

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y  
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Determinación de compuestos bioactivos en *magayas*  
mediante extracción asistida por ultrasonidos de potencia y  
HPLC.**



Amada Garitas Bullón  
Fecha de presentación, 20 de junio 2019

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y  
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

### **Determinación de compuestos bioactivos en *magayas* mediante extracción asistida por ultrasonidos de potencia y HPLC.**

Determination of bioactive compounds in apple pomace by ultrasound-assisted extraction (USA) and HPLC.

Amada Garitas Bullón

TUTOR/ES

Anna María Picinelli Lobo

Maria Jesús Fátima Cañal Villanueva

# ÍNDICE

Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
2. Planteamiento y Objetivos .....	5
3. Material y métodos.....	6
3.1 Muestras .....	6
3.2 Reactivos y disolventes.....	7
3.3 Métodos y equipos.....	7
3.3.1 Extracción de polifenoles y ácidos triterpénicos.....	7
3.3.2 Métodos analíticos.....	8
3.3.3 Análisis estadísticos.....	8
4. Resultados .....	8
4.1 Ensayos previos .....	8
4.2 Optimización de las condiciones de extracción asistida por ultrasonidos ...	9
4.3 Análisis de los ácidos triterpénicos en <i>magayas</i> .....	12
4.4 Análisis de polifenoles en <i>magayas</i> .....	14
5. Discusión.....	16
6. Conclusiones.....	19
Bibliografía.....	20

## Resumen

Actualmente, la industria de la manzana genera como principal sub-producto de la elaboración de zumos y bebidas fermentadas las *magayas*, restos del prensado formados por pulpa, piel y semillas. Este material posee un elevado contenido de polifenoles, junto con ácidos triterpénicos, ambos objeto de estudio. En el presente trabajo se ha optimizado un método de extracción asistida por Ultrasonidos de Potencia: relación soluto/disolvente (1/20), solvente de extracción (80% de etanol en agua), amplitud de ultrasonidos del 100% y tiempo de extracción de 15 minutos. El método optimizado se aplica para la evaluación de estos compuestos en 20 *magayas* monovarietales y 15 plurivarietales procedentes de la industria sidrera. Los perfiles de ácidos triterpénicos obtenidos, están constituidos por ácido ursólico como componente mayoritario, con niveles de concentración comprendidos entre 2,17 y 10,10 mg/g *magaya*. Con respecto a los polifenoles estudiados, los flavonoles representan entre el 50% y el 92% del total. La hiperina es el compuesto mayoritario, con un rango de concentración entre 0,12 y 0,67 mg/g *magaya*. El contenido en polifenoles totales oscila entre 1,98 y 6,39 mg/g *magaya*, todo ello confirma el potencial de la revalorización de las *magayas* mediante la recuperación de compuestos de alto valor, susceptibles de ser usados en alimentación, farmacia o cosmética.

Palabras clave: **Magaya, Ácidos Triterpénicos, Polifenoles y Ultrasonidos.**

## Summary

Nowadays, the apple-based industry generates huge amounts of apple pomace, the main by-product from the making of juices and ciders. This material is constituted by flesh, peel and seeds. Apple pomace contains highly-valued components like triterpenic acids and polyphenols, both of them being the subject of the present study. In this work, an extraction method assisted by ultrasound has been optimized. To do so, parameters such as the solute/solvent ratio (1/20), the extractant mixture (80% ethanol in water), the ultrasonic amplitude (100%) and the extraction time (15 min) were evaluated. The optimized method was subsequently applied to the analysis of triterpenic acids and polyphenols in 20 monovarietal and 15 multivarietal industrial cider apple pomaces. The profiles of triterpene acids are constituted by ursolic acid as a major component, with concentration between 2.17 and 10.10 mg/g *magaya*. Regarding the polyphenols studied, flavonols represent between 50% and 92% of the total. Hyperin is the majority compound, with a concentration range between 0.12 and 0.67 mg/g *magaya*. The total polyphenols content ranged between 1.98 and 6.39 mg/g apple pomace, thus confirming the potential of the use of apple pomace for recovering of high-valued compounds, susceptible to be employed in food, pharmacy and cosmetic industries.

Keywords: **Apple pomace, Triterpenic Acids, Polyphenols and Ultrasound.**

## 1. Introducción

La SIDRA es uno de los productos más reconocibles y emblemáticos de Asturias. En el último año se elaboraron alrededor de 34 millones de litros de sidra natural, lo que sitúa esta región en el primer lugar a nivel nacional (<https://www.asturias.es>). Cuenta además con una Denominación de Origen Protegida “Sidra de Asturias”, cuya implantación en el mercado aumenta progresivamente (<http://www.sidradeasturias.es>).

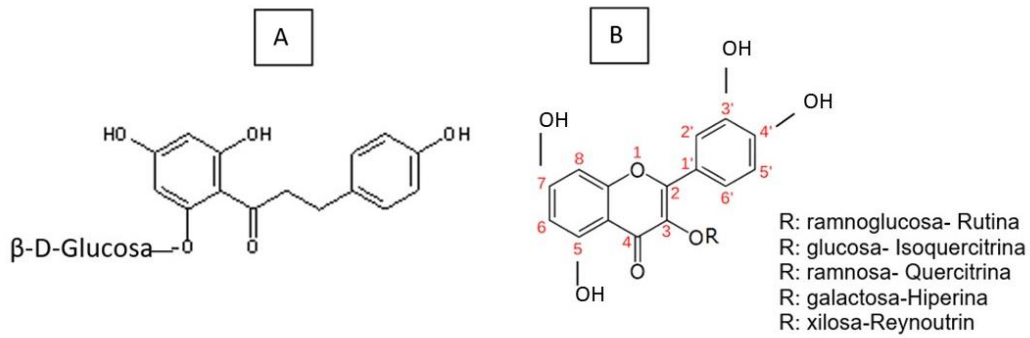
La industria de elaboración de sidra natural genera cada año entre 9 y 12.000 toneladas de *magayas*, esto es, restos del prensado de la manzana de sidra constituidos por pulpa, semillas, piel y pedúnculos (Vendruscolo et al., 2008).

En la actualidad la magaya se utiliza como alimento para el ganado, pero gran cantidad de este material es desechado, lo que supone una carga económica para el sector elaborador, y una carga ambiental. Se han publicado numerosos estudios evaluando múltiples posibilidades de aprovechamiento. Algunas de estas vías son: la industria farmacéutica (Mirabella et al., 2014), y alimentación y cosméticos (Lata et al., 2005; Sudha et al., 2007). Algunos trabajos realizados en Asturias describen la actividad antiviral de extractos de este sub-producto o el uso de la magaya en la elaboración de aguardientes (Rodríguez Madrera et al., 2013; Suárez Valles et al., 2010).

Las *magayas* contienen alrededor de un 70-85% de humedad lo que aumenta la probabilidad de deterioro de sus componentes químicos y afecta su estabilidad en el almacenaje (Lavelli & Corti, 2011). Aunque el tiempo de exposición al aire o el tratamiento posterior al prensado (p.e., secado) puedan afectar sus cualidades, otros aspectos como las variedades y las condiciones ambientales durante el crecimiento de la manzana, tienen una gran influencia (De Fátima-Sato et al., 2011). La *magaya* es una fuente de diferentes elementos de alto valor: fibra dietética, azúcares compuestos volátiles, triterpenoides, ácidos no volátiles y polifenoles (Schieber et al., 2001; Waldbauer et al., 2017).

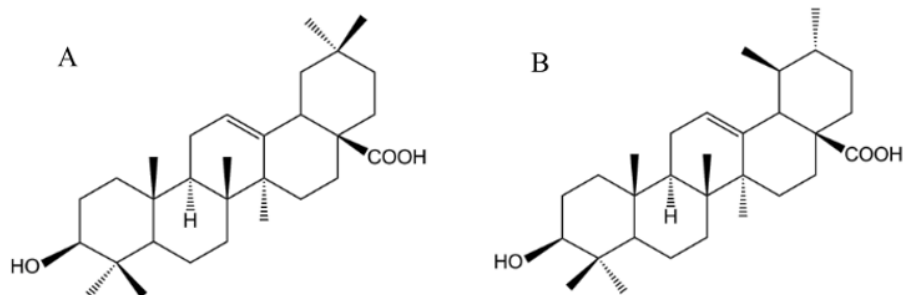
Los polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas, con un alto valor biológico. Durante el prensado de la manzana, parte de ellos pasa al mosto, pero una proporción importante queda retenida en la magaya, ya que la mayoría de estos compuestos se encuentra localizados en la piel, en profunda interacción con las paredes celulares (Sanoner et al., 1999). Entre los componentes identificados destacan flavanoles (catequina, epicatequina), procianidinas, ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, derivados del ácido *p*-cumárico), flavonoles (derivados de la quercetina), dihidrocalconas (floricina, floretín 2-xiloglucósido) y antocianinas (Ćetković et al., 2008; Diñeiro García et al., 2009; Vrhovsek et al., 2004). Algunos de estos compuestos, como la floricina, son considerados un buen marcador para la identificación de productos derivados de manzana. Otros, como las procianidinas, han sido reconocidas entre las mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante de las manzanas (Chinnici et al., 2004).

En la Figura 1 se muestran las estructuras químicas de algunos polifenoles.



**Figura 1:** Moléculas químicas de los polifenoles. A - Floricina. B - Flavonol.

Otros componentes bioactivos de gran importancia, y menos estudiados, son los ácidos triterpénicos, concretamente: el ácido ursólico (AU) y el ácido oleanólico (AO), mostrados en la Figura 2. El AO y su isómero, el AU se encuentran ampliamente distribuidos en el reino de las plantas y productos alimentarios derivados de ellas (Guinda et al., 2010). Ambos son compuestos importantes que forman parte de la cera presente en la cutícula que recubre el fruto o las hojas (Koch & Ensikat, 2008). Las ceras de la cutícula constituyen un buen recurso de triterpenos ya que juegan un papel en protección contra estrés biótico, ya sea contra la acción de herbívoros o patógenos (Poirier et al., 2018; Szakiel & Mroczek, 2007). La cantidad de ácido ursólico que pueden contener los vegetales puede variar en función de la estación del año, o del desarrollo del fruto (Pensec et al., 2014; Peragón, 2013).



**Figura 2:** (A) Ácido Oleanólico (B) Ácido Ursólico

La investigación sobre estos compuestos ha sido creciente en los últimos años debido a sus actividades relacionadas con la salud: su capacidad anti-inflamatoria, antitumoral, hepato-protectora, antibacteriana, anti-VIH, analgésica, gastroprotectora y propiedades asociadas con la prevención y cuidados paliativos de la diabetes, etc. (Cargnin & Gnoatto, 2017; López-Hortas et al., 2018) Incluso se relaciona el ácido ursólico con el rendimiento físico, puesto que estimula el crecimiento, muscular y reduce la grasa (Kunkel et al., 2011)

Para la extracción de estos compuestos bioactivos hay diferentes estrategias actualmente en uso (maceración, digestión, Soxhlet) caracterizadas, en general, por su laboriosidad y por el empleo de una elevada cantidad de disolventes.

El reto actual es el de obtener un rendimiento de extracción máximo en el menor tiempo posible, y para ello se han desarrollado técnicas alternativas a las anteriores que agrupan las cualidades deseadas de economía, eficacia y reproducibilidad (Tiwari, 2015). Entre ellas, la aplicación de Ultrasonidos de Alta Potencia (UAP) ha cobrado notoriedad en la extracción de compuestos de alto valor en todo tipo de matrices, tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial (Lavilla & Bendicho, 2017).

Los ultrasonidos son una forma de energía asociada al sonido a frecuencias que están por encima del umbral detectado por el oído humano, entre 16-20 kHz y 1MHz. El rango de energía que tiene interés desde el punto de vista de la extracción de componentes es el de baja frecuencia, denominado Ultrasonidos de Alta Potencia (16 – 100kHz). Cuando un líquido se somete a ultrasonidos tiene lugar en el medio una presión acústica,  $P_a$ , que responde a una ecuación del tipo:

$$P_a = P_A \text{sen}(2 \cdot \pi \cdot f \cdot t) \quad (1)$$

$P_A$  es la máxima amplitud de la onda;  $f$  su frecuencia y  $t$ , el tiempo.

La efectividad de esta técnica es debida al fenómeno conocido como *cavitación*, que consiste en la formación de microburbujas de vapor, su crecimiento e implosión durante la propagación de la onda de ultrasonidos en el medio líquido. Esto origina en el entorno de dichas burbujas una condiciones extremas similares a haber alcanzado los 5000°C y 2000 atm (Flannigan & Suslick, 2005). Estos pequeños colapsos dan lugar la disrupción de las paredes celulares, permitiendo así la penetración del disolvente y la transferencia de masa. La cavitación está relacionada con las características de los ultrasonidos aplicados y del medio líquido (Lavilla & Bendicho, 2017). Entre sus principales ventajas destacan el incremento del rendimiento de extracción y la posibilidad de usar disolventes menos dañinos para el medio ambiente (Tiwari, 2015).

Las aplicaciones de la técnica de ultrasonidos son numerosas y diversas. Cabe citar algunas relacionadas con la recuperación de componentes bioactivos de subproductos vegetales, por ejemplo, polifenoles (Pingret et al., 2012; Virost et al., 2010); ácidos triterpénicos (Fan et al., 2016; Woźniak et al., 2018), y pectinas (Minjares-Fuentes et al., 2014).

## 2. Planteamiento y Objetivos

La magaya es un sub-producto de la industria sidrera que es preciso aprovechar, no solo por motivos medioambientales sino también económicos. Este material contiene una gran diversidad de componentes de alto valor nutricional, farmacéutico y cosmético, por lo que una posible estrategia consiste en extraer dichos compuestos de una forma eficiente y reproducible.

Por ello, el Objetivo de este Trabajo es optimizar una técnica de extracción asistida por Ultrasonidos de Potencia para evaluar el potencial de las magayas para la recuperación de ácidos triterpénicos y polifenoles de bajo peso molecular, en concreto, flavonoles y dihidrocalconas, para su análisis por HPLC.

Para ello, se estudian las condiciones de extracción (potencia y tiempo) y el método optimizado se aplica en el análisis de 20 muestras monovarietales (variedades de manzana de sidra de diferentes grupos tecnológicos) y 15 industriales obtenidas de mezclas plurivarietales con distintos sistemas de prensado utilizados en Asturias.

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Muestras

Se analizaron 35 *magayas*, 20 de tipo monovarietal y 15 de procedencia industrial, cuyas características se resumen en las Tablas 1A y 1B. Estas fueron secadas a 60°C durante 48 horas, molidas y tamizadas a un tamaño de partícula 0,5mm, y mantenidas al vacío en desecador hasta su análisis.

**Tabla 1A.** Magayas de manzanas pertenecientes a la DOP Sidra de Asturias.

Nomenclatura de trabajo	Variedades	Grupo tecnológico
M1	Ernestina	Dulce-Amarga
M2	Meana	Amargo-Ácida
M3	Solarina	Semiácida
M4	Regona	Ácido-amarga
M5	Verdialona	Dulce
M6	Perezosa	Semiácida
M7	Durona de Tresali	Ácido-amarga
M8	Fuentes	Muy ácida
M9	Prieta	Ácida
M10	Perico	Semiácida
M11	Coloradona	Dulce-amarga
M12	Xuanina	Ácida
M13	De la Riega	Semiácida
M14	Blanquina	Ácida
M15	San Roqueña	Ácida
M16	Teórica	Muy ácida
M17	Panquerina	Semiácida
M18	Clara	Amarga
M19	Raxao	ácida
M20	Collaos	Semiácida

Dapena de la Fuente & Blázquez Noguero (2009)

La prensa tradicional, es una prensa hidráulica de cajón en la que tiempo de prensado es prolongado (2-4 días) y la fuerza se aplica de manera vertical. En la prensa neumática la presión se ejerce a través de una membrana interna, la cual comprime la manzana contra las paredes de la prensa. Por último, la prensa horizontal de pistón



tipo Bucher-Guyer está formada por un cilindro en el que están dispuestas una serie de varillas flexibles, recubiertas de una fibra sintética a través de las cuales pasa el mosto de manzana, con un nivel discreto de sólidos en suspensión.

**Tabla 1B.** Magayas procedentes de la industria sidrera asturiana

Nomenclatura de Trabajo	Prensa	Procedencia de la manzana	Tiempo de prensado
I1	N	Francesa	8h
I2	N	Francesa	8h
I3	N	Francesa	8h
I4	N	Asturiana	8h
I5	N	Asturiana	8h
I6	T	Gallega	24h
I7	T	Gallega	48h
I8	T	Gallega	24h
I9	T	Asturiana	48h
I10	T	Asturiana	24h
I11	N	Asturiana	8h
I12	PH	Asturiana	1,5h <sup>1</sup>
I13	PH	Asturiana	1,5h
I14	PH	Asturiana	1,5h <sup>2</sup>
I15	PH	Asturiana	1,5h

T: tradicional; N: neumática; PH: prensa horizontal del pistón, tipo Bucher-Guyer (1): tratamiento enzimático después del prensado; (2): maceración previa (Total del tratamiento 24h).

### 3.2 Reactivos y disolventes

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania), carbonato sódico, ácido acético, metanol y etanol de calidad cromatográfica (Panreac, Barcelona, España). Los patrones de ácido gálico, floridina, flavonoles (rutina, avicularina y quercitrin) y los ácidos triterpénicos ursólico (AU) y oleanólico (AO) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (S. Louis, MO, USA). Los patrones de avicularina e isoquercitrin fueron suministrados por Extrasynthèse (Genay, Francia).

### 3.3 Métodos y equipos

#### 3.3.1 Extracción de polifenoles y ácidos triterpénicos

Se utilizó un equipo de ultrasonidos (UP200Ht 200W, 26kHz de Hielshcher Ultrasound Power, REM, Asturias, España) provisto de una sonda de 2mm. Las muestras de magaya (1,0 g) se sometieron a extracción en tubos de centrifuga con 20mL de una mezcla de etanol/agua (80/20), a 30°C durante 15 minutos, aplicando una potencia de 200W (Amplitud del 100%). Se centrifuga (10min, 10°C, 17.000G) y el sobrenadante se filtra (PVDF 0,45µm, Teknokroma, Barcelona, España) para su análisis.

### 3.3.2 Métodos analíticos

#### Cromatográficos

El equipo cromatográfico está integrado por una bomba de baja presión (Waters 600), un inyector automático (Waters 717 plus), un detector de fotodiodos (Waters 2996) y un sistema Empower v.3.0 para el control de las condiciones de análisis y la recogida de datos. La separación, tanto de polifenoles como ácidos triterpénicos, se realizó inyectando 10 µL en una columna de fase inversa C<sub>18</sub> Nucleosil C120 (250 x 4,6mm; 3µm, Marcherey-Nagel, Panreac, Barcelona) a 30°C, utilizando como fase móvil mezclas de ácido acético al 2% y metanol, de acuerdo con las condiciones que se citan a continuación:

a) Ácidos triterpénicos:

Régimen de elución isocrático (0.80 mL/min) con Metanol/Ácido acético (90/10). Longitud de onda de detección: 210 nm.

b) Polifenoles:

Régimen de elución en gradiente, de acuerdo con lo establecido por Diñeiro García et al. (2009). Longitudes de onda de detección: 280 nm para las dihidrocalconas (floricina y floretilin 2-xiloglucósido) y 350 nm para los flavonoles (rutina, isoquercitrina, avicularina, hiperina, quercitrin).

En ambos casos, la cuantificación se realizó a partir de calibraciones externas, inyectando por duplicado disoluciones patrón con concentraciones conocidas de cada compuesto. Se emplearon como estándares: floricina para las dihidrocalconas, quercitrin para los flavonoles; oleanólico y ursólico. Los ácidos triterpénicos T1-T6 se cuantifican usando como patrón el ácido ursólico.

#### Espectrofotométricos

Los Polifenoles Totales (PT) se determinaron por espectrofotometría de acuerdo con el método de Folin (Métodos Oficiales de Análisis, 1998). Se empleó un Perkin-Elmer Lambda 35 utilizando celdas desechables de 1 cm de paso óptico. La reacción se desarrolló directamente en las celdillas, añadiendo los reactivos en este orden:

Un volumen de muestra de 0,030 ml, 2,37ml del reactivo Folin previamente diluido en agua al 6,5% y por último 0,60 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. La lectura se efectúa a 750 nm, y los resultados se expresan en mg ácido gálico/g de *magaya* seca.

### 3.3.3 Análisis estadísticos

El paquete estadístico SPSS v.12 para Windows se utilizó para ejecutar los análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los factores experimentales (relaciones soluto/disolvente, proporción de etanol, tiempo y potencia de ultrasonidos) sobre las concentraciones de polifenoles y ácidos triterpénicos. Se aplica también un test de Tukey de diferenciación de medias, tomando como nivel de significación  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Ensayos previos

Se realiza una serie de experimentos con el fin de determinar la relación óptima entre sólido y disolvente, y la mezcla de extracción. En todos los casos, las extracciones se efectúan por triplicado en vasos de precipitados, agitando a 500 rpm durante 24 horas.

En el primer ensayo se compara el efecto de la relación soluto/disolvente sobre la concentración de polifenoles totales (mg gálico/g magaya). Se eligen tres valores de la relación: 1/5, 1/10 y 1/20. Se observa que la relación 1/20 proporciona concentraciones de polifenoles totales significativamente superiores ( $p < 0,05$ ), por ende, se elige ésta para las pruebas posteriores.

En el siguiente ensayo se determina el efecto de la proporción de etanol sobre la extracción de los compuestos triterpénicos. Se evalúan tres disolventes con diferentes porcentajes de etanol: 80%, 90% y 100%.

Se analizan por HPLC en estos extractos seis compuestos no identificados (T1-T6) y los ácidos oleanólico y ursólico. Los resultados (mg compuestos /g magaya) indican que no hay diferencias significativas en las concentraciones extraídas debidas a este factor, y que son: T1, 0,75; T2: 0,45; T3, 1,78; T4, 1,18; T5, 0,42; T6, 0,33; AO, 0,24 y AU, 2,16.

Por ello se elige la mezcla de extracción con el menor porcentaje de etanol.

#### **4.2 Optimización de las condiciones de extracción asistida por ultrasonidos**

El tercer ensayo tiene por objetivo determinar qué condiciones de tiempo y potencia de ultrasonidos son adecuadas para lograr la mayor extracción en el menor tiempo posible.

Para ello, se evalúan tres valores de potencia aplicada, modificando la amplitud de la onda (25%, 50%, 100%) de acuerdo con la ecuación (1). En cada caso, se extraen por duplicado a 5, 10, 15 y 30 minutos y se analizan por HPLC los ácidos triterpénicos y los polifenoles. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Los valores de mg de ácido triterpénico/g de magaya evaluados mediante el análisis de la varianza muestra que existen diferencias estadísticamente significativas para la amplitud, tiempo y la interacción entre ambas ( $p = 0,001$ ). En la Tabla 2 se observan dos hechos: primero, que a mayor potencia, mayor extracción en todos los casos, a excepción del compuesto T5 y el ácido oleanólico. Segundo, que a la máxima potencia aplicada no hay, en general, incrementos significativos de la concentración de compuestos extraída a partir de los 15 minutos.

En relación al efecto de las condiciones de trabajo sobre los perfiles fenólicos, se han identificado seis flavonoles (hiperina, rutina + isoquercitrin, reynoutrin, avicularina y quercitrin) y dos dihidrocalconas (floretilin 2-xiloglucósido - F-2XG - y floricina). Los resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas tan solo para la amplitud ( $p = 0,000$ ). Como se muestra en la Tabla 3, la tendencia general es similar a la observada en el caso de los ácidos triterpénicos, es decir, a mayor potencia, mayor concentración extraída.

En consecuencia, se decide seleccionar como condiciones de extracción una amplitud del 100% y 15 minutos de exposición, porque éstas resultan adecuadas para prácticamente la totalidad de los componentes objeto de estudio.

**Tabla 2.** Efecto de la amplitud de ultrasonidos y el tiempo sobre la extracción de compuestos triterpénicos (media  $\pm$  desviación estándar). Datos en mg/g magaya

Componentes	Amplitud	Sig. Tiempo	Sig. Amplitud	Sig. Interacción	Tukey	5min.	10min.	15min	30min
<b>T1</b>	25				a	0,95 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,01
	50	**	*	*	b	1,01 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,04
	100				b	0,99 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,10
<b>Tukey</b>						a	ab	ab	b
<b>T2</b>	25				a	0,74 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,04
	50	***	**	NS	b	0,84 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,03
	100				c	0,87 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02
<b>Tukey</b>						a	a	b	b
<b>T3</b>	25				a	3,68 $\pm$ 0,16	3,66 $\pm$ 0,19	4,10 $\pm$ 0,06	4,09 $\pm$ 0,07
	50	***	***	***	b	4,02 $\pm$ 0,08	4,22 $\pm$ 0,18	4,22 $\pm$ 0,09	4,48 $\pm$ 0,04
	100				c	4,35 $\pm$ 0,06	4,45 $\pm$ 0,07	4,56 $\pm$ 0,09	4,47 $\pm$ 0,09
<b>Tukey</b>						a	b	c	c
<b>T4</b>	25				a	1,92 $\pm$ 0,11	1,97 $\pm$ 0,09	2,28 $\pm$ 0,18	2,40 $\pm$ 0,02
	50	***	***	***	b	2,19 $\pm$ 0,02	2,47 $\pm$ 0,11	2,48 $\pm$ 0,09	2,76 $\pm$ 0,03
	100				c	2,76 $\pm$ 0,06	2,82 $\pm$ 0,07	2,95 $\pm$ 0,05	2,88 $\pm$ 0,05
<b>Tukey</b>						a	b	c	d
<b>T5</b>	25				a	0,64 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02
	50	**	NS	NS	a	0,72 $\pm$ 0,10	0,64 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,03
	100				a	0,65 $\pm$ 0,11	0,49 $\pm$ 0,21	0,63 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,24
<b>Tukey</b>						a	a	a	a
<b>T6</b>	25				a	0,42 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02
	50	**	*	NS	a	0,40 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,02
	100				b	0,44 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,56	0,84 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,52
<b>Tukey</b>						a	b	b	b
<b>AO</b>	25				a	0,64 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,03
	50	***	***	***	c	0,99 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,05
	100				b	0,99 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,06
<b>Tukey</b>						a	b	c	d
<b>AU</b>	25				a	2,81 $\pm$ 0,16	3,09 $\pm$ 0,23	3,89 $\pm$ 0,31	4,11 $\pm$ 0,06
	50	***	***	***	b	3,44 $\pm$ 0,05	4,18 $\pm$ 0,26	4,24 $\pm$ 0,21	5,00 $\pm$ 0,07
	100				c	5,03 $\pm$ 0,06	5,14 $\pm$ 0,13	5,38 $\pm$ 0,14	5,26 $\pm$ 0,18
<b>Tukey</b>						a	b	c	d

Valores con distinta letra en la misma fila o columna indican, respectivamente, diferencias significativas para el tiempo y la amplitud (test de Tukey,  $p < 0,05$ ). (\*\*\*) Sig.  $p < 0,01$ ; (\*\*) Sig.  $p < 0,05$ ; (\*)  $p < 0,10$ ; NS: no significativo.

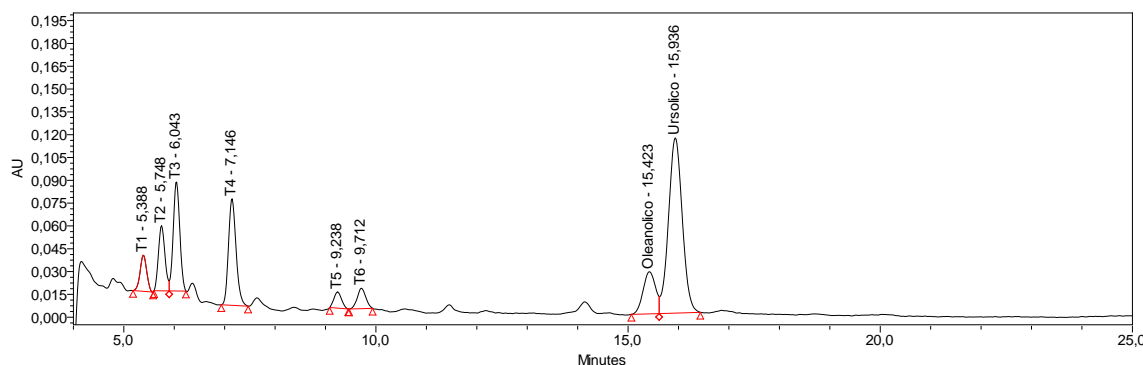
**Tabla 3.** Efecto de la amplitud de ultrasonidos y el tiempo sobre la extracción de polifenoles (media  $\pm$  desviación estándar). Datos en mg/g *magaya*.

Componentes	Amplitud	Sig. Tiempo	Sig. Amplitud	Sig. Interacción	Tukey	5min.	10min.	15min	30min
	25				a	0,27 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01
<b>Hiperina</b>	50	NS	**	NS	b	0,28 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,28	0,28 $\pm$ 0,01
	100				a	0,27 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01
	25				a	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01
<b>Rutina + Isoquercitrin</b>	50	NS	**	NS	a	0,16 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01
	100				a	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01
	25				a	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
<b>Reynoutrin</b>	50	NS	NS	NS	a	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
	100				a	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
	25				a	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01
<b>Avicularina</b>	50	NS	NS	NS	a	0,22 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01
	100				a	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,10
	25				a	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01
<b>Quercitin</b>	50	NS	NS	NS	a	0,20 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01
	100				a	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,10
	25				a	0,25 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01
<b>Floricina</b>	50	NS	***	NS	b	0,26 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01
	100				c	0,28 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,10
	25				b	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
<b>F-2XG</b>	50	NS	***	NS	a	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
	100				b	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,10

Valores con distinta letra en la misma columna indican diferencias significativas para la amplitud (test de Tukey,  $p < 0,05$ ). (\*\*\*) Sig.  $p < 0,01$ ; (\*\*) Sig.  $p < 0,05$ ; (\*)  $p < 0,10$ ; NS: no significativo.

### 4.3 Análisis de los ácidos triterpénicos en *magayas*

En la Figura 3 se muestra un cromatograma de ácidos triterpénicos en un extracto de *magaya*. Fueron identificados por inyección de los patrones correspondientes los ácidos oleanólico y ursólico, y se cuantificaron otros 6 componentes desconocidos, (T1-T6) tomando el ursólico como estándar.



**Figura 3:** Cromatograma ( $\lambda$ : 210nm) de ácidos triterpénicos de un extracto de *magaya*.

En las Tablas 4 y 5 se muestran los valores de concentración de ácidos triterpénicos en *magayas* monovarietales e industriales respectivamente.

En general, el ácido ursólico, presente en las *magayas* en un rango de concentración comprendido entre 0,91 y 10,11 mg/g, es el compuesto mayoritario. Le siguen en orden de importancia los ácidos triterpénicos T3 y T4.

Las muestras procedentes de la industria presentan contenidos significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) de T1, T2, T4 y T6, mientras que las muestras monovarietales contienen mayores niveles de T3. En el resto de los ácidos analizados no se observan diferencias significativas entre ambas categorías.

- *Magayas* monovarietales

La suma de los ácidos triterpénicos analizados en esta categoría de muestras varía entre 6,61 (M12) y 13,91 (M13) mg/g. El ácido ursólico es el compuesto mayoritario en todas las *magayas*, a excepción de la muestra 6, en la que predominan los ácidos T3 y T4. Estos tres componentes representan en conjunto entre el 63% y el 95% de los ácidos presentes. Por el contrario, otros ácidos como T1, T2, T5 y T6 no se detectan en gran parte de las *magayas*.

**Tabla 4.** Valores de concentración de triterpenos en magayas monovarietales (mg/g).

	Ref Tabla1A	T1	T2	T3	T4	T5	T6	AO	AU	Suma
<b>Amargo-Dulce</b>	<b>M1</b>	nd	1,57	0,59	0,70	0,40	0,60	0,33	3,43	7,62
	<b>M2</b>	nd	nd	3,27	1,57	0,12	0,15	0,49	4,20	9,80
	<b>M4</b>	0,62	0,30	1,64	1,25	0,43	0,50	0,49	4,29	9,52
	<b>M5</b>	nd	nd	2,88	2,00	0,58	0,65	0,66	4,28	11,05
	<b>M7</b>	0,67	0,31	3,56	2,04	0,55	nd	0,90	4,80	12,83
	<b>M11</b>	0,58	nd	2,74	0,99	0,52	nd	0,60	4,88	10,31
	<b>M18</b>	nd	nd	2,83	2,27	0,09	nd	1,03	6,13	12,35
<b>Semiácidas</b>	<b>M3</b>	0,27	0,65	0,52	1,20	nd	0,43	0,50	4,60	8,17
	<b>M6</b>	0,48	0,06	3,51	3,37	0,57	nd	0,47	2,17	10,63
	<b>M10</b>	nd	nd	2,78	2,27	nd	nd	0,92	4,67	10,64
	<b>M13</b>	nd	nd	4,00	2,16	0,69	nd	1,27	5,80	13,92
	<b>M17</b>	Nd	nd	1,83	2,47	nd	nd	1,04	5,70	11,04
	<b>M20</b>	0,04	nd	1,57	1,45	0,33	0,35	0,35	3,17	7,26
<b>Ácidas-Muy ácidas</b>	<b>M8</b>	nd	1,54	1,05	2,49	nd	nd	0,94	5,11	11,13
	<b>M9</b>	nd	0,04	2,44	1,59	nd	nd	0,41	2,35	6,83
	<b>M12</b>	nd	nd	2,17	0,58	nd	nd	0,35	3,51	6,61
	<b>M14</b>	nd	nd	2,09	2,17	0,41	0,38	0,51	3,66	9,22
	<b>M15</b>	nd	2,20	0,46	1,26	0,55	0,57	1,11	5,98	12,13
	<b>M16</b>	0,46	nd	3,12	1,54	nd	nd	0,36	3,41	8,89
	<b>M19</b>	nd	nd	2,66	1,24	nd	nd	0,98	6,46	11,34

nd: no detectado.

- Magayas industriales

En la categoría de magayas industriales, la suma de compuestos triterpénicos varía entre 5,21 mg/g en la muestra I6, y los 22,52 mg/g de la referencia I12. Análogamente lo descrito en el apartado anterior, el ácido ursólico es el componente mayoritario en todas las muestras, a excepción de las magayas I2, en la que predomina el ácido T4, y en las referencias I6, I7, en las que los compuestos T3, T4 y ursólico están en concentraciones similares.

Entre las magayas industriales, a diferencia de lo observado entre las monovarietales, solo los compuestos T5 y T6 están ausentes en algunas de las muestras (I2, I5, I10)

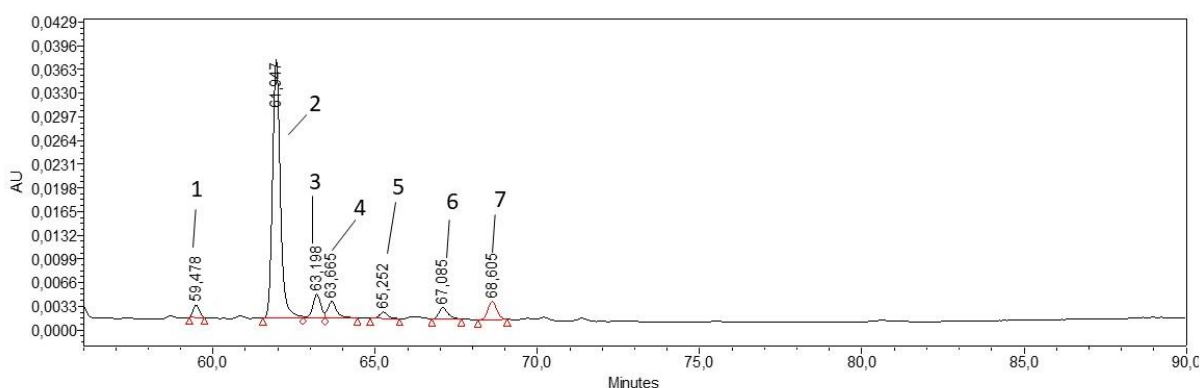
**Tabla 5** Valores de concentración de triterpenos en magayas industriales (mg/g).

	Ref. Tabla1B	T1	T2	T3	T4	T5	T6	AO	AU	Suma
<b>Neumáticas</b>	<b>I1</b>	0,71	0,73	0,95	4,30	0,48	0,60	1,06	6,07	14,9
	<b>I2</b>	0,88	0,87	1,08	5,23	nd	nd	0,04	1,36	9,46
	<b>I3</b>	0,89	1,00	1,08	5,76	0,64	0,42	0,96	5,81	16,56
	<b>I4</b>	0,35	0,34	0,63	3,51	0,35	0,30	0,64	4,66	10,78
	<b>I5</b>	0,37	0,32	0,54	3,14	nd	nd	nd	4,42	8,79
	<b>I11</b>	1,26	0,75	4,57	2,98	0,61	0,43	0,90	5,35	16,85
<b>Tradicionales</b>	<b>I6</b>	0,68	0,60	1,11	1,15	0,22	0,27	0,21	0,97	5,21
	<b>I7</b>	0,74	0,72	1,40	1,36	0,18	0,18	0,28	0,91	5,77
	<b>I8</b>	0,55	0,63	1,31	1,33	0,38	0,41	0,54	3,87	9,02
	<b>I9</b>	0,80	0,71	2,62	2,76	0,61	0,54	1,17	5,70	14,91
	<b>I10</b>	0,48	0,71	1,82	1,78	nd	nd	0,60	3,80	9,19
<b>Pistón Horizontal</b>	<b>I12</b>	1,05	1,69	2,91	3,40	0,68	0,86	1,83	10,10	22,52
	<b>I13</b>	2,05	0,89	3,19	2,69	0,56	0,44	0,95	5,21	15,98
	<b>I14</b>	0,56	0,63	1,23	2,12	0,39	0,41	1,18	6,74	13,26
	<b>I15</b>	0,66	0,66	1,74	2,13	0,42	0,37	1,10	6,57	13,65

nd: no detectado.

#### 4.4 Análisis de polifenoles en magayas

En la figura 4 se muestra el cromatograma de los compuestos fenólicos analizados en este estudio. Son 6 flavonoles (hiperina, rutina+isoquercitrin, reynoutrin, avicularina y quercitrin) y dos dihidrocalconas: la foricina y el floretin 2-xiloglucósido (F-2XG).



**Figura 4:** Cromatograma de polifenoles ( $\lambda=280$  nm) de un extracto de magaya. (1) Floretin2-Xiloglucósido (2) Floricina (3) Hiperina, (4) Rutina+Isoquercitrin (5) Reynoutrin, (6) Avicularina (7) Quercitrin.

En las tablas 6 y 7 se recogen los valores de concentración de polifenoles en magayas, monovarietales e industriales respectivamente. Los valores de polifenoles totales determinados por el método de Folin varían en el conjunto de magayas analizadas entre 1,36 y 6,39 mg/g. Entre los compuestos fenólicos analizados por



HPLC, los flavonoles representan entre el 50% y el 92% del total, siendo la hiperina el compuesto mayoritario. El análisis de varianza indica la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos categorías de magayas en relación a la concentración de polifenoles totales (mayor en monovarietales, con un promedio de 3,77mg/g), quercitrin (mayor en industriales, con un promedio de 0,21 mg/g) y floricina (mayor en monovarietales, con un promedio de 0,34 mg/g).

- Magayas monovarietales

La concentración de polifenoles totales varía en este conjunto de muestras entre 2,43 mg/g de la variedad Perezosa (M6) y 6,39 mg/g de la variedad Coloradona (M11). Como ya se indicó previamente, la Hiperina es el compuesto mayoritario, con rangos de concentración entre 0,12 y 0,67 mg/g, seguida por la floricina, que varía entre 0,15-0,69 mg/g (Tabla 6).

**Tabla 6.** Valores de concentración de polifenoles en muestras monovarietales. Datos en mg/g de *magaya*.

	Ref Tabla 1A	Hiperina	Rutina + Isoquercitrin	Reynoutrin	Avicularina	Quercitrin	Floricina	F-2X6	PT	suma
<b>Carácter amargo</b>	<b>M1</b>	0,28	0,14	0,10	0,21	0,14	0,15	nd	2,67	3,69
	<b>M2</b>	0,24	0,11	0,09	0,12	0,13	0,32	0,12	3,08	4,21
	<b>M4</b>	0,22	0,11	0,12	0,19	0,15	0,69	0,08	4,74	6,30
	<b>M5</b>	0,33	0,16	0,11	0,19	0,15	0,25	0,11	3,11	4,41
	<b>M7</b>	0,23	0,19	0,13	0,22	0,14	0,37	0,14	3,75	5,17
	<b>M11</b>	0,18	0,11	0,16	0,26	0,15	0,46	0,13	6,39	7,84
	<b>M18</b>	0,27	0,18	0,15	0,28	0,13	0,50	0,06	4,66	6,23
<b>Semiácidas</b>	<b>M3</b>	0,25	0,16	0,13	0,07	0,20	0,30	0,12	3,45	4,68
	<b>M6</b>	0,16	0,13	0,09	0,12	0,12	0,22	0,11	2,43	3,38
	<b>M10</b>	0,21	0,12	0,11	0,18	0,22	0,60	0,14	3,62	5,2
	<b>M13</b>	0,31	0,16	0,11	0,14	0,14	0,21	nd	3,08	4,15
	<b>M17</b>	0,28	0,12	0,13	0,19	0,21	0,45	0,13	3,98	5,49
	<b>M20</b>	0,12	0,25	0,12	0,15	0,16	0,22	0,12	3,34	4,48
<b>Ácidas-Muy ácidas</b>	<b>M8</b>	0,66	0,50	0,21	0,28	0,40	0,19	nd	4,26	6,5
	<b>M9</b>	0,37	0,27	0,12	0,13	0,22	0,24	0,05	2,97	4,37
	<b>M12</b>	0,57	0,20	0,18	0,30	0,13	0,41	0,20	4,65	6,64
	<b>M14</b>	0,17	0,13	0,09	0,12	0,15	0,53	0,12	3,01	4,32
	<b>M15</b>	0,67	0,35	0,15	0,21	0,27	0,21	0,11	4,23	6,2
	<b>M16</b>	0,49	0,29	0,18	0,24	0,20	0,16	nd	3,76	5,32
	<b>M19</b>	0,20	0,31	0,14	0,19	0,22	0,40	0,05	4,76	6,27

PT: polifenoles totales (mg gálico/g). nd: no detectado.

- Magayas industriales

En esta categoría, la concentración de polifenoles totales varía entre 1,36 mg/g de la magaya I7, y 5,25 de la referencia I1. La hiperina es también, en esta categoría, el compuesto mayoritario, variando su contenido entre 0,14 y 0,42 mg/g,

correspondientes a las muestras I12 e I15, ambas procedentes de una prensa de pistón horizontal (Tabla 7).

**Tabla 7.** Valores de concentración de polifenoles en muestras industriales. Datos en mg/g de *magaya*.

	RefM	Hiperina	Rutina + Isoquercitrin	Reynoutrin	Avicularina	Quercitrin	Floricina	F-2X6	PT	Suma
Neumáticas	I1	0,24	0,10	0,12	0,22	0,30	0,33	0,11	5,25	6,67
	I2	0,24	0,09	0,12	0,23	0,28	0,26	nd	3,81	5,03
	I3	0,17	0,18	0,12	0,23	0,29	0,39	nd	3,47	4,85
	I4	0,39	0,23	0,16	0,18	0,21	0,34	0,14	3,59	5,24
	I5	0,31	0,20	0,15	0,25	0,23	0,37	0,12	4,70	6,33
	I11	0,30	0,17	0,14	0,24	0,21	0,30	nd	2,94	4,3
Tradicionales	I6	0,25	0,17	0,10	0,18	0,15	0,20	0,12	3,89	5,06
	I7	0,27	0,19	0,15	0,24	0,19	0,18	0,11	1,36	2,69
	I8	0,26	0,19	0,13	0,19	0,18	0,22	0,12	3,28	4,57
	I9	0,28	0,18	0,15	0,25	0,22	0,17	0,12	2,67	4,04
	I10	0,20	0,14	0,11	0,16	0,16	0,20	0,12	2,85	3,94
Pistón Horizontal	I12	0,14	0,09	0,09	0,07	0,14	0,17	nd	1,98	2,68
	I13	0,34	0,21	0,16	0,26	0,22	0,30	0,12	3,99	5,6
	I14	0,26	0,14	0,13	0,21	0,18	0,29	0,12	2,56	3,89
	I15	0,42	0,24	0,18	0,32	0,26	0,37	0,13	3,33	5,25

PT: polifenoles totales (mg gálico/g). nd: no detectado.

## 5. Discusión

- Optimización de las condiciones de extracción de ácidos triterpénicos y polifenoles

En este trabajo se ha planteado la optimización de un método de extracción asistida por ultrasonidos de potencia para la recuperación simultánea de ácidos triterpénicos y polifenoles en magayas, uno de los principales subproductos de la industria sidrera.

En primer lugar, dada la distinta naturaleza de los compuestos de interés se procedió a optimizar la mezcla de extracción. En cuanto a la extracción de polifenoles en magayas, se han propuesto mezclas de etanol/agua entre 30-50% (Virot et al., 2010; Wang et al., 2018), o incluso solo agua, una posibilidad muy atractiva desde el punto de vista industrial (Pingret et al., 2012).

En el caso de los triterpenos, dada su insolubilidad en agua, los disolventes más utilizados en muestras de manzana y magayas son metanol, etanol, acetato de etilo y mezclas de metanol/agua al 80% (Bars-Cortina et al., 2018; Fan et al., 2016; Cargin

& Gnoatto, 2017). Por esta razón se decide utilizar una proporción mínima de etanol, un disolvente considerado como “verde”, en agua (80%).

La eficacia de la extracción asistida por ultrasonidos se basa en su capacidad para fragmentar y erosionar los tejidos vegetales, facilitando la entrada de disolvente y la transferencia de masa (Chemat et al., 2011; Lavilla & Bendicho, 2017; Tiwari, 2015). En nuestro estudio, la aplicación de ultrasonidos durante 15 minutos da lugar a incrementos en la extracción de hasta el 140% en el caso del ácido ursólico en comparación con los ensayos previstos realizados con la agitación durante 24 horas.

Entre las variables a optimizar en la extracción asistida por ultrasonidos están la potencia aplicada, el tiempo de exposición a esta energía y la temperatura. De acuerdo con la ecuación (1), la potencia se modula variando la amplitud de la onda ultrasónica. En nuestro estudio solo se han estudiado potencia/amplitud y tiempo de extracción, manteniendo la temperatura constante a 30 °C. Los resultados indican que a partir de los 15 minutos de exposición no hay incrementos notables de la concentración extraída para la mayoría de los compuestos, tanto ácidos triterpénicos como polifenoles (Tablas 2 y 3). En esta misma línea, Wang et al. (2018) evalúan distintos porcentajes de etanol y tiempos de exposición de la magaya a ultrasonidos (5-30 minutos), obteniendo un nivel de saturación de la extracción de polifenoles totales y catequina a los 30 minutos. Virot et al. (2010) observan que las condiciones de extracción influyen en el tipo específico de polifenoles extraídos a partir de la magaya, partiendo en su caso de un material no molido. Entre los valores ensayados en este estudio obtienen que la extracción de flavonoles fue máxima a mayor temperatura (40°C) y tiempo de exposición (55 minutos).

- Perfiles de ácidos triterpénicos de magayas.

Los ácidos triterpénicos se encuentran fundamentalmente en la capa de cera de la piel de la manzana (He & Liu, 2007; Poirier et al. 2018). Sus concentraciones dependen de la variedad, la exposición al sol y las condiciones ambientales (Andre et al., 2012; Lv et al., 2016; Bars-Cortina et al., 2018).

Se han analizado 8 compuestos triterpénicos, de los cuales el ácido ursólico, T3, T4 y oleanólico son mayoritarios. Con respecto al ácido ursólico, las variaciones de concentración encontradas entre las muestras monovarietales incluidas en este estudio oscilan entre 217 y 646 mg/Kg de magaya seca, valores similares o superiores a los descritos en investigaciones previas analizando la piel de variedades de manzana de mesa (Andre et al., 2012; Bars-Cortina et al., 2018).

Entre las magayas proporcionadas por la industria sidrera se observa incluso mayor variabilidad, comparando con las monovarietales. Por ejemplo, el ácido ursólico tiene un rango de concentraciones entre 0,91 y 10,10 mg/g. El valor más alto de ácido ursólico fue observado en una muestra obtenida con una prensa de pistón horizontal y que había sido sometida a un tratamiento enzimático después del prensado (I12, Tabla 1). El empleo de celulasas facilita la extracción de ácido ursólico en matrices diversas (López-Hortas et al., 2018), sin embargo, dado que no tenemos información precisa

sobre el tipo de tratamiento aplicado por esta industria no es posible inferir conclusión alguna.

Los niveles de estos ácidos son comparables con los descritos por Woźniak et al. (2018), a pesar de los distintos métodos de extracción. Estos autores caracterizan una tecnología de extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> para la recuperación de ácidos triterpénicos en magayas de la elaboración de zumos, constituidas por mezclas de variedades.

El aislamiento y purificación del ácido ursólico es un área de investigación de gran interés, considerando las diversas propiedades de este compuesto (Cargnin & Gnoatto, 2017; Fan et al., 2016). Dado el contenido presente en magayas de sidra, esta estrategia de revalorización tiene gran potencial.

- Perfiles fenólicos de magayas.

En la elaboración de zumos y sidras, una gran parte de los polifenoles presentes en la manzana queda retenida en la magaya, en particular los flavonoles, ubicados en la piel (Ćetković et al., 2008; Diñeiro García et al., 2009).

En el presente estudio los valores de polifenoles totales se establecen entre 1,36 y 6,39 mg/g de magaya, similares a los descritos con anterioridad Suárez Valles et al. (2010). Los valores más altos corresponden a las magayas monovarietales. Los rangos encontrados de estos compuestos son concordantes con los obtenidos por Diñeiro García et al. (2009) y Rodríguez Madera et al. (2017). Tanto los flavonoles como las dihidrocalconas son compuestos muy estables con el tiempo de almacenado de las magayas (Lavelli & Corti, 2011), hecho que puede ser relevante desde el punto de vista del aprovechamiento a gran escala de estos sub-productos.

Entre las magayas de procedencia industrial, las muestras obtenidas con prensas neumáticas tienen contenidos superiores de polifenoles totales. Los polifenoles son compuestos sensibles a la oxidación, por lo que el tiempo de prensado es un factor relevante. A mayor exposición de la magaya al aire, menor contenido en polifenoles totales, como podría observarse en la Tabla 9. Como ejemplo entre las muestras I6, I7 (prensa tradicional, mezcla gallega), y en I9, I10 (prensa tradicional, mezclas de manzana asturiana), las magayas con ciclos de prensado más largos (I7, I9) presentan valores inferiores de polifenoles totales.

El tratamiento con enzimas durante el prensado favorece la transferencia de polifenoles al mosto, lo que podría explicar el menor contenido de polifenoles totales encontrado en la muestra I12 (Oszmiański et al., 2011).

Con respecto a la posible aplicación de nuestros resultados a escala industrial para la recuperación de polifenoles a partir de los sub-productos del prensado se está trabajando en la aplicación de métodos de secado y de extracción aplicando ultrasonidos de potencia, como estrategia eficaz para economizar tiempo y energía.

## 6. Conclusiones

- El empleo de ultrasonidos de potencia favorece la extracción de compuestos bioactivos reduciendo el tiempo de extracción y utilizando disolventes respetuosos con el medio ambiente.
- La magaya es un material valioso ya que contiene cantidades apreciables de ácidos triterpénicos, independientemente de las condiciones en que se han obtenido en la industria. Los perfiles de estos componentes se ven afectados por la variedad de manzana.
- Asimismo, las concentraciones encontradas de polifenoles totales, flavonoles y dihidrocalconas demuestran el potencial de aprovechamiento que representan las magayas. Los perfiles de estos componentes dependen de las variedades y de los sistemas de prensado implicados en el proceso de elaboración.

## Bibliografía

- Andre, C. M., Greenwood, J. M., Walker, E. G., Rassam, M., Sullivan, M., Evers, D., ... Laing, W. A. (2012). Anti-Inflammatory Procyanidins and Triterpenes in 109 Apple Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10546–10554. <https://doi.org/10.1021/jf302809k>
- Bars-Cortina, D., Macià, A., Iglesias, I., Garanto, X. & Badiella, L. (2018). Seasonal variability of the phytochemical composition of new red-fleshed apple varieties compared with traditional new white-fleshed varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 10011-10025. doi:10.1021/acs.jafc.8b03950.
- Cargnin, S. T., & Gnoatto, S. B. (2017). Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. *Food Chemistry*, 220, 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.029>
- Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Savatović, S., Mandić, A., & Tumbas, V. (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109(2), 340–347. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.12.046>
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2010.11.023>
- Chinnici, F., Bendini, A., Gaiani, A., & Riponi, C. (2004). Radical Scavenging Activities of Peels and Pulpes from cv. Golden Delicious Apples as Related to Their Phenolic Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4684–4689. <https://doi.org/10.1021/jf049770a>
- Dapena de la Fuente, E. & Blázquez Noguero, M.D. (2009). Descripción de las variedades de manzana de la DOP “Sidra de Asturias”. Edita: SERIDA, 1-67 pp.
- De Fátima Sato, M., Rigoni, D. C., Giovanetti Canteri, M. H., Lúcia De Oliveira Petkowicz, C., Nogueira, A., & Wosiacki, G. (2011). Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivars. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, (3), 383–389. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.7125>
- Diñeiro García, Y., Suárez Valles, B. & Picinelli Lobo, A. (2009). Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry* 117, 731-738. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.049
- Fan, J-P, Liao, D-D & Zhang, X-H. (2016). Ultrasonic assisted extraction of ursolic from apple pomace: A novel and facile technique. *Separation Science and Technology* 51, 1344-1350. <http://dx.doi.org/10.1080/01496395.2016.1165253>.
- Flannigan, D. J., & Suslick, K. S. (2005). Plasma formation and temperature measurement during single-bubble cavitation. *Nature*, 434(7029), 52–55. <https://doi.org/10.1038/nature03361>

- Guinda, A., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adánez, P., & Castellano, J. M. (2010). Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9685–9691. <https://doi.org/10.1021/jf102039t>
- He, X. & Liu, R.L. (2007). Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. <https://doi.org/10.1021/JF063563O>
- Koch, K., & Ensikat, H. J. (2008). The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron*. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.11.010>
- Kunkel, S. D., Suneja, M., Ebert, S. M., Bongers, K. S., Fox, D. K., Malmberg, S. E., ... Adams, C. M. (2011). mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass. *Cell Metabolism*, 13(6), 627–638. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.020>
- Łata, B., Przeradzka, M., & Binkowska, M. (2005). Great differences in antioxidant properties exist between 56 apple cultivars and vegetation seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8970–8978. <https://doi.org/10.1021/jf051503x>
- Lavelli, V. & Corti, S. (2011). Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chemistry*, 129(4), 1578–1583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.011>
- Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 291–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>
- López-Hortas, L., Pérez-Larrán, P., González-Muñoz, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2018). Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Research International*, 103, 130–149. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.10.028>
- Lv, Y., Tahir, I. I., & Olsson, M. E. (2016). Factors affecting the content of the ursolic and oleanolic acid in apple peel: influence of cultivars, sun exposure, storage conditions, bruising and *Penicillium expansum* infection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 2161-2169. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7332>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). 1998. Métodos Oficiales de Análisis en la Unión Europea. Madrid.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M., Meza-Velázquez, J., Simal, S., et. al. (2014) Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers* 106, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.013>
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>

- Oszmiański, J., Wojdyło A. & Kolniak, J. (2011). Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry* 127, 623-631. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.056
- Pensec, F., Pączkowski, C., Grabarczyk, M., Woźniak, A., Bénard-Gellon, M., Bertsch, C., Szakiel, A. (2014). Changes in the Triterpenoid Content of Cuticular Waxes during Fruit Ripening of Eight Grape (*Vitis vinifera*) Cultivars Grown in the Upper Rhine Valley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32), 7998–8007. <https://doi.org/10.1021/jf502033s>
- Peragón, J. (2013). Time Course of Pentacyclic Triterpenoids from Fruits and Leaves of Olive Tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(27), 6671–6678. <https://doi.org/10.1021/jf401495t>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A-S, Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering* 111, 73-81. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026
- Poirier, B. C., Buchanan, D. A., Rudell, D. R., & Mattheis, J. P. (2018). Differential Partitioning of Triterpenes and Triterpene Esters in Apple Peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(8), 1800–1806. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04509>
- Rodríguez Madrera, R., Pando Bedriñana, R., & Suárez Valles, B. (2017). Enhancement of the nutritional properties of apple pomace by fermentation with autochthonous yeasts. *LWT - Food Science and Technology* vol: 79, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.021>
- Rodríguez Madrera, R., Pando Bedriñana, R., García Hevia, A. & Suárez Valles, B. (2013). Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts. *Food and Bioprocess Processing* 91, 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.04.005>
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., & Drilleau, J. F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4847–4853. <https://doi.org/10.1021/jf990563y>
- Schieber, A., Keller, P., & Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910(2), 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01217-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01217-6)
- Suárez Valles, B., Álvarez, Á. L., Diñeiro García, Y., Barrio, G. Pichinelli del, Lobo, A., & Parra, F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*, 120(1), 339–342. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.09.073>



- Sudha, M. L., Baskaran, V., & Leelavathi, K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*, 104(2), 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.016>
- Szakiel, A. & Mroczek, A. (2007). Distribution of triterpene acids and their derivatives in organs of cowberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) plant. *Acta Biochimica Polonica*, 54(4), 733–740. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17968438>
- Tiwari, B. K. (2015, September 1). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 71, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Vendruscolo, F., Albuquerque, P. M., Streit, F., Esposito, E., & Ninow, J. L. (2008). Apple Pomace: A Versatile Substrate for Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/07388550801913840>
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066–1074. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2009.10.015>
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., & Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6532–6538. <https://doi.org/10.1021/jf049317z>
- Waldbauer, K., McKinnon, R., & Kopp, B. (2017). Apple Pomace as Potential Source of Natural Active Compounds. *Planta Medica*, 83(12/13), 994–1010. <https://doi.org/10.1055/s-0043-111898>
- Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2018). Effects of ultrasound treatment and concentration of ethanol on selectivity of phenolic extraction from apple pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(9), 2104–2109. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13835>
- Woźniak, Ł., Szakiel, A., Pączkowski, C., Marszałek, K., Skąpska, S., Kowalska, H., Jędrzejczak, R. (2018). Extraction of Triterpenic Acids and Phytosterols from Apple Pomace with Supercritical Carbon Dioxide: Impact of Process Parameters, Modelling of Kinetics, and Scaling-Up Study. *Molecules*, 23(11), 2790. <https://doi.org/10.3390/molecules23112790>