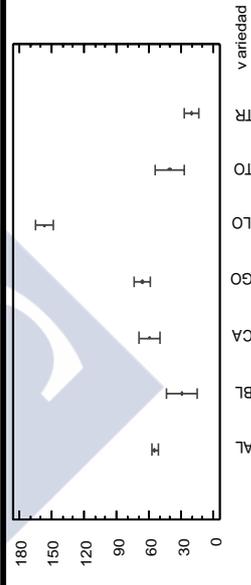


Figura 52 (continuación de la Figura 51) Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de las variedades autóctonas de bagazo

La concentración de compuestos polifenólicos en el bagazo depende además de la variedad²⁴ de otros muchos factores. Entre ellos, las partes de la uva que constituyen principalmente el bagazo, como son las semillas y el hollejo^{32,158}, el tipo de sistema de conducción utilizado y riego de las viñas¹⁴⁷, el tipo de vinificación²⁵, la cosecha¹⁵⁹, el estado de maduración de la uva^{26,160} y el clima²⁷ entre otros. Todos estos factores hacen que la variabilidad en los datos sea muy alta, ya que parten de bodegas diferentes y zonas geográficas diferentes. Por otro lado, para poder crear un modelo robusto que abarque toda esta variabilidad, es necesaria toda esta información. El objetivo último de este modelo, será poder evaluar las características de los bagazos de cosechas futuras, para valorar la homogeneidad de las muestras desde el punto de vista de su perfil polifenólico, con vistas a una potencial explotación industrial de su extracción.

Los polifenoles extraídos son los principales responsables de la capacidad antioxidante de los extractos de bagazo. Esta capacidad antioxidante no sólo depende de la concentración polifenólica total sino también del tipo de polifenol. Estudios como el de Alonso-Borbalan¹⁶¹ afirman, por ejemplo, que flavanoles como la catequina y la epicatequina presentan una actividad antioxidante similar al trans-resveratrol. La actividad antioxidante es una de las características más interesantes de estos extractos desde el punto de vista de su explotación potencial en sectores como el alimentario, cosmético, farmacéutico, etc.

Uno de los parámetros que sirve para valorar la AA, en términos comparativos, es el IC₅₀ (apartado III.4.2). Así, en la siguiente figura (Figura 53 se pueden ver los diferentes valores de IC₅₀ calculados para cada uno de los compuestos polifenólicos estudiados. El ácido gálico es el compuesto estudiado con la mayor capacidad antioxidante, casi seis veces mayor que la q-3-rutinósido. Es importante destacar en este punto que hay múltiples maneras de medir la AA de una disolución o de un extracto. Aquí, mostramos el IC₅₀ de los patrones a título informativo y comparativo; si bien desde la

heterogeneidad de las medidas encontradas en los trabajos resumidos en la Tabla 49, nos ha sido imposible establecer una comparación apropiada.

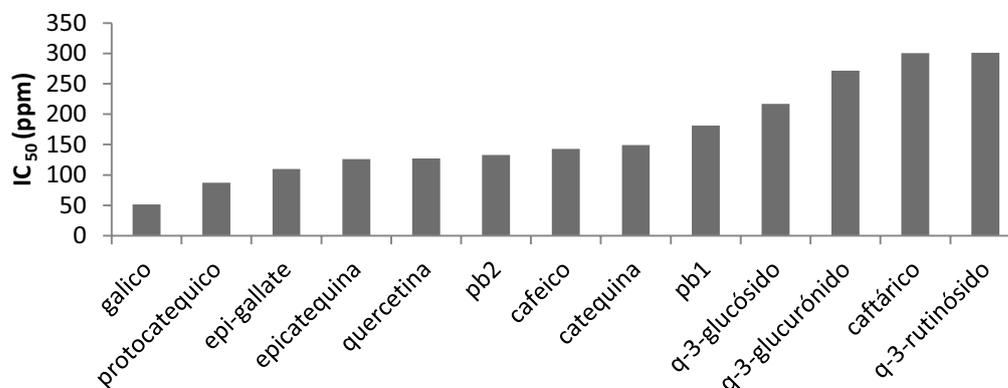


Figura 53 Valores de IC₅₀ para los polifenoles estudiados

Como se puede ver en la Tabla 48, el rango de valores encontrado para IPT (22-44 mg GAE/g seco) en las 7 variedades estudiadas es similar al encontrado por Gonzalez et al.²⁴ utilizando la misma técnica de extracción y bagazo de variedades blancas (31- 47 mg GAE/g seco) (Tabla 49). Esta misma tabla resume los datos polifenólicos publicados hasta el momento de la redacción de esta memoria para bagazo de uva blanca.

El resto de autores que utilizan bagazo blanco, usan técnicas de extracción diferentes a la utilizadas en este trabajo, y como se puede observar prácticamente todos los valores de IPT son inferiores a los obtenidos con la técnica PSE. Matias et al.⁸⁵ analizó bagazo de la variedad loureiro cultivado en el norte de Portugal, utilizando la agitación como método de extracción, y obtuvo un IPT de 14 mg/g. En este trabajo se obtuvieron 44 mg/g al analizar esa misma variedad. Solamente Makris³² y Sagdic⁷² consiguen resultados equivalentes pero utilizando técnicas de extracción convencionales, como son la maceración o mediante shoxlet.

Tabla 49 Datos polifenólicos de diferentes matrices obtenidos por otros autores

Ref.	variedades blancas	método de extracción	IPT mg GAE/g	Gal	Cate	Epicate	Caft	PB1	PB2	TF	Proto	E--galato	q-3-glucósido	q-3-glucurónido	
															µg/g seco
Aliakbarian et al. ⁷¹		Subcritical water agitación	32												
			8												
Brahim et al. ⁷⁵		microondas agitación	8												
			4												
González et al. ²⁴	Chardonnay	PSE	39	473	488		96	131							
			31	154	95		35	47							
			47	633	229		170	140							
			36	125	126		67	87							
Gonzalez-Paramás et al. ⁸⁴ Lores et al. ¹⁴⁷ Makris et al. ³² Matias et al. ⁸⁵ Sagdic et al. ⁷² Sánchez et al. ⁸¹	bagazo	ultrasonidos	-							400					
		ultrasonidos	-							100					
		MSPD	35												
		maceración	48												
		agitación	14												
		shoxlet	-	674,8	334										
		ESCALA INDUSTRIAL	8												
		PSE	43	95	2032	945	24	519	433	4030	4,3	101	570	367	
		PSE	44	89	1595	605	62	611	511	3391	5,2	79	566	586	
		PSE	36	69	1505	872	21	323	471	3191	6,3	89	687	266	
Kammerer et al. ⁸³ Makris et al. ⁶⁷ Yilmaz et al. ⁴¹	Semillas	agitación		106						9,3					
		agitación	111												
		maceración		150	3580	4210									
		agitación		15		61					42				
Kammerer et al. ⁸³ Makris et al. ⁶⁷ Yilmaz et al. ⁴¹ Makris et al. ⁶⁷	piel	agitación		226	134		191	91				35	351	509	
		maceración	10												
		agitación		50	600	440									
		maceración	58												
Brahim et al. ⁷⁵ Makris et al. ³² Mildner et al. ¹⁶²	bagazo	microondas	15												
		maceración	54												
		agitación	20	107,5	129				1650						

Gai: ác. gálico; Cate: catequina; Epi: epicatequina; Caft: ác. caftárico; PB1:prociandina B1; PB2: procianidina B2; TF: flavanoles totales; Proto: ác. protocatequico; E-galato:epicatequina-galato

IV.5.3. Correlación con la actividad antioxidante

En la Tabla 50 se puede observar las diferentes correlaciones existentes entre las concentraciones de polifenoles con la AA.

Existe una correlación alta (0,7) entre el IPT y la AA. Correlaciones así de elevadas e incluso mayores las encontraron otros autores como Orak et al.¹⁶³, que encontró una correlación de 0,75 entre IPT y la AA en diferentes variedades de uva tinta. La catequina, la suma de polifenoles, el ác. gálico y la PB1, presentan correlaciones moderadas con un 0.54, 0.54, 0.48 y 0.47 respectivamente. La PB2 (0,29), epicatequina (0,32), quecetina-3-rutinósido (0,29), la quercetina-3-glucurónido (0,32), la quercetina (0,2), la epicatequina-galato (0,14), el ác. caftárico (0,1), ác. protocatéquico (0,1) y la quercetina-glucósido (0,1) presentan bajas correlaciones con la AA.

El hecho de que ninguno de los polifenoles estudiados presente una elevada correlación por sí sólo con la actividad antioxidante, sugiere que la AA de los extractos de bagazo sea consecuencia de una sinergia entre los compuestos polifenólicos y no se pueda atribuir a compuestos específicos. Este fenómeno ya fue observado por Alonso et al.⁷⁸ en bagazo y por Arnous et al.¹⁶⁴ en vinos tintos. En ambos estudios la AA tenía una gran correlación con la medida de polifenoles totales pero sin embargo presentaba una baja correlación con los principales polifenoles presentes en las muestras.

Es difícil establecer una relación directa entre la AA de cada polifenol y la AA del extracto ya que como se puede ver en la Figura 53 la AA no sólo depende de la concentración de cada polifenol sino también del tipo de compuesto. En algunos casos esta diferencia entre polifenoles puede llegar a ser muy elevada.

Este hecho se puede ver si comparamos los valores del ácido gálico y la quercetina-3-glucósido. La concentración del ác. gálico en el extracto es muy inferior al valor que presenta la quercetina-3-glucósido. Y aun así, la correlación del ácido gálico con la AA es 5 veces mayor.

Tabla 50 Correlación entre la concentración de polifenoles y la AA

	AA	p
IPT	0,702	<0,001
Ác. gálico	0,476	<0,001
Ác. caftárico	0,099	<0,001
Ác. protocatéquico	0,081	<0,001
Catequina	0,540	<0,001
Epicatequina	0,320	<0,001
Epicatequina-galato	0,140	<0,001
PB1	0,473	<0,001
PB2	0,286	<0,001
Q-3-glucósido	0,071	<0,001
Q-3-glucurónido	0,319	<0,001
Q-3-rutinósido	0,285	<0,001
Quercetina	0,192	<0,001
Suma total	0,540	<0,001

IV.5.4. Diferencias de las variedades autóctonas en función de su perfil polifenólico

Se ha estudiado si existen diferencias en la composición polifenólica de los bagazos procedentes de las diferentes variedades de uva autóctonas gallegas. Y, por tanto, si es posible con los datos obtenidos obtener una clasificación correcta de los bagazos en función de su origen. Para el análisis discriminante se han tenido en cuenta los valores de IPT y AA, y los 12 polifenoles medidos en las muestras (ác. gálico, ác. protocatéquico, ác. caftárico, catequina, epicatequina, epicatequina-galato, procianidina B1, procianidina B2, quercetina-glucósido, quercetina-glucurónido, quercetina-rutinósido y quercetina).

Se realizó el análisis discriminante para 5 variedades autóctonas (albariño, godello, treixadura, caíño y loureiro) y el resto de las variedades no se incluyeron. Esta decisión, que afecta a los bagazos de torrontés y blanca lexítima, se tomó porque, aun siendo variedades autóctonas, algunas proceden de bodegas experimentales y no serían comparables con los bagazos de una

bodega comercial, sometidos a procesos como maceraciones, presado industrial, etc...

El resultado del análisis discriminante muestra una correcta clasificación de los bagazos en los cinco grupos. De hecho, el porcentaje de discriminación es del 95,29% de las muestras estudiadas. En la Figura 54 se observa la representación de las funciones de discriminación de las 5 variedades. En ella se ven los posibles problemas de confusión. Si nos fijamos en la Tabla 51 de los porcentajes de muestras correctamente clasificados, se puede ver como las muestras de caíño y loureiro sólo tienen problemas de confusión con albariño. Por otro lado las muestras de treixadura y godello tienen problemas de confusión entre ellas y además el godello con el albariño.

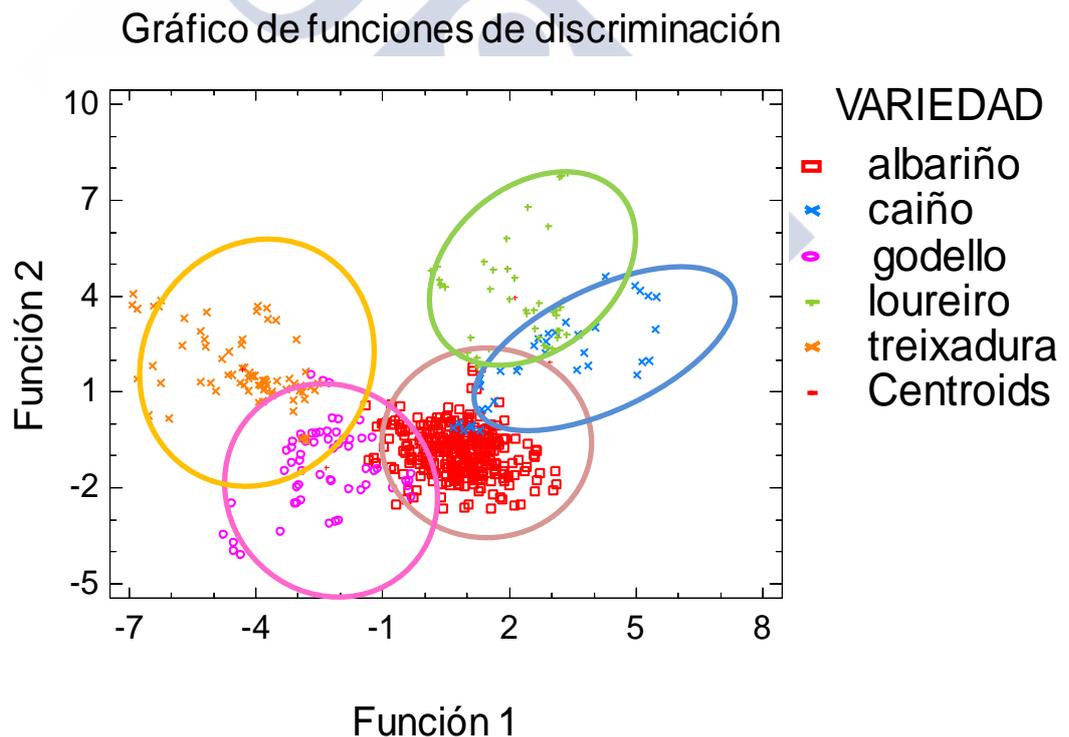


Figura 54 Representación gráfica de las funciones de discriminación por variedades autóctonas

Tabla 51 Tabla de clasificación de los bagazos por variedades autóctonas

VARIEDAD	Albariño	Caíño	Godello	Loureiro	Treixadura
Albariño	97,20%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%
Caíño	19,44%	80,56%	0,00%	0,00%	0,00%
Godello	0,00%	0,00%	93,33%	0,00%	6,67%
Loureiro	11,90%	0,00%	0,00%	88,10%	0,00%
Treixadura	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%

Porcentaje de muestras correctamente clasificadas: 95,29%

En la siguiente tabla (Tabla 52) están las muestras de las variedades utilizadas como muestras desconocidas y su probabilidad de confundirse con una de las variedades previamente clasificadas, una vez eliminadas del análisis 3 muestras que presentaron un comportamiento anómalo y fueron confundidas con otro grupo (ver Tabla 52).

Tabla 52 Probabilidad de confusión de variedades poco estudiadas

	muestras	Variedades con las que se confunden	Probabilidad (%)
Muestras eliminadas de la discriminación	LO01-2010	Caíño	92,9
	TRO2-2012	Albariño	99,9
	TR06-2011	Godello	99,8
Bodegas experimentales	Torrontés	Treixadura	76,0
	Blanca lexítima	Godello	98,1

La bodega que nos proporcionó la muestra TR06 (excluida del análisis), cultiva como variedad mayoritaria godello y posee un porcentaje muy pequeño de treixadura. Según el análisis realizado, esta muestra tendría que ser de la variedad godello con una probabilidad del 99,8. Una posible explicación a este hecho sería que hubo un error en el muestreo y la muestra de bagazo es en realidad de la variedad godello. Este hecho remarca la robustez de la discriminación obtenida en este análisis.

La blanca lexítima y el torrontés, más parecidas al godello y treixadura respectivamente, son muestras pertenecientes a bodegas experimentales,

concretamente al Centro de Formación y Experimentación Agroforestal de Guísamo y a la Estación Enológica de Ribadumia, y en estos casos el bagazo se obtuvo por prensado de la uva en el laboratorio.

Lógicamente, al no existir ningún grupo de referencia para estas variedades, ambas son confundidas con aquellas a las que más se parecen, según el análisis.

IV.6. Diferenciación de los bagazos de albariño en función de la subzona de producción

El albariño es la variedad blanca más producida en Galicia, en este apartado se tratará de buscar una posible diferenciación entre las muestras de albariño cosechadas en 4 de las 5 diferentes subzonas que existen en la D.O. Rías Baixas. Estas subzonas son el Salnés, Condado do Tea, O Rosal y Ribeira do Ulla, de las que las tres primeras son las más antiguas establecidas.

En este estudio se han incluido 55 muestras de bagazo albariño de los 3 años estudiados. El muestro es proporcional a la relación de la producción de albariño en las diferentes subzonas (Figura 55). La zona del Salnés es la zona donde se produce más cantidad de albariño, con un 65% de la producción total de la denominación de origen. La zona de Soutomaior, de más reciente reconocimiento, no se incluyó en el muestreo debido a la escasa producción que posee, un 0,1% de la D.O. Como se puede apreciar en la Figura 56 esta subzona representa un área geográfica muy pequeña.

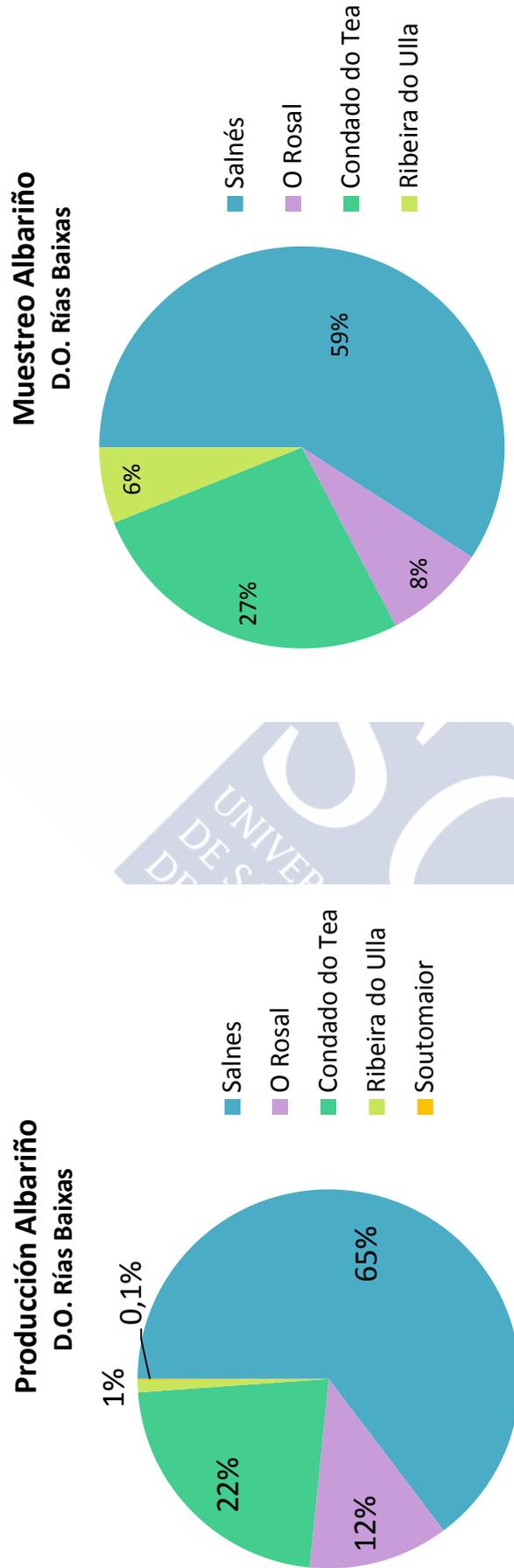


Figura 55 Comparación de la distribución de la producción de albariño y el muestreo en la D.O. Rías Baixas

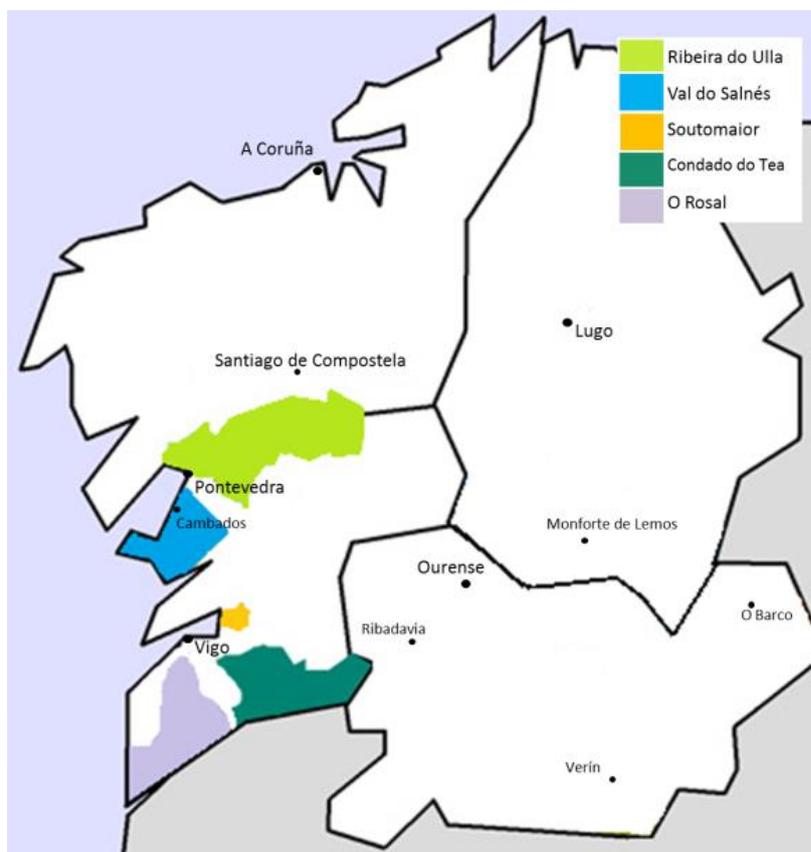


Figura 56 Mapa de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

Para este análisis se llevó a cabo un ANOVA, utilizando como factor la “subzona”, en todos los casos para un nivel de confianza del 95%.

IV.6.1. Análisis del perfil polifenólico de las diferentes subzonas.

El área geográfica total a estudio (Rías Baixas) es bastante homogénea climatológicamente hablando, por este motivo, cabría esperar que no hubiera diferencias significativas entre las muestras de una misma variedad de bagazo (albariño). Sin embargo, en este estudio se han encontrado algunas diferencias significativas entre las subzonas.

En la siguiente gráfica (Figura 57) se ve el promedio de la concentración de los polifenoles individuales de las 4 subzonas de la D.O. Rías Baixas.

Las muestras de todas las subzonas presentan un perfil similar, pero en general, los bagazos de la subzona del Salnés presenta la mayor concentración de polifenoles y la subzona del condado de Tea presenta las menores concentraciones.

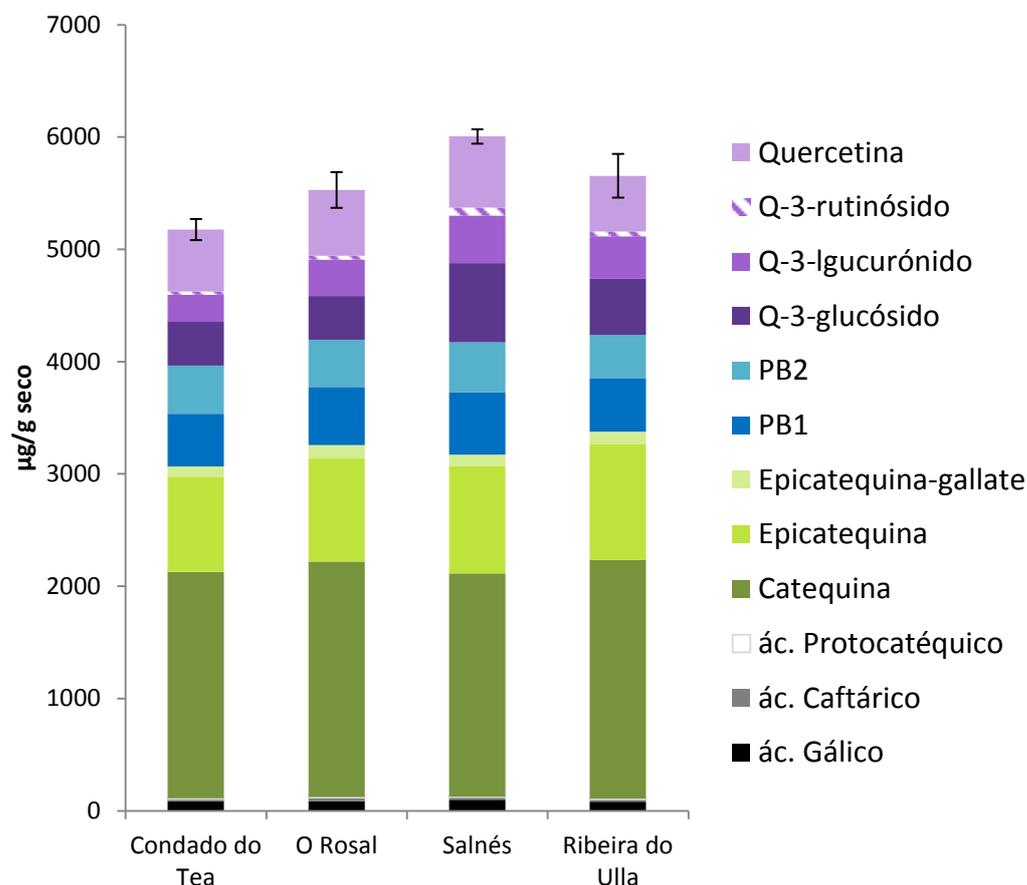


Figura 57 Valores promedio de los polifenoles de los bagazos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

La Figura 58 muestra conjuntamente los valores de IPT y AA de las muestras de bagazo de las 4 subzonas. Como se aprecia en el gráfico ninguna de las zonas destaca significativamente por su AA, sin embargo, con respecto al valor de IPT las muestras de bagazo albariño de la subzona del Salnés presentan un valor significativamente mayor de IPT con respecto al resto de las subzonas.

Resultados y discusión. Extracción de polifenoles del bagazo

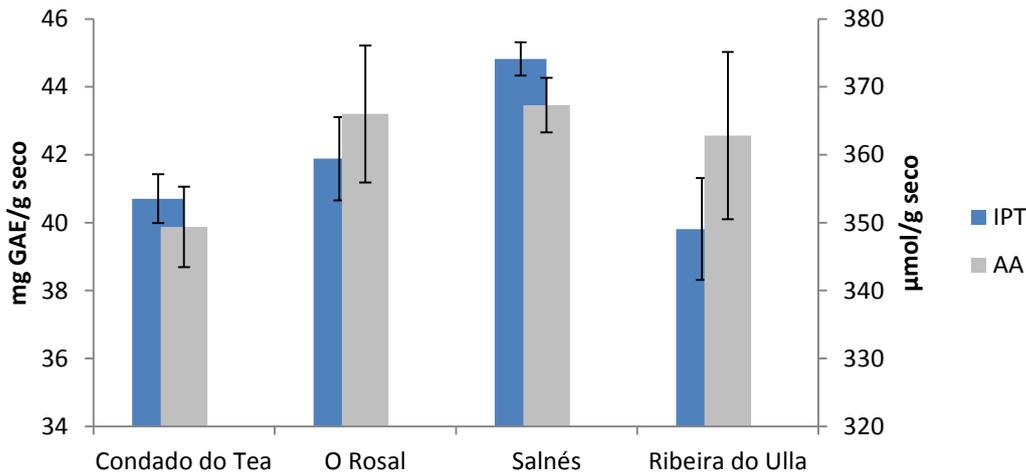


Figura 58 Comparación de los valores de IPT y AA de los bagazos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

A continuación, se puede observar en la Tabla 53 los valores promedios de los bagazos de cada subzona. Además, en esta tabla se muestran también los grupos homogéneos representados por medio de letras. Las Figuras 59 y 60 resume gráficamente esta información.

Tabla 53 Valores promedio de AA, IPT y concentraciones de polifenoles individuales de los bagazos albariños de las subzonas de la D.O. Rías Baixas. Grupos homogéneos

	Condado do Tea	Rosal	Val do Salnés	Ribeira do Ulla
AA	349 ^b ± 6	366 ^{ab} ± 10	367 ^a ± 4	363 ^{ab} ± 12
IPT	41 ^b ± 1	42 ^b ± 1	45 ^a ± 0,5	40 ^b ± 2
Ác. gálico	87 ^b ± 3	86 ^b ± 5	99 ^a ± 1,9	82 ^b ± 6
Ác. protocatéquico	4,1 ^b ± 0,2	5,0 ^a ± 0,3	4,2 ^b ± 0,1	4,2 ^b ± 0,3
Ác. caftárico	21 ^c ± 1	33 ^a ± 1	24 ^b ± 1	23 ^{bc} ± 2
Catequina	2016 ^a ± 42	2095 ^a ± 72	1986 ^a ± 29	2124 ^a ± 88
Epicatequina	849 ^b ± 30	919 ^{ab} ± 52	958 ^a ± 21	1030 ^a ± 63
Epicatequina -galato	91 ^c ± 3	119 ^a ± 6	101 ^b ± 2	113 ^{ab} ± 7
PB1	467 ^b ± 14	519 ^{ab} ± 24	556 ^a ± 9	479 ^b ± 29
PB2	430 ^{ab} ± 12	419 ^{ab} ± 20	444 ^a ± 8	384 ^b ± 24
Q-3-glucósido	389 ^b ± 30	391 ^b ± 51	704 ^a ± 20	499 ^b ± 62
Q-3-glucurónido	243 ^c ± 14	323 ^b ± 24	424 ^a ± 9	379 ^{ab} ± 29
Q-3-rutinósido	27 ^c ± 3	33 ^{bc} ± 5	70 ^a ± 2	43 ^b ± 6
Quercetina	553 ^b ± 27	587 ^{ab} ± 45	634 ^a ± 18	495 ^b ± 55
SUMA	5176 ^c ± 93	5529 ^{bc} ± 159	6006 ^a ± 63	5655 ^{ab} ± 194

Unidades: IPT: mg GAE/g seco ; AA: μmol trolox/g seco; polifenoles: μg/g seco

En primer lugar hay que destacar que en la subzona del Ulla existe una gran dispersión en los datos, como consecuencia de la gran variación de la concentración polifenólica entre cosechas. Posiblemente, la subzona del Ulla presentó unas diferencias en las condiciones climáticas más acusadas que las producidas en el resto de las subzonas (Figuras 59 y 60).

Por otra parte, también existen diferencias significativas entre las subzonas con respecto a la concentración de los polifenoles individuales. La subzona del O Rosal destaca por su elevado contenido en ácidos fenólicos como el ac. caftárico y ác. protocatéquico. La subzona del Salnés destaca por su alto contenido en ác. gálico y en los flavanoles q-3-glucósido, y q-3-rutinósido. Por el contrario, los bagazos de la subzona del Condado de Tea, presenta en general, los valores más bajos de todas las variables, en especial muestra la menor concentración significativa de epicatequina-galato y q-3-glucurónido. Para el resto de compuestos polifenólicos, no existe unas grandes diferencias entre subzonas.



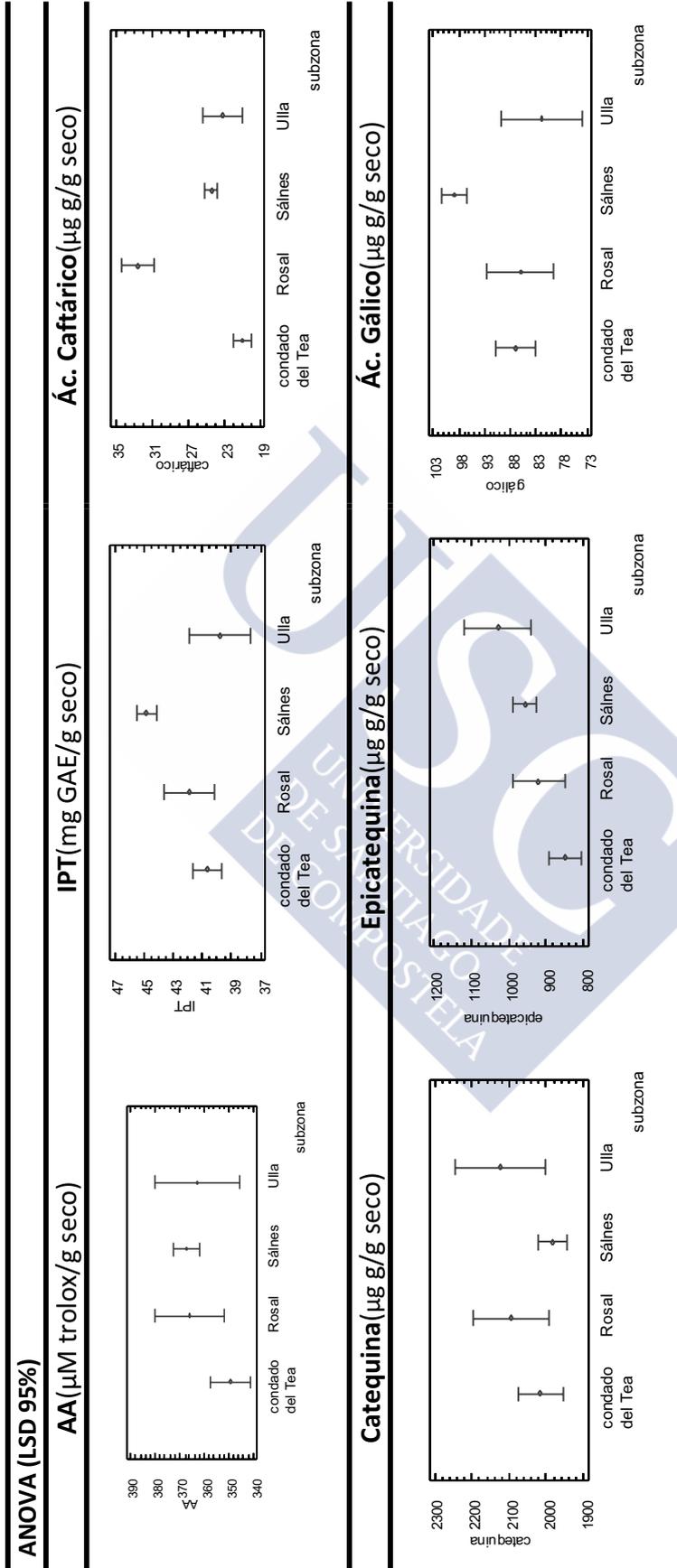


Figura 59 Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

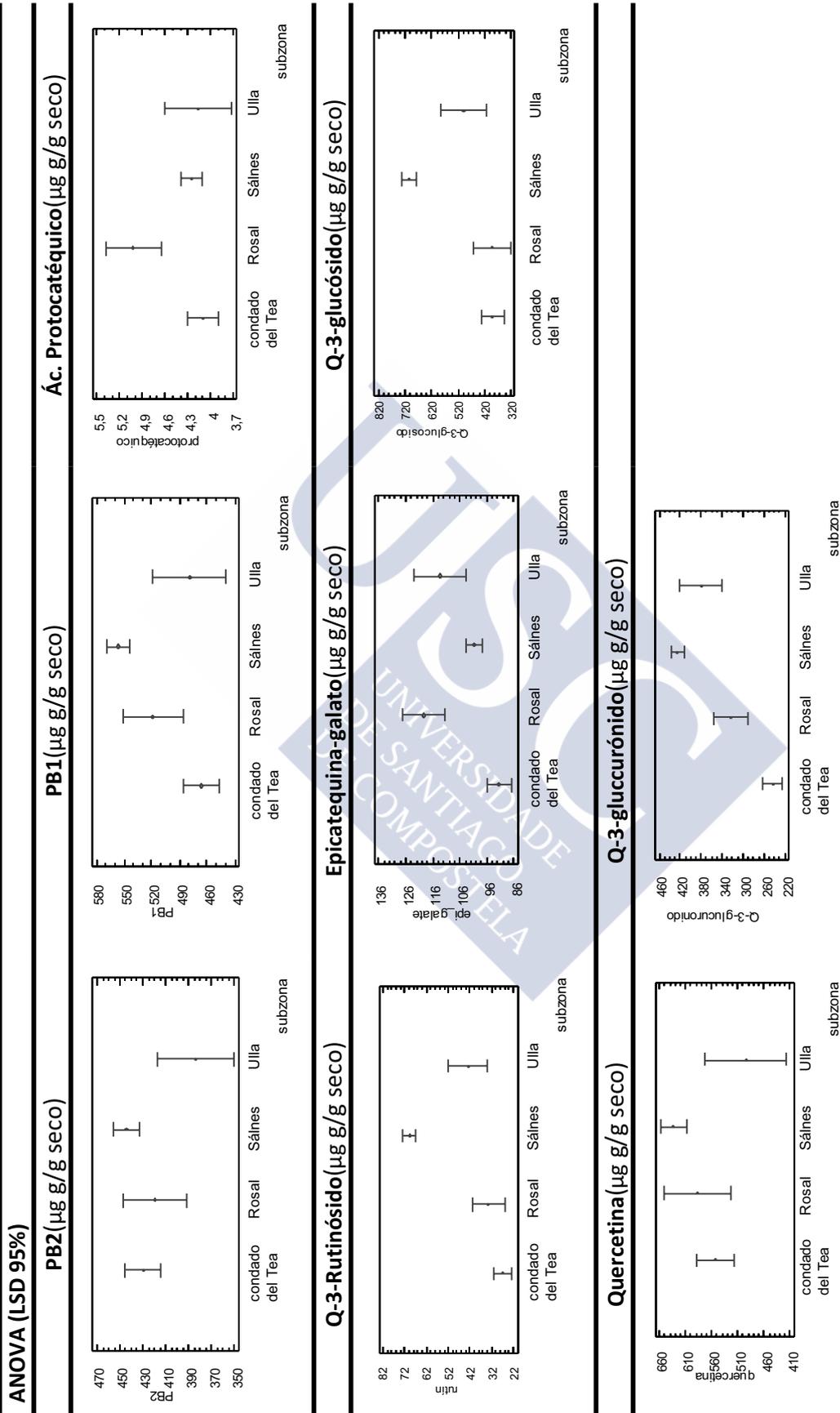


Figura 60 (Continuación Figura 59) Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

IV.6.2. Diferenciación de bagazos de albariño en función de la subzona de producción

Para saber si es posible diferenciar el bagazo de albariño cultivado en cada una de las diferentes subzonas de la D.O. Rías Baixas se realizó un análisis discriminante con todas las muestras de albariño, en el que el factor de discriminación fuera la subzona de cultivo.

Los resultados muestran que, en este caso, se consigue una clasificación correcta del 82,86% de las muestras. En la Tabla 54 se presentan los resultados, que ponen de manifiesto las confusiones entre zonas. Esto se visualiza en la Figura 61, donde se evidencian los solapamientos.

Tabla 54 Tabla de clasificación de los bagazos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas

SUBZONA	Condado del Tea	Rosal	Salnés	Ribeira do Ulla
Condado del Tea	73,61%	15,28%	5,56%	5,56%
Rosal	14,81%	70,37%	3,70%	11,11%
Salnés	6,13%	1,23%	89,57%	3,07%
Ribeira do Ulla	5,56%	5,56%	11,11%	77,78%

Porcentaje de muestras correctamente clasificadas: **82,86%**

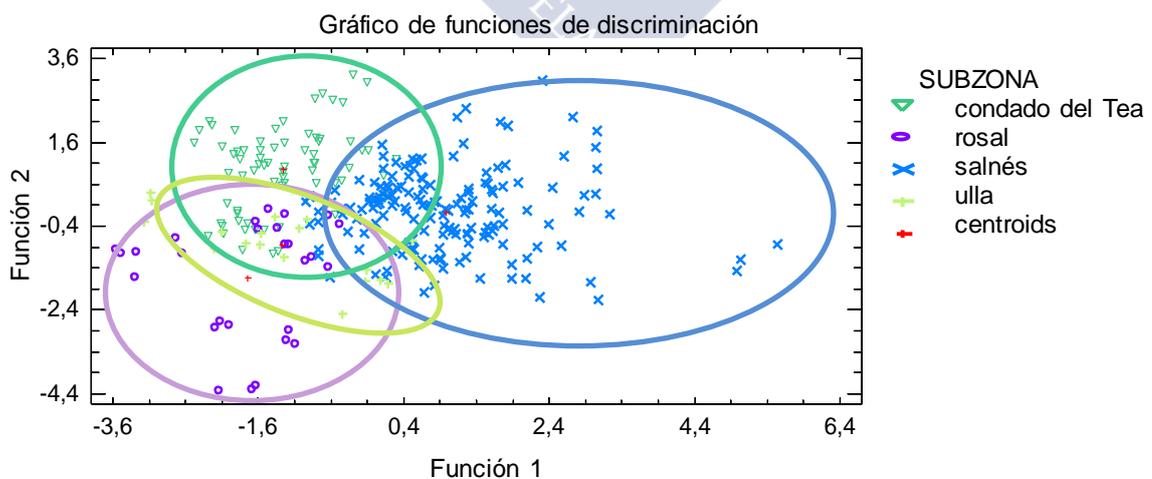


Figura 61 Representación gráfica de las funciones de discriminación por subzonas de la D.O. Rías Baixas de los bagazos de la variedad albariño

La sub-zona del Ulla se encuentra muy dispersa entre el Salnés, el Rosal y el Condado del Tea. Se necesitaría otras variables para diferenciar mejor las diferentes subzonas. Los agrupamientos de las otras tres (Salnés, Condado del Tea y Rosal) son más claros. Solamente el Ulla no se consigue diferenciar.

Si eliminamos los datos del Ulla, la discriminación quedaría de la siguiente manera (Tabla 55), obteniéndose un porcentaje 86,64% de muestras correctamente clasificadas.

Tabla 55 Tabla de clasificación de los bagazos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas (excluida la Ribera del Ulla)

SUBZONA	Condado del Tea	Rosal	Salnés
Condado del Tea	80,56%	13,89%	5,56%
Rosal	11,11%	81,48%	7,41%
Salnés	7,98%	1,84%	90,18%

Porcentaje de muestras correctamente clasificadas: 86,64%

En la Figura 62 se observa mejor el agrupamiento de las muestras de las 3 subzonas clásicas de la DO.

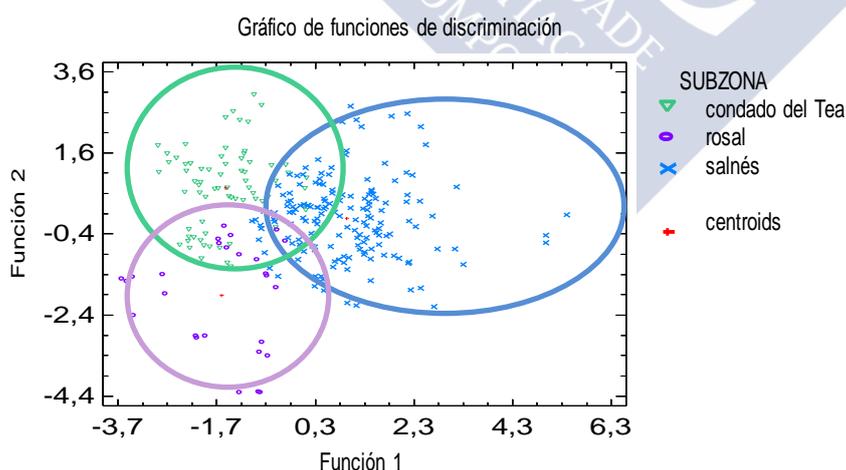


Figura 62 Representación gráfica de las funciones de discriminación por subzonas de la D.O. Rías Baixas de los bagazos de la variedad albariño (excluida la subzona de la Ribeira do Ulla)

IV.7. Variedades no autóctonas cultivadas experimentalmente en Galicia

En este estudio se han incluido 6 variedades no autóctonas: pinot blanc, pinot gris, g-traminer, sauvignon blanc, riesling y chardonnay. En total 15 muestras de las 3 cosechas consideradas (2010, 2011, 2012). Estas muestras fueron cultivadas en la Estación Enológica de Ribadumia. En la mayoría de los casos las muestras fueron uvas directamente. El bagazo correspondiente se obtuvo en el laboratorio, mediante prensado manual. Por lo tanto, estas muestras no pueden considerarse un bagazo tipo de una bodega, ya que no sufrieron las técnicas de vinificación propias de cada bodega.

Factores como el clima, la situación geográfica, las técnicas de cultivo, la preparación de la muestra para su análisis y la técnica de extracción fueron los mismos para estas muestras. Por lo tanto se han eliminado las posibles variaciones a causa de los mismos. Esto conlleva que los datos obtenidos en este análisis son perfectamente comparables entre si y aunque el número de muestras no es muy numeroso podremos sacar conclusiones bastante robustas del estudio.

IV.7.1. Estudio de la composición polifenólica de variedades experimentales

Se ha llevado a cabo el estudio de la composición polifenólica de las variedades experimentales. Para esta comparación se utilizó el ANOVA con un nivel de confianza del 95%. En la Figura 63, están representados los promedios de las concentraciones de los bagazos experimentales, y como se aprecia, las variedades riesling y sauvignon blanc presentan el menor contenido de polifenoles, considerados como suma de los compuestos individuales. Además, en todas las variedades, el compuesto polifenólico con la mayor concentración es la catequina, seguido de la epicatequina. En el caso de chardonnay en el estudio realizado por Gonzalez et al.²⁴ contradice este dato, ya que estos autores observan que la concentración de la epicatequina en esta variedad es mayor que el de la catequina.

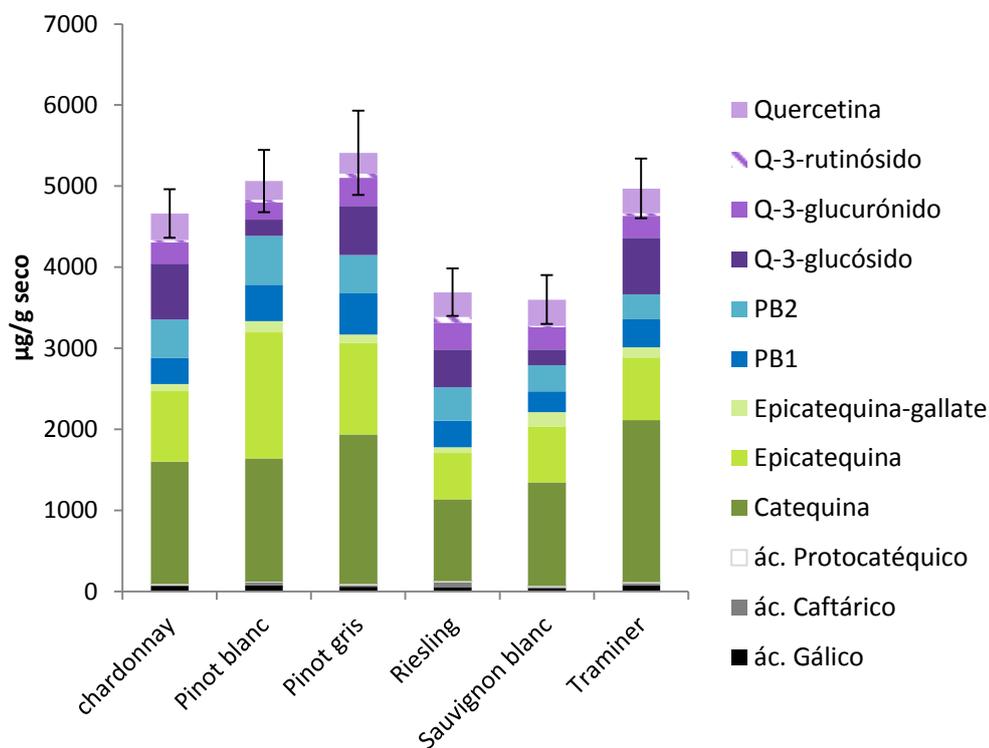


Figura 63 Valores promedio de los polifenoles de las variedades de bagazos experimentales

En la Figura 64 se comparan los valores de IPT y la AA de las 6 variedades de bagazo experimentales. La variedad pinot gris es la que presenta un IPT significativamente mayor con respecto al resto de variedades. Entre estas últimas no existen grandes diferencias significativas. Por otro lado, si comparamos el valor de la AA de los bagazos, comprobamos como entre ellos no hay ninguna diferencia significativa.

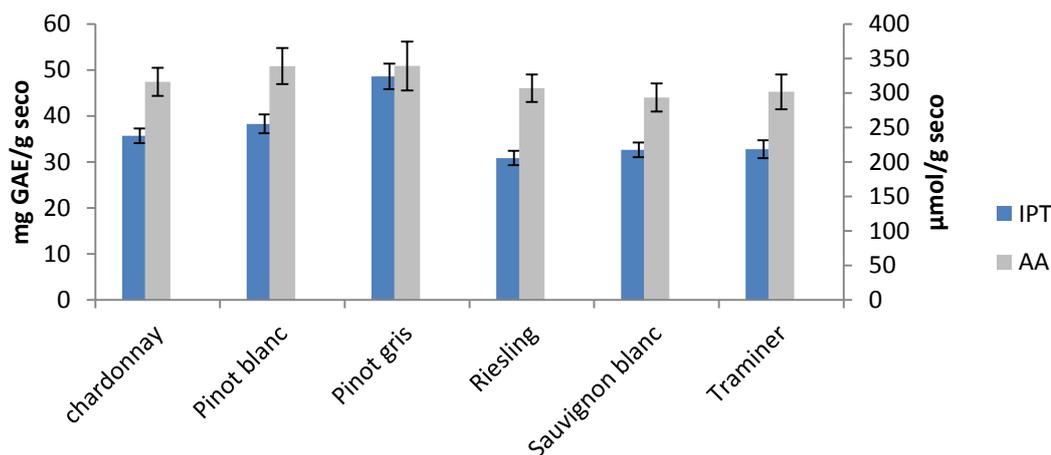


Figura 64 Comparación de los valores de IPT y AA de las variedades de bagazos experimentales

A continuación, se resumen en la Tabla 56 los valores promedio de la concentración de polifenoles individuales identificados en las variedades de bagazos experimentales, además también están representados por medio de letras las diferencias significativas. En las Figuras 65 y 66 se muestran gráficamente estos datos para una interpretación más rápida.

En la Tabla 56 podemos apreciar como la relación de concentración existente entre las procianidinas es similar en todas la variedades, donde la procianidina con mayor concentración es la PB2. Excepto para pinot gris y g-traminer donde no se observan diferencias significativas entre procianidinas. Esta relación también la encuentran Gonzalez et al²⁴ para el caso de la variedad chardonnay. Por el contrario, Rodriguez-Montealegre et al.²⁶ encuentran que la PB1 presenta una concentración mucho más elevada en comparación con la PB2. Ellos lo atribuyen a variaciones producidas por el clima templado con veranos muy calurosos donde se cultivaron sus muestras. Además de este motivo, el diferente sistema de extracción con diferentes disolventes puede hacer que varíen las proporciones entre los diferentes compuestos polifenólicos.

Tabla 56 Valores promedio de IPT, AA y concentraciones de polifenoles individuales de los bagazos experimentales. Grupos homogéneos

	Chardonnay	Pinot blanc	Pinot gris	Riesling	Sauvignon blanc	Traminer
AA	316 ^a ± 20	339 ^a ± 26	339 ^a ± 35	307 ^a ± 20	293 ^a ± 20	301 ^a ± 25
IPT	36 ^{ab} ± 2	38 ^b ± 2	49 ^a ± 3	31 ^d ± 2	33 ^{cd} ± 2	33 ^{bcd} ± 2
Ac. Gálico	69 ^a ± 8	80 ^a ± 11	60 ^{ab} ± 14	56 ^{ab} ± 8	42 ^b ± 8	73 ^a ± 10
Ac. Caftárico	21 ^c ± 6	40 ^b ± 7	27 ^{bc} ± 10	70 ^a ± 5	26 ^{bc} ± 6	38 ^b ± 7
Ac. Protocatéquico	6,3 ^a ± 0,5	3,6 ^c ± 0,6	7,1 ^a ± 0,9	4,7 ^{bc} ± 0,5	3,5 ^c ± 0,5	5,7 ^{ab} ± 0,6
Catequina	1505 ^{bc} ± 135	1518 ^{bc} ± 173	1843 ^{ab} ± 234	1009 ^d ± 131	1276 ^{cd} ± 135	1998 ^a ± 165
Epicatequina	872 ^{bc} ± 105	1555 ^a ± 134	1132 ^{ab} ± 182	569 ^d ± 102	689 ^{cd} ± 105	773 ^{bcd} ± 129
Epicatequina-galato	89 ^{cd} ± 13	140 ^{ab} ± 16	101 ^{bcd} ± 22	73 ^d ± 12	176 ^a ± 13	123 ^{bc} ± 16
PB1	323 ^c ± 35	447 ^{ab} ± 45	507 ^a ± 61	324 ^c ± 34	257 ^c ± 35	348 ^{bc} ± 43
PB2	471 ^{bc} ± 44	605 ^d ± 56	474 ^{abc} ± 76	415 ^{cd} ± 43	321 ^a ± 44	309 ^d ± 54
Q-3-glucósido	687 ^a ± 44	200 ^c ± 56	606 ^{ab} ± 76	463 ^b ± 43	194 ^c ± 44	697 ^a ± 54
Q-3-glucurónido	266 ^b ± 14	214 ^c ± 18	348 ^a ± 24	330 ^a ± 14	277 ^b ± 14	270 ^b ± 17
Q-3-rutinósido	28 ^c ± 3	31 ^c ± 4	50 ^b ± 5	72 ^a ± 3	16 ^d ± 3	34 ^c ± 4
Quercetina	326 ^a ± 6	229 ^c ± 8	256 ^c ± 11	305 ^b ± 6	323 ^{ab} ± 6	304 ^b ± 8
SUMA	4662 ^a ± 300	5063 ^a ± 384	5410 ^a ± 520	3691 ^b ± 292	3601 ^b ± 300	4971 ^a ± 368

Unidades: IPT: mg GAE/g seco ; AA: μmol trolox/g seco; polifenoles: μg/g seco

La variedad riesling destaca por un contenido en caftárico superior al resto de variedades (Figura 65). Este comportamiento ya fue observado por Rodriguez-Montealegre et al.²⁶ que analiza la concentración en polifenoles de las pieles y semillas de las variedades riesling, chardonnay, traminer y sauvignon blanc entre otras. Por otra parte, el resto de variedades forman un grupo homogéneo con respecto a la concentración de ác. caftárico.

Existen pocas diferencias significativas para los flavonoles (catequina, epicatequina y epicatequina-galato) en las variedades experimentales y, además presentan un comportamiento heterogéneo. Solamente la variedad riesling destaca por estar siempre, en el grupo que presenta las concentraciones menores.

Para el resto de ácidos fenólicos (gálico y protocatéquico) no existen diferencias significativas para ninguna variedad de bagazo experimental (Figura 66). Y, con respecto a las procianidinas, las variedades pinot blanc y pinot gris presentan el mayor contenido en PB1, y se encuentran en el grupo con las mayores concentraciones de PB2. Para el resto de variedades no hay diferencias significativas

En general, la variedad experimental pinot blanc y sauvignon blanc presentan las concentraciones menores de los 4 flavanoles (q-3glucósido, q-glucurónido, q-3-rutinósido y quercetina). Para el resto de variedades el comportamiento es muy heterogéneo, destacando la variedad riesling por estar en general, en el grupo que presenta las mayores concentraciones.

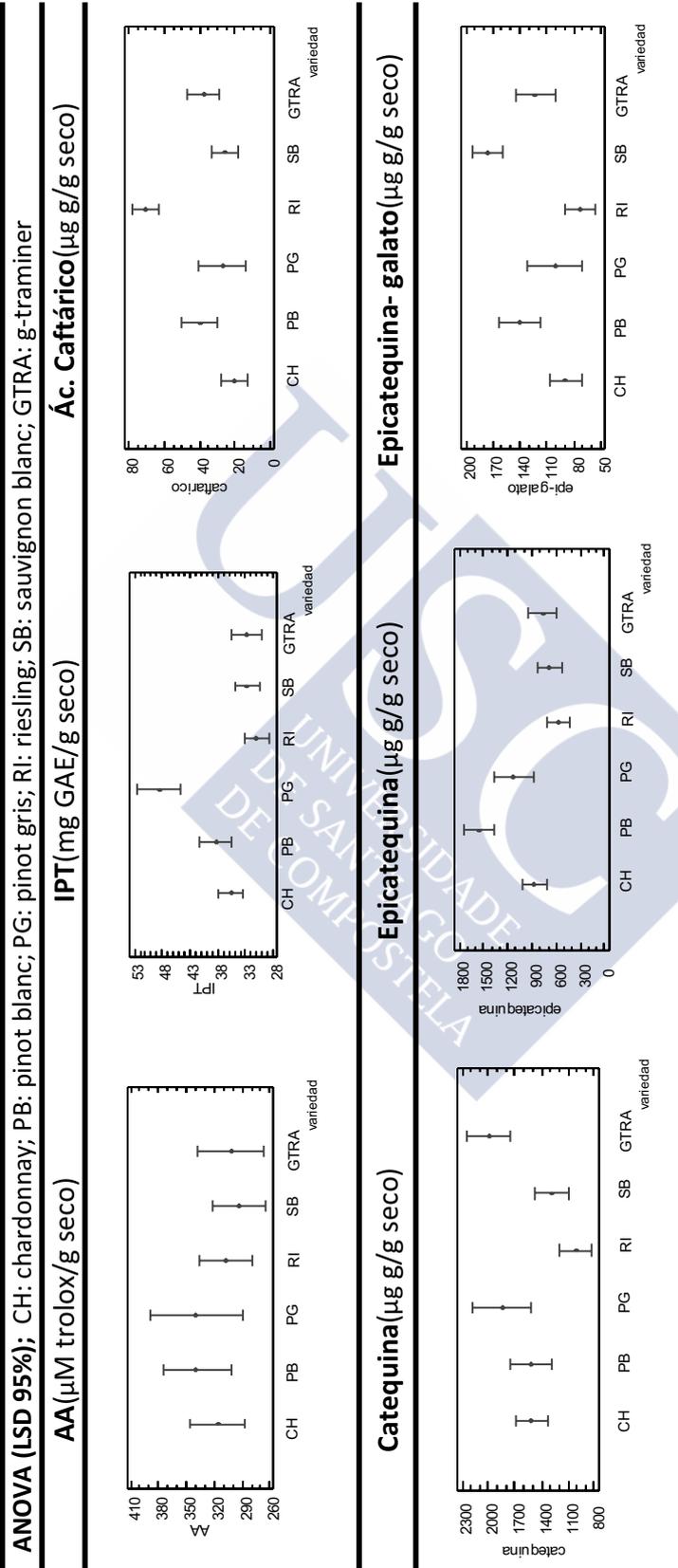
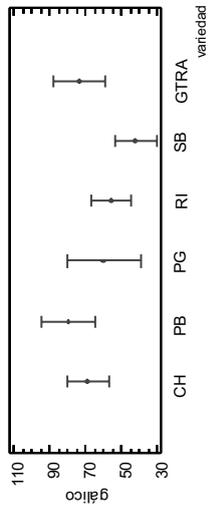


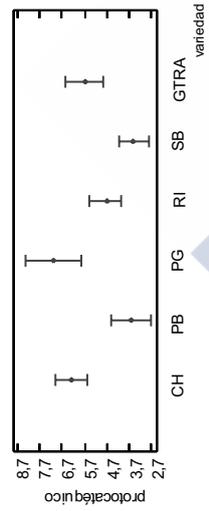
Figura 65 Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos experimentales

ANOVA (LSD 95%); CH: chardonnay; PB: pinot blanc; PG: pinot gris; RI: riesling; SB: sauvignon blanc; GTRA: g-traminer

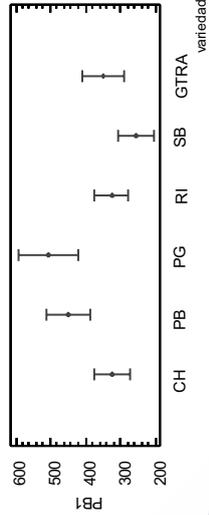
Ác. gálico (µg g/g seco)



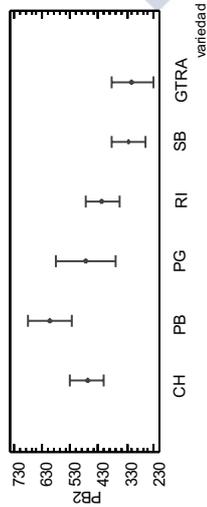
Ác. protocatéquico (µg g/g seco)



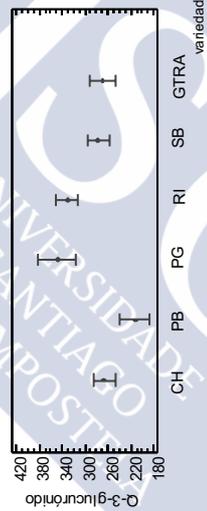
PB1 (µg g/g seco)



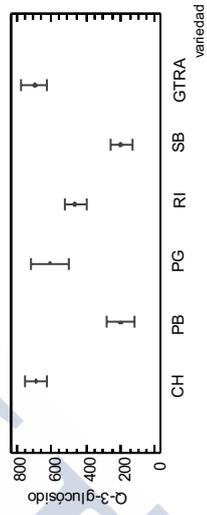
PB2 (µg g/g seco)



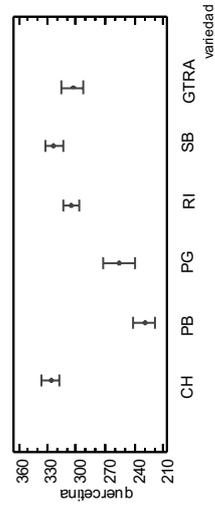
Q-3-glucurónido (µg g/g seco)



Q-3-glucósido (µg g/g seco)



Quercetina (µg g/g seco)



Q-3-rutinósido (µg g/g seco)

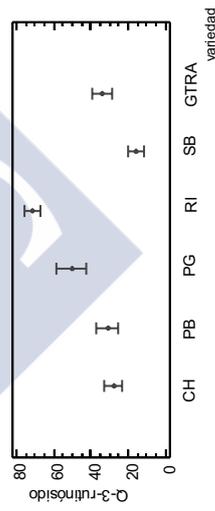


Figura 66 (Continuación Figura 65) Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los bagazos experimentales

IV.7.2. Diferenciación de bagazos de variedades experimentales cultivadas en Galicia: análisis discriminante

Las seis variedades de bagazo se diferencian con un grado de discriminación del 100% en función de su composición polifenólica.

Las variedades sauvignon blanc, pinot gris, riesling y pinot blanc forman grupos perfectamente separados. Las únicas variedades con características algo más similares serían el chardonnay y g-traminer. Por lo tanto, serían las únicas con posibilidad de confundirse (Tabla 57). Estos resultados se visualizan en la Figura 67, en la que se aprecia la separación de las muestras.

Tabla 57 Tabla de clasificación de los bagazos experimentales

VARIEDAD	Chardonnay	Pinot blanc	Pinot gris	Riesling	Sauvignon blanc	G-traminer
Chardonnay	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Pinot blanc	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Pinot gris	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Riesling	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%
Sauvignon blanc	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%
G-traminer	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%

Porcentaje de muestras clasificadas 100,00%

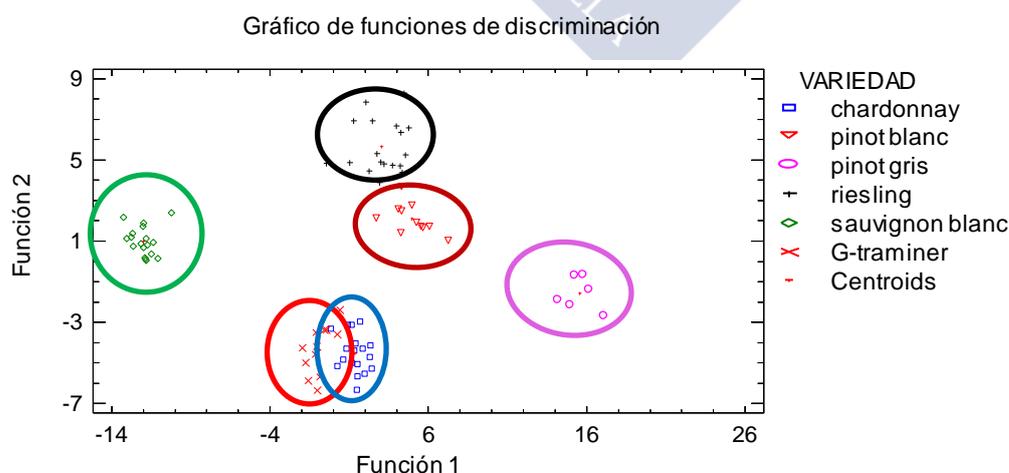


Figura 67 Representación gráfica de las funciones de discriminación por variedades experimentales

IV.7.3. Comparación de las variedades experimentales con las variedades gallegas

Si comparamos las variedades autóctonas con las experimentales podemos observar que tanto tarrantés y blanca lexítima por el lado de las autóctonas y riesling y sauvignon blanc por el lado de las experimentales, son las variedades que presentan una concentración polifenólica significativamente menor (Figura 68). El resto de variedades no presentan diferencias significativas claras. Aunque se puede afirmar que en general las variedades autóctonas presentan valores iguales o superiores a las experimentales. De todos modos, conviene recordar aquí que precisamente los bagazos de tarrantés y blanca lexítima provienen de cultivos pequeños, habiéndose obtenido por presión suave, como es el caso también de las llamadas variedades experimentales. Por lo tanto, la conclusión sobre el mayor o menor contenido en polifenoles en esta comparativa, debe tomarse con extrema cautela.

En general la distribución polifenólica para todas las variedades es la misma; en la que la catequina y la epicatequina son los polifenoles encontrados en mayor proporción y los ácidos fenólicos en menor (Figura 49 y Figura 63).

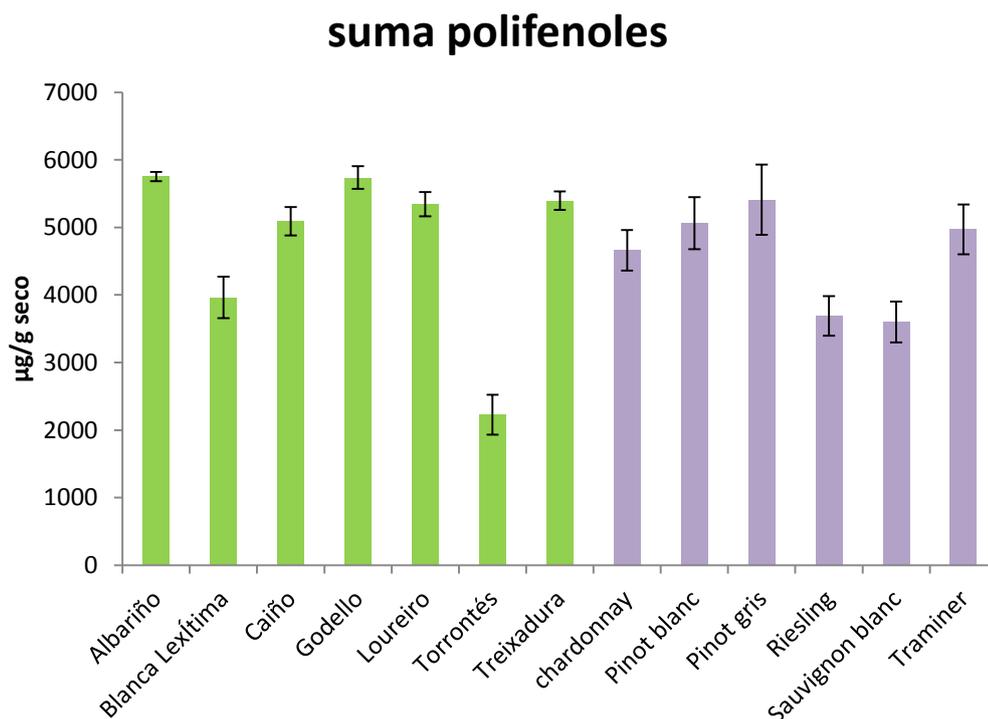


Figura 68 Comparación de la suma de polifenoles de los bagazos de las variedades autóctonas y experimentales

Al introducir los datos de las variedades autóctonas y experimentales en el análisis discriminante se observa, no sólo lo esperado, es decir, que en este caso no forman grupos completamente independientes, sino que a nivel de polifenoles, las variedades g-traminer y pinot gris se asocian con la variedad albariño, la variedad chardonnay lo hace con treixadura, el riesling tiende a confundirse con el loureiro, sauvignon blanc con godello, y por último pinot blanc está entre albariño y treixadura. Esto se observa en la tabla de probabilidades (Tabla 58).

Tabla 58 Tabla de probabilidades de confusión de las variedades experimentales con las variedades autóctonas

muestras	Varietades con las que se confunden	% Probabilidad
X01- G-traminer	Albariño	92,3
X02- Pinot gris	Albariño	99,1
X03- Chardonnay	Treixadura	90,4
X04- Riesling	Loureiro	99,9
X06-Sauvignon blanc	Godello	92,4
X07- Pinot blanc	Albariño	45,1

A continuación, en la Figura 69 se representan las funciones de clasificación del análisis con todas las variedades autóctonas (remarcadas con círculos) y las experimentales. Se observa como utilizando sólo las variables de composición polifenólica consideradas, no es posible conseguir una buena clasificación. Se necesitarían más variables para poder calificar correctamente estos bagazos.

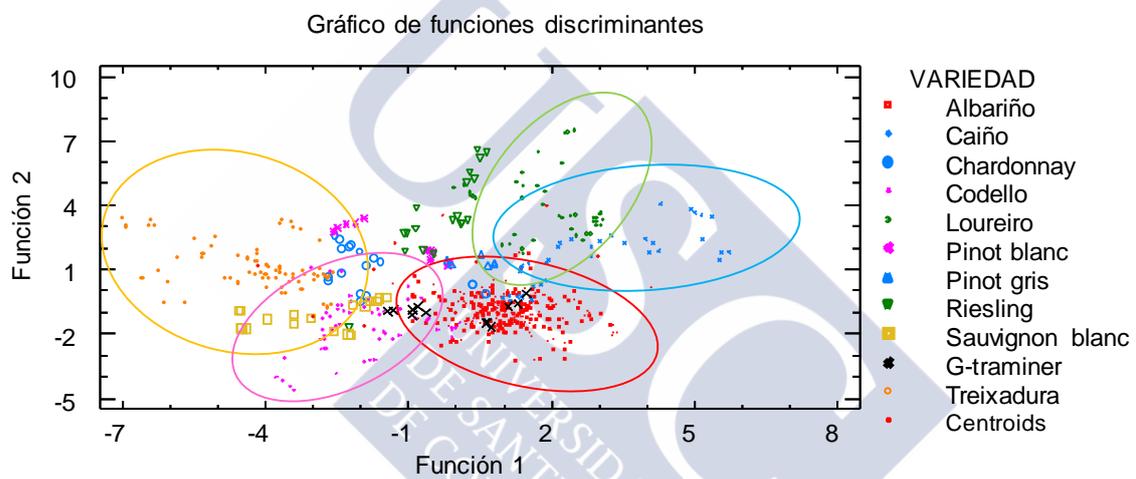


Figura 69 Representación gráfica de las funciones de discriminación de las variedades de bagazo autóctonas y experimentales

EXTRACCIÓN INDUSTRIAL DE POLIFENOLES



IV.8. Desarrollo de la metodología para la producción de un extracto polifenólico a escala industrial

El objetivo inicial de este estudio es evaluar las posibilidades de adaptación y mejora de una técnica de extracción, relativamente reciente como es la MSPD, para extraer polifenoles a partir de uva blanca, después de ser procesada por la industria vitivinícola en la producción del vino. Dentro del objetivo, se pretende además que este proceso discurra siempre mediante criterios de sostenibilidad. Esta innovación está pensada para ponerse en marcha en una empresa cosmética en particular, la cual participó en este proyecto.

A partir de diferentes pruebas a nivel de laboratorio, el proceso de extracción se adaptó hasta llegar al desarrollo de un proceso nuevo para ser explotado a escala industrial. Los ensayos permitieron optimizar aquellas condiciones idóneas para que el método sea el más económico y rápido posible.

En las pruebas preliminares se estudió la influencia de determinados factores en la extracción de polifenoles. A continuación, por medio de herramientas estadísticas, se llegó al punto óptimo del proceso. El último paso consistió en la adaptación del método a una escala a nivel industrial.

En la Tabla 24 están detalladas las medidas de cada columna y los gramos de bagazo que se utilizan en cada una.

IV.8.1. Pruebas preliminares. Influencia de diferentes factores en la extracción

Se llevaron a cabo diferentes pruebas preliminares para estudiar la influencia de factores como: el tipo de disolvente, el dispersante y su tamaño de partícula, además de posibles acciones adicionales de extracción y sus combinaciones. En la siguiente tabla (Tabla 59) se detallan los resultados de esas pruebas.

Tabla 59 Influencia de los factores estudiados en el proceso de escalado en el valor del IPT

Disolvente	IPT	
MeOH : H ₂ O (80:20)	16,08	± 0,92
EtOH : H ₂ O (80:20)	16,20	± 1,07
EtOH : H ₂ O (50:50)	18,31	± 0,25
Aguardiente	22,75	± 2,20
Butilenglicol: H ₂ O (65:35)	13,54	± 0,71
Arena/Disolvente		
Natural/EtOH	16,27	± 0,48
Natural/MeOH	16,84	± 0,59
Comercial/EtOH	16,09	± 0,21
Comercial/MeOH	15,33	± 0,47
Tamaño de arena		
< 320 µm	16,27	± 1,43
320-250 µm	16,07	± 0,34
< 250 µm	17,06	± 1,17
Maceración/Bomba		
Con/con	26,02	± 0,33
Con/sin	27,03	± 0,19
Sin/con	24,03	± 0,22
Sin/sin	17,66	± 0,21
Peso bagazo (g)		
1	15,33	± 0,47
10	21,61	± 0,68
20	24,03	± 0,19
MSPDx100 recirculación		
1ª fracción (500 ml)	16,17	± 0,76
2ª fracción (490 ml)	17,06	± 0,93
3ª fracción (480 ml)	21,82	± 0,89

IPT: mg GAE/g bagazo seco

IV.8.1.1. Influencia del disolvente

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el apartado III.10.6.2 empleando disolventes diferentes: metanol acuoso, etanol acuoso, butilenglicol acuoso y adicionalmente se evaluó la posibilidad de utilizar un coproducto de la industria vitivinícola como disolvente de extracción, aguardiente blanca; se compararon los resultados obtenidos sobre la base del

índice de polifenoles totales, expresado en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de bagazo seco (Tabla 59). Como se aprecia en esta tabla, el aguardiente y la mezcla etanol:agua (50:50) presentan los mayores valores de IPT y el butilenglicol:agua el menor. El resto de combinaciones de disolventes son similares.

IV.8.1.2. Influencia del origen de la arena

En este apartado se estudió la influencia del factor origen de la arena, combinado con diferentes disolventes (Tabla 59) y como se puede apreciar, no hay diferencias significativas ($P_{95} = 0,076$) entre los datos obtenidos con arena comercial y arena natural; ni en ninguna de las combinaciones con los disolventes ($P_{95} = 0,15$).

IV.8.1.3. Influencia del tamaño de partícula

Una vez que concluimos que el origen de la arena no tenía un efecto significativo, se estudió la influencia del tamaño de partícula de la arena. Para ello se tamizó la arena en 3 diferentes rangos de tamaños: $< 0,320$ mm, $0,320 - 0,250$ mm, $< 0,250$ mm. En la Tabla 59 se encuentran los resultados obtenidos para esta prueba.

No se observaron diferencias significativas ($P_{95} = 0,48$) según el tamaño de grano después de tamizar la arena natural por tamices de diferente luz de malla ($250-320 \mu\text{m}$).

Se elegirá así el tamaño de partícula mayor, ya que facilita la elución del disolvente y la no compactación del bagazo.

IV.8.1.4. Estudio de la maceración y la utilización de una bomba

Con el fin de mejorar la extracción, se realizaron una serie de acciones adicionales al simple paso del disolvente de extracción, para estudiar el efecto sobre la recuperación de los compuestos polifenólicos. Estas acciones

consistieron en una maceración previa del bagazo en el disolvente de extracción, la utilización de una bomba y una combinación de ambas. Todo ello sin modificar ninguna otra variable.

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el apartado III.10.6.5. Se estudia la maceración poniendo en contacto el disolvente con la mezcla durante tres horas para ser recogido finalmente por gravedad o empleando una bomba, que acelera el proceso de recuperación del eluato. La bomba utilizada tiene un caudal máximo de 7 L/min.

Después de analizar el efecto de macerar o no macerar la mezcla bagazo:dispersante con el disolvente; y la utilización o no de una bomba, se concluye que el proceso de extracción mejora con ambos: maceración y bombeo (Tabla 59).

IV.8.1.5. Influencia del tamaño de muestra.

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el apartado III.10.6.6, pero empleando diferentes cantidades del bagazo inicial: 1, 10 y 20 g. Los resultados demuestran que a medida que aumenta la masa de bagazo, manteniendo constante la relación muestra:dispersante, la extracción de polifenoles aumenta (Tabla 59).

IV.8.1.6. Influencia de la recirculación

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el apartado III.10.6.7, pero en este caso la cantidad de muestra inicial fue de 100 g mezclados con 200 g del dispersante. Para estos experimentos se empleó una columna ($\times 100$). Se emplearon 500 mL de una mezcla EtOH: H₂O 50:50, que se recirculó tres veces. Los datos se muestran en la Tabla 59, donde observa solamente un ligero aumento del IPT, por lo que se concluye que la mínima mejora en la extracción no compensa el tiempo invertido en la recirculación.

IV.8.1.7. Estudio de los bagazos de otras variedades y de otra matriz polifenólica: semillas de uva

Aunque en Galicia la variedad mayoritaria es el albariño, existen otras variedades de bagazo de uva blanca que presentan también potencial para su revalorización. Por este motivo se estudiaron otras variedades muy apreciadas como son el godello, treixadura, caíño blanco y loureiro. Cada una de ellas con un perfil polifenólico diferenciado que producirá un extracto único.

Además, se realizó el mismo tipo de extracción pero utilizando sólo las semillas de uva albariño. Los resultados se reflejan en las siguientes figuras (Figuras 70 y 71), y como se puede ver, todas ellas serían aptas para proceder a su revalorización. En relación a las semillas de uva, los resultados tanto de IPT como de AA resultaron muy superiores a los presentados por los bagazos. Por lo tanto las semillas son otra alternativa ya que son una fuente muy buena de polifenoles. Los datos pueden verse en el ANEXO I, apartado VI.1.1.

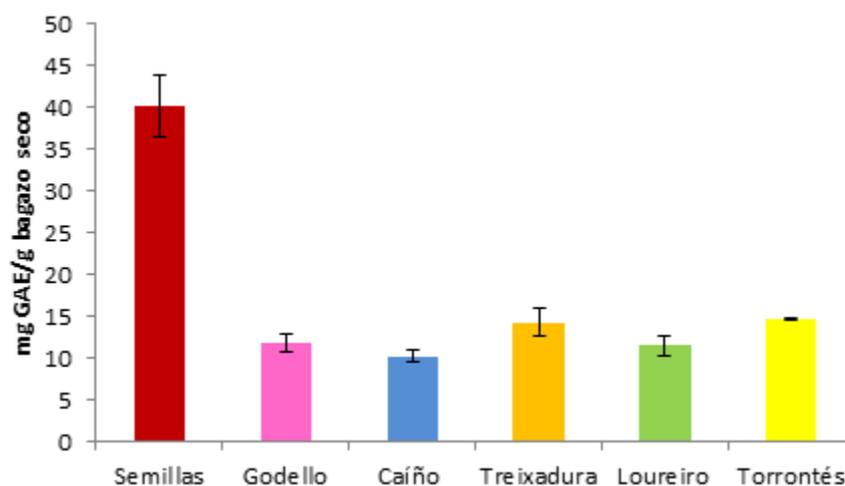


Figura 70 Valores de IPT de las variedades alternativas de bagazo blanco y semillas

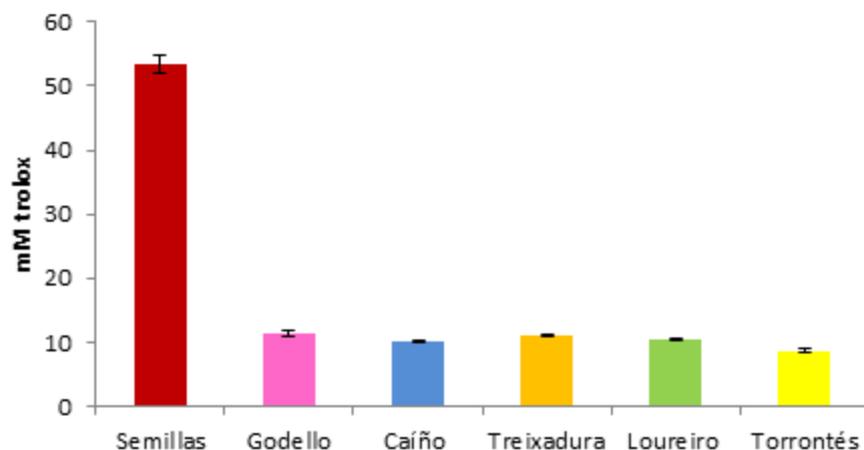


Figura 71 Valores de AA de las variedades alternativas de bagazo blanco y semillas

IV.8.1.8. Conclusiones previas a la optimización final del proceso industrial

- El efecto de la maceración es un factor importante a tener en cuenta.
- La recirculación no aumenta en gran medida la cantidad de polifenoles totales en el extracto final.
- La proporción óptima de disolvente orgánico y agua está en torno al 50%.
- El tamaño de partícula no es importante para este dispersante en particular y en las condiciones experimentales evaluadas.

IV.8.2. Optimización de las condiciones finales de extracción

Realizadas las pruebas preliminares para conocer la influencia de algunos factores como el disolvente, tipo de dispersante, etc, se llevaron a cabo dos diseños experimentales para la optimización del proceso de extracción.

Aunque en las pruebas preliminares con el disolvente glicol:agua no se consiguieran las mejores extracciones, en los siguientes diseños se utilizó este disolvente debido a que es un producto muy utilizado en el sector cosmético, sector industrial al que en un principio está dirigido este tipo de extracto.

IV.8.2.1. Diseño de Cribado

Para optimizar el proceso de extracción de polifenoles a partir de bagazo de uva blanca de la variedad albariño, se procede a la realización de un diseño experimental factorial de tipo Cribado.

Se realizan 20 experimentos para evaluar 4 factores principales que afectan al proceso: cantidad de dispersante, % de glicol en la mezcla de disolventes de extracción, eficacia de la maceración y efecto de la temperatura.

Las variables respuesta que se han medido han sido: IPT y AA. La tabla de los resultados obtenidos para los 20 experimentos se puede ver en ANEXO I, apartado VI.1.2.

A continuación se muestran las cartas Pareto obtenidas al procesar los datos experimentales, de cuyo análisis se deduce que el único factor significativo a esta escala es el % de glicol en la mezcla de disolventes de extracción. Tanto para el IPT como para la AA el efecto de este factor es positivo, es decir cuanto más glicol mayor valor para estas variables (Figura 72).

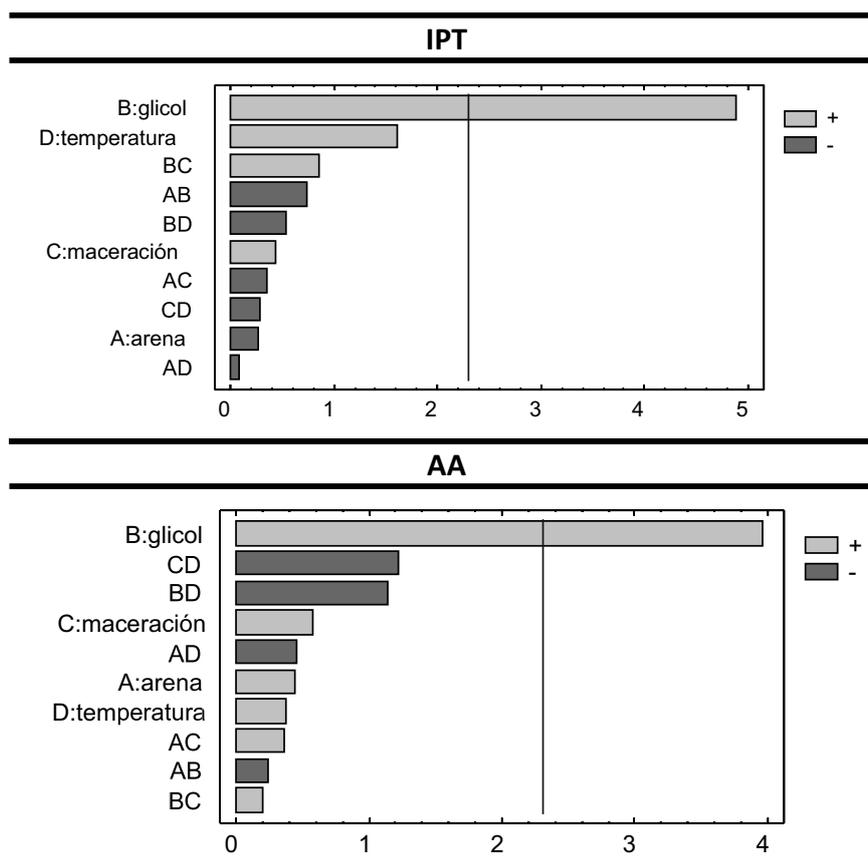


Figura 72 Cartas Pareto del diseño experimental de Cribado (Escalado)

IV.8.2.2. Diseño de Superficie de Respuesta

Una vez se cribaron las variables más significativas en el apartado anterior, se realizó un diseño del tipo Superficie de Respuesta para realizar un ajuste más fino y así poder encontrar el punto óptimo en este proceso.

De esta manera se estudió el porcentaje de glicol en la mezcla de disolventes y también se introdujo la cantidad de arena como factor. El resto de los factores se mantienen constantes (apartado III.10.6.9). A continuación se muestran las cartas Pareto obtenidas junto con los gráficos de efectos principales (Figura 73).

Los datos obtenidos en este diseño experimental se pueden ver en el ANEXO I, apartado VI.1.2.

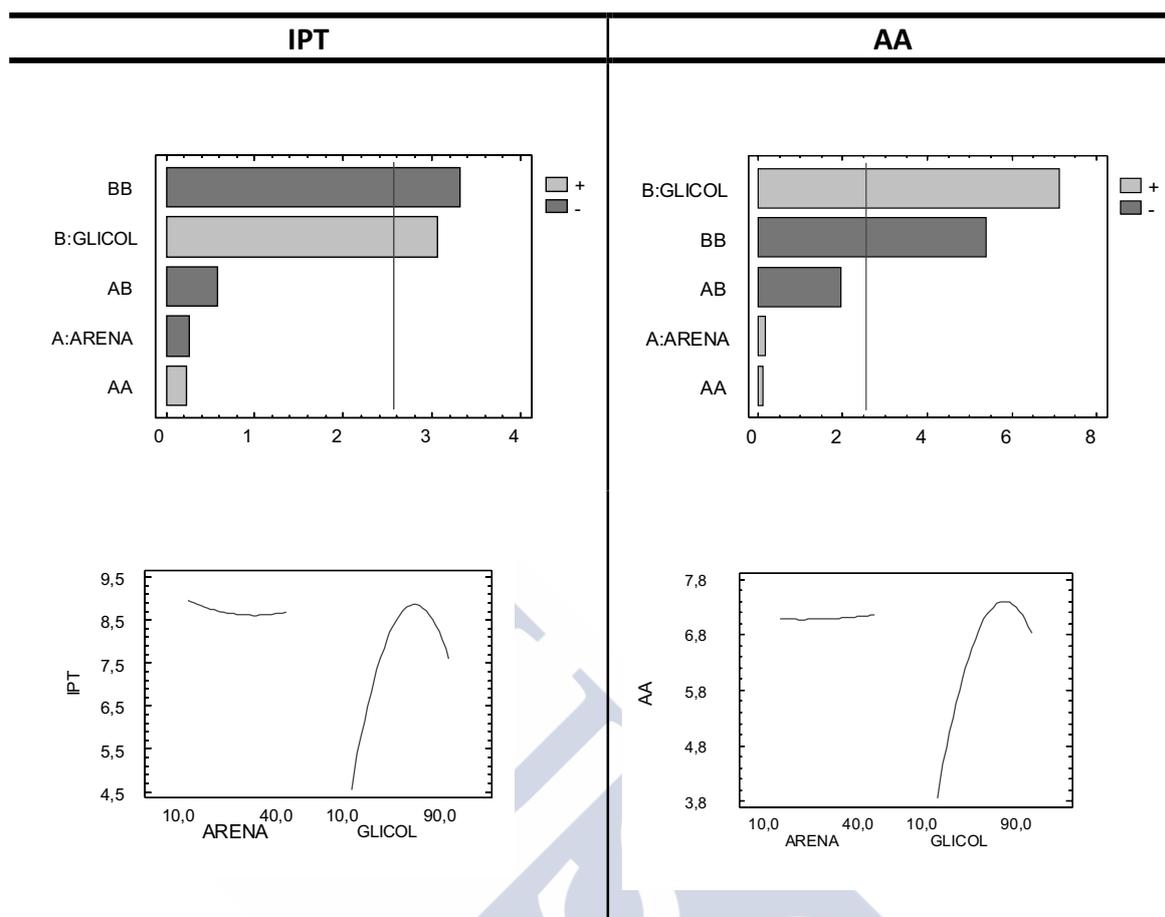


Figura 73 Cartas Pareto y efectos principales en el diseño de "Superficie de Respuesta" (Escalado)

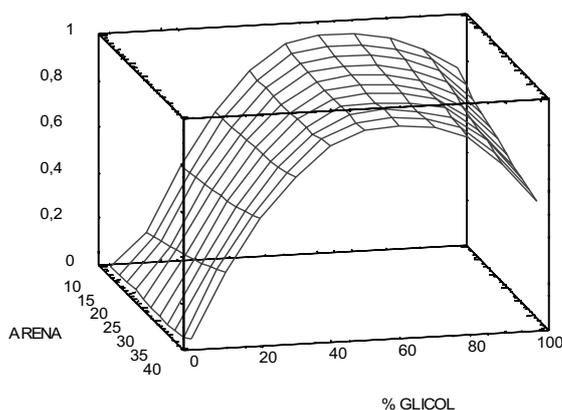
Como se puede ver en la tabla anterior, se confirma que el único parámetro significativo fue el porcentaje de glicol en la muestra de disolvente, mientras que la cantidad de arena utilizada no afecta a la concentración final de polifenoles en el extracto. Cabe destacar, que para el caso del glicol (factor B), la interacción consigo mismo también es significativa para ambas variables de respuesta. Esto indica una relación cuadrática entre el % de glicol y el IPT o la AA, estando el óptimo en ambos casos más cerca del máximo porcentaje del glicol evaluado, pero disminuyendo ambas magnitudes experimentales al acercarse al límite superior del dominio experimental.

Para calcular el valor óptimo de cada factor se optimizó la respuesta de cada uno, y se concluyó como se puede ver en la Tabla 60 que el % de glicol óptimo es de 65% y la masa de dispersante óptima son 10 g de arena.

Tabla 60 Datos optimizados para el diseño de "Superficie de Respuesta" (Escala)

Datos optimizados	
Factor	Valor óptimo
arena	10 g
%glicol	65%

Superficie de Respuesta estimada



IV.8.2.3. Condiciones finales optimizadas

Una vez realizadas las pruebas preliminares y los diseños estadísticos, se concluyó que todos los parámetros para llevar a cabo la extracción con glicol en columna estaban optimizados, a nivel de laboratorio, y son los que están reflejados en la Tabla 61. Los factores que no son significativos se eligieron de tal forma que el proceso de extracción fuera lo más eficiente posible.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la cantidad de arena no es un factor significativo, dependiendo de las necesidades en la escala industrial, se puede elegir una u otra cantidad.

Tabla 61 Condiciones finales optimizadas a escala de laboratorio en el proceso de escalado

Factor	Valor optimizado
Volumen eluído	50 mL
Gramos de bagazo	20 g
Necesidad de maceración	No
Temperatura	ambiente
Gramos de arena	10 g
% glicol	65%

IV.8.3. Escalado y adaptación del proceso a un tamaño industrial

El tipo de columna a la que se quiere adaptar el proceso de extracción es una columna de acero (Figura 23) que está siendo utilizada actualmente en la empresa de la industria cosmética colaboradora en este proyecto.

El proceso optimizado en los anteriores apartados se adaptó para ser utilizado en la columna industrial. Para ello se llevaron a cabo una serie de pruebas en etapas en las que se analizó el IPT y la AA de cada extracto correspondiente y así llegar a obtener los mejores resultados con el proceso más eficiente.

La Figura 74 compara la concentración en polifenoles de los experimentos del diseño de Cribado con las primeras pruebas en esta columna industrial y, como se puede observar en las primeras pruebas realizadas en la columna industrial (EXP.1, EXP.2 y EXP.3), la concentración de polifenoles en el extracto no supera las pruebas realizadas en las columnas a nivel de laboratorio. Por este motivo, para la EXP.6 se llevaron a cabo una serie de ajustes y modificaciones en el proceso, y como se puede observar la extracción de polifenoles se multiplicó por tres.

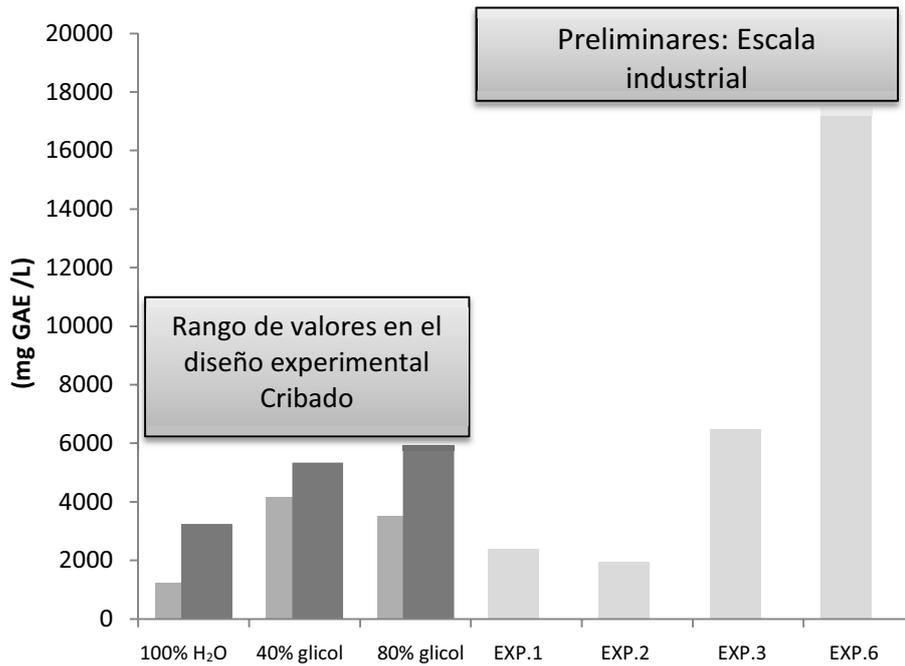


Figura 74 Comparación de los valores de IPT en las extracciones del diseño experimental a escala de laboratorio y a escala industrial

La Figura 75 compara la AA de los extractos producidos en la columna industrial, y como se puede observar, los resultados de la última prueba de extracción (EXP.6) presentan una AA ocho veces superior a la de las primeras extracciones.

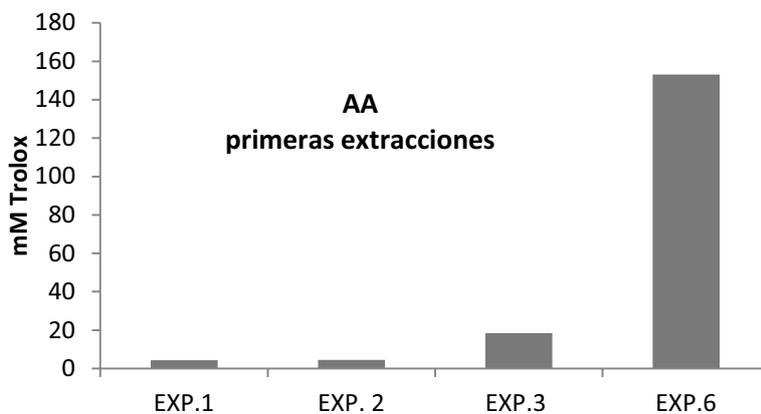


Figura 75 Comparación de los valores de AA en las primeras extracciones con la columna industrial

Se concluye así que el proceso desarrollado en la prueba EXP.6 es óptimo para la extracción de polifenoles a escala industrial.

Como última etapa, se procede a la filtración adicional de cada uno de los extractos obtenidos, para que la empresa de ingredientes para cosméticos valore el resultado (Figura 76). Finalmente, se optó por la filtración de los extractos por un tamaño de poro de 5 micras.



Figura 76 Comparación visual de los extractos filtrados y sin filtrar

El extracto así obtenido, es el extracto objetivo, y es al que la empresa de cosméticos Caroi Line Cosmética ha denominado **UVARIÑO®** según la marca previamente registrada (Figura 77).

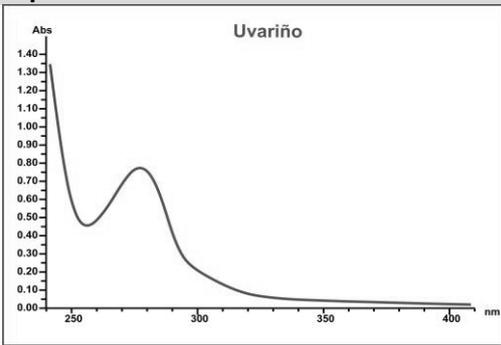


Figura 77 Uvariño®

IV.8.3.1. Caracterización del extracto

Una vez conseguido el extracto final, se llevó a cabo su caracterización. A continuación se muestra una tabla con las características más importantes.

Tabla 62 Características del extracto final

Propiedades		Índices espectrofotométricos	
Apariencia, 20°C	Líquido anaranjado	IPT	17181mg GAE/L
Olor	Aroma característico	AA	76,6 dm
Densidad	1,049 g/mL	Polifenoles identificados	
pH	4,15	Ác. gálico Ac. caftárico Catequina Epicatequina Epicatequina-galato Procianidina B1 Procianidina B2 Quercetina-3-glucósido Quercetina-3-glucurónido Quercetina-3-rutinósido Quercetina	
Espectro U			
			
UVB	Abs _(280nm) = 0,754		
	Abs _(320nm) = 0,080		
UVA	Abs _(350nm) = 0,042		
	Abs _(400nm) = 0,022		

IV.8.3.2. Evaluación de la robustez del proceso

Para evaluar la robustez del procedimiento descrito en términos de variabilidad, estimada como coeficiente de variación de las variables respuesta medidas, se realizó el proceso a escala industrial por quintuplicado, manteniendo constantes las condiciones experimentales. Las variables que se analizaron fueron los dos índices espectrofotométricos (IPT y AA) y los polifenoles ác. gálico, catequina, epicatequina y la suma tres de las quercetinas (quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y quercetina). Los datos medios obtenidos se resumen en la siguiente Tabla 63. En el ANEXO I, apartado VI.1.3 se detallan todos los datos experimentales obtenidos en los ensayos de robustez (EXP. 6-8, 10-13).

Tabla 63 Evaluación de la robustez del proceso industrial

	promedio	CV%
IPT	16969	5
AA	146	19
Ác. gálico	95,4	6,7
Catequina	709,5	7,7
epicatequina	699	13
Suma quercetinas	40,2	12,4

IPT: mg GAE/L; AA: mM trolox; polifenoles: ppm

La variabilidad es inferior al 13,5% excepto para la AA que fue de un 18,8% perfectamente asumible conociendo las limitaciones experimentales. Estos datos confirman la robustez del proceso que, se verá previsiblemente mejorada cuando el procedimiento se implante en la empresa, ya que el hecho de poder regular la presión en la elución del disolvente, mejorará con seguridad la repetibilidad de las extracciones.

IV.8.4. Estudio de la actividad antibacteriana del extracto

IV.8.4.1. Valoración cualitativa de la actividad antibacteriana

En este apartado se describen los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo para medir la actividad antimicrobiana del extracto obtenido frente a tres bacterias Gram + (*S. aureus*, *Bacillus spp.*, *P. acnes*). Esta valoración cualitativa de la actividad antibacteriana se ha realizado mediante pruebas de difusión en disco/pocillo. Estas pruebas se basan en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Después de 24 h de incubación se midió el tamaño del halo de inhibición. Este halo, no es más que la zona alrededor del lugar donde se aplicó el agente antimicrobiano, el cual difundió a través del agar y produjo una inhibición del crecimiento bacteriano.

En la Figura 78 se muestra la foto del ensayo de resistencia-sensibilidad al agente antimicrobiano, donde puede observarse como en una placa totalmente cubierta por *S. aureus*, aparece el “halo de inhibición del crecimiento” generado por el extracto concentrado obtenido como se describe en el apartado III.11.1.

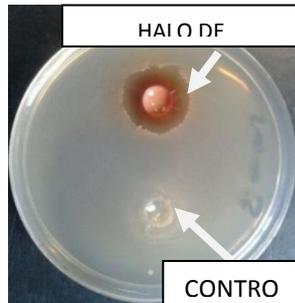


Figura 78 Prueba del estudio de inhibición del extracto polifenólico en la bacteria *S. aureus*

En el centro de la placa, puede verse un control llevado a cabo con el disolvente de elución de los extractos y en donde no aparece el halo inhibitorio. Confirmando de esta manera que el disolvente no ejerce ningún tipo de inhibición frente a la bacteria determinada.

En la Figura 79 puede verse el resultado del ensayo para las tres bacterias estudiadas con el extracto glicólico. En ellas aparece el halo de inhibición del crecimiento generado por el extracto en dos diluciones diferentes, siendo el diámetro del halo de inhibición proporcional a la concentración del extracto. También se muestra en la figura los dos controles correspondientes al butilenglicol acuoso (65/35) (disolvente de elución de los extractos) y en donde no aparece el halo inhibitorio.

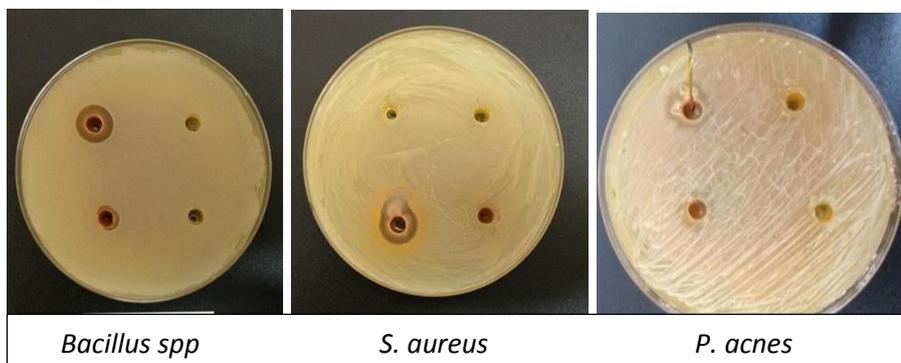


Figura 79 Estudio de la actividad antibacteriana del extracto en *Bacillus spp.*, *S. aureus*, *P. acnes*

IV.8.4.2. Valoración cuantitativa de la actividad antibacteriana

Para determinar de una forma cuantitativa la actividad antibacteriana del extracto se llevó a cabo la determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI) en las tres bacterias Gram+ utilizadas en el ensayo anterior. El procedimiento llevado a cabo está explicado en el apartado III.11.2. Los resultados se valoraron por el método de recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) en placa.

Una vez realizadas las pruebas preliminares y comprobada la no influencia del vehículo en la inhibición del crecimiento de bacterias Gram +, se procedió a ajustar con más exactitud la CMI para *S. aureus*, *Bacillus spp* y *P. acnes*, utilizando como referencia los valores obtenidos en el estudio anterior. La Figura 80 muestra los resultados obtenidos para *S. aureus* y *Bacillus spp*.

Los valores de CMI para las bacterias estudiadas han sido los siguientes:

S.aureus: 1,25-1,5 %

Bacillus spp: 1-1,25 %

P. acnes: 1-1,5 %

Esto indica que pequeñas diluciones del extracto, de entre 1 y 1,5 mL en 100 mL de medio pueden inhibir el crecimiento visible de los microorganismos después de su incubación.

Autores como Katalinic et al.⁵⁴ estudiaron la actividad antibacteriana de extractos de la piel de uva y obtuvieron resultados similares para *S .aureus* y *Bacillus cereus*. En otro estudio, sobre la actividad antibacteriana de extracto de semillas de uva realizado por Jayaprakasha et al.¹⁶⁵ , también vieron inhibición para *S. aureus* y *Bacillus* entre otras, y los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados en este trabajo, incluso cuando el extracto es de semillas. Y como comprobamos en el apartado IV.8.1.7 el extracto de semillas presenta una concentración de polifenoles totales y una AA muy superior al de los bagazos. Esto indica que no todos los polifenoles presentan la misma

capacidad antimicrobiana y que por lo tanto una mayor concentración de polifenoles no siempre implicará una mayor actividad antibacteriana.

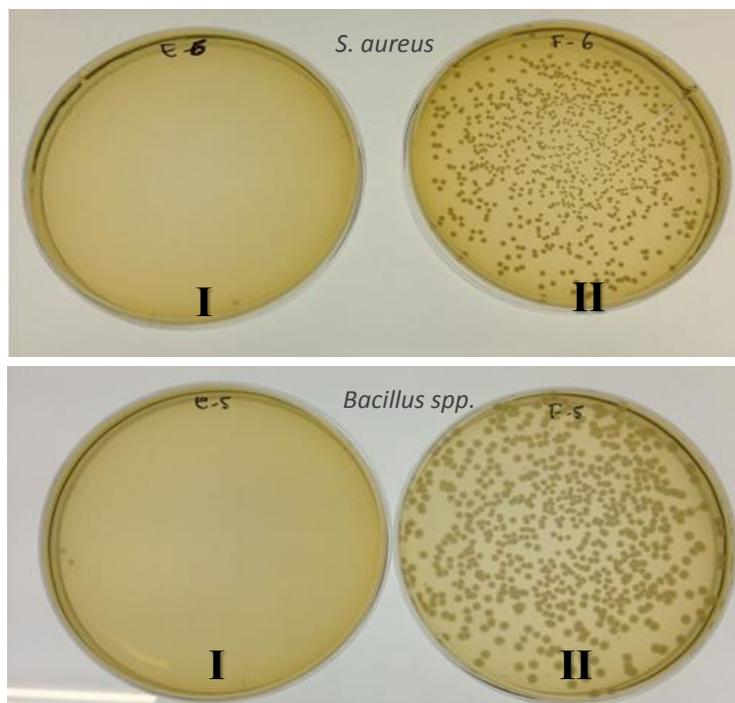


Figura 80 Estudio de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto polifenólico para *S. aureus* y *Bacillus spp.*

Esta elevada capacidad antibacteriana del extracto polifenólico de bagazo frente a estas bacterias en particular, lo hace un potente agente anti-acné, ya que tanto la *S. aureus* como la *P. ácnies* están relacionadas con la aparición de esta patología.

IV.8.5. Estudio de la estabilidad del extracto

Para estudiar la influencia de diferentes factores en el almacenamiento del extracto y poder así elegir la forma más correcta de conservación del mismo, se llevó a cabo este estudio a lo largo de un año. Los detalles del procedimiento están en el apartado III.12.

Todos los datos recogidos en el estudio de estabilidad se detallan en las tablas correspondientes del ANEXO I, apartado VI.1.4. La siguiente tabla

resume los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los datos, dónde un valor de $p > 0,05$ indica que no existen diferencias significativas; y que, por lo tanto, el extracto permanece estable en relación del parámetro evaluado (Tabla 64).

Tabla 64 Datos estadísticos del estudio de estabilidad del extracto polifenólico

	Luz/oscuridad		O ₂ /N ₂		RT/4°C/-20°C	
	t	p	t	p	t	p
IPT	-0,36	0,72	0,003	0,10	22,07	0,0000
AA	-0,34	0,74	-0,82	0,41	0,46	0,21
Ác. gálico	0,75	0,46	3,29	0,002	14,64	0,0000
Catequina	1,92	0,06	-1,74	0,09	4,44	0,02
Epicatequina	0,56	0,58	-1,30	0,20	5,12	0,01
Suma quercetinas	0,34	0,73	0,07	0,94	5,13	0,01
λ=420nm	0,11	0,91	2,63	0,01	3,17	0,051
λ=520nm	-0,24	0,82	2,63	0,01	2,54	0,09
λ=620nm	-1,81	0,08	0,16	0,87	1,71	0,19
Ác. ascórbico	0,04	0,97	-0,10	0,92	6,22	0,003

RT: temperatura ambiente

Al comparar las diferentes formas de almacenamiento se puede ver como la ausencia o presencia de luz no afecta a la estabilidad del extracto.

En el caso de la presencia de O₂ en el espacio de cabeza, esta presenta una influencia apreciable en el oscurecimiento del extracto (420 y 520 nm). En la Figura 81 se muestra la evolución de forma visual, para cada uno de los supuestos casos de almacenamiento.

Estas medidas se realizaron para observar el posible cambio de color de las muestras que en algunos casos podrían tener consecuencias no deseadas en el extracto final.

Cómo se puede observar en la Figura 81, la mayor evolución en el color se da en los viales almacenados en presencia de O₂, a temperatura ambiente y ausencia de luz. En las demás circunstancias se mantiene en gran medida el color original. Es decir, el único cambio significativo en la evolución del color sucede en los extractos con presencia de oxígeno en su espacio de cabeza.

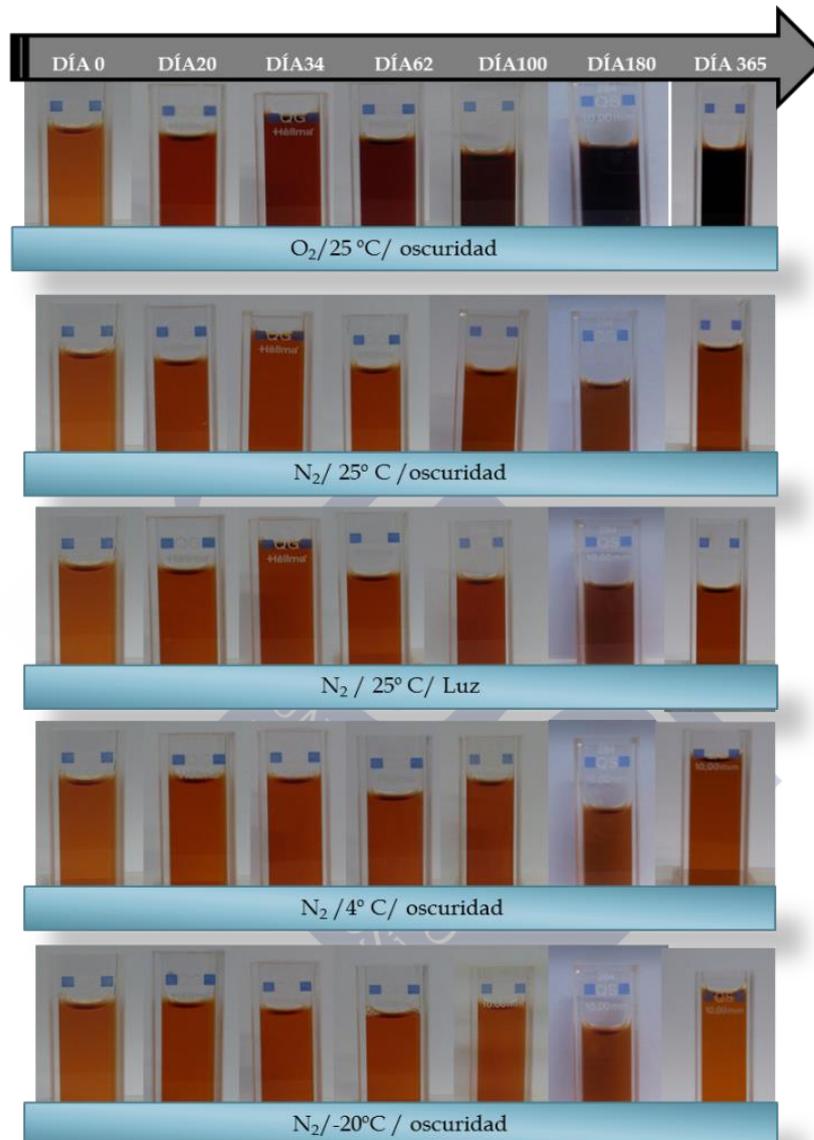


Figura 81 Evolución del color en el extracto polifenólico durante el estudio de estabilidad

La presencia de O₂, también afecta en gran medida a la concentración de ác. gálico, la cual aumenta significativamente a lo largo del tiempo de almacenamiento (Tabla 64), debido, tal vez, a la ruptura de otros polifenoles que presenten la molécula de ác. gálico en su estructura, sobre todo flavanoles

unidos a ácido gálico como por ejemplo la epicatequina-3-galato o la epigalocatequina-3-galato (Figura 82).

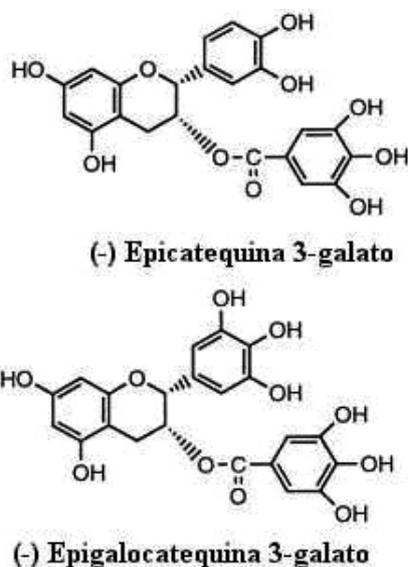


Figura 82 Estructura de la epicatequina-3-galato y la epigalocatequina-3-galato

El factor temperatura de almacenamiento ejerce la mayor influencia en las variables controladas en el estudio. Aun así, no existen diferencias significativas ni para la AA ni para la evolución del color (420, 520, 620 nm). En el resto de variables, sí que presentan cambios significativos:

Para el IPT hay un aumento significativo cuando el extracto se almacena a temperatura de congelación. Para el resto de factores el extracto permanece estable a lo largo del tiempo (Figura 83).

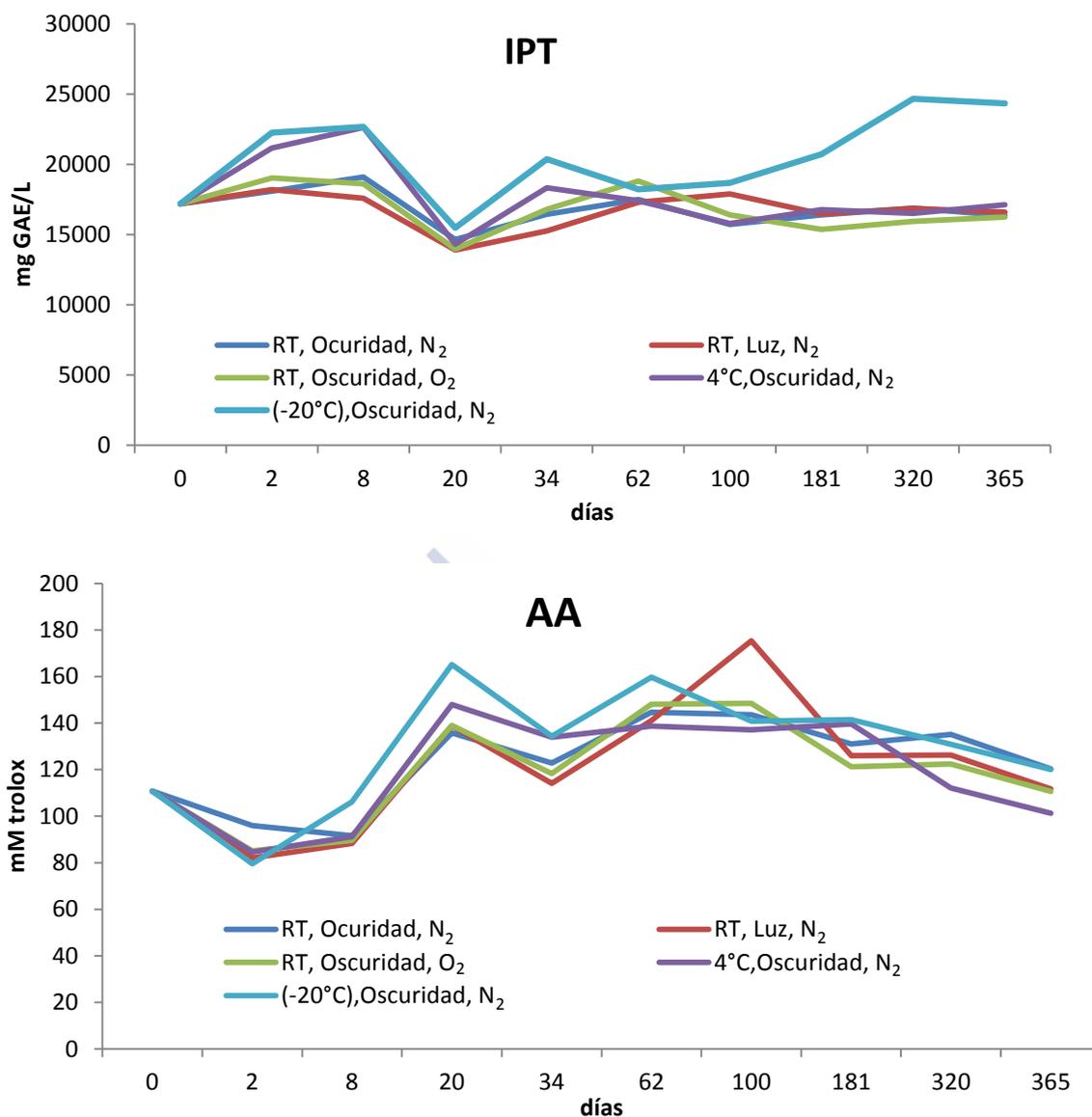


Figura 83 Evolución del IPT y AA del extracto polifenólico en el estudio de estabilidad

Con respecto al ácido gálico existe un aumento significativo en los extractos sometidos tanto a temperatura ambiente como a refrigeración. A congelación permanece estable (Figura 84). Este hecho puede ser debido, como ya se comentó, a la degradación de compuestos que presenten ácido gálico en su estructura. De este modo liberarían el ácido gálico y podría así aumentar su concentración total.

En cuanto a la catequina, se produce una disminución de su concentración a temperatura ambiente. Si se mantiene a refrigeración o congelación, se mantiene estable (Figura 84).

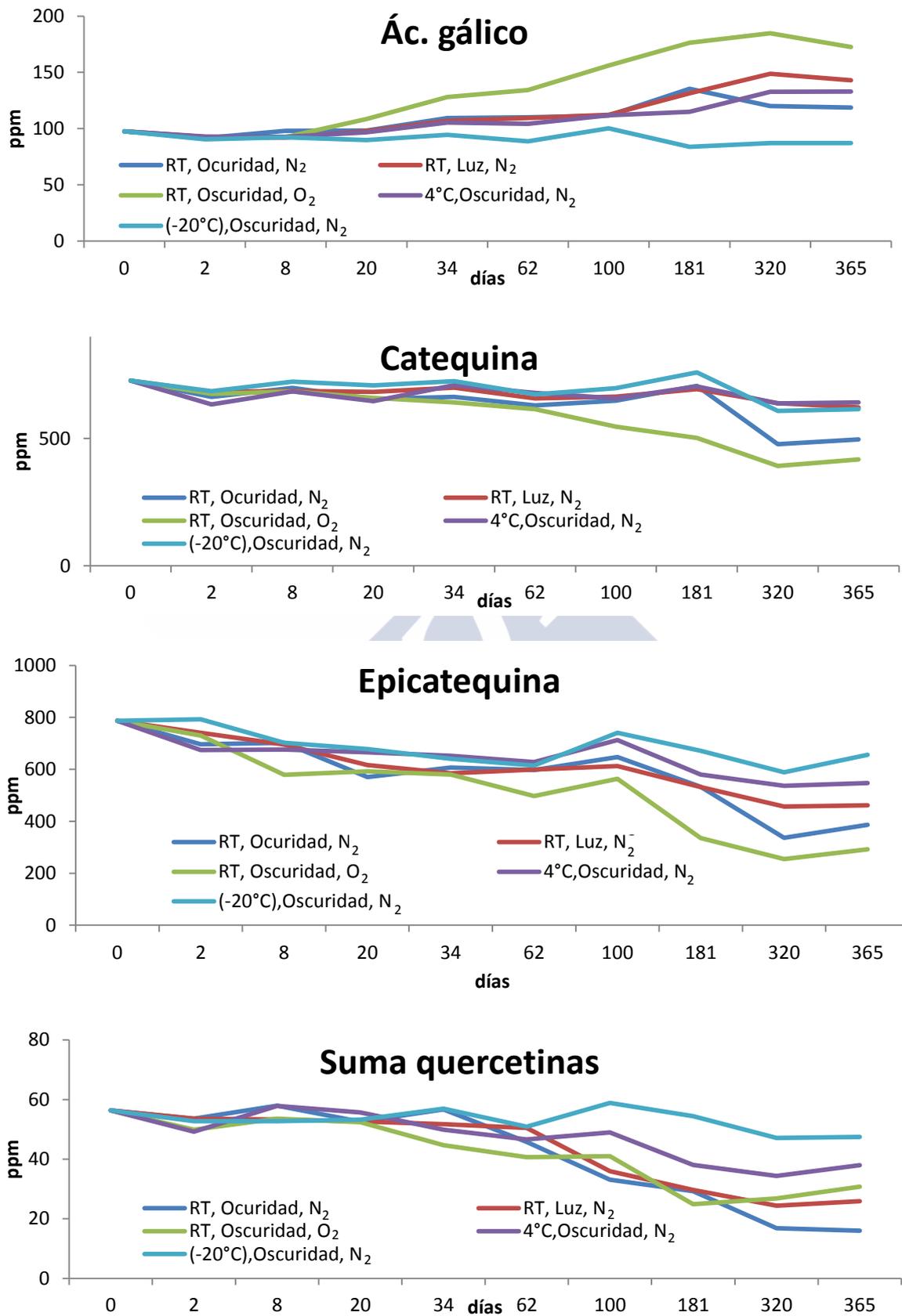


Figura 84 Evolución de la concentración del ácido gálico, catequina, epicatequina y suma de quercetinas del extracto polifenólico durante el estudio de estabilidad

Tanto la epicatequina como la suma de las quercetinas son los compuestos más inestables que hemos controlado. En todos los casos se produce una disminución de su concentración sobre todo a temperatura ambiente, donde se llega a perder casi el 50% para la epicatequina y más del 70% en el caso de las quercetinas. A temperatura de congelación es la forma de almacenamiento donde se pierde el % menor, solamente el 16% aproximadamente en ambos casos (Figura 84). Estos resultados son similares a los encontrados por Van der Sluis¹⁶⁶. Estos autores también observaron que tanto la epicatequina como varias quercetinas glucosiladas presentaban más inestabilidad que otros compuestos polifenólicos durante el almacenamiento.

En el estudio realizado por Murakami et al.¹⁶⁷, donde estudian la estabilidad térmica de varios compuestos polifenólicos entre ellos la quercetina-3-rutinósido, observaron que esta presentaba la mayor inestabilidad al aumento de la temperatura, comparado con el resto; degradándose más rápidamente que ácidos fenólicos como el clorogénico. Además comprobaron que de los productos de descomposición de los polifenoles presentan también AA. Este es el motivo de que la AA del extracto permanezca estable en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas, aunque algunos de los polifenoles presentes inicialmente no lo hagan.

Por otra parte se estudió también la estabilidad de un antioxidante natural como es el ácido ascórbico en el mismo disolvente que el extracto. Y como se puede observar en la siguiente figura (Figura 85), se comportó de forma similar al extracto. Resultó más inestable a temperatura ambiente, además de presentar una coloración amarillenta en los viales en presencia de oxígeno donde pierde casi el 40% de su AA.

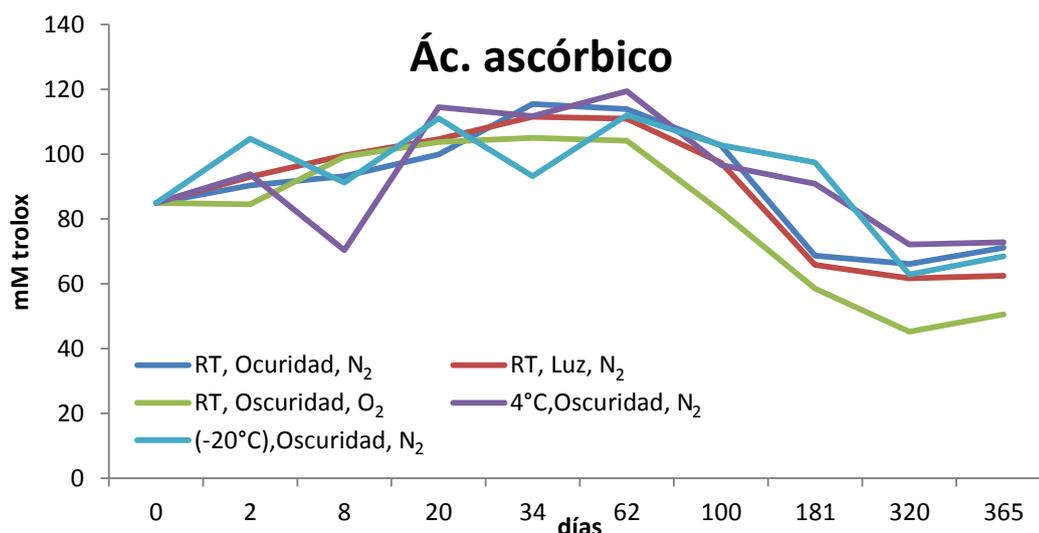


Figura 85 Evolución de la AA de la disolución de ácido ascórbico durante el estudio de estabilidad

IV.8.5.1. Conclusiones al estudio de estabilidad

De este análisis se concluye que el extracto es estable durante un año de almacenamiento, pudiendo ser perfectamente utilizado como un ingrediente en un producto cosmético. Los únicos compuestos que no presentan una gran estabilidad son la epicatequina y las quercetinas. Aun así, el extracto es estable en general si se mantiene a bajas temperaturas. Por otra parte hay que tener en cuenta que el oxígeno ejerce un cambio sustancial en el color del extracto final. Aun así, hay que resaltar que las concentraciones habituales de este tipo de extractos naturales en la industria cosmética no suelen superar el 5% (con % todavía menores en la industria alimentaria); por lo que estos pequeños cambios en la apariencia física del extracto no deberían repercutir en la del producto final.

IV.8.6. Comparación de la AA del extracto con otros antioxidantes comerciales

Se comparó la actividad antioxidante del extracto con la de otros antioxidantes sintéticos comerciales muy utilizados como son el BHT y BHA y con un antioxidante natural como es el ácido ascórbico. La eficacia para

eliminar radicales libres se calculó como se detalla en la sección de metodología correspondiente (apartado III.4.2).

Los resultados obtenidos expresados como la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) fueron de 159 mg GAE/L para el extracto obtenido en el ejemplo 2. Los datos para los antioxidantes sintéticos de referencia fueron 205 mg/L y 1003 mg/L para el BHA y el BHT, respectivamente. Y para el ácido ascórbico fue 134 mg/L.

Como se puede ver en la siguiente gráfica (Figura 86) el extracto presenta una AA 6,3 veces superior al BHT y 1,3 veces superior al BHA. Jayaprakasha et al.¹⁶⁵ encontraron resultados similares con respecto a la comparación del BHA con un extracto polifenólico de semillas de uva, que en principio debería contener más polifenoles y presentar una AA muy superior a la de los extractos de bagazo como ya se comprobó en el apartado IV.8.1.7.

En cuanto a la comparación con el ácido ascórbico resultó que este es 1,2 veces superior.

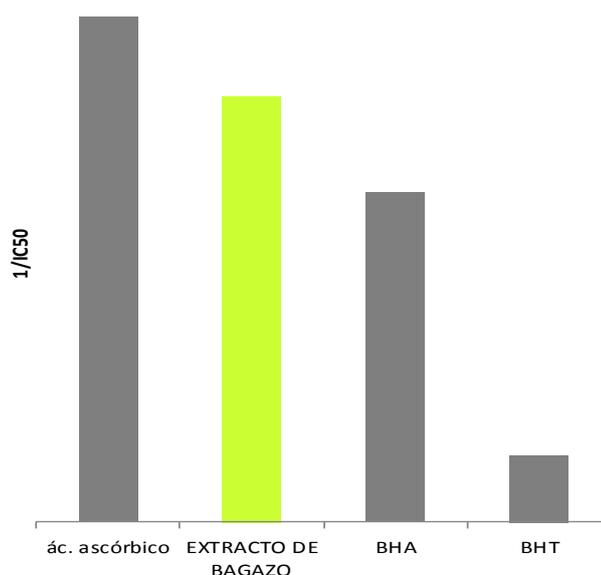


Figura 86 Comparación del IC_{50} del extracto polifenólico, el ácido ascórbico y los antioxidantes sintéticos BHT y BHA

Estos datos reflejan que este extracto polifenólico es una buena opción como alternativa a antioxidantes sintéticos ampliamente utilizados en sectores como el de la alimentación o la cosmética.

IV.8.7. Datos de la Patente

Todo el trabajo desarrollado en este capítulo ha sido patentado bajo el nombre «Extracto polifenólico a partir de residuos de uva blanca». La patente abarca una solicitud a nivel nacional (solicitud nº P201231152) y otra a nivel internacional (solicitud nº PCT/ES2013/070526). ANEXO II, apartado VI.3.1.

Actualmente esta patente se encuentra en explotación por una empresa gallega que la licenció en el campo de la cosmética.

IV.8.8. Spin-off: i-Grape Laboratory S.L.

Debido al resto de alternativas en las que puede tener cabida el extracto polifenólico desarrollado en esta Tesis, se ha llevado a cabo la puesta en marcha de una Spin-off de la Universidad de Santiago de Compostela. De esta manera se ha licenciado esta patente, en el resto de los campos y sectores donde pueda tener aplicación, como pueden ser el farmacéutico o el alimentario. La información de este proyecto está reflejada en el ANEXO III, en el apartado VI.4.1.

**Otras alternativas de REUTILIZACIÓN de los
SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN**



IV.9. Otras alternativas de reutilización de los subproductos de vinificación

En general, los subproductos derivados de la industria vitivinícola tales como el bagazo de uva, presentan cantidades elevadas de nutrientes como el nitrógeno y el potasio, así como de compuestos polifenólicos, cuya concentración como ya se ha comentado, varía en función de la variedad de uva, la parte del fruto que se estudie (piel, semillas, etc) y las condiciones ambientales³². Los nutrientes presentes en el bagazo son importantes para el desarrollo de cultivos mientras que los polifenoles, cuando se encuentran en el suelo en elevadas concentraciones pueden tener efectos negativos, ya que inhiben el crecimiento y desarrollo de las raíces de las plantas¹⁶⁸.

Sin embargo, como se ha venido poniendo de manifiesto a lo largo de toda esta memoria de Tesis, los polifenoles también ofrecen un beneficio debido a su elevada capacidad antioxidante, es decir, su capacidad para eliminar los radicales de oxígeno y otras especies reactivas³⁶. Estos efectos, junto a las numerosas propiedades beneficiosas para la salud varían en función de los distintos tipos de compuestos y son particulares de cada uno de ellos, por lo que los extractos que los contienen se convierten en extractos potencialmente útiles para la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica.

En este trabajo se ha planteado la hipótesis, en colaboración con el *Grupo de Ecología del Suelo de la Universidad de Vigo*, de que la aplicación de un proceso de vermicompostaje del bagazo de uva podría constituir un método viable para el crecimiento y desarrollo de lombrices de tierra, un proceso rápido para obtener un vermicompost estable y maduro; así como un método de separación mecánica adecuado para la evaluación y obtención de polifenoles de una manera rápida y eficaz.

De esta manera, mediante estas acciones innovadoras de aprovechamiento y explotación del bagazo de uva se produce también un hecho importante desde el punto de vista medioambiental, ya que en la actualidad existe una acumulación excesiva del residuo que se elimina así de forma no agresiva con el medio ambiente y ofrece a su vez diferentes alternativas económicas.

En relación con este planteamiento, un objetivo adicional de esta tesis consistió en realizar, junto con el GI de la UVigo, un estudio completo y detallado sobre el potencial del bagazo de uva de la variedad albariño como alimento viable para un buen crecimiento de la población de lombrices, su posible bioconversión en enmienda orgánica para horti- y agricultura y como fuente de compuestos polifenólicos bioactivos de interés industrial.

De esta manera, sometiendo al bagazo de uva a un proceso de vermicompostaje se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la viabilidad del vermicompostaje como técnica de tratamiento del bagazo mediante un seguimiento de la población de lombrices.
2. Evaluar la maduración y estabilización del vermicompost mediante el seguimiento de las características físico-químicas y bioquímicas a lo largo del proceso de vermicompostaje.
3. Determinar la cantidad y evolución de los polifenoles totales presentes en el bagazo de uva, en el vermicompost base (ya presente sobre el que se vierte el bagazo y en las semillas, durante todo el proceso).

Los dos primeros objetivos se abordaron en la Universidad de Vigo, mientras que el tercero de los objetivos forma parte del desarrollo de este proyecto de Tesis Doctoral. Así, la metodología analítica desarrollada y optimizada previamente para la caracterización de las muestras de bagazo de

uva blanca de las variedades vitivinícolas autóctonas gallegas, fue aplicada para el seguimiento del contenido polifenólico a lo largo del proceso de vermicompostaje. Los extractos de las diferentes muestras se obtuvieron por el método optimizado de PSE (Ver detalles experimentales en el apartado III.10.3) y el contenido en polifenoles totales se determinó espectrofotométricamente (apartado III.4.1).

IV.9.1. Evolución del IPT y polifenoles en el bagazo de uva y semillas a lo largo del proceso de vermicompostaje

En la siguiente figura están representados los resultados de IPT del bagazo y de las semillas durante su evolución en el proceso de vermicompostaje (Figura 87).

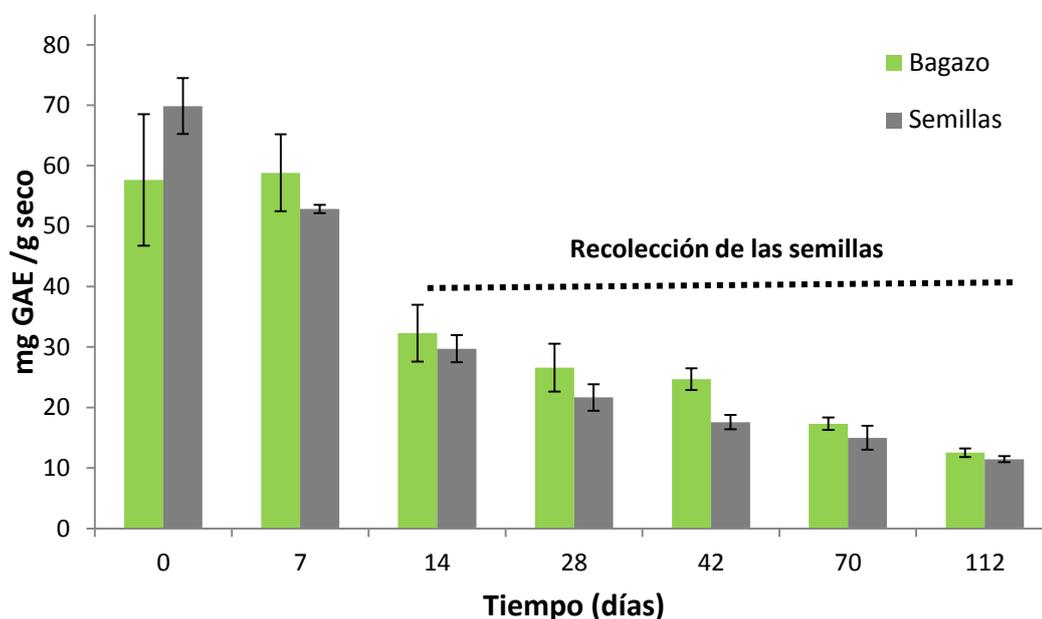


Figura 87 Evolución del IPT del bagazo y de las semillas en el proceso de vermicompostaje

El contenido de polifenoles en el bagazo de uva inicial, que se aprecia en la Figura 87 en color verde, fue de 58 ± 5 mg GAE/g bagazo seco. Durante la fase activa del proceso de vermicompostaje la concentración de polifenoles totales

en el bagazo de uva disminuyó de manera significativa a lo largo del tiempo (Figura 87; $F_{6,24} = 54,959$, $p < 0,0001$), empezando ya en las etapas iniciales (aunque esta disminución no fue significativa hasta el día 14 del proceso) en el cual la población de lombrices aumentó de forma progresiva y presentaba una tasa de ingesta mayor. Los resultados estadísticos indican que la mayor diferencia en la cantidad de polifenoles presentes en el bagazo de uva se dan entre los días 7 y 112 con una disminución del 78%, manteniéndose en las últimas semanas en unos niveles muy bajos en comparación con los presentados antes del inicio del vermicompostaje y alcanzando en el producto final una concentración de $13 \pm 0,24$ mg GAE/g bagazo seco.

En las primeras semanas se aceleró la transformación de la fracción orgánica del bagazo más fácilmente digerible para las lombrices y los microorganismos. Las partes mejor asimilables adquirieron una granulometría más fina y ocuparon la zona inferior del vermirreactor dejando sobre la superficie principalmente las semillas, los tallos y las pieles más duras. Estas partes de la superficie corresponden a las de mayor concentración polifenólica y a la fracción más recalcitrante del bagazo de uva¹⁶⁹, principal causa de pérdida de calidad en su uso como abono en los campos de cultivo; ya que, una elevada concentración de polifenoles en el suelo inhibe el crecimiento de las raíces y por lo tanto de las plantas¹⁶⁸. Esto se debe principalmente a que determinados compuestos polifenólicos presentan una elevada toxicidad, como sucede con el catecol, metil-catecol y polifenoles carboxílicos¹⁷⁰.

A lo largo de la fase de maduración, a partir del día 42 del proceso, la concentración polifenólica total en el bagazo continuó disminuyendo progresivamente a medida que se iba transformando. Esto indicó la presencia de microorganismos asociados al vermicompostaje que estaban degradando estos compuestos dando lugar a un vermicompost maduro y estabilizado.

En la literatura científica se ha demostrado que de modo general, la actividad de las lombrices de tierra, promueve el incremento de las poblaciones microbianas¹⁷¹. Los microorganismos están especializados en degradar los compuestos orgánicos más complejos, como la celulosa y la

lignina⁹¹. De esta manera se elimina la parte del bagazo de mayor fitotoxicidad dando lugar a su vez a un vermicompost final estabilizado y maduro con grandes posibilidades de utilización en agricultura. Por otro lado la descomposición de estos compuestos fitotóxicos es indicativa del grado de madurez¹⁷², un hecho de suma importancia ya que el vermicompost inmaduro puede afectar negativamente al desarrollo de cultivos^{173,174}.

En la Figura 87 también se puede ver, en color gris la evolución del IPT de las semillas. Y como se aprecia, la concentración inicial de polifenoles presentes en las semillas del bagazo de uva fue de 70 ± 1 mg GAE/g semilla seca. A lo largo del tiempo de vermicompostaje la concentración de polifenoles en las semillas, al igual que sucede en el bagazo, también disminuye de forma progresiva y significativa (Figura 88; $F_{5, 20} = 677,234$, $p < 0,0001$). El test estadístico indica que la mayor diferencia en la concentración de polifenoles se da entre los días 0 y 112, entre los cuales los valores obtenidos se redujeron en un 83% alcanzando en el día 112 una concentración de $11 \pm 0,1$ mg GAE/ g semilla seca.

Se han identificado en las semillas tres compuestos polifenólicos más importantes, ác. gálicos, catequina y epicatequina. La concentración de estos compuestos fue determinada hasta el día 42 del proceso de vermicompostaje, coincidiendo con el final de la etapa óptima de recolección de las semillas, y su evolución puede verse a continuación en la Figura 88. En general la concentración de estos tres polifenoles disminuye con el tiempo a lo largo del proceso.

La concentración inicial de ác. gálico en las semillas fue de 240 ± 3 mg/Kg seco. Esta disminuye hasta llegar a un valor de 104 ± 9 mg/Kg seco en el día 42. La concentración de epicatequina disminuye desde 2532 ± 217 mg/Kg seco en el día 0, hasta llegar a 748 ± 38 mg/Kg seco en el día 42. Y por último la catequina pasa de un valor inicial de 4654 ± 297 mg/Kg seco hasta 1723 ± 121 mg/Kg seco el día 42.

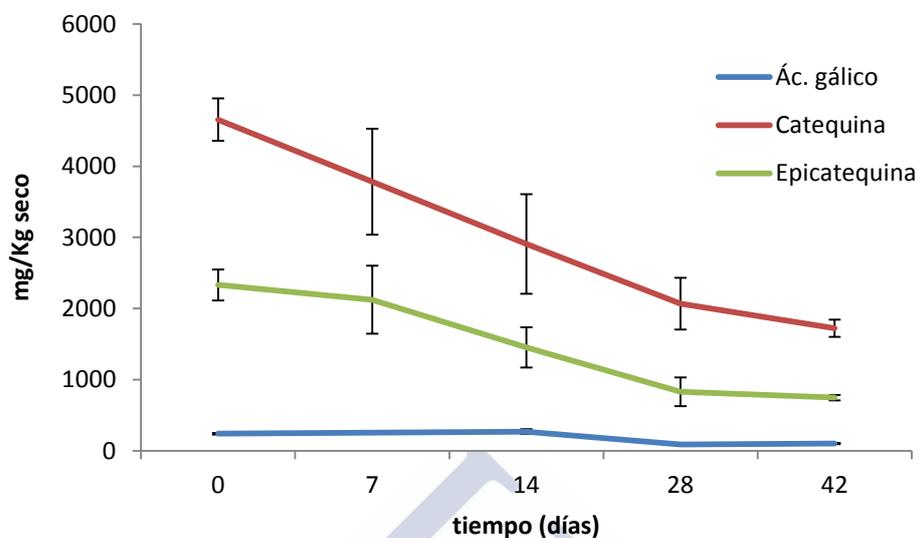


Figura 88 Evolución del ác. gálico, catequina y epicatequina en las semillas durante el proceso de vermicompost

Lo realmente destacable en todo este estudio, es que en las primeras semanas del proceso las semillas mantienen una importante carga polifenólica. Este dato, junto al hecho de que las lombrices de tierra dejan sobre la superficie las partes del bagazo demasiado duras para ser inicialmente degradadas, como es el caso de las semillas, tallos o pieles, hace que se pueda llevar a cabo la separación mecánica de las semillas del resto de la materia prima muy fácilmente, a partir de la 2ª semana del proceso. Estas semillas son una de las partes del bagazo de mayor concentración polifenólica y por lo tanto interesantes como fuente de polifenoles de interés industrial y comercial.

Así pues, durante las últimas semanas de la fase activa esta separación mecánica ya puede tener lugar, (marcado con línea discontinua en la Figura 87) y el óptimo de recogida de semillas se da, aproximadamente, entre los días 28 y 42, antes de que la concentración polifenólica continúe bajando y cuando la mayor parte de las semillas del bagazo se encuentran en las capas

más superficiales lo que permite una obtención manual de una forma rápida y eficaz.

IV.9.2. Evolución del IPT en el vermicompost base

A lo largo del proceso de vermicompostaje, los resultados del análisis del IPT en el vermicompost base, ya presente en el vermirreactor desde el inicio del estudio, muestran que la concentración de polifenoles se mantuvo en los bajos valores esperados. El valor inicial ($4,1 \pm 0,22$ mg GAE/ g vermicompost seco), ligeramente más alto que el promedio de las siguientes semanas, alrededor de 2 mg GAE/g vermicompost seco) indica un potencial traspaso de polifenoles en el momento de carga del vermirreactor con el bagazo inicial (Figura 89), pues es posible que algo del bagazo se cuele a la parte inferior del reactor durante dicha etapa de carga.

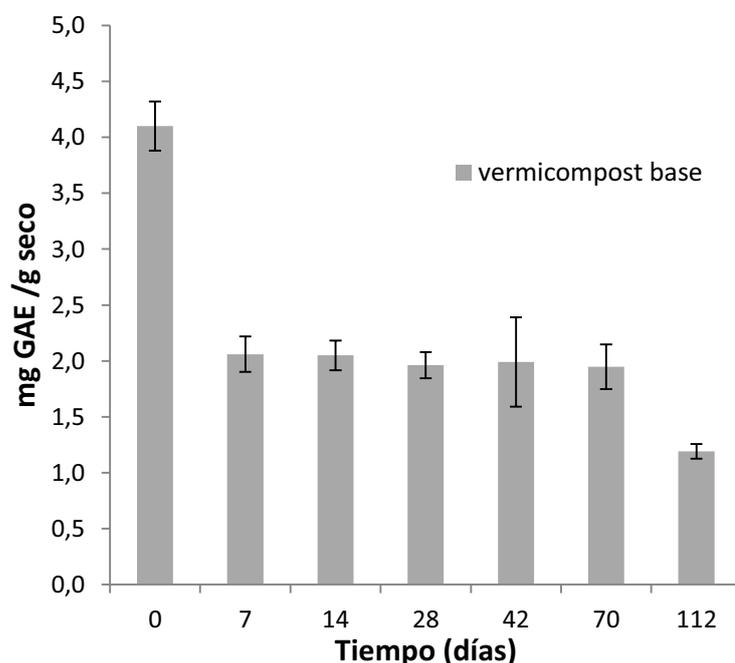


Figura 89 Evolución del IPT en el vermicompost base durante el proceso de vermicompost

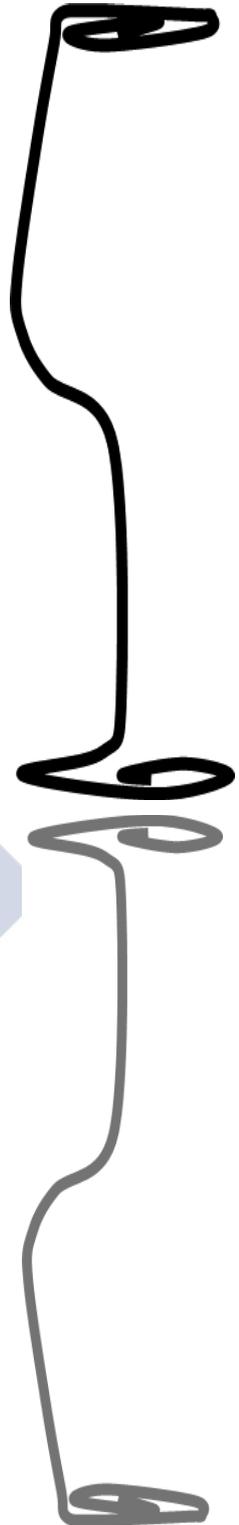
En las semanas siguientes del proceso, la concentración polifenólica se mantuvo estable en niveles muy bajos e incluso descendió en el último día de

muestreo. En este experimento, el vermicompost que estaba ya presente en el vermirreactor actuó a modo de cama para las lombrices, manteniendo unas condiciones de humedad y temperatura ideales para su supervivencia. De esta manera, y una vez extendido el bagazo sobre el vermicompost, se pudo evaluar la presencia y evolución de los polifenoles transferidos de la capa inferior; constatando que, durante el proceso de vermicompostaje del bagazo de uva, la transferencia de polifenoles a la cama de vermicompost fue mínima.





VINO BLANCO



IV.10. Estudio de vinos blancos gallegos de variedades autóctonas

De las variedades vitivinícolas estudiadas, sólo albariño, treixadura y godello se comercializan comúnmente en forma de vinos monovarietales. El resto de las variedades (loureiro, caíño blanco, tarrantés y blanca lexítima) es más corriente encontrarlas como parte de vinos multivarietales. Uno de los motivos es el cultivo minoritario de estas variedades en Galicia¹⁵⁵. Por ello, la obtención de suficientes muestras de estos vinos monovarietales con fines de caracterización, es muy complicada.

En la Tabla 65, se resumen los datos publicados por otros autores sobre el contenido polifenólico (total o por compuestos) y la actividad antioxidante, de vinos blancos monovarietales vinificados en distintas partes del mundo. Como se puede ver, en relación con los 7 vinos monovarietales autóctonos que se estudian en este proyecto, sólo se han encontrado datos referidos al perfil polifenólico para la variedad caíño blanco y para dos de las tres variedades mayoritarias, albariño y godello, aunque esta última variedad fue cultivada en la Comarca del Bierzo (León).

Tabla 65 Datos polifenólicos de diferentes variedades de vino blanco obtenidos por otros autores

Ref.	país	variedad	IPT	AA	GAL	PR	CAFT	CAF	CAT	EPI	PB1	PB2
(175)	Rep. Checa	Chardonnay			0,91	1,2	30,4	1,61	10,65	5,8		
(176)	Sudáfrica	Chardonnay							7,6	5,8		
(177)	Francia	Chardonnay	323	2,27	1,7		36,9	7,6	6,9	3,1	4,7	6,8
(178)	China	Chardonnay	298	0,836								
(176)	Sudáfrica	Sauvignon b.								5,9		
(179)	Brasil	Sauvignon b.	200									
(177)	Francia	Sauvignon b.	330	1,98	1,6		22,1	3,8	7,8	4,2	4,9	2,7
(179)	Brasil	Riesling	230									
(180)	Alemania	Riesling	178-376		-	-	0,5-25,10	1,6	-	0,9		-
(178)	China	Riesling	300	0,451								
(180)	Alemania	G-traminer	166-356		0-1,4	0-3	0-21,1	2,1-25,9	-	-		-
(175)	Rep. Checa	Hibernal			0,88	1,09	32,49	1,38	8,6	5,3		
(181)	España(Valladolid)	Verdejo	186									
(182)	España (Canarias)	Verdejo			1,64	2,7	28,39	2,69	4,33			
(183)	Grecia	-	278		1,77		29,6	0,55	17,6	25,4		
(184)	Grecia	-	97-873	0,47-0,58	1,9-84,7		16-446	6,4-206,7	0-146	0-143		
(145)	Grecia	-	152,8	0,52								
(185)	Portugal (Madeira)	-	252-1936	0,042-0,71								
(186)	España	-	89-408	0,3-2,68								
(182)	España (Canarias)	Albillo			1,03	1,9	4,35	0,9	2,18			
(182)	España (Canarias)	Palomino			0,97	3,3	60,95	4,04	4,05			
(181)	España (DO Rías Baixas)	Albariño	214									
(187)	España (DO Rías Baixas)	Albariño		0,77-2			33,2-85,7		7,2-15,6		12-25	5-30
(188)	España (DO Rías Baixas)	Albariño	107									
(188)	España (DO Rías Baixas)	Caíño	97									
(189)	España (DO Bierzo)	Godello	110				7,5		2,9			
-		Albariño	296	1,09	5,47	0,54	36,5	8,32	7,43	5,80	8,75	2,94
-		B. lexitima	202	0,61	1,17	0,26	23,1	5,98	1,26	0,82	1,24	0,80
-		Caíño	335	1,25	12,6	0,58	51,0	8,26	10,9	8,23	13,4	4,84
-		Godello	222	0,67	3,19	0,65	6,87	1,62	3,92	2,73	5,32	2,45
-		Loureiro	300	1,14	10,3	1,18	48,6	20,4	11,8	9,51	12,4	6,93
-	España (Galicia)	Torrontés	262	0,70	1,05	0,17	7,43	6,70	0,42	0,51	1,40	0,75
-	Valores promedio	Treixadura	326	1,26	7,15	0,83	32,1	7,26	7,18	7,67	10,0	5,14
-	Obtenidos en este trabajo	Chardonnay	253	0,68	1,24	0,17	23,8	15,0	1,64	1,94	3,52	1,58
-		Pinot Blanc	214	0,72	0,56	0,13	0,42	0,79	0,58	0,77	1,30	0,73
-		Pinot Gris	247	0,76	0,99	0,37	18,5	15,7	0,35	0,51	1,56	0,34
-		G-traminer	239	0,82	1,02	0,38	0,20	0,99	0,74	0,50	2,69	0,38
-		Riesling	280	1,25	1,34	0,31	62,6	12,3	0,58	0,58	1,56	0,73
-		Sauvignon b.	230	0,72	1,32	0,11	0,51	1,65	0,66	0,59	1,72	0,78

IPT: mg GAE/L; AA: mM Trolox; polifenoles: mg/L..

GAL: ác. Gálico; PR: ác. Protocatéquico; CAFT:ác. caftárico; CAF:ác. cafeico; CAT:catequina; EPI:epicatequina

IV.10.1. Estudio de la influencia del factor “Año de cosecha”

Para el estudio de la influencia del año de la cosecha (2010, 2011 y 2012), se ha llevado a cabo el ANOVA de este factor, con un nivel de confianza del 95%. Para poder comparar los datos obtenidos hay que tener en cuenta la variabilidad asociada a cada uno de estos tres años, muy diferentes entre sí.

No se introdujeron dentro de este análisis las variedades experimentales ya que no se poseen muestras representativas de los 3 años de cosecha.

Los resultados obtenidos indican que la cosecha del 2010 presenta unos valores de IPT y de suma de polifenoles significativamente menores que el resto de las cosechas. Entre las cosechas del 2011 y 2012 no existen diferencias significativas. Para el caso de la AA la cosecha del 2012 presenta valores significativamente mayores.

Resultados similares a estos fueron obtenidos para el caso de los bagazos, y han sido discutidos en el apartado IV.5.1.

IV.10.2. Análisis del perfil polifenólico de los vinos blancos gallegos

En el siguiente gráfico de barras (Figura 90) están los valores promedios de las concentraciones de polifenoles para cada variedad de vino blanco estudiado.

Loureiro, treixadura, caíño, albariño y blanca lexítima presentan perfiles similares, donde el caftárico es el compuesto que se encuentra en una concentración mucho mayor que el resto de los compuestos. Este resultado lo encuentra también Rodríguez-Bernaldo de Quirós¹⁸⁷ en vinos de la variedad albariño. Para el caso del godello, el perfil es más homogéneo en todos los compuestos. En el estudio realizado por Martínez Lapuente¹⁸⁹ se encontró esta misma distribución en la variedad godello cultivada en el Bierzo aunque sus concentraciones fueron ligeramente inferiores tanto en IPT como en catequina. En la variedad tarrantés el ác. caftárico está en concentraciones similares al cafeico.

Resultados y discusión. Vino Blanco

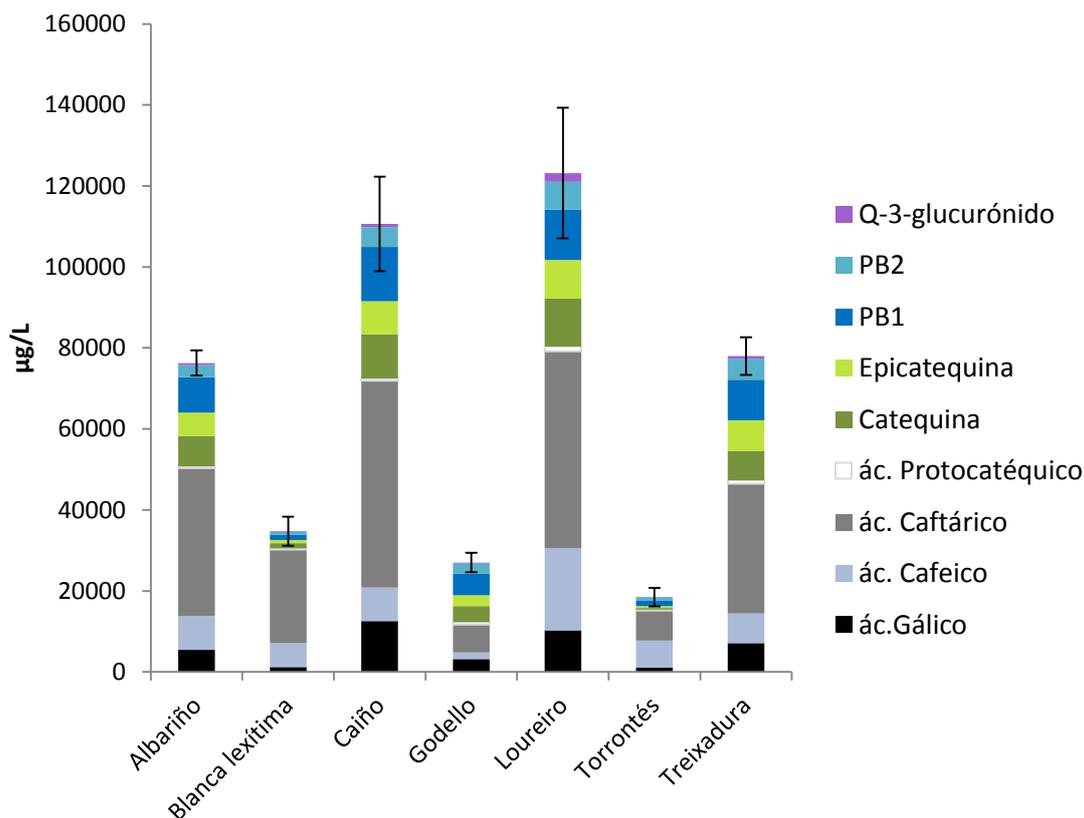


Figura 90 Valores promedio de los polifenoles de vinos blancos monovarietales de Galicia

La Tabla 66 detalla los valores de AA e IPT para todos los vinos monovarietales estudiados, además de los valores numéricos obtenidos en el análisis del perfil polifenólico. Cabe destacar que estos últimos datos se han normalizado, para poder comparar las 7 variedades autóctonas estudiadas; debido a la gran dispersión de los mismos. Para ello se utilizó la siguiente fórmula: $\log(X)+1$, siendo X el valor de cada una de las variables transformadas. Las Figuras 94 y 95 muestran los gráficos de medias para todos los parámetros, resumiendo gráficamente los datos.

Las variedades que presentan una menor AA son blanca leixítima, godello y torrontés (Figura 91). Las variedades albariño, treixadura, loureiro y caíño presentan los valores más elevados. Estos resultados se repiten para el IPT, con la única excepción que el torrontés también se encuentra en el grupo de los que tienen las mayores concentraciones de polifenoles.

Como ya se expuso en el análisis que se muestra en la Figura 53, cada compuesto polifenólico contribuye de forma diferente a la capacidad antioxidante del vino. Además en una mezcla como el vino, la capacidad antioxidante, no viene dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada componente, también está determinada por la interacción que existe entre ellos, pudiendo existir comportamientos sinérgicos¹⁹⁰.

Las variedades loureiro y caíño presentan la suma de polifenoles más elevada. Se contradicen así los datos aportados por Juega et al.¹⁸⁸ cuyas muestras de caíño del Rosal presentaron valores de IPT muy inferiores (97mg GAE/L). Esta diferencia puede ser debida principalmente a los diferentes métodos de vinificación de cada bodega ya que el año de cosecha fue el 2009, y en producción fue muy similar al 2010, reflejado en este trabajo.

Por otra parte, la menor concentración polifenólica la presentan las variedades blanca lexítima, godello y tarrantés. Hay que tener en cuenta que las muestras de la variedad tarrantés como blanca lexítima son de la E.E. de Ribadumia y del Centro de Formación y Experimentación de Guísamo, por lo tanto los datos no son completamente comparables con un vino comercial.

Si analizamos cada compuesto individualmente, el resultado es prácticamente el mismo (Figuras 91 y 92):

La variedad loureiro presenta la mayor concentración de quercetina-3-glucurónido y ácidos fenólicos como el cafeico y protocatéquico; y también de los ácidos fenólicos gálico y caftárico, junto con las variedades caíño y treixadura. Tarrantés y blanca lexítima presentan las menores concentraciones de catequina, epicatequina y procianidinas. Para estas últimas loureiro, caíño y treixadura presentan los valores más elevados.

En el estudio realizado por Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al.¹⁸⁷ se presentan resultados similares a los encontrados en este trabajo en vino albariño, tanto para la AA (Tabla 65) como para su perfil polifenólico. La diferencia más notable es que estos autores encuentran unas concentraciones de procianidinas muy superiores. Por otra parte, todas las muestras del vino

analizado por ellos pertenece a un año de cosecha diferente (2006) a las de las muestras del presente trabajo, por lo tanto esta variación puede deberse a la influencia del año de la cosecha.

Autores como Fernandez-Pachón et al.¹⁸⁶ o Paixao et al.¹⁸⁵ encontraron datos similares de IPT y AA para otras variedades blancas originarias del sur de España y Madeira (Tabla 65).

Cabe destacar que debido a la gran cantidad (más de 130) y diversidad de variedades vitivinícolas blancas distribuidas por todo el mundo es muy difícil establecer comparaciones de los perfiles polifenólicos sin tener en cuenta todos los demás factores que influyen en las características finales de un vino embotellado. Por ello, es necesario recordar aquí que estos estudios de caracterización son, por una parte una contribución al conocimiento de dichos perfiles polifenólicos tan diversos; y, por otra, son la base necesaria, para la potencial construcción de un modelo estadístico multivariante robusto que, en último término, serviría como herramienta para la contribución en la detección del fraude. Dicho modelo, que se desarrolla en los apartados siguientes, no ha de ser en ningún caso estático y debería ir enriqueciéndose con nuevos datos de perfiles polifenólicos de variedades blancas en cosechas sucesivas. Única vía para intentar acercarse a la diversidad del contenido polifenólico del gran abanico de variedades de uva existentes.

Tabla 66 Valores promedio de AA, IPT y concentraciones de polifenoles individuales de los vinos blancos gallegos. Grupos homogéneos

	Albariño		B. Lexítima		ño		Godello		Loureiro		Torrontés		Treixadura	
AA	1086 ^b	± 34	607 ^c	± 72	1247 ^{ab}	± 153	666 ^c	± 45	1138 ^{ab}	± 78,9	695 ^c	± 43	1264 ^a	± 70
IPT	295 ^a	± 5	202 ^c	± 5	335 ^a	± 10	221 ^c	± 5	300 ^{ab}	± 5	261 ^{bc}	± 22	325 ^a	± 11
Ác. Gálico	5465 ^b	± 444	1170 ^d	± 25	12579,9 ^a	± 2432	3187 ^c	± 175	10244 ^a	± 2044	1052 ^d	± 27,9	7145 ^{ab}	± 1281
Ác. Cafeico	8319 ^b	± 796	5983 ^b	± 1271	8257,3 ^b	± 1524	1620 ^c	± 197	20349 ^a	± 3208	6696 ^b	± 1745	7263 ^b	± 1712
Ác. Caftárico	36499 ^b	± 1458	23075 ^b	± 3110	51036 ^a	± 1804	6867 ^c	± 1183	48585 ^a	± 3111	7434 ^c	± 521	32063 ^{ab}	± 1514
Ác. Protocatéquico	537 ^d	± 32	260 ^e	± 49	584,9 ^{cd}	± 93	bc	± 48	1179 ^a	± 66	e	± 10	b	± 77
Catequina	a	±	c	± 373	10885,6 ^a	± 2156	3922 ^b	± 453	11837 ^a	± 2547	423 ^c	± 42	7180 ^{ab}	± 1215
Epicatequina	5803 ^a	± 468	818 ^c	± 144	8231,8 ^a	± 2093	2727 ^b	± 337	9509 ^a	± 2153	514 ^c	± 8,9	7667 ^a	± 1732
PB1	8752 ^{bc}	± 643	1239 ^d	± 203	13381,7 ^{ab}	± 3087	5323 ^c	± 410	12425 ^{ab}	± 2549	1396 ^d	± 38,4	10023 ^a	± 1070
PB2	2943 ^c	± 263	796 ^d	± 20	4840 ^{ab}	± 1228	2454 ^{bc}	± 295	6928 ^a	± 1737	748 ^d	± 11,8	5140 ^a	± 1039
Q-3-glucurónido	523 ^c	± 61	149 ^d	± 56	828,8 ^b	± 176	233 ^d	± 55	2113 ^a	± 222	40 ^d	± 1,4	687 ^{bc}	± 121
Suma polifenoles	76275 ^b	± 3119	33793 ^c	± 3613	110628 ^a	± 11658	26985 ^{cd}	± 2399	123173 ^a	± 16109	18476 ^d	± 2265	78004 ^b	± 4637

Datos: media ± desviación estándar

Diferentes superíndices = diferencias significativas LSD (p<0,05)

Datos normalizados: todas las variables excepto la AA y el IPT

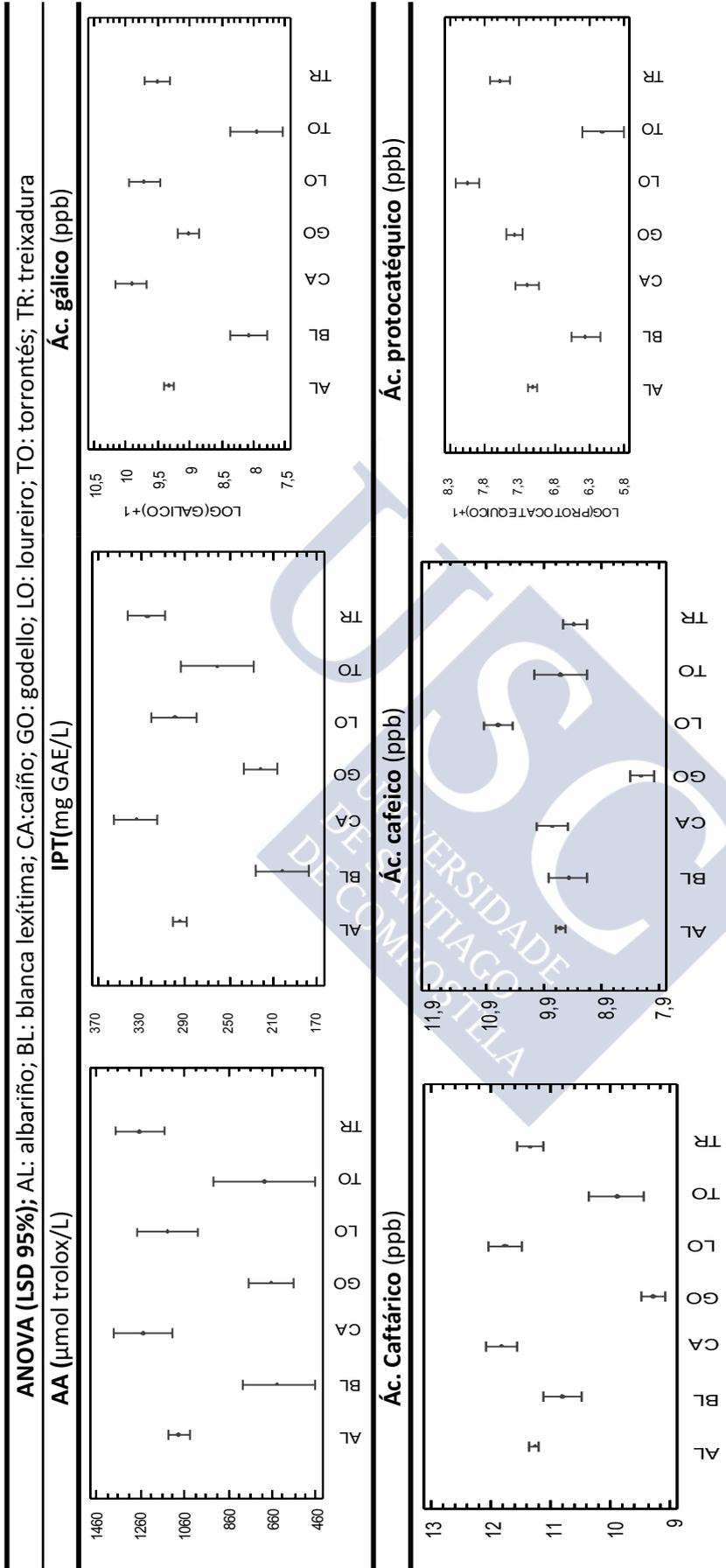


Figura 91 Gráficos de los valores promedio de las variedades autóctonas gallegas de vino blanco

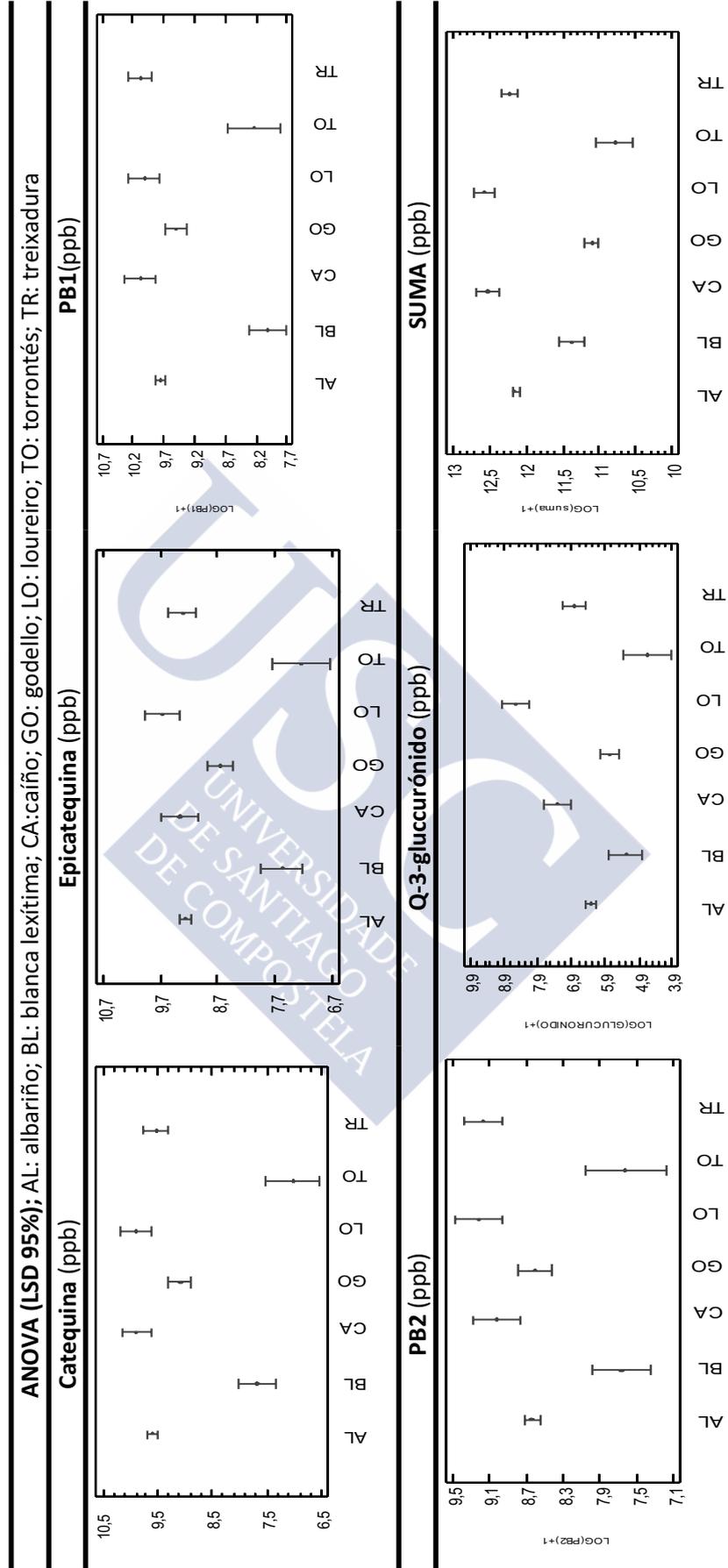


Figura 92 (continuación Figura 91) Gráficos de los valores promedio de las variedades autóctonas gallegas de vino blanco

IV.10.3. Correlación entre la composición polifenólica y la AA

La Tabla 67 muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de polifenoles y la AA. Si analizamos esta correlación con cada polifenol individualmente, observamos que tanto la catequina (0,67), como la epicatequina (0,64) y la PB1 (0,67) presentan las correlaciones mayores. La PB2 (0,53), el ácido gálico (0,53) y la quercetina-3-glucurónido (0,43) presentan correlaciones moderadas. Y los compuestos estudiados que tienen la menor correlación con la AA son el ácido caftárico (0,35), el protocatéquico (0,35) y por último el ácido cafeico (0,24).

Resultados similares fueron obtenidos por Kallithraka et al¹⁸³., en su estudio sobre los cambios polifenólicos en el almacenamiento de los vinos blancos. Estos autores obtuvieron correlaciones incluso mayores para determinados polifenoles como la epicatequina (0,78) o el IPT (0,856) en vinos blancos recién embotellados. Sin embargo la correlación iba reduciéndose a lo largo del tiempo debido a una disminución en su contenido fenólico: IPT (0,569), epicatequina (sin correlación). Estos datos ponen de manifiesto que el tiempo que los vinos estuvieron embotellados pudo modificar su perfil polifenólico y disminuir así su correlación con la AA. Fernández-Pachón encontró una correlación muy inferior entre la AA de los vinos blancos y su IPT (0,55).

Este mismo comportamiento encontrado en vinos blancos monovarietales también lo presentaron los extractos de bagazo correspondientes a los vinos analizados.

Tabla 67 Correlación entre la concentración de polifenoles y AA en los vinos blancos gallegos

	AA	p-valor
IPT	0,73	<0,0000
Ác. gálico	0,53	<0,0000
Ác. cafeico	0,24	0,0001
Ác. caftárico	0,35	<0,0000
Ác. protocatéquico	0,35	<0,0000
Catequina	0,67	<0,0000
Epicatequina	0,64	<0,0000
PB1	0,67	<0,0000
PB2	0,53	<0,0000
Q-3-glucurónido	0,43	<0,0000
Suma total	0,65	<0,0000

IV.11. Diferenciación de los vinos monovarietales gallegos

Se ha aplicado el análisis discriminante, utilizando todos los datos y todas las variables: dos índices espectrofométricos (IPT y AA) y los 9 polifenoles presentes en todas las muestras (ác. gálico, ác. protocatéquico, ác. caftárico, ác. cafeico, catequina, epicatequina, PB1, PB2 y quercetina-glucurónido).

Se realizó el análisis discriminante para 5 variedades autóctonas (albariño, godello, treixadura, caíño y loureiro).

El torrontés y la blanca lexítima, aun siendo variedades autóctonas, no se utilizaron en la clasificación porque además de no tener muestras de todos los años, y no son completamente representativas de un proceso de vinificación en bodega con fines de comercialización (maceraciones, mecanismo de prensado de las uvas, etc.).

El análisis discriminante realizado fue exitoso, en el sentido de que el porcentaje de discriminación y clasificación correcta de las muestras estudiadas fue del 91,85% (Tabla 68). En la Figura 93 se observa la representación de las funciones de discriminación de las 5 variedades. En ella se puede ver como los vinos de la variedad loureiro presentan unas

características completamente diferentes al resto de variedades. Como ya se comentó en el estudio del perfil polifenólico, las diferencias más notables de esta variedad con respecto al resto se encuentran en la mayor concentración de 3 compuestos polifenólicos (ácido cafeico, ácido protocatéquico y quercetina-3-glucurónico).

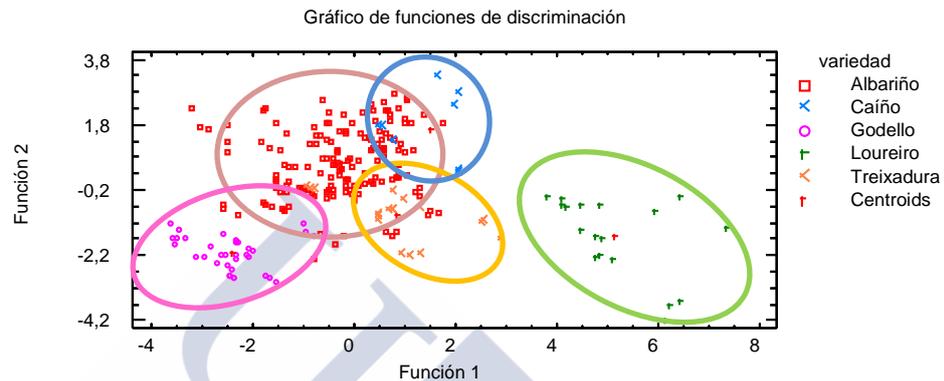


Figura 93 Representación gráfica de las funciones de discriminación de los vinos monovarietales blancos gallegos

Tabla 68 Tabla de clasificación de los vinos monovarietales blancos gallegos

variedad	Albariño	Caíño	Godello	Loureiro	Treixadura
Albariño	87,74%	3,87%	3,87%	0,00%	4,52%
Caíño	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Godello	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%
Loureiro	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%
Treixadura	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%

Porcentaje de muestras correctamente clasificadas: **91,85%**

Esta buena clasificación sugiere que la elección de los 9 compuestos polifenólicos y los dos índices es acertada y que estas variables, son suficientes para clasificar correctamente los vinos en las 5 variedades estudiadas. Estos resultados se confirman por comparación con los obtenidos en un estudio realizado por Makris et al.¹⁹¹, sobre la discriminación por variedad y origen geográfico de muestras de vino tinto. Estos autores llegaron a la conclusión de que los polifenoles mayoritarios que se encontraban en el vino, como el ácido caftárico y los flavanoles, especialmente la PB1 y la PB2, presentaban la mayor influencia para diferenciar tanto el origen geográfico como la variedad. Esto

puede apoyar además la tesis de que las diferencias relacionadas con la genética (varietales) y las influencias medioambientales están más profundamente asociadas a los polifenoles mayoritarios. Lampír et al.¹⁷⁵ obtuvieron resultados similares en cuanto a la discriminación por variedad de vinos blancos, pero concluyeron, sin embargo que el perfil polifenólico no resulta eficaz para la diferenciación del origen geográfico de las muestras.

En la siguiente tabla (Tabla 69) se detallan las muestras de las variedades utilizadas como muestras de origen desconocidas y su probabilidad de confundirse con una de las variedades habituales.

Tabla 69 Probabilidad de confusión entre vinos de distintas variedades

	Muestras	Variedades de confusión	Probabilidad (%)
Muestras eliminadas de la discriminación	v-CA04	Albariño	97
Bodegas experimentales	v-TO01	Albariño/Godello	55/43
	v-X05	Albariño/Godello	79/15
Albariños comerciales de menos de 3 euros	v-AL18	Albariño	70
	v-AL19	Albariño	94

La muestra de vino de blanca lexítima (v-X05) y la torrontés (v-TO01) son muestras pertenecientes a la Estación Enológica de Ribadumia y al Centro de Formación y Experimentación Agroforestal de Guísamo, por tanto, tienen carácter experimental. Con este estudio se ponen de manifiesto diferencias significativas en su perfil polifenólico con respecto a cualquiera de las variedades mayoritarias estudiadas. Como se muestra en la tabla no existe un grupo claro de asociación.

La muestra CA04 es un vino del Rosal y es una mezcla entre caíño y albariño, se desconoce el porcentaje de la mezcla pero en este análisis lo clasifica como albariño con una probabilidad del 97%.

Se analizaron también dos vinos albariños que costaban menos de 3 euros en el mercado, los dos pertenecientes a la subzona del Salnés. Uno de ellos se clasificó bien como albariño con un 94% de probabilidad y el otro obtuvo sólo

un 70%. Según este análisis este último vino presenta dudas de la variedad de procedencia utilizada, o al menos, respecto a su carácter monovarietal.

IV.12. Diferenciación de los vinos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas

De la misma manera que en las muestras de bagazo, en este análisis se tratará de valorar la existencia de posibles diferencias entre los vinos de la D.O. Rías Baixas producidos en las 4 de las 5 diferentes subzonas que conforman esta D.O.. Para ello, se procesaron los datos de 43 muestras de vino, de las cuales 26 son del Salnés, 4 del Rosal, 10 del Condado del Tea y 3 de la Ribeira do Ulla. De la zona de Soutomaior no se dispuso de muestras. Aún así, como ya se comentó en el capítulo IV.5.2, la producción de vino en esta subzona solamente representa el 0,1% del total. Para este análisis se llevó a cabo ANOVA, utilizando como factor la "subzona", en todos los casos para un nivel de confianza del 95%.

Los valores promedio de las concentraciones de los polifenoles de los vinos vinificados en bodegas de las diferentes subzonas de la D.O. Rías Baixas aparecen detallados en la Figura 94. Como se aprecia en esa figura, la subzona del Rosal presenta la suma de polifenoles más elevada, aproximadamente el doble que el resto de las subzonas. Por otra parte, el resto de subzonas presentan unas concentraciones más similares entre sí.

Resultados y discusión. **Vino Blanco**

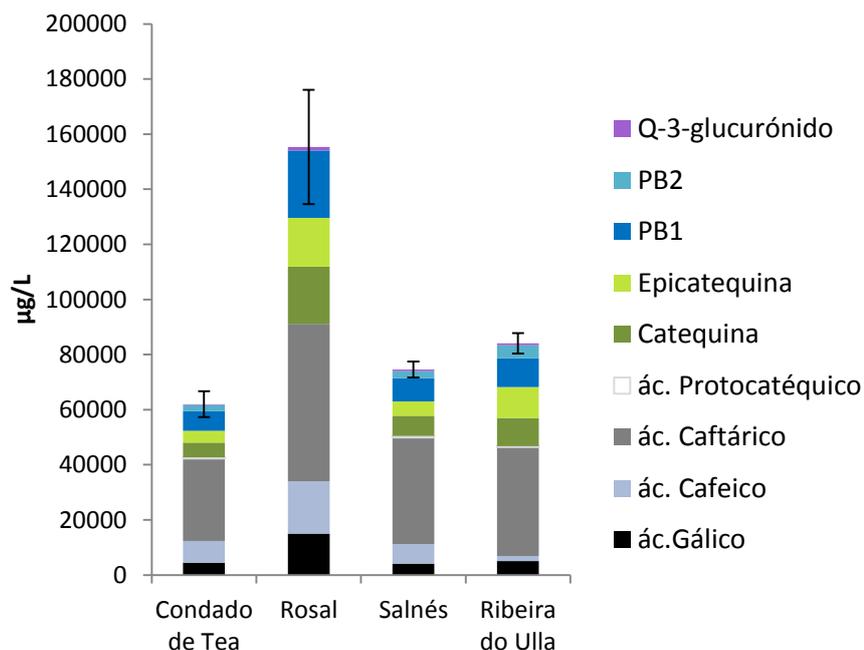


Figura 94 Valores promedio de los polifenoles de los vinos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

En la Tabla 70 están resumidos los valores promedio de polifenoles y de la AA de las diferentes subzonas, además están marcados, por medio de letras los grupos homogéneos. En las Figuras 95 y 96 se muestran gráficamente estos mismo datos y como se puede apreciar, en general, las muestras de la subzona de O Rosal presentan concentraciones significativamente mayores para todas las variables, excepto para el IPT, ya que en este caso la subzona del Ulla presenta una concentración similar. Entre el resto de subzonas, no existen grandes diferencias.

Resultados y discusión. **Vino Blanco**

Tabla 70 Valores promedio de AA, IPT y concentraciones de polifenoles individuales de los vinos de la variedad albariño de la subzonas de la D.O. Rías Baixas. Grupos homogéneos

	Condado do Tea		O Rosal		Val do Salnés		Ribeira do Ulla	
AA	982 ^c	± 53	1984 ^a	± 113	1052 ^c	± 42	1438 ^b	± 37
IPT	266 ^c	± 7	367 ^a	± 18	308 ^b	± 9	327 ^a	± 5
Ác. gálico	4448 ^b	± 359	14979 ^a	± 3497	4110 ^b	± 251	5097 ^b	± 372
Ác. cafeico	7921 ^b	± 598	19000 ^a	± 3091	7143 ^c	± 1318	1867 ^d	± 129
Ác. caftárico	29897 ^c	± 3270	57192 ^a	± 5168	38650 ^b	± 1787	39427 ^{bc}	± 2261
Ác. protocatéquico	441 ^c	± 18	779 ^a	± 157	614 ^a	± 55	331 ^{bc}	± 30
Catequina	5352 ^c	± 655	20672 ^a	± 2211	7299 ^{bc}	± 565	10278 ^b	± 231
Epicatequina	4253 ^c	± 594	17733 ^a	± 3368	5123 ^c	± 466	11225 ^b	± 581
PB1	7239 ^b	± 533	24495 ^a	± 4082	8474 ^b	± 818	10447 ^b	± 474
PB2	2155 ^c	± 194	10115 ^a	± 2174	2550 ^c	± 254	4662 ^b	± 279
Q-3-glucurónido	276 ^c	± 40	1239 ^a	± 227	603 ^b	± 102	797 ^{abc}	± 197
SUMA	61982 ^b	± 4714	166207 ^a	± 20713	74567 ^b	± 2881	84132 ^b	± 3702

Unidades: IPT: mg GAE/L ; AA: μmol trolox/L; polifenoles: $\mu\text{g/L}$

Datos: media \pm desviación estándar

Diferentes superíndices = diferencias significativas LSD ($p < 0,05$)

Datos normalizados: Ác. cafeico

Cabe destacar, que la subzona de la Ribeira do Ulla presenta la menor concentración de ác. cafeico (Figura 95), y que en general la subzona del Condado del Tea presenta los valores más bajos para todos los parámetros estudiados.

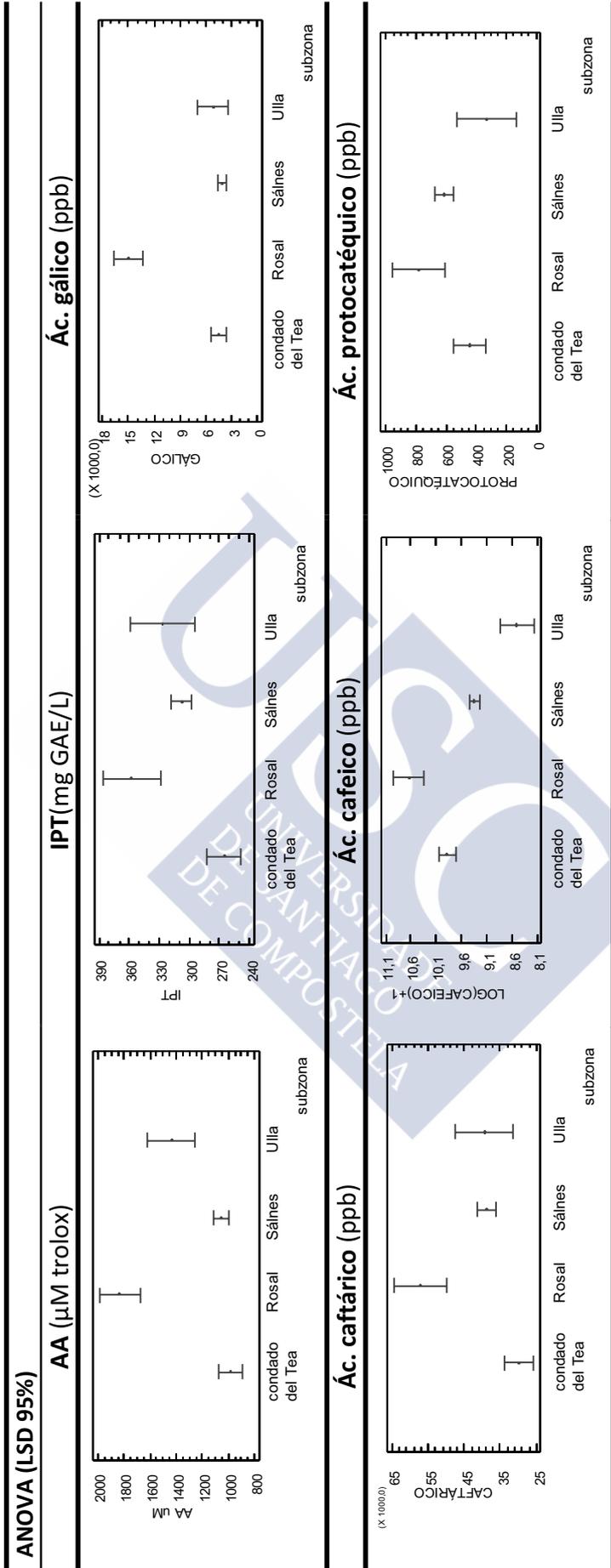


Figura 95 Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

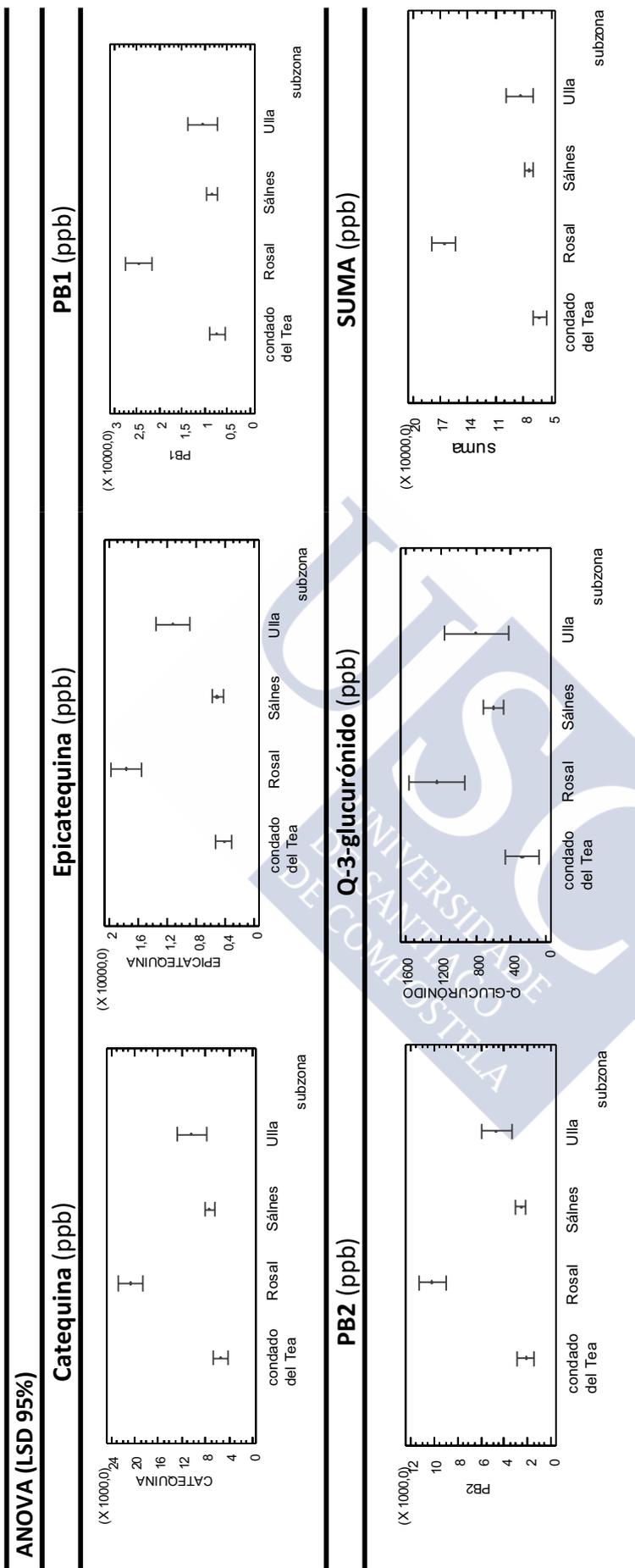


Figura 96 (Continuación Figura 95) Gráficos de los valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos de la variedad albariño de las subzonas de la D.O. Rías Baixas

Podríamos pensar que el origen geográfico, concretamente la subzona de la D.O., es en este caso el factor más influyente en la composición polifenólica, puesto que se trata en todos los casos de vinos de la misma variedad (100 % Albariño). Pero como se vio en el apartado IV.10.2, las variedades con mayor carga polifenólica en general y mayor AA eran loureiro y caíño. Estos vinos proceden también de la subzona de O Rosal (y la mayoría pertenecen a la misma bodega). Por todo ello cabría pensar que, en este caso, no solamente influirá el origen geográfico, sino que las prácticas particulares de cada bodega están ejerciendo una influencia muy importante sobre el perfil polifenólico de las muestras. Reforzando este hecho están los datos de IPT obtenidos por Juega et al¹⁸⁸ para albariño de la zona del Rosal pero de una bodega diferente a las participantes en este estudio, los cuales obtienen unos datos muy inferiores (107mg GAE/L).

Para saber si es posible diferenciar, mediante su perfil polifenólico y AA un vino albariño cultivado en cada una de las diferentes subzonas de la D.O. Rías Baixas, se realizó un análisis discriminante con todas las muestras de albariño, en el que el factor de discriminación fue la subzona de cultivo. Se utilizaron todas las variables.

En la Figura 97 se muestra la representación gráfica de las funciones de discriminación. Como se puede ver, la subzona del Rosal presenta claramente una diferencia notable con respecto al resto de las subzonas en su perfil polifenólico.

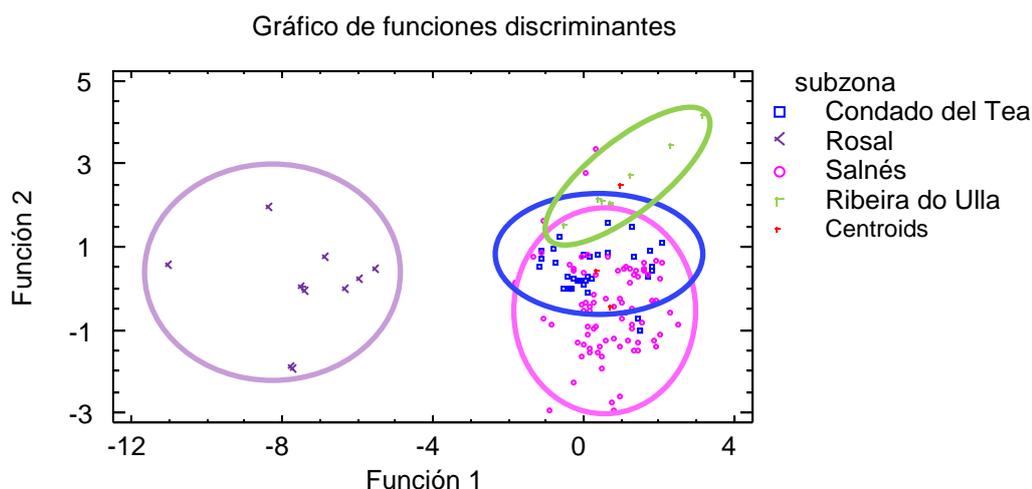


Figura 97 Representación gráfica de las funciones de discriminación para las subzonas de la D.O. Rías Baixas de los vinos de la variedad albariño

En la tabla de clasificación (Tabla 71) se ve como solamente la zona del Rosal y la de Ribeira do Ulla se clasifican correctamente. Las zonas del Condado del Tea y el Salnés no se diferencian entre sí. De ahí el bajo porcentaje de clasificación (77,44%). Para diferenciar estas dos subzonas sería necesario considerar otras variables adicionales.

Tabla 71 Tabla de clasificación de los vinos de la variedad albariño por subzonas de la D.O. Rías Baixas"

subzona	Condado del Tea	Rosal	Salnés	Ribeira do Ulla
Condado del Tea	78,79%	0,00%	15,15%	6,06%
Rosal	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%
Salnés	23,46%	0,00%	71,60%	4,94%
Ribera del Ulla	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%

Porcentaje de casos clasificados correctamente: 77,44%

IV.13. Estudio de los vinos procedentes de variedades experimentales no autóctonas cultivadas en Galicia

Se analizaron los vinos de seis variedades de uva no autóctonas de Galicia, pero cultivadas en la subzona del Salnés: pinot blanc, pinot gris, g-

traminer, sauvignon blanc, riesling y chardonnay. Estas muestras de vino fueron suministradas por la Estación Enológica de Ribadumia. En este caso sólo dispusimos de vinos de la cosecha del 2010 excepto para la variedad chardonnay y riesling.

En la Figura 98 se puede observar que las variedades pinot blanc, sauvignon blanc y g-traminer tienen un perfil polifenólico diferente al resto de los vinos estudiados, para los cuales el compuesto que está en mayor proporción es el ác. caftárico, en cambio para estas variedades es PB1 el polifenol más abundante.

Resultados completamente distintos fueron encontrados por Landrault et al.¹⁷⁷. Estos autores analizaron vinos de la variedad saugvignon blanc cultivados en Francia y observaron un perfil diferente, donde el ác. caftárico es el compuesto más abundante y con un contenido polifenólico superior a excepción del ác. gálico. En el caso de esta variedad el factor origen geográfico tiene un valor muy importante. Por otra parte Pour et al.¹⁸⁰ estudiaron diferentes vinos de la variedad g-traminer cultivada en Alemania, algunos de los cuales tienen características similares a las encontradas en este trabajo; esto podría conducir a pensar que en esta variedad el factor origen no resulta tan influyente; si bien, hay que tomar estas conclusiones con cautela, pues el número de muestras analizadas es pequeño.

Resultados y discusión. Vino Blanco

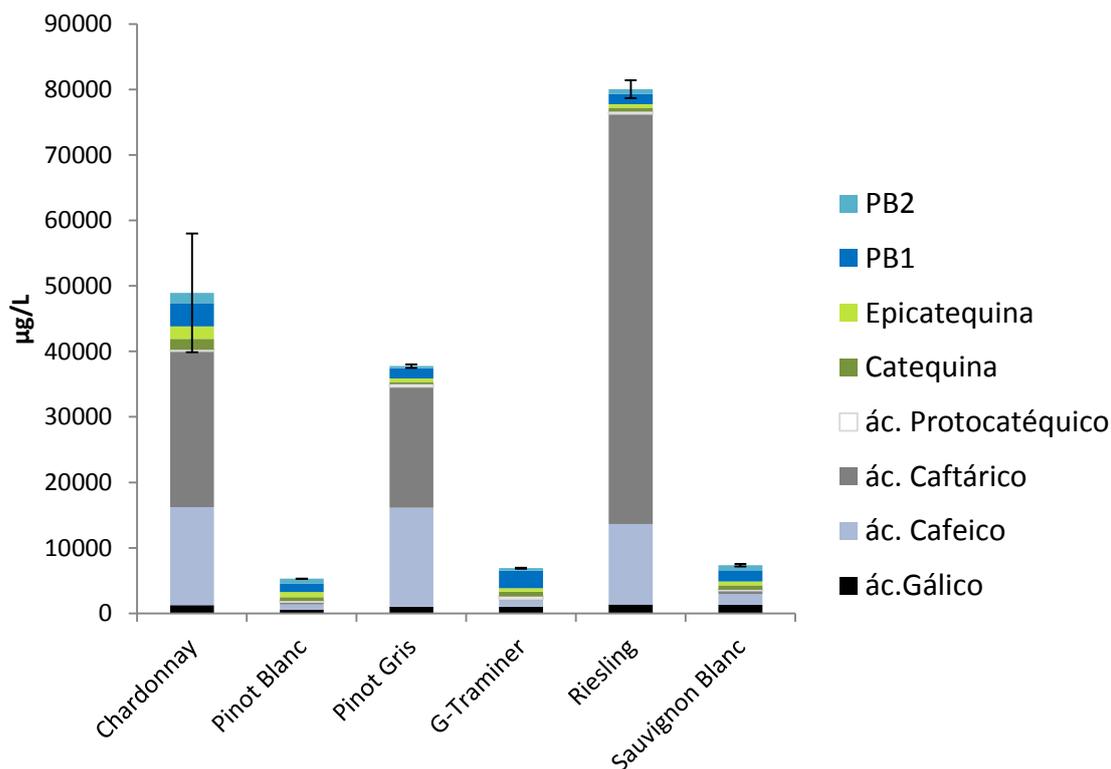


Figura 98 Valores promedio de los polifenoles de las variedades experimentales de vino

A continuación, en la Tabla 72 se resumen los valores promedio de la concentración de polifenoles individuales identificados en los vinos de las variedades experimentales, además también están representados por medio de letras los grupos homogéneos. En las Figura 99 y Figura 100 se muestran gráficamente estos mismos datos.

El vino que presenta valores de la AA y el contenido en caftárico más elevados es la variedad riesling (Tabla 72). Autores como Li et al.¹⁷⁸ y Pour et al.¹⁸⁰, que analizaron esta variedad obtuvieron valores muy inferiores a los nuestros (Tabla 65). Los valores publicados¹⁷⁹ de IPT para las variedades riesling, sauvignon blanc y chardonnay también fueron inferiores.

Tabla 72 Valores promedio de IPT, AA y concentraciones de polifenoles individuales de los vinos experimentales. Grupos homogéneos

	Chardonnay		Pinot Blanc		Pinot Gris		G-traminer		Riesling		Sauvignon blanc	
AA	676,2c	± 41,8	719,5bc	± 6,5	757,2bc	± 4,4	815,7b	± 3,3	1247,3a	± 57,6	715,7bc	± 4,4
IPT	253,5ab	± 20,9	214,5b	± 0,1	247,1ab	± 3,0	239,4ab	± 1,7	279,9a	± 3,0	229,9b	± 1,4
Ác. gálico	1240,8ab	± 106,8	562,6c	± 40,2	991,1b	± 4,6	1015,0b	± 20,0	1344,6a	± 77,9	1322,7a	± 83,0
Ác. cafeico	14995,8a	± 107,0	786,0b	± 18,8	15156,6a	± 131,8	986,2b	± 31,8	12302,9a	± 3623,0	1653,8b	± 12,1
Ác. caftárico	23838,5b	± 8272,8	420,5c	± 5,6	18470,9b	± 182,4	202,2c	± 1,8	62637,3a	± 4952,0	511,4c	± 8,8
Ác. protocatéquico	173,5b	± 9,9	131,2b	± 9,5	366,6a	± 7,4	380,3a	± 10,2	314,3a	± 41,7	108,0b	± 2,1
Catequina	1643,2a	± 112,0	582,0bc	± 56,9	345,9c	± 9,9	742,0b	± 53,1	583,4bc	± 53,6	663,1b	± 27,4
Epicatequina	1943,1a	± 198,9	772,6b	± 21,8	514,6b	± 10,4	503,2b	± 11,1	575,4b	± 31,8	591,0b	± 25,4
PB1	3520,2a	± 371,7	1299,1c	± 4,2	1558,4c	± 28,4	2690,2b	± 31,6	1558,4c	± 18,0	1722,7c	± 30,3
PB2	1584,9a	± 109,0	726,1b	± 2,5	341,6c	± 8,2	380,2c	± 9,2	734,6b	± 32,8	781,9b	± 20,2
Suma polifenoles	48940,1b	± 9065,8	5280,0c	± 44,2	37745,7b	± 251,7	6899,3c	± 82,1	80051,0a	± 1370,4	7354,6c	± 186,9

Unidades: IPT: mg GAE/L ; AA: μ mol trolox/L; polifenoles: μ g/L

Datos: media \pm desviación estándar

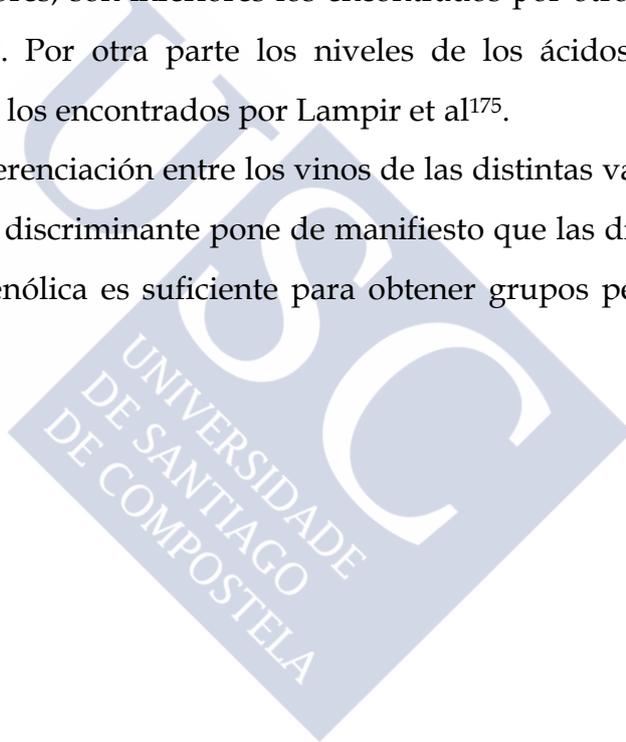
Diferentes superíndices = diferencias significativas LSD ($p < 0,05$)

Datos normalizados: Ác. Cafeico, Ác. Caftárico y la suma de polifenoles

Si analizamos la concentración de los polifenoles individuales, se observa como la variedad riesling las mayores concentraciones de ácido caftárico, y pertenece al grupo homogéneo de mayor concentración de ác. cafeico (Figura 99). Las variedades riesling, g-traminer y pinot gris destacan por los valores elevados de ác. protocatéuico. Y por último, la variedad pinot blanc es la que presenta la menor concentración de ácido gálico.

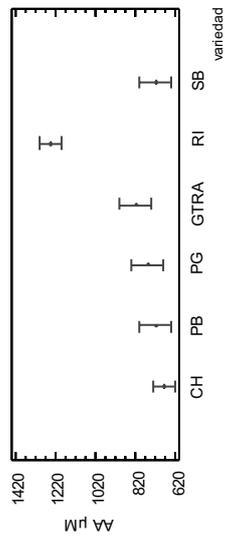
El chardonnay destaca por catequina, epicatequina, PB1 y PB2 (Figura 100). Aun así, sus valores, son inferiores los encontrados por otros autores en diferentes países¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Por otra parte los niveles de los ácidos caftárico y cafeico son similares a los encontrados por Lampir et al¹⁷⁵.

En cuanto a la diferenciación entre los vinos de las distintas variedades no autóctonas, el análisis discriminante pone de manifiesto que las diferencias en su composición polifenólica es suficiente para obtener grupos perfectamente separados entre sí.

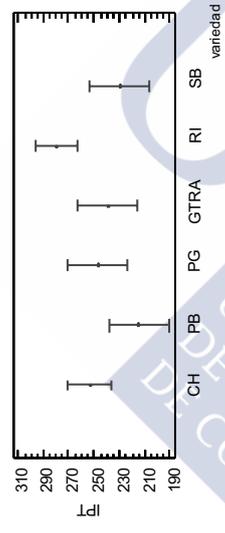


ANOVA (LSD 95%); CH: chardonnay; PB: pinot blanc; PG: pinot gris; RI: riesling; SB: sauvignon blanc; GTRA: g-traminer

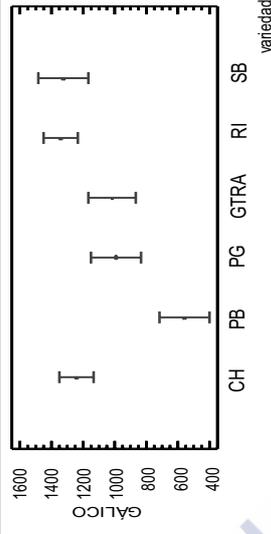
AA(μ M trolox)



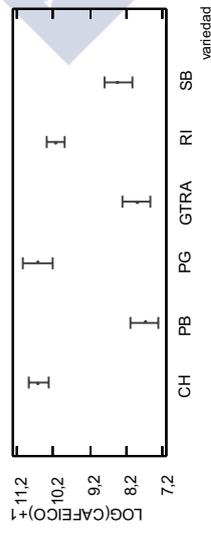
IPT(mg GAE/L)



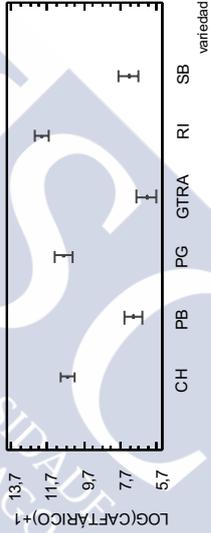
Ác. gálico(ppb)



Ác. cafeico(ppb)



Ác. caftárico(ppb)



Ác. protocatéquico(ppb)

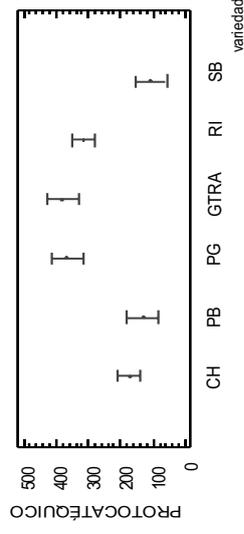


Figura 99 Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos experimentales

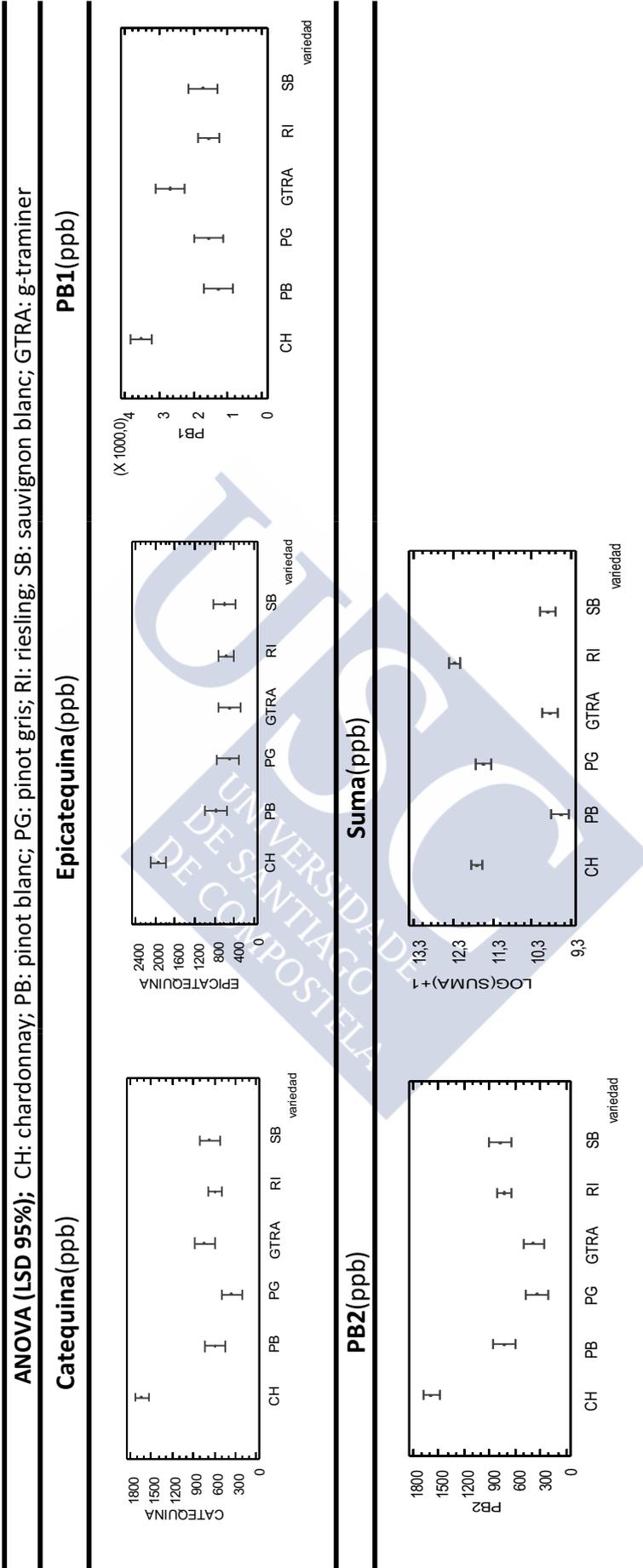


Figura 100 (Continuación Figura 99). Valores promedio de IPT, AA y polifenoles individuales de los vinos experimentales

En el gráfico de las funciones de discriminación (Figura 101) se observan los resultados obtenidos, un porcentaje de clasificación de un 100% (Tabla 73). No obstante, la proximidad en la representación entre pinot blanc y sauvignon blanc indica que estas variedades serían más semejantes entre sí. Por otra parte la variedad riesling presenta características muy diferentes a las de todas las demás.

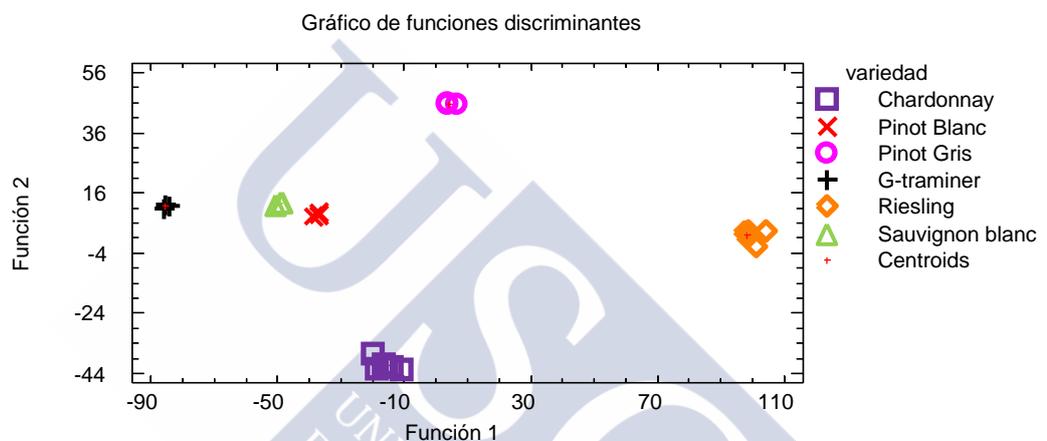


Figura 101 Representación gráfica de las funciones de discriminación para los vinos experimentales

Tabla 73 Tabla de clasificación de los vinos experimentales

variedad	Chardonnay	Pinot b.	Pinot Gris	G-traminer	Riesling	Sauvignon b.
Chardonnay	100 %	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Pinot Blanc	0,00%	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Pinot Gris	0,00%	0,00%	100%	0,00%	0,00%	0,00%
G-traminer	0,00%	0,00%	0,00%	100 %	0,00%	0,00%
Riesling	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100%	0,00%
Sauvignon b.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100%

Porcentaje de muestras correctamente clasificadas: 100,00%

Estos resultados podrían hacer pensar que la influencia del “terroir” en los vinos finales no es tan acusada como las diferencias en el perfil polifenólico

originadas por la variedad de uva de procedencia; ya que, todos estos vinos proceden exactamente de la misma zona geográfica y, consecuentemente, tanto las características del terreno, como las características climatológicas han sido las mismas en cada añada. Sin embargo, todos los vinos se diferencian perfectamente entre sí.

IV.13.1. Comparación de 4 vinos de variedades autóctonas y de variedades experimentales.

En las siguientes gráficas se comparan los vinos en cuanto a la suma de polifenoles (Figura 102) como a AA e IPT (Figura 103).

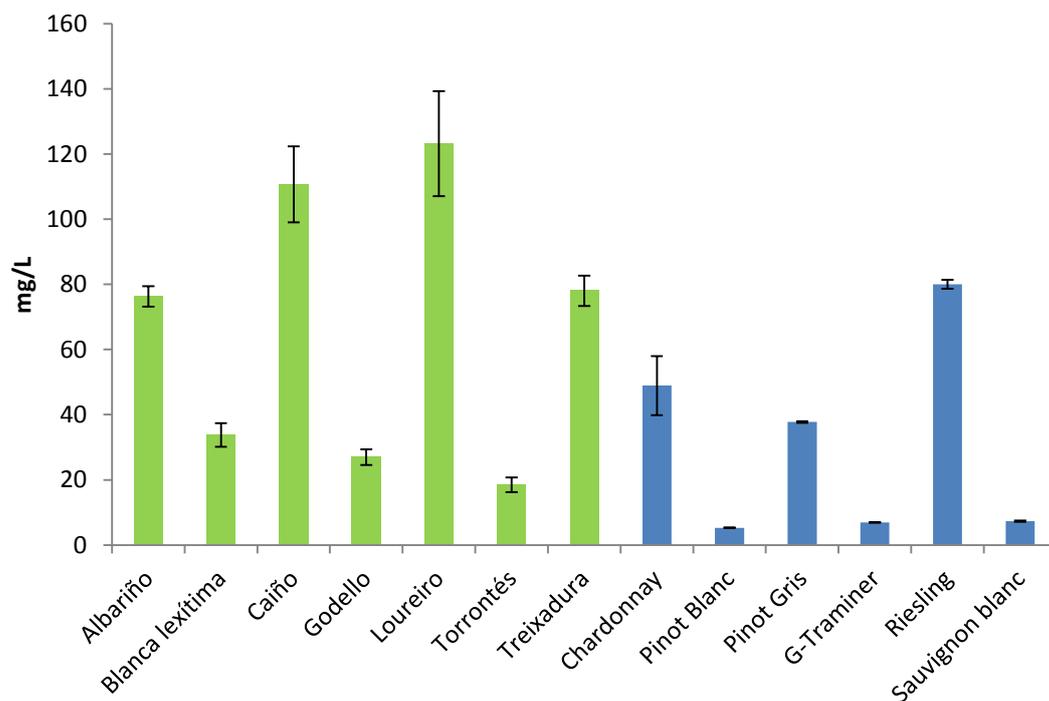


Figura 102 Comparación de la suma de polifenoles de los vinos de las variedades autóctonas y experimentales

A pesar de la cautela con la que hay que extraer conclusiones debido a las razones expuestas a lo largo de este trabajo, se puede observar que, a nivel de composición polifenólica, las variedades autóctonas y no autóctonas comparan bien, destacando riesling y chardonnay y pinot gris en el grupo de vinos con mayor concentración de polifenoles (cuantificada como suma de

concentraciones individuales). Por otra parte, esta conclusión aparece aún más reforzada al considerar la AA y el valor del IPT, para los cuales no hay diferencia entre vinos de un origen u otro.

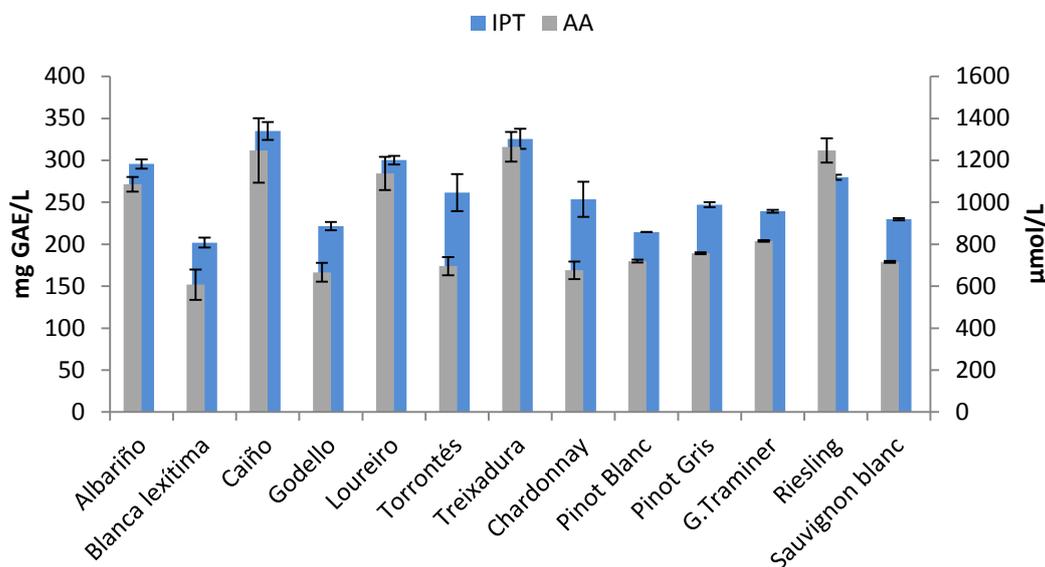


Figura 103 Comparación de la AA e IPT de los vinos de las variedades autóctonas y experimentales

Adicionalmente, para intentar evaluar la robustez del modelo estadístico propuesto para clasificar los vinos monovarietales, se utilizaron los vinos obtenidos a partir de variedades experimentales como muestras ciegas. Así, a partir del análisis discriminante realizado en el apartado IV.11, se evaluaron los vinos experimentales como muestras desconocidas. En la Tabla 74 se pueden ver los resultados obtenidos. Las variedades g-traminer, sauvignon blanc y pinot blanc son más parecidas al godello, con probabilidades superiores al 0,98. El resto de variedades no presentan características similares con ninguno de los cinco vinos autóctonos de la clasificación.

La variedad riesling que, teóricamente, está emparentada genéticamente con la variedad albariño, presenta unas características más parecidas a la variedad loureiro en este estudio.

Tabla 74 Probabilidad de confusión de las variedades experimentales con las variedades autóctonas

muestras	Variedades de confusión	Probabilidad (%)
X01- G-traminer	Godello	98,7
X02- Pinot gris	Albariño	81,6
X03- Chardonnay	Albariño	80,2
X04- Riesling	Loureiro	82,1
X06-Sauvignon blanc	Godello	98,8
X07- Pinot blanc	Godello	98,9
Verdejo	Loureiro	60,1

Se ha incluido también como muestra ciega un vino comercial procedente de una denominación de origen no gallega de la variedad verdejo. Como se aprecia en los resultados del análisis, este vino no presenta características similares a ninguna de las variedades autóctonas analizadas (60,1% de parecido con la variedad Loureiro) (Tabla 74).

IV.14. Correlación entre el vino y su bagazo de partida

Otro de los objetivos que se plantearon en este proyecto, es el estudio de las relaciones existentes entre un vino monovarietal y el bagazo que genera. Es decir, si de algún modo, se puede valorar la cantidad de polifenoles que pasan al vino y los que se quedan en el bagazo. Si bien para un correcto planteamiento de este estudio debería considerarse obviamente la carga polifenólica de las uvas de partida, este planteamiento es, sin embargo, muy difícil de llevar a la práctica; y sólo hemos conseguido parejas “vino-bagazo” directamente relacionadas gracias al gran esfuerzo de algunas de nuestras bodegas colaboradoras, que incluso, en ocasiones, vinificaron independientemente nuestras muestras de vino monovarietal. Se ha concluido que el único modo de abordar seriamente este objetivo sería ceñirse a una única finca experimental de una sola bodega y hacer el seguimiento del perfil polifenólico de todo el proceso: desde el envero de la uva hasta el vino embotellado, pasando por la caracterización del bagazo generado en su obtención.

A pesar de todo, se han explorado los datos disponibles y estudiar si se puede establecer una correlación entre los vinos y sus correspondientes bagazos. Para ello se utilizaron sólo los vinos y bagazos para los que se contaban con muestras de los 3 años de cosecha.

A continuación, en la Tabla 75 se detallan los valores de correlación de las diferentes variables. En general los valores de correlación son bajos. Los mayores, los presentan la PB1 (0,39) y el ác. caftárico (0,37). Tanto el ác. protocatéquico como la PB2 no presentan correlaciones significativas.

Tabla 75 Correlación entre los vinos y su bagazo de partida

	Pearson	p-valor
AA	0,31	0,0041
IPT	0,26	0,0168
Ác. gálico	0,22	0,0479
Ác. caftárico	0,37	0,0004
Ác. protocatéquico	0,07	0,5227
Catequina	0,32	0,0025
Epicatequina	0,25	0,0211
PB1	0,39	0,0002
PB2	0,19	0,0767
Q-3-glucurónido	0,26	0,0168
Suma total	0,24	0,0194

Esta baja correlación confirma la dificultad del planteamiento inicial y, además, puede ser debida a que la concentración de polifenoles que presenta la pulpa de cada uva no sea proporcional al contenido de polifenoles que presenta el bagazo correspondiente (hollejos y semillas); puesto que, en el caso de los vinos blancos es de la pulpa de donde la mayoría de los polifenoles presentes pasan la vino. Por otra parte las diferentes prácticas de vinificación utilizadas en la bodega pueden variar el contenido final en compuestos polifenólicos del mosto. Así, una uva que, en principio, posea un contenido bajo de polifenoles puede producir un vino con más carga polifenólica si se somete a un tiempo de maceración más extenso o si se vinifica en diferentes condiciones de temperatura.

Por tanto, la evaluación del porcentaje de la carga polifenólica inicial de la uva que pasa al vino dependerá, como se comentaba anteriormente, de la realización de un diseño experimental específico y adecuado; y requerirá del conocimiento del modo de vinificación de la bodega colaboradora correspondiente.

IV.15. Contribución al estudio evolutivo de los polifenoles en función de diferentes técnicas de vinificación y conservación

Con el objetivo de contribuir al estudio evolutivo de los polifenoles en función de diferentes técnicas de vinificación y conservación, se han llevado a cabo varios estudios preliminares en vino blanco. El primero de ellos consistió en analizar la influencia de la maceración en el contenido polifenólico del vino. El segundo estudio pretende valorar la evolución en la composición de polifenoles del vino blanco de variedades autóctonas de Galicia, a causa de una posible degradación oxidativa por prácticas de conservación inadecuadas. Los resultados obtenidos en ambos estudios están reflejados en los siguientes apartados.

IV.15.1. Diferencias en el perfil polifenólico de un vino sometido a maceración

A parte de los factores ya mencionados que afectan a la concentración de polifenoles en la uva, y que a su vez afectan al contenido de estos en el vino. Existen otros factores como las diferentes técnicas de vinificación que se llevan a cabo en cada bodega de forma particular. Una de las prácticas es la maceración, en la que el bagazo permanece en contacto con el mosto un tiempo y a una temperatura determinada²³. Aunque en ningún caso las condiciones de maceración de los blancos se aproximan siquiera a las de los vinos tintos, en los cuales las partes sólidas de las uvas permanecen macerando durante todo o una buena parte del tiempo que dura la fermentación (7-15 días).

Con el fin de observar este efecto se analizó el mismo vino sometido o no a maceración. El vino es de la variedad albariño y de la zona del Salnés (AL02-SM). Esta maceración consistió en 12-18 horas de contacto con el bagazo y a una temperatura de 14 °C. En la Tabla 76 se pueden ver las diferencias significativas en el perfil polifenólico. En general el vino macerado presenta un porcentaje mayor de compuestos polifenólicos. Solamente el caftárico y la q-3-glucósido presentan una mayor concentración en el vino sin macerar. Estos resultados se aprecian mejor gráficamente.

La relación inversa entre la concentración de cafeico y caftárico (Figura 104) en ambos tipos de vinos puede ser debida a la hidrólisis enzimática del caftárico en ácido cafeico y ácido tartárico durante el proceso de vinificación¹⁹² (Figura 105). Si no se llevan a cabo las acciones necesarias (eliminación del oxígeno, añadir ácido ascórbico, SO₂) se puede perder entre el 35-100% de la concentración de caftárico. En cuanto a la AA el vino macerado también presenta un valor significativamente mayor, debido al aumento en compuestos polifenólicos.

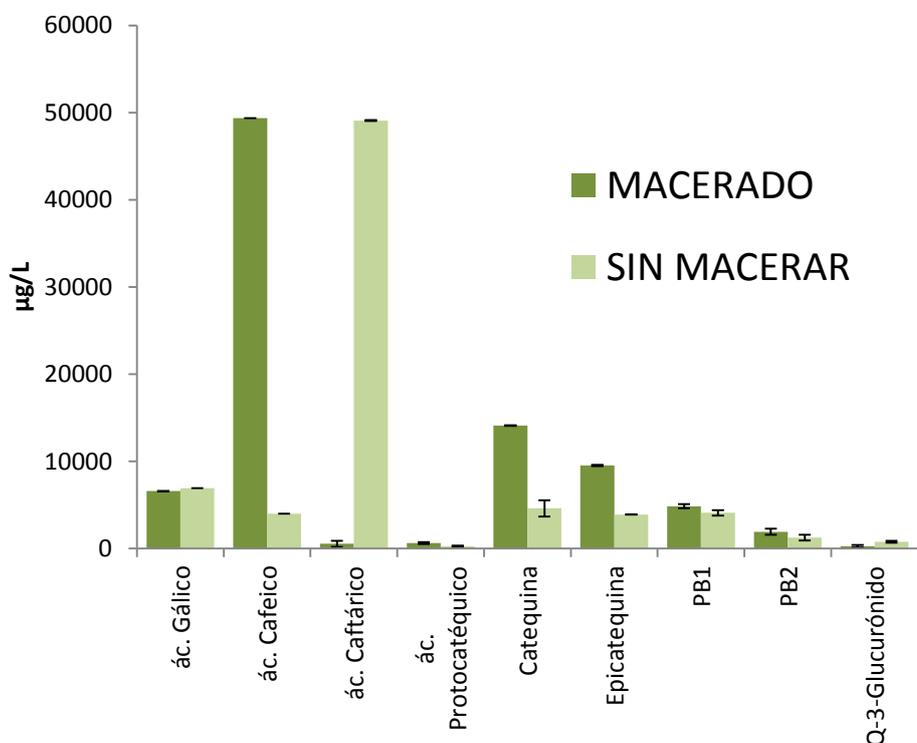


Figura 104 Comparación del perfil polifenólico de un vino macerado y sin macerar

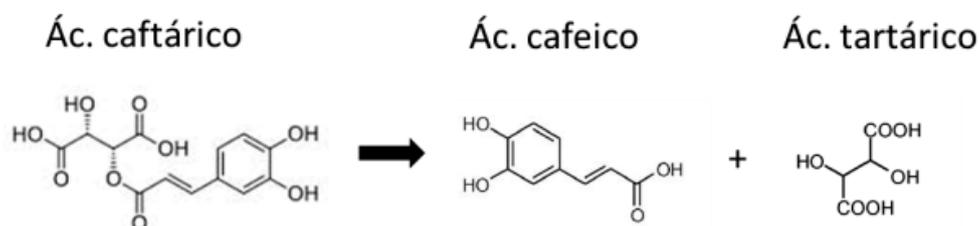


Figura 105 Reacción de hidrólisis del **ác. caftárico** en **ác. cafeico** y **ác. tartárico**

Tabla 76 Comparación del perfil polifenólico de un vino blanco sometido o no a maceración

	Macerado		Sin macerar	
AA	1348, ^a	± 7	1211 ^b	± 17
IPT	486 ^a	± 10	397 ^b	± 6
Ác. Gálico	6586 ^a	± 356	6929 ^a	± 51
Ác. Cafeico	49374 ^a	± 108	4004 ^b	± 76
Ác. Caftárico	548 ^b	± 35	49090 ^a	± 934
Ác. Protocatéquico	627 ^a	± 67	272 ^b	± 22
Catequina	14092 ^a	± 237	4608 ^b	± 319
Epicatequina	9519 ^a	± 340	3905 ^b	± 325
PB1	4848 ^a	± 150	4093 ^b	± 106
PB2	1928 ^a	± 61	1259 ^b	± 87
Q-3-glucurónido	278 ^b	± 19	782 ^a	± 8

IPT: mg GAE/L ; AA: μmol trolox/L; polifenoles: $\mu\text{g/L}$

Datos: media \pm desviación estándar(n=3)

Diferentes superíndices = diferencias significativas LSD ($p < 0,05$)

Datos normalizados: **Ác. caftárico**

Este aumento en la concentración de polifenoles durante la maceración fue también observado por Henanz et al.³⁴. Estos autores observaron cambios significativos no solamente con el tiempo de maceración sino también con las condiciones de temperatura en la que se lleva a cabo.

No obstante, el aumento excesivo de ciertos polifenoles en el vino puede presentar un gran inconveniente, como es el caso de los flavanoles como la catequina, producen cambios organolépticos no deseables en el vino final.

IV.15.2. Degradación de los polifenoles en vino blanco

Los cambios en la coloración del vino son el resultado de una serie de complejas reacciones que se producen durante su elaboración, envejecimiento o almacenamiento¹⁸³. Estas reacciones producen un pardeamiento del vino, y pueden ser de carácter enzimático o no enzimático¹⁹³⁻¹⁹⁵. Estos dos procesos se producen durante elaboración del vino, pero una vez que el vino está embotellado los fenómenos de oxidación presentes predominantes son los no enzimáticos. Los principales componentes a los que afectan estas reacciones oxidativas son los compuestos polifenólicos. Esta serie de reacciones son complejas ya que participan, además de compuestos fácilmente oxidables, otros constituyentes incluyendo el SO₂, ácido ascórbico (si se ha añadido al vino) y metales como el hierro o el cobre^{194,196}. En el caso particular de los vinos blancos el proceso oxidativo se inicia por la oxidación de derivados del catecol (o-difenol), como pueden ser el ácido cafeico, el ácido gálico o las catequinas, los cuales son los sustratos más fácilmente oxidables presentes en el vino blanco¹⁹⁵. La concentración de estos o-difenoles está correlacionada con el pardeamiento en los vinos blancos¹⁹⁶.

El estudio realizado en esta Tesis se llevó a cabo con el fin de valorar la evolución en el comportamiento de diferentes polifenoles del vino blanco de tres variedades autóctonas de Galicia, a causa de una posible degradación oxidativa por unas prácticas inadecuadas, ya sea durante la elaboración del vino, o durante su almacenamiento posterior.

Las altas temperaturas o la exposición a la luz, pueden provocar en el vino determinadas reacciones que impliquen cambios en la composición de sus compuestos volátiles y en su perfil polifenólico, que a su vez provoquen modificaciones en sus características organolépticas¹⁹⁷. Pero las reacciones producidas en el vino por estos dos factores son diferentes, por este motivo los cambios producidos también lo son¹⁹⁸.

Estos cambios producidos en su perfil polifenólico, coloración o actividad antioxidante, pueden variar de un vino a otro dependiendo de su perfil y concentración inicial de polifenoles. Esto es debido a las diferencias de cada compuesto en cuanto a su estabilidad frente a las diferentes fuentes de degradación y las características de los nuevos productos originados durante ese proceso de degradación. Por este motivo el estudio se llevó a cabo con tres vinos blancos con características muy diferentes. En la Tabla 77 están detalladas sus características más importantes.

Tabla 77 Características iniciales de los vinos utilizados en los test de degradación

	pH	Abs*	AA	IPT	HPLC-DAD			LC-MS/MS					
					Cafe	Caft	Gal	Cat	Epicat	PB1	PB2	Pro	Q-glucu
Albariño	3,45	0,102	1,4	320	3,1	38,9	13	14,0	13,9	13,7	5,6	0,6	2,0
Caíño	3,39	0,154	1,9	407	3,3	62,1	33,5	16,5	12,0	18,1	5,7	0,3	2,2
Godello	3,65	0,081	0,9	205	2,5	8,2	nd	6,7	4,6	6,3	3,4	0,5	0,2

Unidades: AA: μM trolox/L; IPT:mg GAE/L; Polifenoles: mg/L

Cafe: $\acute{\text{a}}\text{c.}$ cafeico; Caft: $\acute{\text{a}}\text{c.}$ caftárico; Gal: $\acute{\text{a}}\text{c.}$ gálico; Cat:catequina; Epicat:epicatequina;

Pro: $\acute{\text{a}}\text{c.}$ protocatéuico; Q-glucu:q-3-glucurónido

nd: no detectado

*Abs: $\lambda=420\text{nm}$ (t_{po}=0)

Además de estudiar el comportamiento de la AA y la Abs a 420nm durante estos diseños experimentales, se estudió el comportamiento de 3 fenoles: $\acute{\text{a}}\text{c.}$ caftárico, $\acute{\text{a}}\text{c.}$ cafeico y $\acute{\text{a}}\text{c.}$ gálico. El $\acute{\text{a}}\text{c.}$ caftárico es el hidroxicinamato más abundante en los vinos blancos y es un precursor del $\acute{\text{a}}\text{c.}$ cafeico ya que está formado por la unión de este $\acute{\text{a}}\text{c.}$ y el $\acute{\text{a}}\text{c.}$ tartárico, por lo tanto como consecuencia de su hidrólisis se libera al medio $\acute{\text{a}}\text{c.}$ cafeico. El $\acute{\text{a}}\text{c.}$ cafeico es muy común en los vinos y presenta una gran actividad antioxidante, además de ser muy estudiado entre otras cosas, por sus

propiedades protectoras de los aromas en vino¹⁹⁹ o por contribuir a la estabilidad del color en los vinos tintos²⁰⁰. El ác. gálico presenta una elevada capacidad antioxidante y contribuye también de una manera muy importante a la estabilidad del aroma, como sucede con el ác. cafeico²⁰¹.

Para poder simular la degradación de los diferentes vinos en un corto período de tiempo se llevaron a cabo dos estudios: termo-degradación y foto-degradación. Los detalles de los mismos están explicados en el apartado III.14. El estudio de termo-degradación se ha realizado a una temperatura de 55°C asegurándonos así la inactivación de enzimas como la polifenol oxidasa (PPO), caso de que estuviesen todavía presentes, ya que a esa temperatura la enzima es rápidamente destruida²⁰².

IV.15.2.1. Influencia del oxígeno en la evolución de los vinos blancos

Con el objetivo de conocer la influencia del oxígeno en contacto con el vino durante el proceso de degradación térmica, se llevó a cabo un experimento previo a los test de degradación. Esta prueba, consistió en realizar el test de termo-degradación introduciendo o no nitrógeno en el espacio de cabeza, para eliminar el oxígeno y comparar de esta forma los resultados. Las variables mediadas en este caso fueron su IPT, la AA y la medida a la longitud de onda de 420nm, que nos indicará el cambio en su coloración hacia tonos más oscuros, también llamado pardeamiento del vino.

A continuación se muestran las gráficas que representan la variación porcentual de estas variables en los vinos estudiados, en presencia o no de O₂ en contacto con el vino, después de haber sido sometidos al test de termo-degradación. Es decir, una vez que los vinos han sometido a estas pruebas previas, se ha calculado, a partir de los datos iniciales y finales de cada variable estudiada, la variación porcentual producida.

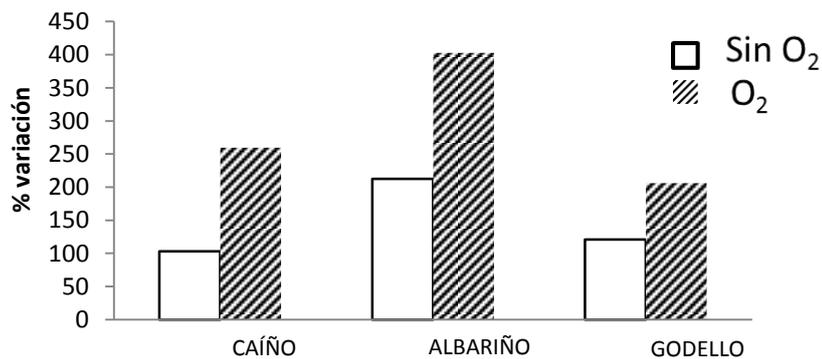


Figura 106 Diferencia de la Abs a 420nm del vino en el test de termo-degradación, en presencia o no de oxígeno



Figura 107 Aspecto del vino albariño después de la termo-degradación con y sin oxígeno

Como se puede apreciar en las figuras Figura 106 y Figura 107, la variación en la medida de la absorbancia a 420nm confirma que el pardeamiento de los vinos es mayor si se encuentra en contacto con el oxígeno. Sin embargo en la medida de polifenoles totales no existe una gran variación en ninguno de los dos casos (Figura 108). En los 3 casos la variación ronda el 10%, siendo la diferencia más elevada para el caíño con oxígeno en su espacio de cabeza cuyo valor de IPT disminuye hasta un 18%.

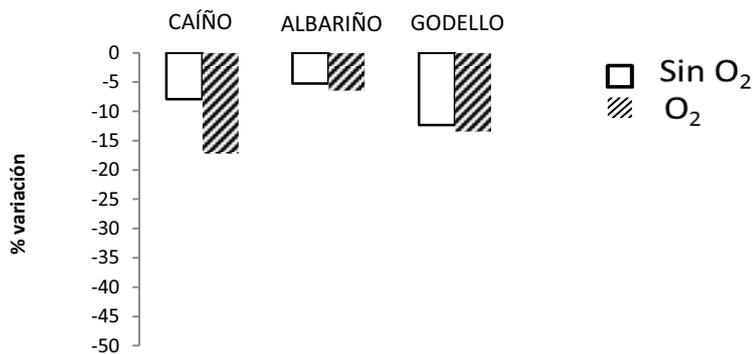


Figura 108 Variación del IPT durante la termo-degradación en presencia o no de oxígeno

Por otra parte, el valor de la AA también permanece estable. La variación en la medida para los tres tipos de vinos también es del 10%, a excepción del valor del godello en ausencia de oxígeno que aumenta hasta un 20% aproximadamente. Hay que destacar que estas pequeñas variaciones son positivas en el caso de estar en ausencia de oxígeno y son negativas si por el contrario los vinos se encuentran en presencia de oxígeno (Figura 109).

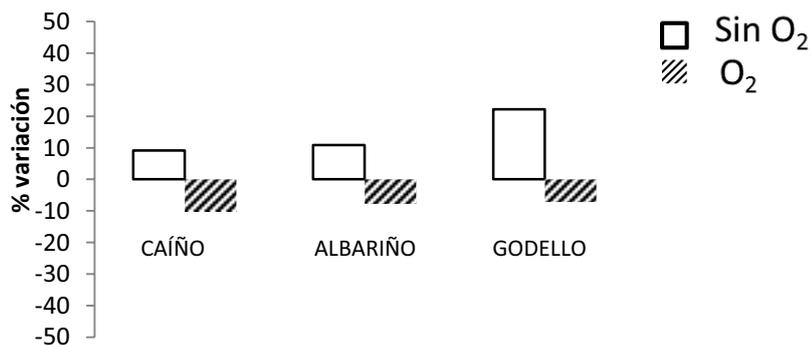


Figura 109 Variación de la AA después de la termo-degradación en presencia o no de oxígeno

En este estudio también se midieron tanto el ác. caftárico como el ác. cafeico y se comprobó que también existe una diferencia en la evolución del

vino en presencia o ausencia de oxígeno. Los resultados están representados en la Figura 110.

El ác. caftárico permanece bastante estable, la variación más grande la presenta el caíño (disminuye un 20%) en contacto con oxígeno, al contrario de lo que le sucede al albariño y al godello. Esta diferencia en su comportamiento puede ser debida a la presencia en estos dos últimos vinos de compuestos más fácilmente oxidables que ejerzan un efecto protector hacia otros compuestos como puede ser el ác. caftárico. Uno de estos compuestos podría ser la catequina, cuya concentración es significativamente menor en el vino de la variedad caíño en comparación con la gran concentración presente en las otras variedades.

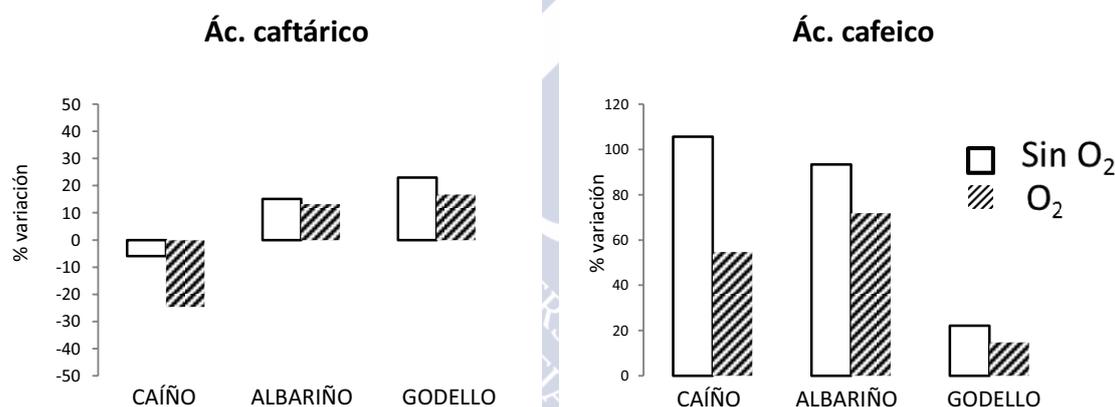


Figura 110 Variación del ác. caftárico y ác. cafeico después de la termo-degradación en presencia o no de oxígeno

En la evolución del ác. cafeico también existe una diferencia, y de un modo más significativo de lo que ocurría en el ác. caftárico. Aunque en ambos casos la concentración aumenta, esta tendencia es menor cuando el vino se encuentra en presencia de oxígeno. Esta diferencia puede ser debida a que, aunque compuestos precursores del ác. cafeico estén degradándose y produciendo el aumento de la concentración de cafeico en el medio, la presencia de oxígeno puede degradar también al ác. cafeico provocando una disminución en el contenido final de este compuesto. Benítez et al.¹⁹⁸ encontraron un comportamiento similar en la comparación de un vino

sometido a altas temperaturas y/o luz UV. Aunque como en este trabajo el aumento era generalizado, el mayor aumento de ác. caftárico se presentaba cuando el vino estaba sometido sólo a altas temperaturas.

Las condiciones en las que se lleva a cabo el test de foto-degradación implican que el vino se encuentre en presencia de oxígeno, por este motivo en las siguientes pruebas de termo-degradación del vino, no se utilizará el nitrógeno para el desplazamiento del oxígeno presente en el espacio de cabeza, para igualar así las condiciones de ambos test.

Por lo tanto, en ambas pruebas habrá que tener en cuenta también la influencia que el oxígeno pueda ejercer sobre los tres tipos de vino blanco estudiados (caíño, albariño y godello).

IV.15.2.2. Estudio de la foto-degradación de los patrones de los ácidos caftárico y cafeico

Para conocer el comportamiento de dos de los polifenoles mayoritarios presentes en el vino blanco y que tienen un importante papel en las reacciones de oxidación del mismo, se llevó a cabo el estudio de las cinéticas de foto-degradación de los patrones puros. Como se puede ver en la siguiente Figura 111, el ác. caftárico disminuye su concentración con el tiempo de exposición a la luz UV hasta llegar casi a desaparecer a los 180 min.

Por otro lado a la vez que el ác. caftárico desaparece, se forma un nuevo compuesto, el ác. cafeico. Este compuesto generado aumenta su concentración a medida que disminuye el ác. caftárico. La evolución de este nuevo compuesto puede observarse en la misma gráfica donde el cafeico está marcado con línea discontinua (Figura 111).

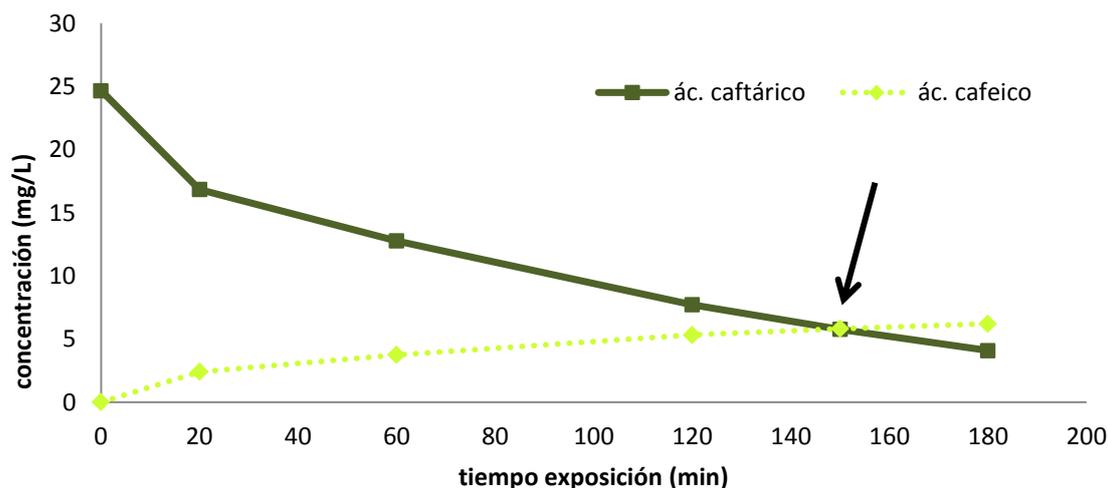


Figura 111 Evolución del patrón de ácido caftárico durante la foto-degradación de un patrón puro (25 mg/L)

Este hecho de degradación del ácido caftárico y aumento del ácido cafeico es debido a la ruptura de la molécula de ácido caftárico que provoca la liberación del ácido cafeico y ácido Tartárico (ver Figura 105).

Esta ruptura ya se observó al estudiar la oxidación durante la maceración en el apartado IV.15.1. Aunque en aquel caso, la ruptura de la molécula podría ser debida también a otros factores como la hidrólisis enzimática.

Para seguir con este estudio se llevó a cabo la foto-degradación del ácido cafeico individualmente, para conocer así su evolución de forma aislada. En la Figura 112 se puede ver la evolución de un patrón de 40 mg/L de este compuesto. El resultado obtenido fue la disminución en su concentración pero de una forma menos acusada que el caftárico. Mientras que para el ácido cafeico a los 150 min solamente se ha degradado el 18%, en cambio para el caftárico ya se había degradado más del 70%, en iguales condiciones experimentales. Este hecho pone de manifiesto que el cafeico, debido a su estructura presenta una mayor estabilidad frente a la luz UV. Aun así, se degrada por la acción de este factor; este es el motivo por el cual el cafeico generado por la degradación del caftárico no aumenta su concentración durante todo el tiempo que dura la degradación del caftárico, sino que llega un momento que su concentración se

estabiliza. En este punto (marcado con una flecha negra) la generación de cafeico está equilibrada con su degradación (Figura 111).

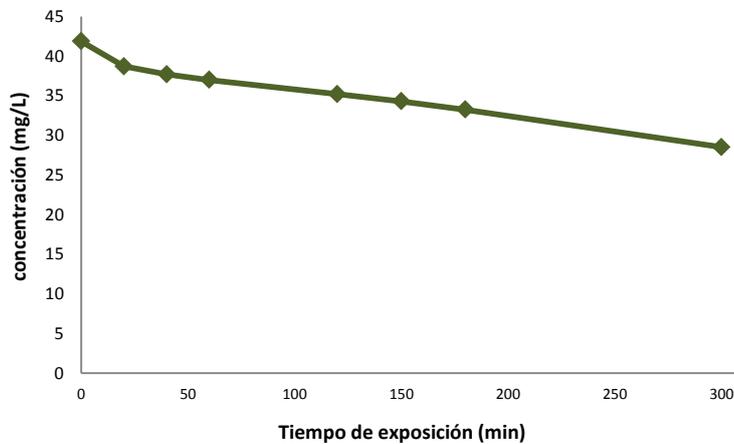


Figura 112 Evolución del patrón de ác. cafeico durante la foto-degradación

Debido a la diferente AA de los compuestos polifenólicos, se llevó a cabo el seguimiento de su AA durante el estudio de foto-degradación de forma individual. En la siguiente figura está representada la evolución de la AA de ambos compuestos (Figura 113).

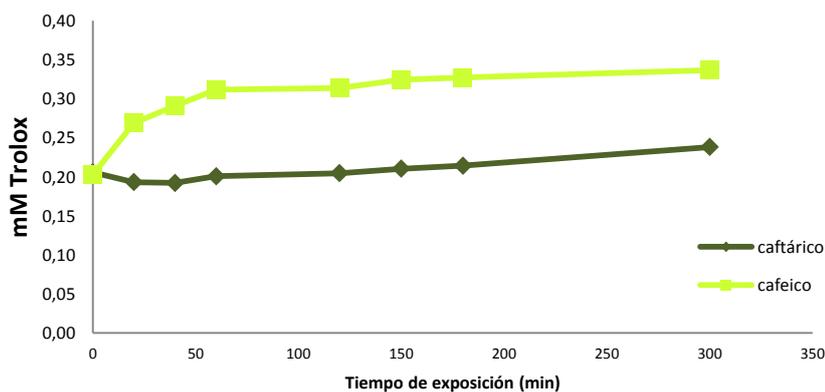


Figura 113 Evolución de la AA del ác. caftarico y del ác. cafeico durante la foto-degradación

En el caso del caftarico la tendencia es a aumentar ligeramente la AA de la disolución, en cambio como vimos en la Figura 111 la concentración del

compuesto disminuye a lo largo del tiempo. Este comportamiento es debido a la generación de ác. cafeico cuya AA es incluso mayor que la del caftárico.

Para el ác. cafeico, la evolución de su AA es diferente a la del ác. caftárico. Durante el test de foto-degradación la concentración de ác. cafeico disminuye con el tiempo, en cambio su AA es estable durante los 300min que dura el test. La estabilidad en esta medida puede ser debida a la generación de otros compuestos a partir de la molécula de ác. cafeico que también presenten AA.

Aunque la evolución de un patrón de un compuesto puede ser diferente cuando está aislado en una disolución o cuando se encuentra formando parte de una mezcla de compuestos como es el caso de los vinos, estas pruebas nos dan una idea del comportamiento que presentan estos dos polifenoles frente a un factor como es la radiación UV unido al contacto con el oxígeno. Por otro lado, este estudio realizado con patrones puros ocurre en ausencia de enzimas y por lo tanto aumenta el conocimiento de los fenómenos de pardeamiento no enzimático en vinos.

IV.15.3. Evolución de las características del vino blanco frente a la termo y foto-degradación

Las variables estudiadas en estas pruebas para observar la evolución a lo largo del tiempo de las tres variedades de vino blanco, bajo las dos fuentes de degradación, fueron: la AA, el pardeamiento (Abs a 420nm) y también se cuantificaron 5 polifenoles mayoritarios presentes en los 3 vinos blancos: ác. caftárico, ác. cafeico, ác. gálico, catequina y epicatequina.

En la siguiente tabla están los resultados obtenidos tanto de la foto como de la termo-degradación en relación a la AA y al pardeamiento (Figura 114). Como se puede observar, la AA es en general estable en ambos test de degradación. Aun así existen algunas excepciones como es el caso del godello, ya que mientras que permanece estable frente a la temperatura, presenta una disminución del 30% frente a la radiación UV. Contrario a este comportamiento se encuentra el del caíño, cuya AA aumenta casi un 15% a

altas temperaturas, debido tal vez a la presencia de productos de degradación con una AA mayor que los compuestos de partida.

Zafrilla et al.²⁰³ estudiaron la evolución de diferentes vinos blancos y tintos durante el almacenamiento y comprobaron que aunque las concentraciones de polifenoles variaban a lo largo del tiempo, la AA fue estable durante ese período. Los compuestos que más disminuyen en su caso son los flavonoles conjugados y afirman que estos compuestos presentan menor AA que sus correspondientes compuestos libres, por este motivo la AA es prácticamente estable a lo largo del tiempo. Estos resultados confirman los obtenidos en este trabajo donde también se observó la estabilidad de la AA de los vinos frente a diferentes factores.

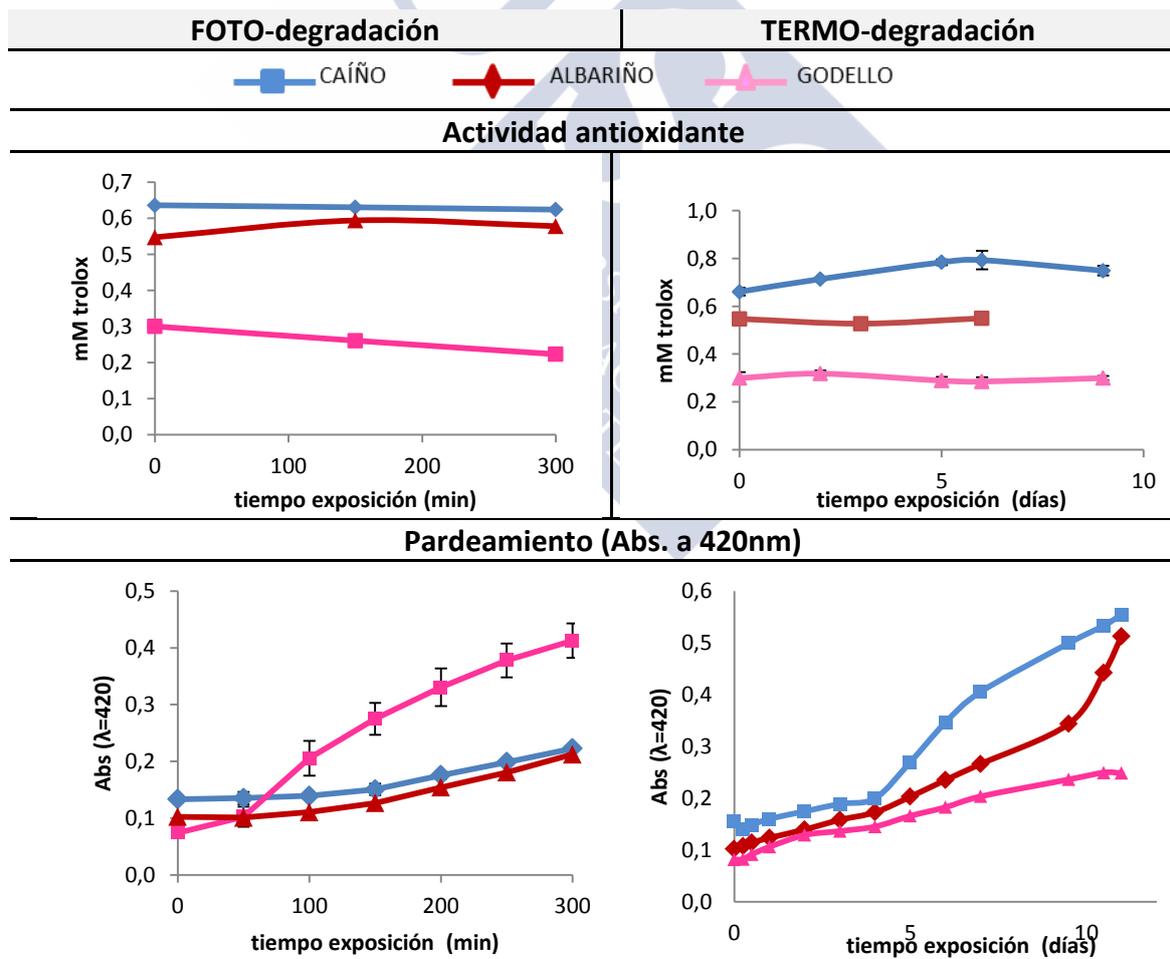


Figura 114 Evolución de la AA y del Pardeamiento (Abs. a 420 nm) durante los experimentos de la foto y termo-degradación de los vinos

Con respecto al pardeamiento (Figura 114), el comportamiento general es el aumento constante de la medida de la absorbancia a 420 nm. Sin embargo diversos autores¹⁹⁵ observaron dos etapas diferenciadas a lo largo del tiempo. En la primera etapa, se produce un aumento constante del pardeamiento hasta llegar a un máximo en el día 2 aproximadamente, a partir de ese momento la medida disminuye hasta llegar de nuevo a niveles iniciales, y en la segunda etapa, a partir del día 3 la medida aumenta constantemente hasta el final. Esta diferencia de comportamiento puede ser debida a la mayor concentración de SO₂ presente en sus vinos, la cual puede reducir, según la hipótesis de los autores, el ácido caftárico oxidado, provocando así la disminución en el pardeamiento aproximadamente en el día 3. La correlación entre la inhibición del pardeamiento y la concentración de SO₂ ya había sido observada por Pérez-Zúñiga et al¹⁹³.

La evolución de los tres vinos frente a los dos tipos de factores es diferente, mientras que en la foto-degradación el vino que presenta un mayor aumento de la absorbancia es el godello y los otros dos presentan aumentos moderados, en la termo-degradación los vinos que presentan un mayor aumento son el caño y el albariño, y el que no presenta una evolución tan acusada es el godello (Figura 115). De esta diferencia podría deducirse que ambos factores, radiación UV y temperatura, producen reacciones diferentes en los compuestos presentes en el vino, de tal manera que la presencia o no de determinados compuestos ejercerá una mayor o menor influencia en el pardeamiento del vino dependiendo del predominio del factor de degradación al que estén sometidos. Benítez et al.¹⁹⁸ llegaron a esta misma conclusión al comparar los efectos de la radiación UV y las altas temperaturas en la degradación del vino blanco.



Figura 115 Comparación visual de la evolución del pardeamiento de los vinos en el test de termo-degradación

El mayor aumento en el pardeamiento a causa de la temperatura de los vinos de caíño y albariño frente a los de godello puede ser debido a la baja concentración en flavanoles que presenta el godello. Estos compuestos al degradarse por medio de las altas temperaturas sufren determinadas reacciones que producen compuestos coloreados. Sioumis et al.¹⁹⁵ en su estudio sobre las cinéticas de pardeamiento de los vinos blancos encontraron una relación significativa entre compuestos como la catequina y la epicatequina y el pardeamiento de los vinos blancos. Este dato concuerda con el comportamiento de los vinos estudiados en este apartado.

Como ya se comentó anteriormente, los efectos de la radiación UV para el godello son mayores que para el resto de los vinos y la AA también presenta una gran disminución relativa, al contrario de los otros vinos en los que permanece estable. La diferencia más notable que presenta el godello frente al resto de los vinos es la baja concentración de ác. caftárico (entre 7 y 13 veces menor), este hecho puede afectar a su comportamiento frente a estos factores de degradación.

A continuación se pueden observar los resultados obtenidos para los ácidos caftárico y cafeico y gálico (Figura 116) durante los dos test de degradación.

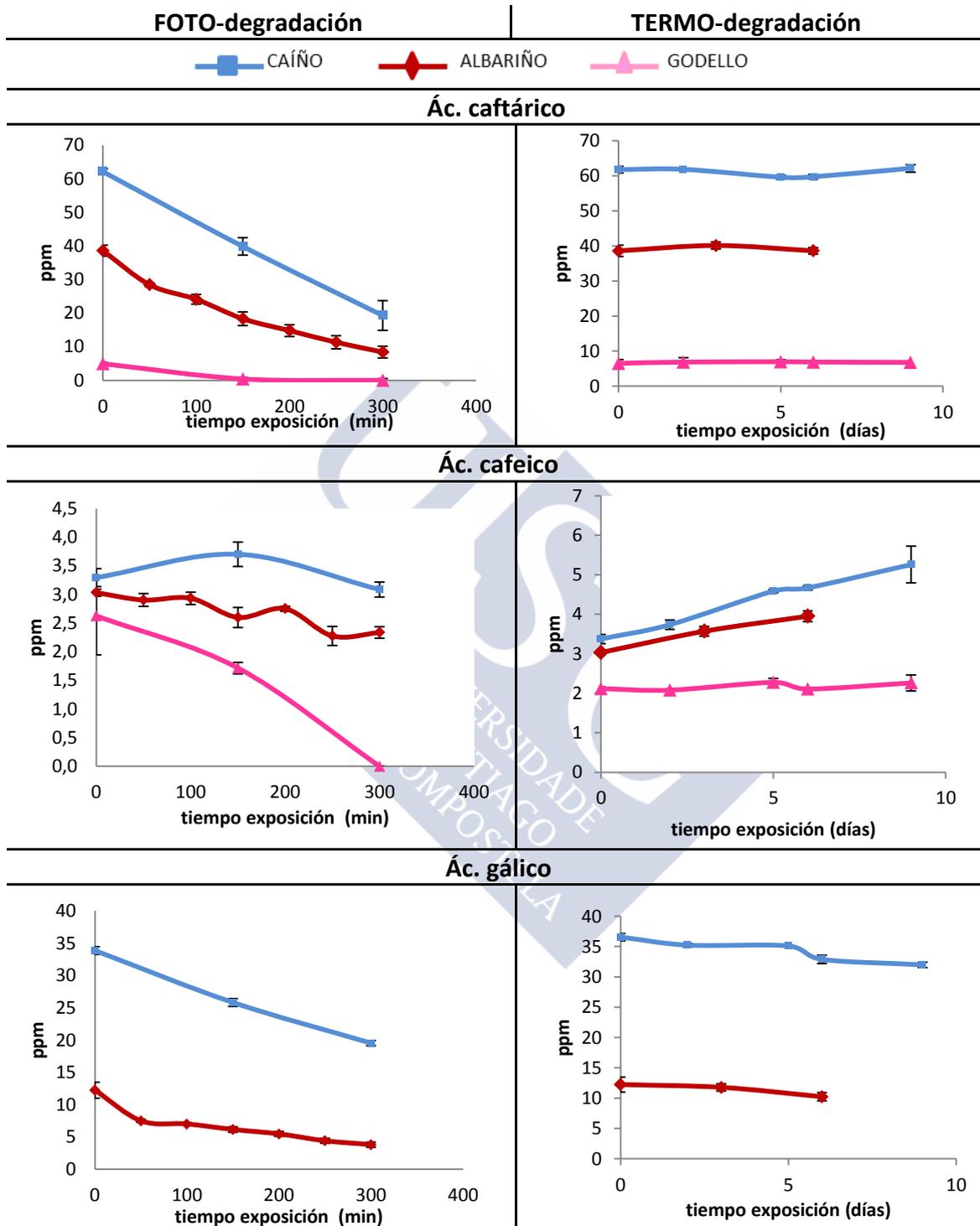


Figura 116 Evolución de los ácidos caftárico, cafeico y gálico durante los experimentos de la foto y termo-degradación de los vinos

Para el caso del caftárico el comportamiento es muy diferente si comparamos la foto-degradación con la termo-degradación. Mientras que para la foto-degradación la tendencia de los tres vinos es a disminuir la concentración de ác. caftárico con el tiempo (disminuye más de un 60%), en la termo-degradación la tendencia es mantener una concentración estable en las tres variedades. Estos resultados indican que este compuesto presenta una gran estabilidad frente a las altas temperaturas y que por el contrario es muy inestable frente a la radiación UV.

El ác. cafeico también presenta un comportamiento diferente entre los dos factores de degradación y entre cada vino estudiado (Figura 116). En la fotólisis la tendencia de los tres vinos es la disminución del contenido con el tiempo, pero esta disminución no presenta la misma pendiente para las tres variedades de vino estudiadas. Mientras que para el caíño y para el albariño la disminución es muy leve (5-10%), en el caso del godello la pérdida es completa. Este hecho está influenciado por el contenido inicial de caftárico en cada vino y su degradación posterior formando cafeico. Así, el caíño y el albariño presentan una alta concentración de caftárico que prácticamente equilibra el contenido de cafeico durante la degradación; llegando incluso a aumentar su concentración en los primeros 150 min de degradación, en el caso del caíño. Por el contrario, el godello presenta unos niveles de caftárico iniciales muy bajos, por ello la concentración de cafeico resultante de su degradación será también muy escasa, y no podrá contrarrestar la pérdida de cafeico en el vino. Por otra parte, el vino de la variedad godello presenta el pH más elevado de los vinos estudiados, este hecho puede influir también en la facilidad de degradación del ác. cafeico, como ya lo comprobaron Grimes et al.²⁰⁴ al estudiar las cinéticas de foto-degradación del ácido cafeico a diferentes pH. Además, la baja concentración de ác. caftárico en los vinos, puede producir un mayor aumento del pardeamiento frente a la radiación UV, como sucede en el godello (Figura 115). De este modo, una alta concentración de

caftárico inicial se convierte en un posible protector del pardeamiento del vino blanco frente a la radiación UV. Esta es una hipótesis de elevado interés práctico que surge de estos estudios y sobre la que el grupo de investigación continúa trabajando.

De igual manera que el caftárico, el cafeico también es estable frente a la temperatura (Figura 116). En las gráficas se puede ver que aumenta su concentración tanto para el caíño como para el albariño y permanece estable en el caso del godello. Este aumento del cafeico no puede ser debido a la degradación del caftárico porque como comentamos permanece estable frente a este factor, por este motivo podría ser debido a la degradación de otra molécula o moléculas precursoras del ác. cafeico más inestables frente a la temperatura, como pudiera ser el ácido clorogénico (Figura 117).

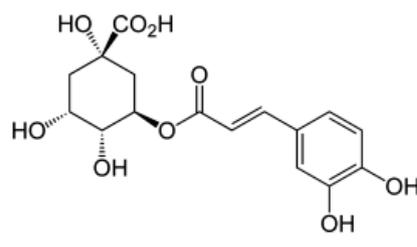


Figura 117 Estructura del ácido clorogénico

El ácido gálico, tanto en la foto-degradación como en la termo-degradación, presentó una disminución de su concentración con el tiempo, aunque esta disminución fue más acusada frente a la radiación UV (50% de disminución). Este comportamiento diferente frente a los dos test ya fue observado anteriormente por Benítez et al.¹⁹⁸, comprobando que la disminución del ácido gálico fue significativa solamente frente a la radiación UV.

Resultados similares a los encontrados en este trabajo fueron obtenidos por Kallitraka et al.¹⁸³, quienes también observaron la disminución en vinos blancos de compuestos como el caftárico y la estabilidad en el tiempo del cafeico durante 9 meses de almacenamiento en botella. Recamales et al.²⁰⁵ también observaron cambios similares en la evolución de los compuestos

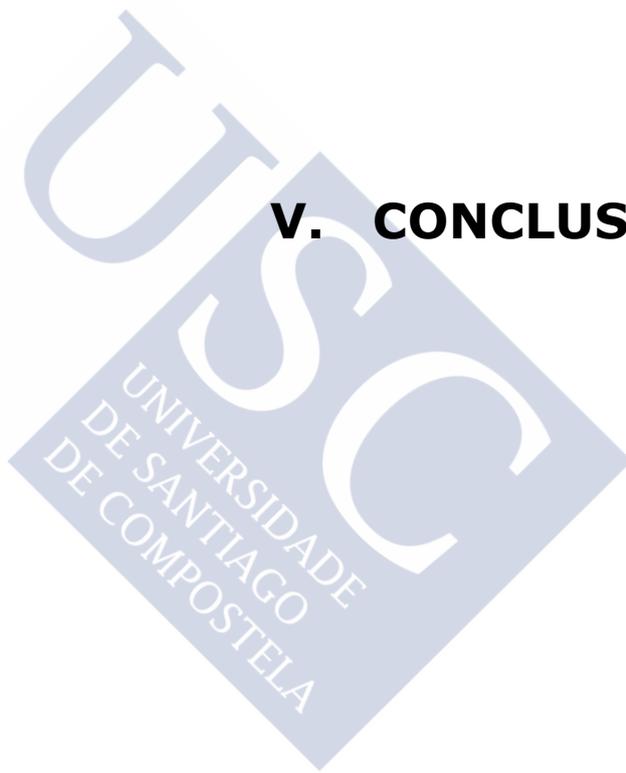
polifenólicos de los vinos blancos durante 12 meses de almacenamiento. Los vinos estudiados por estos autores disminuyeron en general su contenido polifenólico sobre todo aquellos que habían sido sometidos a temperaturas de almacenamiento elevadas, produciendo así un mayor cambio en su aspecto visual.

IV.15.4. Conclusiones al estudio de degradación del vino blanco

El estudio presentado aquí, y que se considera todavía preliminar, pone de manifiesto la importancia del comportamiento individual de los distintos polifenoles en el fenómeno de pardeamiento de los vinos blancos. Así mismo, los resultados de este estudio, que concuerdan con los publicados por otros autores, ponen de manifiesto la complejidad de estos procesos.

La comprensión de los fenómenos de pardeamiento, tanto no enzimático como enzimático, de los vinos blancos, requiere un planteamiento experimental complejo que daría en sí mismo para una tesis doctoral. Este apartado pretende, por tanto, servir de una pequeña contribución a dicha comprensión.

V. CONCLUSIONES



A lo largo del trabajo de Tesis presentado en esta memoria, se ha abordado el estudio de la composición polifenólica de bagazos y vinos de variedades de uva blanca gallegas, desarrollando metodologías para la identificación y determinación de los principales compuestos presentes en las muestras, para lo cual se pusieron a punto métodos de extracción que utilizan técnicas limpias de extracción (PSE y MSPD) junto con metodologías de cromatografía líquida con detector de DAD y de MS/MS y espectrofotometría UV-visible. El trabajo se ha conducido principalmente sobre un tipo de muestra (el bagazo de uva blanca) muy poco estudiado y apenas considerado hasta ahora. Se ha conseguido además cumplir el objetivo de desarrollar un procedimiento de extracción de polifenoles utilizable a escala industrial, como forma de valorizar los residuos de la industria vitivinícola, y se ha colaborado en nuevas iniciativas para el aprovechamiento de dichos residuos. A continuación se detallan los principales logros y conclusiones.

- **Desarrollo de metodologías para la separación y detección de compuestos polifenólicos.**

Se han desarrollado métodos de HPLC y LC-MS/MS para el análisis de polifenoles en bagazo y vino de variedades de uva blanca gallega; y se identificaron positivamente 13 polifenoles en total: los ácidos fenólicos, gálico, protocatéquico, caftárico, cafeico; los flavonoles, catequina, epicatequina y epicatequina-galato; las procianidinas B1 y B2; y los flavanoles, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido y quercetina; 12 de ellos en los extractos de bagazo y 9 en vinos blancos.

- **Optimización de un método de extracción de polifenoles de bagazo por PSE.**

Se optimizó la extracción de polifenoles del bagazo mediante PSE utilizando diseños experimentales: de tipo “Cribado” y “Superficie de Respuesta”.

Se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para prácticamente todos los compuestos identificados.

Los parámetros de calidad del método han sido satisfactorios con límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) de $\leq 2,87$ ppb y $\leq 9,56$ ppb, respectivamente.

El método de PSE es rápido, cada extracción dura menos de 20 minutos, frente a las varias horas de los métodos basados en maceración/agitación, y consume mucho menos disolvente orgánico y, por lo tanto produce menos residuos, siguiendo los principios de la "Química Verde"; esto implica que es más respetuoso con el medioambiente.

- **Optimización de un método de extracción de polifenoles de bagazo por MSPD.**

Se optimizó la extracción de polifenoles del bagazo mediante MSPD con la finalidad de conseguir una metodología que pudiera ser aplicada fácilmente en cualquier laboratorio de bodega.

El método propuesto no necesita reactivos caros y la única instrumentación requerida es un espectrofotómetro, potencialmente disponible en cualquier laboratorio. El método es rápido y económico y una herramienta útil para experimentos enotécnicos en bodega.

- **Influencia del sistema de conducción de la vid en el perfil polifenólico.**

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de diferentes sistemas de conducción de la vid, ensayados en una bodega del Salnés, para comprobar la influencia de los mismos sobre la composición polifenólica. Dado que se aplicaron los dos métodos de extracción desarrollados previamente (PSE y MSPD) se han podido comparar al mismo tiempo las eficacias extractivas de ambos y sus ventajas e inconveniencias.

Se comprobó que la extracción mediante PSE es aproximadamente el doble de eficaz que la llevada a cabo mediante MSPD, desde el punto de vista

de la obtención de polifenoles totales. Si bien, MSPD es un método más económico y sencillo de aplicar en el laboratorio de una bodega.

Sin embargo, la conclusión a la que se llega por ambos métodos sobre los sistemas de conducción es bastante similar; destacando que el sistema GDC produce uvas con niveles más elevados de polifenoles. Estos resultados se confirmaron sobre los vinos monovarietales correspondientes.

- **Caracterización polifenólica de bagazos blancos monovarietales.**

El estudio de un total de 100 muestras de bagazo pertenecientes a las 5 D.O. de Galicia de tres cosechas consecutivas, 2010, 2011 y 2012; ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

- *La concentración polifenólica depende de la cosecha:* En este estudio la cosecha de 2012 presentó una concentración significativamente mayor que las del 2011 y 2010, considerando la suma de los polifenoles individuales y la AA, lo que resalta la necesidad de que cualquier estudio de caracterización debe extenderse un mínimo de 3 años para ser verdaderamente representativo.
- *La concentración polifenólica depende de la variedad:* loureiro es la variedad con el mayor valor de AA e IPT. Albariño y godello son los bagazos que en general presentan las mayores concentraciones de compuestos polifenólicos.
- *El IPT presenta una elevada correlación con la AA.* Catequina, la suma de polifenoles, ác. gálico y PB1 presentan correlaciones moderadas.
- *La comparación polifenólica ha permitido la diferenciación varietal de los bagazos autóctonos,* con un 95,29% de muestras correctamente clasificadas.
- En la comparación de las muestras de bagazo albariño de las diferentes sub-zonas de la D.O. Rías Baixas, se concluyó que en general *las muestras de la subzona del Salnés presentan una mayor concentración de polifenoles.*

- En el análisis discriminante de muestras de bagazo albariño por sub-zonas de la D.O. Rías Baixas, se obtuvo un 82,86% de muestras correctamente clasificadas. Las muestras de la subzona del Ulla se encuentran muy dispersas entre el Salnés, el Rosal y el Condado del Tea. Por lo tanto, *la diferenciación de los bagazos de albariño por subzonas de producción requeriría considerar otras variables.*
- El estudio de variedades no autóctonas pero cultivadas experimentalmente en Galicia ha permitido diferenciarlas en función de su composición polifenólica (discriminando del 100%) y, si bien la AA es bastante parecida para todas ellas, la variedad pinot gris presenta un IPT significativamente mayor, y las variedades riesling y sauvignon blanc presentan en general el menor contenido de polifenoles.

- **Extracción industrial de polifenoles de bagazo**

A partir de diferentes pruebas a nivel de laboratorio, el proceso de extracción se adaptó hasta llegar al desarrollo de un procedimiento nuevo para ser explotado a escala industrial. Se optimizaron las condiciones idóneas para que el método sea el más económico y rápido posible, utilizando bagazo fresco, sin necesidad de secado previo, arena y un disolvente, butilenglicol, que permite obtener extractos fáciles de tratar industrialmente.

- Se evaluó la robustez del proceso. Todos los CV determinados fueron menores del 19%.
- Se demostró la estabilidad del extracto durante un año en condiciones de congelación o refrigeración.
- El extracto presenta un IPT de 17181 mg GAE/L y una AA de 76,6 mM. Esta actividad antiradicalaria es 6,3 veces superior a la del BHT y 1,3 veces superior a la del BHA. Se identificaron 11 compuestos polifenólicos, entre los que destaca la catequina (709 ppm) como compuesto mayoritario. Se ha constatado, que el

extracto obtenido a escala industrial presenta una marcada actividad antimicrobiana para *S.aureus* (CMI: 1,25-1,5%), *Bacillus spp* (CMI: 1-1,25%) y *P. acnes* (CMI: 1-1,5%).

Este estudio demuestra las excelentes propiedades de este extracto polifenólico para ser utilizado en diferentes sectores como es el cosmético, el alimentario/nutracéutico, el farmacéutico, etc.

- **Alternativas de reutilización de los subproductos de vinificación**

Este proceso de vermicompostaje del bagazo de uva es un procedimiento que ofrece, por un lado, obtener un biofertilizante libre de polifenoles, de alto interés como *enmienda orgánica* y, por otro lado, ofrece *una vía que facilita la separación de las semillas* en las primeras semanas del proceso, cuando todavía presentan una alta proporción de polifenoles para su posterior extracción y aplicación en diversos sectores industriales. Este proceso es económico y respetuoso con el medio ambiente.

- **Caracterización de la composición polifenólica de vinos blancos monovarietales**

A partir del análisis del perfil polifenólico de los vinos monovarietales obtenidos a partir de 7 variedades de uva autóctona gallega, procedentes de 3 cosechas consecutivas (2010, 2011, 2012), se llegó a las siguientes conclusiones:

- *La concentración de polifenoles varía en función del año de la cosecha:* la cosecha del 2010 presentó valores de IPT y de suma de polifenoles significativamente menores que el resto. Entre las cosechas del 2011 y 2012 no se han encontrado diferencias significativas. En el caso de la AA, la cosecha del 2012 presentó valores significativamente mayores.
- *La concentración de polifenoles depende de la variedad:* las menores concentraciones en compuestos polifenólicos se encontraron en los

vinos de blanca lexítima, godello y torrontés. Mientras que caíño y el loureiro presentan, en general, los valores más elevados.

- *La correlación entre polifenoles y AA en los vinos es relevante en algunos casos. Así, tanto la catequina (0,67), como la epicatequina (0,64) y la PB1 (0,67) presentan correlaciones importantes. El IPT presentó también una correlación elevada (0,73).*
- *Los vinos monovarietales se diferencian entre sí con un alto porcentaje de muestras correctamente clasificadas (91,85%), con lo que se puede afirmar que los compuestos polifenólicos y los índices espectrofotométricos, son suficientes para diferenciar los vinos.*
- *El análisis del perfil polifenólico de los vinos de la variedad albariño de la diferentes subzonas de la D.O. Rías Baixas, permite concluir que los vinos de la subzona del Rosal son los que presentan en general el mayor contenido en compuestos polifenólicos. En el análisis discriminante llevado a cabo posteriormente con estas muestras se obtuvo sólo un 77,44% de muestras clasificadas correctamente. Esto sugiere que *para diferenciar los vinos de las subzonas de la D.O. Rías Baixas sería necesario implementar otras variables.**
- *El análisis del perfil polifenólico de los vinos de variedades de uva no autóctonas de Galicia, cultivadas experimentalmente en el Salnés, puso de manifiesto que en general, las variedades riesling y chardonnay presentan mayores concentraciones de compuestos polifenólicos. Así, utilizando el perfil polifenólico para tratar de diferenciar estas variedades, se obtuvo un porcentaje de acierto del 100%, demostrando que las variables utilizadas son suficientes para una correcta diferenciación de los vinos, como en el caso de los bagazos. En todo caso hay que resaltar que el número de muestras de algunas variedades y/o en algunas cosechas debería ser mayor para que las conclusiones fuesen robustas.*

- **Contribución al estudio evolutivo de los polifenoles de vino blanco en función de diferentes técnicas de vinificación y conservación.**

- *Se ha llevado a cabo un estudio preliminar sobre el efecto de la maceración en el contenido polifenólico de un vino blanco.* En general, un vino macerado presenta un porcentaje mayor de compuestos polifenólicos que un vino sin macerar. Solamente el ácido caftárico y la quercetina-3-glucósido presentan una mayor concentración en el vino sin macerar. La baja concentración de ácido caftárico es debida, probablemente, a la hidrólisis enzimática que lo convierte en ácido cafeico y ácido tartárico durante el proceso de vinificación; hecho que se confirma con la mayor concentración relativa de cafeico en el vino sin macerar.
- Con el fin de valorar la evolución en el *comportamiento de diferentes polifenoles del vino blanco, a causa de una posible degradación oxidativa* por unas prácticas inadecuadas, se compararon los resultados de dos test de degradación: uno basado en irradiación con luz UV (foto-degradación) y otro en el efecto de la temperatura (termo-degradación). Las conclusiones obtenidas sobre los vinos de 3 variedades fueron las siguientes:
 - En general los tres vinos son más sensibles al test de foto degradación que al test de termodegradación, a excepción de la AA que no presenta en general variaciones significativas.
 - Este estudio pone de manifiesto la importancia del comportamiento individual de los distintos polifenoles en el fenómeno de pardeamiento de los vinos blancos. Así mismo, los resultados de este estudio, que concuerdan con los publicados por otros autores, ponen de manifiesto la complejidad de estos procesos.



VI. ANEXOS

VI.1. Anexo I. Datos adicionales del proceso de escalado industrial

VI.1.1. Datos de otras variedades y otras matrices en el escalado

Tabla 78 Condiciones experimentales de los experimentos realizados en las columnas x20

Variedad	disolvente	bagazo (g)	arena (g)	Litros eluidos
Semillas	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05
Godello	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05
Caíño	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05
Treixadura	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05
Loureiro	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05
Torrontés	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05
Albariño	Glicol:Agua (65:35)	20	20	0,05

Tabla 79 Valores de IPT y AA en los extractos de las diferentes variedades de bagazo y semillas obtenidas en la columna x20

	Semillas	Godello	Caíño	Treixadura	Loureiro	Torrontés	Albariño
IPT							
mg GAE/L	8043	1991	1664	2518	2049	1673	2751
SD	755	166	123	286	209	14	139
%CV	9	8	8	11	11	1	5
mg/g seco	20,1	11,8	10,2	14,3	11,5	14,6	13,8
SD	1,9	1,0	0,8	1,6	1,2	0,1	0,7
%CV	9,4	8,3	7,4	11,4	10,2	0,9	5,1
AA							
mM trolox	53,4	11,5	10,1	11,2	10,5	8,6	14,8
SD	1,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1
%CV	5,3	7,5	3,1	2,8	4,2	6,6	1,4

VI.1.2. Datos de diseños en la optimización del escalado

Tabla 80 Resultados de IPT y AA en el diseño de Cribado (Escalado)

Nº exp	IPT	AA
1	6,70	8,26
2	22,5	14,3
3	21,8	13,2
4	21,6	18,5
5	29,1	12,9
6	13,0	10,1
7	9,72	10,3
8	22,4	13,8
9	6,37	7,80
10	26,3	18,8
11	16,0	10,7
12	22,5	14,5
13	11,8	10,3
14	20,3	16,3
15	17,3	13,6
16	20,6	16,1
17	9,56	9,63
18	22,7	16,0
19	22,3	16,8
20	6,11	6,22

IPT: mg GAE/g secos; AA:mM trolox

Tabla 81 Resultados de IPT y AA en el diseño de Superficie de Respuesta (Escalado)

nº Exp	Arena(g)	% Glicol	IPT	AA
1	25	10	5,71	8,48
2	25	50	8,45	14,1
3	40	10	4,63	8,54
4	40	50	9,05	15,0
5	10	50	10,3	15,2
6	25	50	8,69	13,1
7	10	10	3,68	6,18
8	25	50	7,02	13,9
9	40	90	7,26	12,4
10	10	90	7,73	14,1

IPT: mg GAE/g secos; AA:mM trolox

VI.1.3. Datos de la robustez del proceso optimizado en el escalado

Tabla 82 Resultados de IPT y AA en el estudio de robustez del proceso de escalado

		EXP.6	EXP.7	EXP.8	EXP.10	EXP.11	EXP.12	EXP.13
IPT	mg GAE /L	17534	17181	17766	16051	17126	16255	17643
	SD	39	154	135	135	115	77	77
	% CV	0,2	0,9	0,8	0,8	0,7	0,5	0,4
	mg GAE /g seco	6,90	6,80	15,4	13,9	14,8	14,1	15,3
	SD	0,02	0,06	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	% CV	0,22	0,89	0,8	0,8	0,7	0,5	0,4
AA	mM trolox	153	122	131	106	178	147	169
	SD	8	6	4	0,1	1	2	4
	% CV	10	10	6	0,3	1	3	5
	mM/g seco	0,06	0,05	0,12	0,09	0,16	0,13	0,15
	SD	0,003	0,002	0,006	0,001	0,008	0,002	0,004
	% CV	10,43	9,77	6,41	0,25	1,07	3,32	4,65

Tabla 83 Valores de los polifenoles en el estudio de robustez del proceso de escalado

		EXP.6	EXP.7	EXP.8	EXP.10	EXP.11	EXP.12	EXP.13
ÁC. GÁLICO	mg/L	74,2	97,7	99,1	99,2	95,4	84,6	104
	SD	6,4	1,7	0,02	1,4	0,9	0,9	2
	% CV	8,6	1,7	0,02	1,4	0,9	1,0	2
	mg/g	0,030	0,039	0,087	0,087	0,084	0,074	0,092
	SD	0,003	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
	% CV	8,613	1,698	0,017	1,380	0,911	1,051	2,040
CATEQUINA	mg/L	702	727	787	683	689	598	737
	SD	1	0,3	3	28	19	0,4	36
	%CV	0,2	0,04	0,3	4	3	0,07	5
	mg/g seco	0,281	0,291	0,691	0,60	0,61	0,527	0,65
	SD	0,001	0,001	0,001	0,03	0,02	0,001	0,03
	%CV	0,183	0,043	0,338	4,13	2,77	0,072	4,95
EPICATEQUINA	mg/L	757	786	809	682	626	585	752
	SD	3	19	36	33	37	2	29
	%CV	0,3	2	4	5	6	0,3	4
	mg/g seco	0,303	0,31	0,71	0,60	0,55	0,51	0,66
	SD	0,001	0,01	0,03	0,03	0,03	0,00	0,03
	%CV	0,342	2,39	4,38	4,86	5,92	0,27	3,83
QUERCETINAS	mg/L	40,3	56,4	44,5	43,1	37,5	44,0	41,6
	SD	5,2	0,6	0,3	0,9	1,4	0,6	2,9
	%CV	12,9	1,1	0,7	2,0	3,8	1,3	7,0
	mg/g seco	0,02	0,02	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04
	SD	0,0021	0,0002	0,0003	0,0008	0,0012	0,0005	0,0026
	%CV	12,87	1,08	0,68	2,02	3,76	1,26	6,97

ANEXOS

VI.1.4. Datos del estudio de estabilidad del extracto

Tabla 84 Valores del estudio de estabilidad del extracto

25 °C; N ₂ ; Luz																		
Día	IPT			AA			Ác. gálico			Catequina			Epicatequina			Quercetinas		
	mg GAE/L	SD	CV	mM	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV
0	17181	154	1	110	2	4	98	2	2	728	0,3	0,01	787	19	2	56	1	1
2	18195	321	2	82	4	9	93	1	1	683	48	7	741	87	12	54	2	4
8	17578	536	3	88	2	5	92	1	2	687	11	2	695	2	0,4	53	4	7
20	13890	148	1	138	5	8	98	2	2	683	18	3	616	23	4	53	1	2
34	15263	483	3	114	2	3	107	0,1	0,1	699	8	1	585	2	0,3	52	3	5
62	17297	412	2	142	1	2	109	4	4	657	33	5	600	3	0,4	50	3	5
100	17882	475	3	176	6	7	112	0,2	0,1	665	6	1	612	39	6	36	2	5
181	16467	198	1	126	2	2	131	1	0,1	694	21	3	532	9	2	30	1	3
320	16854	206	1	126	10	8	149	3	2	639	6	1	457	15	3	24	0,5	2
365	16603	331	2	112	6	5	143	11	8	622	25	4	461	4	1	26	1	3

25 °C; N ₂ ; oscuridad																		
Día	mg GAE/L			mM			ppm			ppm			ppm			ppm		
	mg GAE/L	SD	CV	mM	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV
0	17181	154	1	110	2	4	98	2	2	728	0,3	0,01	787	19	2	56	1	1
2	18086	892	5	96	3	7	92	1	1	663	14	2	696	49	7	54	3	6
8	19092	1611	8	92	3	7	98	3	3	699	44	6	702	64	9	58	2	3
20	14648	425	3	136	5	8	98	4	4	656	15	2	571	32	6	53	1	2
34	16446	1605	10	122	7	11	109	1	1	664	7	1	607	25	4	57	1	1
62	17501	574	3	144	2	2	110	3	2	630	11	2	597	40	7	46	4	8
100	15718	195	1	144	2	2	112	1	1	649	7	1	648	55	8	33	1	3
181	16392	358	2	131	5	4	136	2	2	707	6	1	533	26	5	29	1	2
320	16882	278	2	135	7	5	120	7	6	478	32	7	336	15	5	17	1	7
365	16351	161	1	120	10	9	119	5	5	496	10	2	386	27	7	16	1	4

25 °C; O ₂ ; oscuridad																		
Día	mg GAE/L			mM			ppm			ppm			ppm			ppm		
	mg GAE/L	SD	CV	mM	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV
0	17181	154	1	110	2	4	98	2	2	728	0,3	0,01	787	19	2	56	1	1
2	19018	452	2	86	3	6	92	0,2	0,1	675	0,2	0,01	731	2	0,3	50	1	2
8	18616	617	3	90	3	7	93	4	5	685	19	3	579	23	4	54	3	5
20	13971	880	6	138	4	6	109	2	2	659	3	0,4	592	70	12	52	3	5
34	16793	158	1	118	1	2	128	6	5	642	22	3	580	24	4	45	2	4
62	18800	1939	10	148	6	8	134	1	1	615	14	2	497	24	5	41	5	13
100	16399	304	2	148	6	8	156	4	2	547	4	1	564	21	4	41	2	4
181	15358	426	3	121	5	4	176	1	0,1	502	5	1	335	2	0	25	4	18
320	15929	693	4	122	8	7	185	2	1	392	3	1	255	4	2	27	1	2
365	16242	328	2	111	9	8	173	3	2	418	9	2	292	3	1	31	2	5

ANEXOS

Tabla 85 Continuación (Tabla 84) Valores del estudio de estabilidad de extracto

4 °C; N2; oscuridad																		
Día	IPT			AA			Ác. gálico			Catequina			Epicatequina			Quercetinas		
	mg GAE/L	SD	CV	mM	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV
0	17181	154	1	110	2	4	98	2	2	728	0	0	787	19	2	56	1	1
2	21147	373	2	84	4	9	93	4	4	634	23	4	674	77	11	49	15	30
8	22629	4429	20	92	2	5	93	4	5	685	18	3	676	45	7	58	1	2
20	14322	478	3	148	5	7	97	0,3	0,1	646	45	7	666	32	5	56	2	4
34	18324	92	0,5	134	4	6	105	1	1	709	9	1	653	10	2	50	2	3
62	17405	606	3	138	1	2	104	1	1	679	14	2	628	4	1	47	7	15
100	15773	415	3	138	6	5	112	3	3	657	7	1	712	8	1	49	4	8
181	16780	845	5	140	8	6	115	4	4	704	17	2	580	3	1	38	1	2
320	16514	1436	9	112	11	10	133	2	1	638	5	1	537	13	2	34	6	17
365	17120	1009	6	101	10	10	133	0	0	642	4	1	547	3	1	38	1	2
-20 °C; N2; oscuridad																		
Día	mg GAE/L			mM			ppm			ppm			ppm			ppm		
	mg GAE/L	SD	CV	mM	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV	ppm	SD	CV
0	17181	154	1	110	2	4	98	2	2	728	0	0	787	19	2	56	1	1
2	22249	2479	11	80	1	4	91	4	4	686	21	3	793	24	3	53	0,2	0,3
8	22663	2555	11	106	3	6	92	2	2	723	6	1	702	2	0,1	53	0,3	1
20	15482	1558	10	166	13	16	90	5	6	708	17	2	678	54	8	53	3	5
34	20365	1517	7	134	5	8	94	3	3	725	30	4	640	11	2	57	4	6
62	18215	401	2	160	4	5	89	1	2	673	13	2	615	16	3	51	2	4
100	18684	354	2	140	12	17	100	0,1	0,1	698	5	1	741	37	5	59	3	6
181	20725	1635	8	141	1	1	83	0,2	0,1	759	3	0	671	13	2	54	0,4	1
320	24664	747	3	131	11	8	87	0,1	0,1	608	13	2	588	0,6	0,2	47	11	23
365	24337	1983	8	120	8	7	87	2	2	616	41	7	656	19	3	47	11	24

ANEXOS

Tabla 86 Valores de absorbancia durante el estudio de estabilidad del extracto

25 °C; N ₂ ; Luz									
Día	Abs (420nm)	SD	CV	Abs (520nm)	SD	CV	Abs (620nm)	SD	CV
0	4,200	0,005	0,119	1,269	0,030	2,367	0,235	0,002	0,854
2	4,388	0,134	3,046	1,162	0,003	0,243	0,238	0,003	1,273
8	4,001	0,197	4,931	1,090	0,004	0,389	0,217	0,001	0,327
20	4,265	0,045	1,045	1,213	0,020	1,632	0,242	0,011	4,675
34	4,136	0,204	4,924	1,386	0,025	1,837	0,269	0,009	3,424
62	4,486	0,020	0,441	1,460	0,079	5,424	0,294	0,001	0,481
100	5,220	0,028	0,542	1,988	0,018	0,889	0,323	0,004	1,096
181	5,800	0,023	0,562	2,330	0,040	0,929	0,417	0,015	0,835
320	4,745	0,178	4,390	1,720	0,204	4,818	0,380	0,031	1,333
365	5,500	0,260	6,207	1,540	0,045	1,111	0,380	0,023	0,715
25 °C; N ₂ ; oscuridad									
0	4,200	0,005	0,119	1,269	0,030	2,367	0,235	0,002	0,854
2	4,521	0,161	3,566	1,204	0,021	1,762	0,252	0,021	8,154
8	4,007	0,006	0,159	1,150	0,003	0,246	0,235	0,001	0,602
20	4,367	0,172	3,935	1,217	0,007	0,581	0,241	0,005	2,058
34	4,496	0,136	3,020	1,474	0,025	1,727	0,264	0,008	3,214
62	4,444	0,023	0,509	1,542	0,020	1,284	0,297	0,003	0,952
100	5,273	0,032	0,604	1,940	0,064	3,280	0,326	0,004	1,301
181	4,590	0,007	0,501	1,830	0,001	0,128	0,300	0,036	0,819
320	4,960	0,015	0,835	1,990	0,011	0,992	0,345	0,040	0,929
365	4,965	0,031	1,333	1,770	0,040	3,173	0,323	0,204	4,818
25 °C; O ₂ ; oscuridad									
0	4,200	0,005	0,119	1,269	0,030	2,367	0,235	0,002	0,854
2	4,556	0,062	1,350	1,25	0,022	1,754	0,257	0,001	0,550
8	4,602	0,025	0,553	1,41	0,007	0,501	0,313	0,003	0,904
20	5,372	0,011	0,197	1,779	0,015	0,835	0,392	0,002	0,542
34	6,482	0,020	0,305	2,334	0,031	1,333	0,504	0,006	1,122
62	8,046	0,065	0,809	3,164	0,023	0,715	0,674	0,005	0,735
100	18,59	0,354	1,902	6,605	0,007	0,107	0,935	0,006	0,681
181	37,045	0,008	0,672	10,230	0,003	1,159	1,457	0,260	6,207
320	40,023	0,001	0,128	15,078	0,004	1,482	1,656	0,025	0,581
365	41,032	0,011	0,992	14,545	0,002	0,850	1,745	0,018	0,368

Valores de Absorbancia corregidos según nivel de dilución

ANEXOS

Tabla 87 (Continuación Tabla 86) Valores de absorbancia durante el estudio de estabilidad del extracto

4 °C; N ₂ ; oscuridad									
Día	Abs (420nm)	SD	CV	Abs (520nm)	SD	CV	Abs (620nm)	SD	CV
0	4,200	0,005	0,119	1,269	0,030	2,367	0,235	0,002	0,854
2	4,484	0,095	2,129	1,168	0,004	0,303	0,221	0,026	11,86
8	4,154	0,023	0,562	1,157	0,006	0,550	0,234	0,002	0,908
20	4,059	0,178	4,390	1,173	0,011	0,965	0,232	0,001	0,305
34	4,192	0,260	6,207	1,398	0,054	3,844	0,246	0,004	1,440
62	4,378	0,025	0,581	1,374	0,025	1,853	0,233	0,004	1,521
100	4,808	0,018	0,368	1,783	0,039	2,182	0,26	0,008	2,997
181	4,800	0,006	0,159	1,723	0,021	1,762	0,259	5,372	0,011
320	4,890	0,172	3,935	1,75	0,003	0,246	0,275	6,482	0,020
365	4,995	0,136	3,020	1,8	0,007	0,581	0,27	8,046	0,065
-20 °C; N ₂ ; oscuridad									
Día	Abs (420nm)	SD	CV	Abs (520nm)	SD	CV	Abs (620nm)	SD	CV
0	4,200	0,005	0,119	1,269	0,030	2,367	0,235	0,002	0,854
2	4,406	0,036	0,819	1,158	0,008	0,672	0,262	0,003	1,080
8	4,337	0,040	0,929	1,108	0,001	0,128	0,231	0,006	2,761
20	4,227	0,204	4,818	1,141	0,011	0,992	0,23	0,004	1,845
34	4,072	0,045	1,111	1,248	0,040	3,173	0,244	0,003	1,159
62	4,184	0,034	0,811	1,29	0,014	1,096	0,239	0,004	1,482
100	4,823	0,025	0,513	1,643	0,018	1,076	0,25	0,002	0,850
181	4,010	0,008	3,214	1,5	0,045	1,045	0,2	0,003	0,243
320	3,790	0,003	0,952	1,33	0,204	4,924	0,191	0,004	0,389
365	3,995	0,004	1,301	1,365	0,020	0,441	0,201	0,020	1,632

Valores de absorbancia corregidos según nivel de dilución

ANEXOS

Tabla 88 Valores de AA del ácido ascórbico durante el estudio de estabilidad

AA- Ác. Ascórbico

25 °C; N ₂ ; Luz				-20 °C; N ₂ ; oscuridad				25 °C; O ₂ ; oscuridad			
Día	mM	SD	CV	Día	mM	SD	CV	Día	mM	SD	CV
0	84	5	11	0	84	5	11	0	84	5	11
2	104	5	11	2	104	8	15	2	84	4	10
8	92	3	5	8	92	1	3	8	100	1	1
20	112	3	5	20	112	2	4	20	104	2	3
34	94	6	10	34	94	4	8	34	106	5	9
62	112	5	10	62	112	2	3	62	104	4	9
100	102	1	1	100	102	1	3	100	82	2	5
181	66	4	6	181	97	5	5	181	59	3	6
320	62	3	5	320	63	3	4	320	45	3	7
365	62	3	6	365	69	2	3	365	50	4	8

25 °C; N ₂ ; oscuridad				4 °C; N ₂ ; oscuridad			
Día	mM	SD	CV	Día	mM	SD	CV
0	84	5	11	0	84	5	11
2	90	7	16	2	94	3	7
8	94	2	4	8	70	5	14
20	100	8	16	20	114	3	5
34	116	7	13	34	112	4	7
62	114	4	8	62	120	2	4
100	102	1	1	100	96	4	8
181	69	5	7	181	91	6	7
320	66	6	9	320	72	8	11
365	71	4	5	365	73	6	9

VI.2. Anexo II. Publicaciones

- **Domínguez, J.;** Martínez-Cordeiro, H.;Alvarez-Casas, M.;Lores, M.“Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertilizer and bioactive polyphenols” *Waste Management & Research*, in press.
- **Alvarez-Casas, M.;** García-Jares, C. Llompart, M.; Lores, M. "Effect of Experimental Parameters in the Pressurized Solvent Extraction of Polyphenolic Compounds from White Grape Marc” *Food Chemistry*, 157, 524-532, 2014.
- **Martínez-Cordeiro, H.;** Alvarez-Casas, M.; Lores, M. Domínguez, J.; “Vermicompostaje del bagazo de uva: fuente de enmienda orgánica de alta calidad agrícola y de polifenoles bioactivos” *Recursos Rurais*, 9, 55-63, 2013.
- **Lores, M.;** Alvarez-Casas, M.; Llompart, M.; García-Jares, C. “Uvariño: cosmetic power from White” *Expression Cosmetique*, 23, 2013.
- **Lores, M.;** Iglesias-Estévez, M.; Alvarez-Casas, M.;Llompart, M.; García-Jares, C. “Extraction of bioactive polyphenols from grape marc by a matrix solid-phase dispersion method” *Recursos Rurais*, 8, 39-47, 2012.

En preparación:

- “Polyphenolic profile of Galician white monovarietal grape bagasses”. *Waste Management & Research*.
- “Polyphenolic composition of autochthonous varietal white wine from Galicia”. *Food Chemistry*.

VI.3. Anexo III. Patentes de invención

VI.3.1. Documentos de la Patente (P201231152)



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201231152	
Fecha de recepción:	19 julio 2012, 15:21 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	BagazoCosmetico	
Solicitante:	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	EXTRACTO POLIFENÓLICO A PARTIR DE RESIDUOS DE UVA BLANCA	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (17 p.) Dibujos.pdf (2 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip POWATT.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=S. Torrente 22120,O=Universidade de Santiago de Compostela,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	19 julio 2012, 15:21 (CEST)	
Codificación del envío:	43:ED:44:06:82:BB:A2:D8:B0:67:B1:E9:7D:E7:32:4A:DE:17:37:DB	

/Madrid, Oficina Receptora/

ANEXOS



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPANOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> [] [] [] [] []
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electronica
(5) DIRECCIÓN ELECTRÓNICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION:	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA España ES Q1518001A Edificio EMPRENDIA - Campus Vida Santiago de Compostela 15 A Coruña 15782 España ES +34 881 815585 +34 881 815575 Susana Torrente <input checked="" type="checkbox"/> [] []
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	LORES AGUIN Marta España ES
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	GARCIA IARES Carmen España ES
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS:	ALVAREZ CASAS Marta España ES

ANEXOS

(7-4) INVENTOR 4:	DNI/PASAPORTE: APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	LLOMPART Maria España ES
(8) TÍTULO DE LA INVENCION:		EXTRACTO POLIFENÓLICO A PARTIR DE RESIDUOS DE UVA BLANCA
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESION	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCION DE DEPÓSITO: NUMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	{ }
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CODIGO PAÍS: NUMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: NÚMERO DE PODER:	TORRENTE VILASANCHEZ Susana España ES 32804989-C Edificio EMPRENDIA - Campus Vida Santiago de Compostela 15 A Coruña 15782 España ES +34 881 815585 +34 881 815575 susana.torrente@usc.es
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN:	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 17 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 25 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 4 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1

ANEXOS

<p>FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> N.º de figura(s): 3 <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/></p>
<p>(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACION ADJUNTA:</p> <p align="center">DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:</p>	<p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p>
<p>(19) NOTAS:</p>	
<p>(20) FIRMA:</p> <p align="center">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p align="right">LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:</p>	<p>ES, Universidade de Santiago de Compostela, S. Torrente 22120 Santiago de Compostela 19 Julio 2012</p>



VI.3.2. Documentos de la Patente (PCT/ES2013/070526)



**TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES
NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS QUE
CONSTITUYEN SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD INTERNACIONAL
PRESENTADA DE FORMA ELECTRÓNICA.**

(Instrucciones Administrativas del PCT, Parte Séptima)

- 1.-Se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha recibido en la fecha de recepción indicada más abajo, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
- 2.-Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que la Oficina Receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del art. 11.1, es decir, si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional. En cuanto la Oficina Receptora haya comprobado los documentos, avisará al solicitante.
- 3.-El número de la supuesta solicitud internacional indicado más abajo ha sido otorgado automáticamente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la Oficina Receptora.

Número de presentación	300097847	
Solicitud Número PCT	PCT/ES2013/070526	
Fecha de recepción	18 julio 2013	
Oficina Receptora	Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid	
Referencia del expediente del solicitante o mandatario	Bagazo_PC T	
Solicitante	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA	
Número de solicitantes	1	
País	ES	
Título de la invención	EXTRACTO POLIFENÓLICO A PARTIR DE RESIDUOS DE UVA BLANCA	
Documentos presentados	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-vlog.xml eolf-appb-P000002.pdf (3 p.) eolf-appb-P000004.pdf (4 p.)	eolf-requ.xml eolf-fees.xml eolf-appb-P000001.pdf (27 p.) eolf-appb-P000003.pdf (1 p.)
Presentado por	CN=TORRENTE VILASANCHEZ, SUSANA (FIRMA),givenName=SUSANA,SN=TORRENTE,serialNumber=32804989C, C=ES	
Método de Transmisión	Online	
Fecha y hora de expedición del recibo	18 julio 2013, 20:04 (CEST)	
Información oficial condensada de la presentación	7E:04:C0:71:AE:FD:7C:13:B8:AA:2A:A1:F9:7E:74:AB:8E:0D:6A:93	

/Madrid, Oficina Receptora/

ANEXOS

Bagazo_PC T

1/4

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

0	Para uso de la oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No.	
0-2	Fecha de presentación internacional	
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	
0-4	Formulario PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT Online Filing Version 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-5	Petición El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Española de Patentes y Marcas (RO/ES)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	Bagazo_PC T
I	Título de la invención	EXTRACTO POLIFENÓLICO A PARTIR DE RESIDUOS DE UVA BLANCA
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	Todos los Estados designados
II-4	Nombre	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
II-5	Dirección	Edificio EMPRENDIA - Campus Vida 15782 Santiago de Compostela España
II-6	Estado de nacionalidad	ES
II-7	Estado de domicilio	ES
II-8	No. de teléfono	+34 881815585
II-9	No. de facsímil	+34 881815575
II-10	Correo electrónico	susana.torrente@usc.es
III-1	Solicitante y/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-1-3	Inventor para	
III-1-4	Nombre (APELUDOS, Nombre)	LORES AGUIN, Marta
III-1-5	Dirección	Edificio EMPRENDIA - Campus Vida 15782 Santiago de Compostela España

ANEXOS

Bagazo_PC T

2/4

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

III-2 III-2-1 III-2-3 III-2-4 III-2-5	Solicitante y/o inventor Esta persona es: Inventor para Nombre (APELUDOS, Nombre) Dirección	Inventor únicamente GARCIA JARES, Carmen Edificio EMPRENDIA - Campus Vida 15782 Santiago de Compostela España
III-3 III-3-1 III-3-3 III-3-4 III-3-5	Solicitante y/o inventor Esta persona es: Inventor para Nombre (APELUDOS, Nombre) Dirección	Inventor únicamente ALVAREZ CASAS, Marta Edificio EMPRENDIA - Campus Vida 15782 Santiago de Compostela España
III-4 III-4-1 III-4-3 III-4-4 III-4-5	Solicitante y/o inventor Esta persona es: Inventor para Nombre (APELUDOS, Nombre) Dirección	Inventor únicamente LLOMPART, Maria Edificio EMPRENDIA- Campus Vida 15782 Santiago de Compostela España
IV-1 IV-1-1 IV-1-2 IV-1-3 IV-1-4 IV-1-5 IV-1-5(a)	Mandatario o representante común; o dirección para la correspondencia La persona identificada a continuación se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como: Nombre (APELUDOS, Nombre) Dirección No. de teléfono No. de facsímil Correo electrónico Autorización a utilizar el correo-e) Se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar esta dirección de correo-e para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean:	Mandatario TORRENTE VILASANCHEZ, Susana Edificio EMPRENDIA - Campus Vida 15782 Santiago de Compostela España +34 881815585 +34 881815575 susana.torrente@usc.es como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel

ANEXOS

Bagazo_PC T

3/4

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

V	DESIGNACIONES	
V-1	Según la Regla 4.9.a), la presentación de este petitorio constituye la designación de todos los Estados contratantes vinculados por el PCT en la fecha de presentación internacional a efectos de todo tipo de protección disponible y, cuando proceda, de la concesión tanto de patentes regionales como de patentes nacionales.	
VI-1	Reivindicación de prioridad de una solicitud nacional anterior	
VI-1-1	Fecha de presentación	19 Julio 2012 (19.07.2012)
VI-1-2	Número	P201231152
VI-1-3	País	ES
VI-2	Petición de documento de prioridad Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) identificada(s) supra como punto(s):	VI-1
VI-3	Incorporación por referencia : cuando un elemento de la solicitud internacional mencionado en el Artículo 11.1)iii)d) o e) o una parte de la descripción, de las reivindicaciones o de los dibujos mencionada en la Regla 20.5.a) no está contenido en otro lugar en esta solicitud internacional pero figura íntegramente en una solicitud anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en la que uno o varios elementos mencionados en el Artículo 11.1)iii) fueron recibidos inicialmente por la Oficina receptora, ese elemento o esa parte, a reserva de confirmación según la Regla 20.6, se incorporará por referencia en esta solicitud internacional a los efectos de la Regla 20.6.	
VII-1	Administración encargada de la búsqueda internacional elegida	Oficina Española de Patentes y Marcas (ISA/ES)
VIII	Declaraciones	Número de declaraciones
VIII-1	Declaración sobre la identidad del inventor	-
VIII-2	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente	-
VIII-3	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior	-
VIII-4	Declaración sobre la calidad de inventor (sólo para la designación de los Estados Unidos de América)	-
VIII-5	Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad	-

ANEXOS

Bagazo_PC T

4/4

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

IX	Lista de verificación	Número de hojas	Fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-1	Petitorio (incluidas las hojas de declaración)	4	✓
IX-2	Descripción	27	✓
IX-3	Reivindicaciones	3	✓
IX-4	Resumen	1	✓
IX-5	Dibujos	4	✓
IX-7	TOTAL	39	
	Elementos de acompañamiento	Documento(s) en papel adjunto(s)	Fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-8	Hoja de cálculo de tasas	-	✓
IX-18	Soporte físico PCT-SAFE	-	-
IX-20	Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen	1	
IX-21	Idioma de presentación de la solicitud internacional	castellano	
X-1	Firma del solicitante , del mandatario o del representante común	(PKCS7 Firma Digital)	
X-1-1	Nombre (APELUDOS, Nombre)	TORRENTE VILASANCHEZ, Susana	
X-1-2	Nombre del firmante	ES, TORRENTE VILASANCHEZ, SUSANA (FIRMA)	
X-1-3	Calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)	(Representante)	

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA ÚNICAMENTE

10-1	Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	
10-2	Dibujos:	
10-2-1	Recibido	
10-2-2	No recibido	
10-3	Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional	
10-4	Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones requeridas según el Artículo 11(2) del PCT	
10-5	Administración encargada de la búsqueda internacional	ISA/ES
10-6	Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda	

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL ÚNICAMENTE

11-1	Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional	
------	---	--

VI.3.3. Documentos de la Patente (P201300935)



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, ENERGÍA
Y TURISMO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

Nº SOLICITUD: P 2 0 1 3 0 0 9 3 5	
FECHA Y HORA DE ENTRADA EN OEPM: 08-OCT '13 10:21	
FECHA Y HORA DE ENTRADA EN LUGAR DISTINTO A LA OEPM:	
LUGAR DE PRESENTACIÓN	CODIGO

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD	
(2) TIPO DE SOLICITUD: <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> ENTRADA EN FASE NACIONAL DE SOLICITUD PCT	(3) EXPEDIENTE PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD: Nº SOLICITUD: FECHA PRESENTACIÓN:

2. TÍTULO DE LA INVENCION (4)

Procedimiento para la obtención y aislamiento de un fertilizante orgánico y de semillas de uva a partir de residuos de uva
--

EXENTO DE PAGO DE TASAS
art. 63 de la Ley Orgánica
11/2001 de Reforma Universitaria

3. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

(5) APELLIDOS Y NOMBRE / DENOMINACIÓN SOCIAL UNIVERSIDADE DE VIGO				NIF/PASAPORTE Q8650002B	
DIRECCIÓN POSTAL Campus Universitario s/n	CODIGO POSTAL Y LOCALIDAD 36310 Vigo	PROVINCIA Pontevedra	PAIS RESIDENCIA España	CODIGO PAIS RESIDENCIA ES	
PAIS DE NACIONALIDAD España	CODIGO PAIS NACIONALIDAD	CNAE (6)	PYME (7)		
DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO	Nº TELÉFONO FIJO	Nº TELÉFONO MÓVIL	(8) INDICACIÓN DEL MEDIO DE NOTIFICACIÓN PREFERENTE <input type="checkbox"/> CORREO POSTAL <input type="checkbox"/> CORREO ELECTRÓNICO		
PORCENTAJE DE TITULARIDAD (9): %	NOTA: DE NO ESPECIFICARSE DICHO PORCENTAJE, LA OEPM PRESUMIRÁ IGUALES LAS CUOTAS DE LOS SOLICITANTES.				
EL SOLICITANTE TAMBIÉN (10) <input type="checkbox"/> SI ES INVENTOR:	<input type="checkbox"/> NO		MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: (11) <input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar):		
(12) EL SOLICITANTE ES UNA UNIVERSIDAD PÚBLICA ESPAÑOLA				<input type="checkbox"/> SI	

4. OTROS SOLICITANTES Y/O INVENTORES (13)

<input checked="" type="checkbox"/> LOS DEMAS SOLICITANTES Y/O INVENTORES SE INDICAN EN HOJA COMPLEMENTARIA

ANEXOS

F 2 0 1 0 0 0 0 0

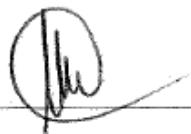
5. IDENTIFICACIÓN DEL REPRESENTANTE

(14) REPRESENTACIÓN <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ESTÁ REPRESENTADO		EL SOLICITANTE ESTÁ REPRESENTADO POR: <input type="checkbox"/> AGENTE DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> OTRO REPRESENTANTE		(15) Nº PODER GENERAL
(16) ACTUACIÓN POR MEDIO DE AGENTE	NOMBRE		CÓDIGO DE AGENTE	
(17) ACTUACIÓN POR MEDIO DE OTRO REPRESENTANTE	NOMBRE	DIRECCIÓN POSTAL	N.I.F.	
DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO	Nº TELÉFONO	(18) INDICACIÓN DEL MEDIO DE NOTIFICACIÓN PREFERENTE <input type="checkbox"/> CORREO POSTAL <input type="checkbox"/> CORREO ELECTRÓNICO		

6. OTROS DATOS

(19) REMINDICACIÓN DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	PAIS ORIGEN	CODIGO PAIS	FECHA	NÚMERO
(20) EXPOSICIONES OFICIALES <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	NOMBRE		FECHA	LUGAR
(21) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO	AUTORIDAD DE DEPÓSITO	CODIGO PAIS	FECHA	NÚMERO
LISTAS DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS				
La descripción contiene un listado de secuencias biológicas en concordancia con la norma ST.25 OMPI <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Se adjunta un soporte de datos legible por ordenador que incluye el listado de secuencias biológicas en concordancia con la norma ST.25 OMPI <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
El solicitante declara por medio de esta instancia, que la información registrada en el soporte de datos legible por ordenador es idéntica a la contenida en el listado de secuencias biológicas incluido en la descripción de la versión escrita de esta solicitud <input type="checkbox"/>				
(22) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES			<input type="checkbox"/> SI	

7. ÍNDICE DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN / FECHA Y FIRMA (23)

<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN. Nº PÁGINAS: 19 <input checked="" type="checkbox"/> Nº DE REMINDICACIONES: 13 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº PÁGINAS: 1 <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS. Nº PÁGINAS: <input type="checkbox"/> SOPORTE LEGIBLE POR ORDENADOR DE LISTA DE SECUENCIAS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> FIGURA A PUBLICAR EN BOPI Nº: ____ <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> SOLICITUD CAP <input checked="" type="checkbox"/> OTROS: <i>REFERENCIA. PARECE NO PUBLICADA.</i>	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE  José Antonio Vilán Vilán-Vicente, Ingeniero
		FIRMA DEL FUNCIONARIO 

ANEXOS



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, ENERGÍA
Y TURISMO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Nº SOLICITUD:

P 201300935

FECHA Y HORA DE ENTRADA EN OEPM:

08-OCT'13 10:21

FECHA Y HORA DE ENTRADA EN LUGAR DISTINTO A LA OEPM:

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SOLICITUD

(1) MODALIDAD:

 PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS SOLICITANTES (2)

(3) APELLIDOS Y NOMBRE / DENOMINACIÓN SOCIAL / INFORMACIÓN RELATIVA A UNIVERSIDAD PÚBLICA ESPAÑOLA	PAÍS NAC.	CÓD. NAC.	NIF/ PASAPORTE	(4) ESTA PERSONA TAMBIÉN ES INVENTOR:	(5) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input checked="" type="checkbox"/> SI	ES	ES	Q1518001A	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %
ESTE SOLICITANTE ES UNIVERSIDAD PÚBLICA: <input type="checkbox"/> SI				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> INVENCION LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION <input type="checkbox"/> OTROS (Especificar): _____ PORCENTAJE DE TITULARIDAD: %

NOTA: DE NO ESPECIFICARSE EL PORCENTAJE DE TITULARIDAD, LA OEPM PRESUMIRÁ IGUALES LAS CUOTAS DE LOS SOLICITANTES.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS INVENTORES (Incluir sólo aquellos inventores que no figuren como solicitantes) (6)

APELLIDOS Y NOMBRE	PAÍS NACIONALIDAD	CODIGO NAC.	NIF/PASAPORTE
DOMÍNGUEZ MARTÍN, Jorge	España	ES	33278057R
LORES AGUÍN, Marta	España	ES	35450286H
MARTÍNEZ CORDEIRO, Hugo	España	ES	36171960K
ÁLVAREZ CASAS, Marta	España	ES	44448765T

VI.4. Anexo IV. I+D+i

VI.4.1. Proyecto ARGOS

A partir de la participación en el programa Argos, 2013, se formó un equipo de emprendedores, el cual, resultó ganador con el 1º premio gracias a su plan de negocio. Posteriormente, se llevó a cabo la creación de la Spin-off i-Grape Laboratory S.L.



VI.4.2. Resumen ejecutivo i-Grape



i-Grape Laboratory es una empresa que se dedica a la producción de extractos naturales destinados a diversos sectores industriales, teniendo como base la utilización de técnicas sostenibles medioambientalmente con el fin de

ofrecer a sus clientes un producto personalizado que les aporte un alto valor añadido frente al consumidor final.

Cada vez son más los consumidores que sustituyen el consumo de productos sintéticos por productos naturales y orgánicos. Este cambio obedece a varias razones entre las que se incluye una mayor preocupación por la salud y por la imagen personal combinado con el fácil acceso a la información y las campañas publicitarias que apoyan hábitos de vida saludables. De igual modo se comienza a instaurar una conciencia social que apoya las técnicas de producción sostenibles y que rechaza aquellas poco respetuosas con el medioambiente.

i-Grape Laboratory, consciente de este cambio, propone nuevas alternativas naturales a las empresas asentadas en mercados como el dermocosmético y nutracéutico-alimentario, teniendo la I+D+i como piedra angular y ofertando productos eficaces que cumplan los más altos estándares de calidad.

El proceso productivo está protegido mediante una patente de la USC cedida a **i-Grape Laboratory** a través de un acuerdo de transferencia de tecnología. Este proceso se basa en la utilización del bagazo de la uva como materia prima y esto confiere al sistema una gran ventaja competitiva en costes, ya que el bagazo es un residuo de la industria vitivinícola y su coste es cero.

El proceso productivo permite ofrecer al cliente un extracto en estado líquido o sólido (en polvo), de forma que sea totalmente adaptable a sus necesidades.

De este modo nace su primera línea de productos, consistentes en un extracto de uva blanca que dadas sus propiedades antioxidantes y antibacterianas resulta de gran interés para la industria dermocosmética, en la elaboración de formulaciones coadyuvantes en el tratamiento del acné, y para la industria alimentaria, como ingrediente natural con una alta capacidad antioxidante.

Tanto la capacidad antioxidante como la antibacteriana han sido probadas y corroboradas por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas- LIDSA de la Universidad de Santiago.

En relación con la capacidad antioxidante, el extracto ofrecido por i-Grape Laboratory tiene una eficacia relativa equivalente a ≈ 10 veces mayor que la del BHT y $\approx 1,3$ veces mayor que la del BHA, los antioxidantes sintéticos más utilizados.

En relación con la capacidad antibacteriana, el extracto ha demostrado su capacidad inhibidora en distintas familias de bacterias, entre ellas varias de las involucradas en el desarrollo del acné o del deterioro de algunos alimentos.

El tamaño de mercado de los extractos naturales es enorme, debido principalmente a la multitud de usos que poseen dichos extractos, pasando por industrias que van desde las farmacéuticas, alimentación, bebidas, cosmética, tintes para ropa, etc. Para concretar un dato, señalaremos que el mercado mundial de los ingredientes naturales para alimentación superó los 3.500 Millones de dólares en 2.012. Sólo el segmento de antioxidantes naturales de uso alimentario en Europa tenía un tamaño de 270 Millones de dólares en 2.012 con una previsión de 333 Millones en 2.016. Los principales productores internacionales son multinacionales como la alemana BASF o la estadounidense DuPONT.

En la industria de los productores de extractos naturales y dentro del mercado español, podemos tomar como ejemplo a seguir a la empresa EVESA (Extractos Vegetales SA), constituida en los años 70 y que en el ejercicio 2012 obtuvo una facturación de más de 14 Millones de euros.

La inversión solicitada para este proyecto se sitúa en torno a **200.000 euros** y se estructura en dos fases: una primera planta piloto y el escalado a una planta de mayor capacidad en un plazo de tres años, además del desarrollo comercial de la empresa.

DESTINO CAPITAL SOLICITADO	2015	2017
Montaje planta piloto e inicio de las	60.000	

ANEXOS

acciones comerciales		
Escalado a planta industrial		140.000
Expansión red comercial		

El capital aportado se estructura según la siguiente previsión

APORTACIONES DE CAPITAL	2015	2017	TOTAL
Aportación socios (Capital Social + Préstamos + Ampliaciones de capital)	37.667	42.000	79.667
Inversores	60.000	140.000	200.000
TOTAL	97.667	182.000	279.667

Los datos financieros previstos son los siguientes:

	2015	2016	2017	2018	2019
Ingresos de explotación	139.627	176.003	578.596	1.015.005	1.660.925
Beneficio después impuestos	22.592	-8.045	134.589	322.365	664.302

El Valor Actual Neto del proyecto es de **1.830.388 euros**.



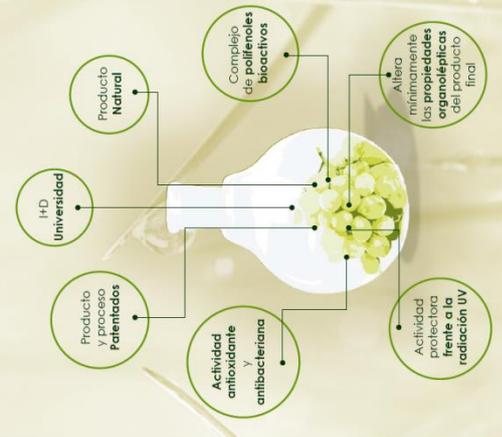


i-Grape
Laboratory

"Bringing you
the power of nature"

derma EXTRACT

"Extracto propiencológico de uva blanca con intensa actividad **antioxidante, antibacteriana** y protectora frente a la radiación UV"



derma EXTRACT

"Actividad **bactericida y bacteriostática** frente a la principal cepa implicada en la etiología del acné: **Staphylococcus aureus**"

"Actividad **antioxidante** testada muy superior a los antioxidantes sintéticos BHA y BHT"

PROPIEDADES

Apariencia: Líquido color ámbar

Olor: Característico

Consistencia: Muy viscosa

pH: 3.5 a 3.8 a 20 °C

Solubilidad: En agua soluble

Densidad: 1.049 g/ml

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Índice de polifenoles totales: 17384 mg/dL

Polifenoles: **catequina** (484 mg/L), **epigallocatequina** (254 mg/L), **quercetina** (19 mg/L)

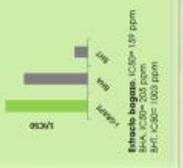
Otros compuestos fenólicos identificados: ácido catéico, epicatequina, galato, **resveratrol** (1.187 mg/L), **resveratrol-3-O** (248 mg/L)

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

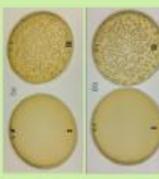
134 mM Trolox

1472 ppm Vitamina C

EFICACIA EN LA ELIMINACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (CAM)



Staphylococcus aureus (Fig. 1a,b): 1.25 - 1.5 %

Propionibacterium acnes: 1.1 - 1.5 %

Bacillus spp. (Fig. 1c,d): 1 - 1.25 %

Edificio Empresa
Campus Vida s/n
15782 Santiago de Compostela
www.i-grape.es

F-Grape Laboratory, 2014

 www.i-grape.es

 twitter.com/igrapelab

 facebook.com/igrapelab

 twitter.com/igrapelab



SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μL: Microlitros

Å: Amstrong

°C: Grados centígrados

λ: Longitud de onda

A

AA: actividad antioxidante

Ác.: Ácido

ACN: Acetonitrilo

AL: Albariño

ANOVA: (*"analysis of variance"*) Análisis de la varianza

ASE: (*"Accelerated solvent extraction"*) Extracción acelerada con disolventes

AU: Unidades de absorbancia

C

CA: caíño blanco

CAFE: ácido cafeico

CAFT: ácido caftárico

CATE: catequina

cm: Centímetros

CTE: Equivalentes de catequina

D

D.O.: Denominación de origen

DAD: Detector de Red de diodos

SD: desviación estándar

E

EPA: (*"U.S. Environmental Protection Agency"*) La Agencia de Protección Ambiental de EEUU

EPICATE: epicatequina

eV: electrón voltio

EXP.: experimento

G

g: Gramos

GAE: Equivalentes de ácido gálico

GAL: ácido gálico

GCA: Ácido clorogénico

GDC: Sistema de conducción

GO: godello

GPC: (*"Gel Permeation Chromatography"*) Cromatografía de permeación en gel

H

HDL: (*"High density lipoproteins"*) Lipoproteínas de alta densidad

HPLC: "High-performance liquid chromatography" Cromatografía de líquidos de alta resolución

I

IC50: concentración que inhibe el 50% del radical

IPT: Índice de Polifenoles Totales

L

L: litros

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LDL: ("Low density lipoproteins") Lipoproteínas de baja densidad

LO: loureiro

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

LSD: "Least Significant Difference"

M

mM: milimolar

M: molar

MAE: ("Microwave-assisted extraction") Extracción asistida por microondas

mg : Miligramos

min: Minuto

mL: Mililitros

MPa: megapascales

MSPD: ("Matrix solid phase dispersion") Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida

N

nm: Nanómetros

O

OMS: Organización mundial de la salud

P

PB1: procianidina B1

PB2: procianidina B2

PFC: proyecto fin de carrera

Porp. Disolv.: porporción de disolvente

PROTO: ácido protocatéquico

PSE: ("Pressurized solvent extraction") Extracción mediante disolventes presurizados

Psi: "Pounds per square inch" Libra por pulgada cuadrada

PT: Punto triple

Q

Q: quercetina

R

R²: coeficiente de correlación

Ref. : Referencia

RSM: “*Response Surface Methodology*” Métodos de Superficie de Respuesta

RT: temperatura ambiente

S

SFE: (“*Supercritical fluid extraction*”) Extracción por fluidos supercríticos

SD: desviación estándar

SH: sistema de conducción Scott Henry

T

TF: (*Total Flavanols*) Flavanoles Totales

TFC: (*Total Flavonoids content*) Flavonoides Totales

THC: (“*Total Hydroxycinnamate*”) Hidroxicinamatos Totales

TIC: total ion chromatogram

Tm: Tonelada

TO: torrontés

tr: Tiempo de retención

TR: treixadura

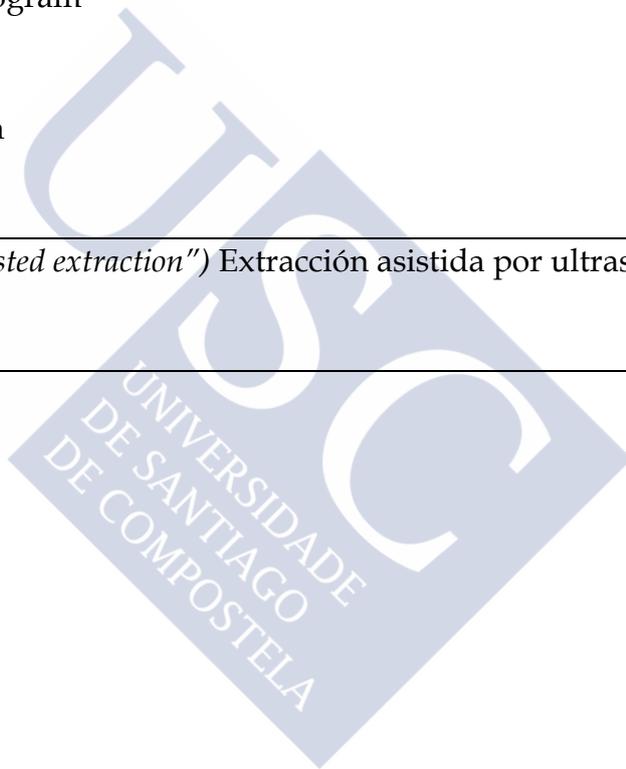
U

UAE: (“*Ultrasound-assisted extraction*”) Extracción asistida por ultrasonidos

UV: Ultravioleta

W

W: Watios





BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Dreosti, I. E.** Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition* 16, 692-694, (2000).
- 2 **Sen, S.;Chakraborty, R.;Sridhar, C.;Reddy, Y.;De, B.** Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International journal of pharmaceutical sciences review and research* 3, 91-100, (2010).
- 3 **Boots, A. W.;Haenen, G. R. M. M.;Bast, A.** Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585, 325-337, (2008).
- 4 **Diplock, A.;Charuleux, J.-L.;Crozier-Willi, G.;Kok, F.;Rice-Evans, C.;Roberfroid, M.;Stahl, W.;Vina-Ribes, J.** Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* 80, S77-S112, (1998).
- 5 **Halliwel, B.** Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35, 1147-1150, (2007).
- 6 **Halliwel, B.** Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401, 1-11, (2007).
- 7 **Cos, P.;Hermans, N.;Calomme, M.;Maes, L.;Bruyne, T.;Pieters, L.;Vlietinck, A.;Berghe, D. V.** Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. *Journal of pharmacy and pharmacology* 55, 1291-1297, (2003).
- 8 **Cadenas, E.** Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* 6, 391-397, (1997).
- 9 **Valenzuela B, A.;Nieto K, S.** Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y aceites* 47, 186-196, (1996).
- 10 **Zheng, W.;Wang, S. Y.** Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5165-5170, (2001).
- 11 **White, P.;Xing, Y.** Antioxidants from cereals and legumes. *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*, 25-63, (1997).
- 12 **Quideau, S.;Deffieux, D.;Douat-Casassus, C.;Pouységu, L.** Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Edit.* 50, 586-621, (2011).
- 13 **Shi, J.;Nawaz, H.;Pohorly, J.;Mittal, G.;Kakuda, Y.;Jiang, Y.** Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—Engineering and technology. *Food reviews international* 21, 139-166, (2005).
- 14 **Treutter, D.** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4, 147-157, (2006).
- 15 **Hall, C.** Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. *Antioxidants in food: practical applications. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited*, 159-209, (2001).
- 16 **Fuhrman, B.;Aviram, M.** Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against Atherogenic Modifications. *Handbook of antioxidants* 8, 303, (2001).
- 17 **Rice-Evans, C. A.;Miller, N. J.;Paganga, G.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio. Med.* 20, 933-956, (1996).
- 18 **Garcia-Salas, P.;Morales-Soto, A.;Segura-Carretero, A.;Fernández-Gutiérrez, A.** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15, 8813-8826, (2010).
- 19 **Heim, K. E.;Tagliaferro, A. R.;Bobilya, D. J.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 13, 572-584, (2002).
- 20 **Casares Faulín, A. B.** Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. (2011).
- 21 **Pokorný, J.;Yanishlieva, N.;Gordon, M.** *Antioxidants in food: practical applications.* (Elsevier, 2001).

- 22 **Ribéreau-Gayon, P.;Dubourdieu, D.;Lonvaud, A.** *Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications*. Vol. 1 (John Wiley & Sons, 2006).
- 23 **Darias-Martín, J. J.;Rodríguez, O.;Díaz, E.;Lamuella-Raventós, R. M.** Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chem.* 71, 483-487, (2000).
- 24 **González-Centeno, M. R.;Jourdes, M.;Femenia, A.;Simal, S.;Rosselló, C.;Teissedre, P.-L.** Characterization of Polyphenols and Antioxidant Potential of White Grape Pomace Byproducts (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 11579-11587, (2013).
- 25 **Busse-Valverde, N.;Gomez-Plaza, E.;Lopez-Roca, J. M.;Gil-Munoz, R.;Bautista-Ortin, A. B.** The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *J Agric Food Chem* 59, 5450-5455, (2011).
- 26 **Rodríguez Montealegre, R.;Romero Peces, R.;Chacón Vozmediano, J. L.;Martínez Gascueña, J.;García Romero, E.** Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compositon Anal.* 19, 687-693, (2006).
- 27 **van Leeuwen, C.;Friant, P.;Choné, X.;Tregoa, O.;Koundouras, S.;Dubourdieu, D.** Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 207-217, (2004).
- 28 **Ky, I.;Crozier, A.;Cros, G.;Teissedre, P.-I.** Polyphenols composition of wine and grape sub-products and potential effects on chronic diseases. *Nutrition and Aging* 2, 165-177, (2014).
- 29 **Jayaprakasha, G.;Singh, R.;Sakariah, K.** Antioxidant activity of grape seed (< i> *Vitis vinifera*</i>) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.* 73, 285-290, (2001).
- 30 **Xu, C.;Zhang, Y.;Wang, J.;Lu, J.** Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapeseeds. *Food Chem.* 122, 688-694, (2010).
- 31 **Negro, C.;Tommasi, L.;Miceli, A.** Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technol.* 87, 41-44, (2003).
- 32 **Makris, D. P.;Boskou, G.;Andrikopoulos, N. K.** Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J. Food Compositon Anal.* 20, 125-132, (2007).
- 33 **Nardini, M.;Forte, M.;Vrhovsek, U.;Mattivi, F.;Viola, R.;Scaccini, C.** White wine phenolics are absorbed and extensively metabolized in humans. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2711-2718, (2009).
- 34 **Hernanz, D.;Recamales, Á. F.;González-Miret, M. L.;Gómez-Míguez, M. J.;Vicario, I. M.;Heredia, F. J.** Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *J. Food Eng.* 80, 327-335, (2007).
- 35 **Organization, W. H.** *World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease. Guidelines for assesment and management of cardiovascular risk*, <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd> (2007).
- 36 **El Gharras, H.** Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *Int. J Food Sci. Tech.* 44, 2512-2518, (2009).
- 37 **Siddhuraju, P.;Becker, K.** Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2144-2155, (2003).
- 38 **Fuhrman, B.;Aviram, M.** Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 321-324, (2002).
- 39 **El Gharras, H.** Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int. J Food Sci. Tech.* 44, 2512-2518, (2009).
- 40 **Lotito, S. B.;Fraga, C. G.** Catechins delay lipid oxidation and α -tocopherol and β -carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Experimental Biology and Medicine* 225, 32-38, (2000).

- 41 **Yilmaz, Y.; Toledo, R. T.** Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 52, 255-260, (2004).
- 42 **Sánchez-Moreno, C.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F.** Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research* 20, 941-953, (2000).
- 43 **Jaiswal, R.; Kiprotich, J.; Kuhnert, N.** Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry* 72, 781-790, (2011).
- 44 **Xia, E.-Q.; Deng, G.-F.; Guo, Y.-J.; Li, H.-B.** Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 622-646, (2010).
- 45 **Daglia, M.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 174-181, (2012).
- 46 **Mildner-Szkudlarz, S.; Bajerska, J.; Zawirska-Wojtasiak, R.; Górecka, D.** White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *J Sci Food Agric* 93, 389-395, (2013).
- 47 **Aviram, M.; Fuhrman, B.** Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 146-161, (2002).
- 48 **Selani, M.; Contreras-Castillo, C.; Shirahigue, L.; Gallo, C.; Plata-Oviedo, M.; Montes-Villanueva, N.** Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Science* 88, 397-403, (2011).
- 49 **Banon, S.; Díaz, P.; Rodríguez, M.; Garrido, M. D.; Price, A.** Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat science* 77, 626-633, (2007).
- 50 **Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I.** Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.* 92, 547-557, (2005).
- 51 **Vivas, N.; Augustin, M.; Lonvaud-Funel, A.** Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *J Sci Food Agric* 80, 1675-1678, (2000).
- 52 **Han, J.; Britten, M.; St-Gelais, D.; Champagne, C. P.; Fustier, P.; Salmieri, S.; Lacroix, M.** Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chem.* 124, 1589-1594, (2011).
- 53 **Afaq, F.; Katiyar, S. K.** Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini reviews in medicinal chemistry* 11, 1200-1215, (2011).
- 54 **Katalinić, V.; Možina, S. S.; Skroza, D.; Generalić, I.; Abramović, H.; Miloš, M.; Ljubenković, I.; Piskernik, S.; Pezo, I.; Terpinc, P.; Boban, M.** Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119, 715-723, (2010).
- 55 **Funatogawa, K.; Hayashi, S.; Shimomura, H.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H.; Hirai, Y.** Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and immunology* 48, 251-261, (2004).
- 56 **Tosi, E. A.; Ré, E.; Ortega, M. E.; Cazzoli, A. F.** Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem.* 104, 1025-1029, (2007).
- 57 **Hirasawa, M.; Takada, K.** Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 225-229, (2004).
- 58 **Thimothe, J.; Bonsi, I. A.; Padilla-Zakour, O. I.; Koo, H.** Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10200-10207, (2007).

- 59 **Vinardell, M.;Ugartondo, V.;Mitjans, M.** Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Ind. Crop. Prod.* 27, 220-223, (2008).
- 60 **Grigonis, D.;Venskutonis, P.;Sivik, B.;Sandahl, M.;Eskilsson, C.** Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (< i> Hierochloë odorata</i>). *J. Supercrit. Fluid.* 33, 223-233, (2005).
- 61 **Laufenberg, G.;Kunz, B.;Nystroem, M.** Transformation of vegetable waste into value added products::(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. *Bioresource Technol.* 87, 167-198, (2003).
- 62 **Ugartondo, V.;Mitjans, M.;Tourinho, S.;Torres, J. L.;Vinardell, M. P.** Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chemical research in toxicology* 20, 1543-1548, (2007).
- 63 **Manach, C.;Scalbert, A.;Morand, C.;Rémésy, C.;Jiménez, L.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747, (2004).
- 64 **Peschel, W.;Sánchez-Rabareda, F.;Diekmann, W.;Plescher, A.;Gartzía, I.;Jiménez, D.;Lamuela-Raventós, R.;Buxaderas, S.;Codina, C.** An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* 97, 137-150, (2006).
- 65 **Jerez, M.;Tourinho, S.;Sineiro, J.;Torres, J. L.;Núñez, M. J.** Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. *Food Chem.* 104, 518-527, (2007).
- 66 **Zhang, G.;Hu, M.;He, L.;Fu, P.;Wang, L.;Zhou, J.** Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities< i> in vitro</i>. *Food and Bioprocess Processing* 91, 158-168, (2013).
- 67 **Makris, D. P.;Boskou, G.;Andrikopoulos, N. K.** Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technol.* 98, 2963-2967, (2007).
- 68 **Torres, J.;Bobet, R.** New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4627-4634, (2001).
- 69 **Fontana, A. R.;Antoniolli, A.;Bottini, R.** Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem* 61, 8987-9003, (2013).
- 70 **Pérez-Serradilla, J.;Luque de Castro, M.** Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chem.* 124, 1652-1659, (2011).
- 71 **Aliakbarian, B.;Fathi, A.;Perego, P.;Dehghani, F.** Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *J. Supercrit. Fluid.* 65, 18-24, (2012).
- 72 **Sagdic, O.;Ozturk, I.;Ozkan, G.;Yetim, H.;Ekici, L.;Yilmaz, M. T.** RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chem.* 126, 1749-1758, (2011).
- 73 **Monrad, J. K.;Howard, L. R.;King, J. W.;Srinivas, K.;Mauromoustakos, A.** Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2862-2868, (2010).
- 74 **Amendola, D.;De Faveri, D. M.;Spigno, G.** Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J.Food Eng.* 97, 384-392, (2010).
- 75 **Brahim, M.;Gambier, F.;Brosse, N.** Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Ind. Crop. Prod.* 52, 18-22, (2014).
- 76 **Tseng, A.;Zhao, Y.** Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (Pinot Noir and Merlot). *J. food sci.* 77, H192-H201, (2012).

- 77 **Hogan, S.;Canning, C.;Sun, S.;Sun, X.;Zhou, K.** Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11250-11256, (2010).
- 78 **Alonso, A. M.;Guillén, D. A.;Barroso, C. G.;Puertas, B.;García, A.** Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5832-5836, (2002).
- 79 **Careri, M.;Corradini, C.;Elviri, L.;Nicoletti, I.;Zagnoni, I.** Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5226-5231, (2003).
- 80 **Torres, J. L.;Varela, B.;García, M. T.;Carilla, J.;Matito, C.;Centelles, J. J.;Cascante, M.;Sort, X.;Bobet, R.** Valorization of Grape (*Vitis vinifera*) Byproducts. Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7548-7555, (2002).
- 81 **Sánchez, M.;Franco, D.;Sineiro, J.;Magariños, B.;Núñez, M.** Antioxidant power, bacteriostatic activity, and characterization of white grape pomace extracts by HPLC–ESI–MS. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 291-301, (2009).
- 82 **Guerrero, M. S.;Torres, J. S.;Nuñez, M. J.** Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technol.* 99, 1311-1318, (2008).
- 83 **Kammerer, D.;Claus, A.;Carle, R.;Schieber, A.** Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4360-4367, (2004).
- 84 **González-Paramás, A. M.;Esteban-Ruano, S.;Santos-Buelga, C.;de Pascual-Teresa, S.;Rivas-Gonzalo, J. C.** Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 52, 234-238, (2004).
- 85 **Matias, A. A.;Serra, A. T.;Silva, A. C.;Perdigão, R.;Ferreira, T. B.;Marcelino, I.;Silva, S.;Coelho, A. V.;Alves, P. M.;Duarte, C. M. M.** Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. *International Journal of Food Sciences & Nutrition* 61, 357-368, (2010).
- 86 **Wijngaard, H.;Hossain, M. B.;Rai, D. K.;Brunton, N.** Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. In.* 46, 505-513, (2012).
- 87 **Cavero, S.;García-Risco, M. R.;Marín, F. R.;Jaime, L.;Santoyo, S.;Señoráns, F. J.;Reglero, G.;Ibañez, E.** Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: Chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays. *J. Supercrit. Fluid.* 38, 62-69, (2006).
- 88 **Virost, M.;Tomao, V.;Le Bourvellec, C.;Renard, C. M.;Chemat, F.** Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* 17, 1066-1074, (2010).
- 89 **Sánchez, M.;Franco, D.;Sineiro, J.;Magariños, B.;Núñez, M. J.** Antioxidant power, bacteriostatic activity, and characterization of white grape pomace extracts by HPLC–ESI–MS. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 291-301, (2009).
- 90 Xunta de Galicia. <http://www.medioruralemar.xunta.es/>. (07-07-2014).
- 91 **Domínguez, J.;Aira, M.;Gómez-Brandón, M.** in *Microbes at Work* (eds Heribert Insam;Ingrid Franke-Whittle;Marta Goberna) Ch. 5, 93-114 (Springer Berlin Heidelberg, 2010).
- 92 **Aira, M.;Sampedro, L.;Monroy, F.;Domínguez, J.** Detritivorous earthworms directly modify the structure, thus altering the functioning of a microdecomposer food web. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2511-2516, (2008).
- 93 **Aira, M.;Domínguez, J.** Las lombrices de tierra y los microorganismos: desentrañando la caja negra del vermicompostaje. *Acta. zool. mex.* 26, 385-395, (2010).
- 94 **Aira, M.;Monroy, F.;Domínguez, J.** *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon

- mineralization during vermicomposting of pig manure. *Microbial ecol.* 54, 662-671, (2007).
- 95 **Lores, M.;Gómez-Brandón, M.;Pérez-Díaz, D.;Domínguez, J.** Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2993-2996, (2006).
- 96 **Aira, M.;Monroy, F.;Domínguez, J.** *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) activates fungal growth, triggering cellulose decomposition during vermicomposting. *Microbial ecol.* 52, 738-747, (2006).
- 97 **Domínguez, J.** in *Earthworm Ecology (2nd edition)* (ed CA Edwards) 401-424 (CRC Press LLC, 2004).
- 98 **Domínguez, J.;Briones, M.;Mato, S.** Effect on the diet on growth and reproduction of *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia* 41, 566, (1997).
- 99 **Khanal, R. C.;Howard, L. R.;Prior, R. L.** Procyanidin composition of selected fruits and fruit byproducts is affected by extraction method and variety. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8839-8843, (2009).
- 100 **Ghafoor, K.;Park, J.;Choi, Y.-H.** Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 485-490, (2010).
- 101 **Pereira, C. G.;Meireles, M. A. A.** Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology* 3, 340-372, (2010).
- 102 **Hamburger, M.;Baumann, D.;Adler, S.** Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants—effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical analysis* 15, 46-54, (2004).
- 103 **Herrero, M.;Cifuentes, A.;Ibanez, E.** Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.* 98, 136-148, (2006).
- 104 **András, C. D.;Simándi, B.;Örsi, F.;Lambrou, C.;Missopolinou-Tatala, D.;Panayiotou, C.;Domokos, J.;Doleschall, F.** Supercritical carbon dioxide extraction of okra (*Hibiscus esculentus* L) seeds. *J Sci Food Agric* 85, 1415-1419, (2005).
- 105 **Bernardo-Gil, M. G.;Grenha, J.;Santos, J.;Cardoso, P.** Supercritical fluid extraction and characterisation of oil from hazelnut. *European journal of lipid science and technology* 104, 402-409, (2002).
- 106 **Bernardo-Gil, M. G.;Lopes, L. M. C.** Supercritical fluid extraction of *Cucurbita ficifolia* seed oil. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 593-597, (2004).
- 107 **Romdhane, M.;Gourdon, C.** Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal* 87, 11-19, (2002).
- 108 **Vinatoru, M.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8, 303-313, (2001).
- 109 **Ballard, T. S.;Mallikarjunan, P.;Zhou, K.;O'Keefe, S.** Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem.* 120, 1185-1192, (2010).
- 110 **Beejmohun, V.;Fliniaux, O.;Grand, E.;Lamblin, F.;Bensaddek, L.;Christen, P.;Kovensky, J.;Fliniaux, M. A.;Mesnard, F.** Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical Analysis* 18, 275-282, (2007).
- 111 **Proestos, C.;Komaitis, M.** Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Science and Technology* 41, 652-659, (2008).
- 112 **Barker, S. A.;Long, A. R.;Short, C. R.** Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 475, 353-361, (1989).
- 113 **Barker, S. A.** Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 885, 115-127, (2000).

- 114 **Bogialli, S.;Di Corcia, A.** Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting
contaminants from foodstuffs. *J. Biochem. Bioph. Meth.* 70, 163-179, (2007).
- 115 **Kristenson, E. M.;Brinkman, U. A. T.;Ramos, L.** Recent advances in matrix solid-phase
dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25, 96-111, (2006).
- 116 **García-López, M.;Canosa, P.;Rodríguez, I.** Trends and recent applications of matrix
solid-phase dispersion. *Analytical and bioanalytical chemistry* 391, 963-974, (2008).
- 117 **Ziaková, A.;Brandsteterová, E.;Blahová, E.** Matrix solid-phase dispersion for the liquid
chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *J. Chromatogr.*
A 983, 271-275, (2003).
- 118 **Xiao, H. B.;Krucker, M.;Albert, K.;Liang, X. M.** Determination and identification of
isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-
performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric
detection. *J. Chromatogr. A* 1032, 117-124, (2004).
- 119 **Manhita, A. C.;Teixeira, D. M.;da Costa, C. T.** Application of sample disruption
methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples.
J. Chromatogr. A 1129, 14-20, (2006).
- 120 **Dopico-García, M. S.;Valentão, P.;Jagodzińska, A.;Klepczyńska, J.;Guerra, L.;Andrade,
P. B.;Seabra, R. M.** Solid-phase extraction versus matrix solid-phase dispersion:
Application to white grapes. *Talanta* 74, 20-31, (2007).
- 121 **Palma, M.;Piñeiro, Z.;Barroso, C.** Stability of phenolic compounds during extraction
with superheated solvents. *J. Chromatogr. A* 921 169-174, (2001).
- 122 **Rockenbach, I. I.;Jungfer, E.;Ritter, C.;Santiago-Schübel, B.;Thiele, B.;Fett, R.;Galensa,
R.** Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS<
sup> n</sup> and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Res. In.* 48, 848-855, (2012).
- 123 **García-Marino, M.;Rivas-Gonzalo, J. C.;Ibáñez, E.;García-Moreno, C.** Recovery of
catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water
extraction. *Anal. chim. acta* 563, 44-50, (2006).
- 124 **Hossain, M.;Brunton, N.;Martin-Diana, A.;Barry-Ryan, C.** Application of response
surface methodology to optimize pressurized liquid extraction of antioxidant
compounds from sage (*Salvia officinalis* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme
(*Thymus vulgaris* L.). *Food Funct.* 1, 269-277, (2010).
- 125 **Dionex.** *Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction (ASE). Technical Note
208; Dionex Corporation: Sunnyvale, CA (2004).*
- 126 **Fernandez-Alvarez, M.;Llompert, M.;Lamas, J. P.;Lores, M.;Garcia-Jares, C.;Garcia-
Chao, M.;Dagnac, T.** Simultaneous Extraction and Cleanup Method Based on
Pressurized Solvent Extraction for Multiresidue Analysis of Pesticides in Complex Feed
Samples. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3963-3973, (2009).
- 127 **Navarro, M.;Picó, Y.;Marín, R.;Mañes, J.** Application of matrix solid-phase dispersion
to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J.*
Chromatogr. A 968, 201-209, (2002).
- 128 **García de Llasera, M. P.;Reyes-Reyes, M. L.** A validated matrix solid-phase dispersion
method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples. *Food
Chem.* 114, 1510-1516, (2009).
- 129 **Macedo, A. N.;Nogueira, A. R.;Brondi, S. H. G.** Matrix Solid-Phase Dispersion
Extraction for Analysis of Cypermethrin Residue in Cows' Milk. *Chromatographia* 69,
571-573, (2009).
- 130 **Kristenson, E. M.;Haverkate, E. G.;Slooten, C. J.;Ramos, L.;Vreuls, R. J.;Brinkman, U.
A. T.** Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in
fruit followed by gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*
917, 277-286, (2001).

- 131 **Kruve, A.;Künnapas, A.;Herodes, K.;Leito, I.** Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1187, 58-66, (2008).
- 132 **dos Santos, T. F. S.;Aquino, A.;Dórea, H. S.;Navickiene, S.** MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 390, 1425-1430, (2008).
- 133 **Abhilash, P.;Jamil, S.;Singh, N.** Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. *J. Chromatogr. A* 1176, 43-47, (2007).
- 134 **Sánchez-Brunete, C.;Miguel, E.;Tadeo, J. L.** Determination of organochlorine pesticides in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 74, 1211-1217, (2008).
- 135 **Radišić, M.;Grujić, S.;Vasiljević, T.;Laušević, M.** Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 113, 712-719, (2009).
- 136 **Cai, J.;Gao, Y.;Zhu, X.;Su, Q.** Matrix solid phase dispersion–Soxhlet simultaneous extraction clean-up for determination of organochlorine pesticide residues in tobacco. *Analytical and bioanalytical chemistry* 383, 869-874, (2005).
- 137 **Cunha, S. C.;Fernandes, J. O.;Beatriz, M.;Oliveira, P.** Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 73, 514-522, (2007).
- 138 **García, M.;Rodríguez, I.;Cela, R.** Optimisation of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of organophosphate compounds in dust samples. *Anal. chim. acta* 590, 17-25, (2007).
- 139 **Frenich, A. G.;Bolanos, P. P.;Vidal, J. L. M.** Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1153, 194-202, (2007).
- 140 **Kishida, K.;Furusawa, N.** Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulfonamides in meat. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 26, 2931-2939, (2003).
- 141 **Ruiz, M. J.;Cameán, A. M.;Moreno, I. M.;Picó, Y.** Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1073, 257-262, (2005).
- 142 **Canosa, P.;Rodríguez, I.;Rubi, E.;Cela, R.** Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* 79, 1675-1681, (2007).
- 143 **Singleton, V. L.;Rossi, J. A., Jr.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158, (1965).
- 144 **Brand-Williams, W.;Cuvelier, M.;Berset, C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28, 25-30, (1995).
- 145 **Psarra, E.;Makris, D. P.;Kallithraka, S.;Kefalas, P.** Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *J Sci Food Agric* 82, 1014-1020, (2002).
- 146 **Kim, D.-O.;Chun, O. K.;Kim, Y. J.;Moon, H.-Y.;Lee, C. Y.** Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6509-6515, (2003).
- 147 **Lores, M.;Iglesias - Estévez, M.;Álvarez-Casas, M.;Llompert, M.;Garcia-Jares, C.** Extraction of bioactive polyphenols from grape marc by a matrix solid-phase dispersion method. *Recursos Rurais* 8, 39- 47, (2012).

- 148 **Fattouch, S.;Caboni, P.;Coroneo, V.;Tuberoso, C. I.;Angioni, A.;Dessi, S.;Marzouki, N.;Cabras, P.** Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 55, 963-969, (2007).
- 149 **Papagiannopoulos, M.;Mellenthin, A.** Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process. *J. Chromatogr. A* 976, 345-348, (2002).
- 150 **Luthria, D. L.** Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *J Sci Food Agric* 86, 2266-2272, (2006).
- 151 **Coletta, A.;Berto, S.;Crupi, P.;Cravero, M. C.;Tamborra, P.;Antonacci, D.;Daniele, P. G.;Prenesti, E.** Effect of viticulture practices on concentration of polyphenolic compounds and total antioxidant capacity of Southern Italy red wines. *Food Chem.* 152, 467-474, (2014).
- 152 **Fragasso, M.;Antonacci, D.;Pati, S.;Tufariello, M.;Baiano, A.;Forleo, L. R.;Caputo, A. R.;La Notte, E.** Influence of training system on volatile and sensory profiles of primitivo grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic., ajev.* 2012.11074, (2012).
- 153 **Coletta, A.;Trani, A.;Faccia, M.;Punzi, R.;Dipalmo, T.;Crupi, P.;Antonacci, D.;Gambacorta, G.** Influence of viticultural practices and winemaking technologies on phenolic composition and sensory characteristics of Negroamaro red wines. *Int. J Food Sci.Tech.* 48, 2215-2227, (2013).
- 154 **Pérez-Lamela, C.;García-Falcón, M.;Simal-Gándara, J.;Orriols-Fernández, I.** Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* 101, 601-606, (2007).
- 155 **D. O. Rías Baixas.** <<http://doriasbaixas.com/public/manager.php>> (04-2014).
- 156 **AEMET.** *Agencia estatal de meteorología*, <<http://www.aemet.es/es/portada>> (04-2014).
- 157 **Lee, J.;Rennaker, C.** Influence of extraction methodology on grape composition values. *Food Chem.* 126, 295-300, (2011).
- 158 **Hollecker, L.;Pinna, M.;Filippino, G.;Scrugli, S.;Pinna, B.;Argiolas, F.;Murru, M.** Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography–electron spray ionisation-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 3402-3408, (2009).
- 159 **Lee, J.-E.;Hwang, G.-S.;Van Den Berg, F.;Lee, C.-H.;Hong, Y.-S.** Evidence of vintage effects on grape wines using 1H NMR-based metabolomic study. *Anal. chim. acta* 648, 71-76, (2009).
- 160 **Alonso Borbalán, Á. M.;Zorro, L.;Guillén, D. A.;García Barroso, C.** Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography–mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *J. Chromatogr. A* 1012, 31-38, (2003).
- 161 **García-Ruiz, A.;Bartolomé, B.;Cueva, C.;Martín-Álvarez, P.;Moreno-Arribas, M.** Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *J. appl. microbiol.* 107, 1042-1053, (2009).
- 162 **Mildner-Szkudlarz, S.;Zawirska-Wojtasiak, R.;Gośliński, M.** Phenolic compounds from winemaking waste and its antioxidant activity towards oxidation of rapeseed oil. *Int. J Food Sci.Tech.* 45, 2272-2280, (2010).
- 163 **Orak, H. H.** Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae* 111, 235-241, (2007).
- 164 **Arnous, A.;Makris, D. P.;Kefalas, P.** Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5736-5742, (2001).

- 165 **Jayaprakasha, G. K.;Selvi, T.;Sakariah, K. K.** Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. In.* 36, 117-122, (2003).
- 166 **Van der Sluis, A. A.;Dekker, M.;van Boekel, M. A. J. S.** Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 3. Stability during Storage. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1073-1080, (2005).
- 167 **Murakami, M.;Yamaguchi, T.;Takamura, H.;Atoba, T.** Effects of Thermal Treatment on Radical-scavenging Activity of Single and Mixed Polyphenolic Compounds. *J. food sci.* 69, FCT7-FCT10, (2004).
- 168 **Inbar, Y.;Chen, Y.;Hadar, Y.** Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of solid wastes from wineries. *Soil Science* 152, 272-282, (1991).
- 169 **Berg, B.;McClagherty, C.** Plant litter. *Decomposition, humus formation, carbon sequestration.* Berlin, DE. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2003).
- 170 **Catapano, A. L.** Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 48, 39-44, (1997).
- 171 **Edwards, C. A.;Bohlen, P. J.** *Biology and ecology of earthworms.* Vol. 3 (Springer, 1996).
- 172 **Wu, L.;Ma, L.;Martinez, G.** Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *J. Environ. Qual.* 29, 424-429, (2000).
- 173 **Hirai, M. F.;Chamyasak, V.;Kubota, H.** Standard measurement for compost maturity. *BioCycle: J. waste recy.* 24, 54-56, (1983).
- 174 **He, X.-T.;Logan, T. J.;Traina, S. J.** Physical and chemical characteristics of selected US municipal solid waste composts. *J. Environ. Qual.* 24, 543-552, (1995).
- 175 **Lampír, L.** Varietal Differentiation of White Wines on the Basis of Phenolic Compounds profile. *Czech J. Food Sci* 31, 172-179, (2013).
- 176 **de Villiers, A.;Majek, P.;Lynen, F.;Crouch, A.;Lauer, H.;Sandra, P.** Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-coloured phenolic content. *Eur. Food Res. Technol.* 221, 520-528, (2005).
- 177 **Landrault, N.;Poucheret, P.;Ravel, P.;Gasc, F.;Cros, G. r.;Teissedre, P.-L.** Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3341-3348, (2001).
- 178 **Li, H.;Wang, X.;Li, Y.;Li, P.;Wang, H.** Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chem.* 112, 454-460, (2009).
- 179 **Lee, G.;Rossi, M. V.;Coichev, N.;Moya, H. D.** The reduction of Cu (II)/neocuproine complexes by some polyphenols: total polyphenols determination in wine samples. *Food Chem.* 126, 679-686, (2011).
- 180 **Pour N., M. S.;Jürgen K., H.;Schmitt, A.;Dieter P., C.;Dietrich, H.** Polyphenolic composition of German white wines and its use for the identification of cultivar *Mitteilungen Klosterneuburg* 57, 146-152, (2007).
- 181 **Dávalos, A.;Gómez-Cordovés, C.;Bartolomé, B.** Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 48-54, (2004).
- 182 **Darias-Martín, J.;Andrés-Lacueva, C.;Díaz-Romero, C.;Lamuela-Raventós, R.** Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 871-876, (2008).
- 183 **Kallithraka, S.;Salacha, M. I.;Tzourou, I.** Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* 113, 500-505, (2009).
- 184 **Makris, D. P.;Psarra, E.;Kallithraka, S.;Kefalas, P.** The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Res. In.* 36, 805-814, (2003).

- 185 **Paixão, N.;Perestrelo, R.;Marques, J. C.;Câmara, J. S.** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* 105, 204-214, (2007).
- 186 **Fernández-Pachón, M. S.;Villaño, D.;García-Parrilla, M. C.;Troncoso, A. M.** Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. chim. acta* 513, 113-118, (2004).
- 187 **Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.;Lage-Yusty, M. A.;López-Hernández, J.** HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Res. In.* 42, 1018-1022, (2009).
- 188 **Juega, M.;Costantini, A.;Bonello, F.;Cravero, M. C.;Martinez-Rodriguez, A. J.;Carrascosa, A. V.;Garcia-Moruno, E.** Effect of malolactic fermentation by *Pediococcus damnosus* on the composition and sensory profile of Albariño and Caiño white wines. *J. appl. microbiol.* 116, 586-595, (2014).
- 189 **Martínez Lapuente, L.** *study of phenolic composition, biogenic amines and sensory analysis in eight white and rose sparkling wines made from alternative grape varieties*, Universidad de La Rioja, (2011).
- 190 **Peyrat-Maillard, M.;Cuvelier, M.;Berset, C.** Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80, 1007-1012, (2003).
- 191 **Makris, D. P.;Kallithraka, S.;Mamalos, A.** Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta* 70, 1143-1152, (2006).
- 192 **Singleton, V.;Salgues, M.;Zaya, J.;Trousdale, E.** Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 50-56, (1985).
- 193 **Pérez-Zúñiga, F. J.;Abad, F. B.;González Cartagena, L.** Kinetics of non-enzymatic oxidation reactions: browning in white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 252-256, (2000).
- 194 **Danilewicz, J. C.** Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 73-85, (2003).
- 195 **Sioumis, N.;Kallithraka, S.;Makris, D. P.;Kefalas, P.** Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chem.* 94, 98-104, (2006).
- 196 **Li, H.;Guo, A.;Wang, H.** Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* 108, 1-13, (2008).
- 197 **D'Auria, M.;Emanuele, L.;Racioppi, R.** The effect of heat and light on the composition of some volatile compounds in wine. *Food Chem.* 117, 9-14, (2009).
- 198 **Benítez, P.;Castro, R.;Natera, R.;Barroso, C. G.** Changes in the polyphenolic and volatile content of "Fino" Sherry wine exposed to high temperature and ultraviolet and visible radiation. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 302-309, (2006).
- 199 **Roussis, I. G.;Lambropoulos, I.;Tzimas, P.** Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 274-278, (2007).
- 200 **Darias-Martín, J.;Martín-Luis, B.;Carrillo-López, M.;Lamuela-Raventós, R.;Díaz-Romero, C.;Boulton, R.** Effect of Caffeic Acid on the Color of Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2062-2067, (2002).
- 201 **Roussis, I. G.;Sergianitis, S.** Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour Frag. J.* 23, 35-39, (2008).
- 202 **Cilliers, J. J. L.;Singleton, V. L.** Nonenzymic Autoxidative Reactions of Caffeic Acid in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 84-86, (1990).

- 203 **Zafrilla, P.;Morillas, J.;Mulero, J.;Cayuela, J. M.;Martínez-Cachá, A.;Pardo, F.;López Nicolás, J. M.** Changes during Storage in Conventional and Ecological Wine: Phenolic Content and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4694-4700, (2003).
- 204 **Grimes, S. M.;Mehta, L. K.;Ngwang, H. C.** Photocatalytic degradation of trans-cinnamic, dihydrocinnamic, trans-caffeic, and dihydrocaffeic acids and characterization of the products. *J. Environ. Sci. Heal. A* 36, 599-612, (2001).
- 205 **Recamales, Á. F.;Sayago, A.;González-Miret, M. L.;Hernanz, D.** The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res. In.* 39, 220-229, (2006).

