

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Potencial antioxidante de los compuestos
presentes en el bagazo de uva proveniente de la
elaboración de vinos asturianos”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

ÁNGELA FERNÁNDEZ GARCÍA

JULIO, 2019



Agradecimientos

Tras haber finalizado mi Trabajo Fin de Máster (TFM), me gustaría recordar a las personas y a las instituciones que han cooperado para que este modesto estudio se haya podido llevar a cabo, en especial quiero agradecer:

A mis tutoras, la Dra. Rosana Badía Laíño y la Dra. Marta Elena Díaz García por su dedicación y esmero, así como por sus explicaciones para introducirme un poco más en la Química Analítica y hacerme ver cuáles son mis capacidades.

A Christian Chimeno, Clarissa Murru y Jorge Espina por las horas de laboratorio compartidas, por la paciencia y por ofrecerme una mano amiga en los momentos que no veía fin a este máster.

A la Bodega VidAs de Cangas de Onís, Asturias, por proporcionarnos el bagazo de uvas autóctonas que se ha utilizado como materia prima en este trabajo y sin cuya ayuda no habría sido posible realizarlo.



Universidad de Oviedo



ÍNDICE

Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	ix
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.De la industria del vino en el mundo a la actividad vitivinícola asturiana.....	1
1.2.Generación de residuos aprovechables en la industria vitivinícola.....	2
1.3.Encapsulación de antioxidantes.....	3
1.4.Objetivos.....	4
2.MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.Compuestos presentes en el bagazo de uva.....	5
2.2.Antioxidantes.....	6
2.2.1.Definición.....	6
2.2.2.Clasificación.....	6
2.2.3.Antioxidantes presentes en el bagazo de uva.....	8
2.3.Métodos empleados para la extracción de antioxidantes.....	10
2.3.1.Extracción por ultrasonidos.....	10
2.3.2.Extracción líquido-líquido.....	11
2.3.3.Extracción sólido-líquido.....	11
2.4.Métodos empleados para la determinación de antioxidantes.....	12
2.4.1.Métodos de medida basados en la capacidad estabilizante de radicales.....	12
2.4.1.1.Método Folin-Ciocalteu.....	12
2.4.1.2.Otros métodos.....	13
2.4.2.Método de medida basado en la protección proteica de la oxidación.....	14
2.5.Métodos empleados para la encapsulación de antioxidantes.....	14
2.5.1.Sistemas de encapsulación para introducción en alimentos.....	15
2.5.2.Zeína como material de encapsulación.....	16
3.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	18
3.1.Muestra.....	18
3.2.Reactivos y disoluciones.....	18

3.3.Equipos e instrumentación analítica.....	18
3.4.Extracción de antioxidantes.....	19
3.4.1.Selección del medio disolvente empleado para la extracción.....	19
3.4.2.Estudio del efecto de la presencia de sales.....	20
3.4.3.Estudio de la variación del tiempo de sonicación.....	20
3.4.4.Extracción simple y extracciones sucesivas.....	20
3.5.Determinación de la capacidad antioxidante por el método Folin-Ciocalteu.....	20
3.6.Estudio de la estabilidad de los antioxidantes extraídos.....	21
3.7.Encapsulación en nanopartículas de zeína.....	21
3.7.1.Preparación de nanopartículas.....	21
3.7.2.Estudio espectrofotométrico UV-Vis.....	22
3.7.3.Estudio del tamaño de las nanopartículas.....	23
3.7.4.Potencial zeta de las nanopartículas.....	23
4.RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	24
4.1.Cuantificación de la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en el bagazo de uva.....	24
4.2.Optimización de la extracción de antioxidantes.....	26
4.2.1.Elección del medio disolvente.....	27
4.2.2.Presencia de sales.....	28
4.2.3.Influencia del tiempo de sonicación.....	30
4.2.4.Estudio de la extracción en etapas sucesivas.....	31
4.2.5.Aplicación de la metodología desarrollada a otras variedades de uva.....	33
4.3.Estabilidad de los antioxidantes a diferentes temperaturas.....	34
4.4.Encapsulación de antioxidantes en nanopartículas de zeína.....	37
4.4.1.Estudio de la absorbancia.....	38
4.4.2.Caracterización morfológica de las nanopartículas sintetizadas.....	40
4.4.3.Estudio del potencial zeta.....	44
5.CONCLUSIONES.....	46
6.ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	47
7.BIBLIOGRAFÍA.....	48

RESUMEN

La industria vitivinícola es un pilar importante de la economía y la cultura a nivel mundial, pero también en Asturias, donde se busca un crecimiento de la producción de vino con D.O.P. (Denominación de Origen Protegida) para aumentar su atractivo en el mercado. En las últimas décadas se están buscando aplicaciones para revalorizar el residuo sólido que genera, el bagazo de uva, que causa unos sobrecostes que las empresas no quieren asumir. Actuales estudios apuntan que el bagazo de uva es rico en compuestos bioactivos con actividad antioxidante, como los flavonoles, las antocianinas y los estilbenos de interés en muchos campos de la industria. En este trabajo, se extrajeron tales antioxidantes por medio de una extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos y se cuantificó la capacidad antioxidante de los extractos con el método Folin-Ciocalteu. Se optimizó el procedimiento de extracción, escogiendo los siguientes factores: medio disolvente EtOH:H₂O 6:4, adición de sales (1 g de MgSO₄ y 0,25 g de NaCl) y tiempo de sonicación de 30 minutos, con influencia positiva de la extracción en etapas sucesivas. Se sintetizaron nanopartículas de zeína como sistema coloidal de encapsulación y de liberación controlada de compuestos antioxidantes, aportándoles a éstos mayor estabilidad, con la ventaja de que la zeína es una proteína comestible y biocompatible, lo que permitiría utilizarlas como aditivos de antioxidantes en alimentos. Las nanopartículas más grandes y estables se consiguieron a partir de una síntesis con adiciones discretas de la disolución de zeína sobre los antioxidantes diluídos en agua.

ABSTRACT

Wine industry is an important pillar of economy and culture all over the world, but also in Asturias, where the increase of wine production is supported by P.D.O. (Protected Designation of Origin) in order to make it more attractive in the food market. In the last decades, new applications of wine pomace have been searched as this solid residue generates a cost overrun that industries refuse to accept. Recent studies show that wine pomace is rich in bioactive compounds which have antioxidant activity, as flavonols, anthocyanins and stilbenes with wide ranging uses in industries. In this study, antioxidants have been extracted by solid-liquid extraction supported by ultrasound-assisted extraction and their antioxidant capacity has been measured by Folin-Ciocalteu method. The extraction method has been optimized and the following factors have been chosen: solvent system EtOH:H₂O 6:4, salt addition (1 g of MgSO₄ and 0.25 g of NaCl) and 30 minutes of sonication. The method of successive extractions has a positive influence. Zein nanoparticles have been synthesised as a colloidal system of controlled release of antioxidants, offering them more stability with the advantage of the biocompatibility of zein making it possible to use them as food antioxidant additives. The biggest and more stable proteins have been created by a synthesis with discrete additions of zein solution over the diluted antioxidants in water.

Lista de figuras

Figura 1. Principales zonas de producción de vino D.O.P. en Asturias.....	2
Figura 2. Proceso de elaboración del vino blanco y tinto.....	5
Figura 3. Acción de los antioxidantes sobre los radicales libres.....	6
Figura 4. Ejemplos de antioxidantes presentes en el bagazo de uva.....	9
Figura 5. Sistema Soxhlet (De Castro, M. L. & Priego-Capote, F, 2010).....	11
Figura 6. Reacción del reactivo de Folin (García, E. et al, 2015).....	12
Figura 7. Reacción del radical DPPH (Teixeira, J. et al, 2013).....	13
Figura 8. Fórmula química del Trolox.....	14
Figura 9. Principales sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos (Sponton, O.E, 2016).....	16
Figura 10. Modelos de la estructura molecular de la α -zeína (Padua, G.W. & Guardiola, L.V, 2015).....	17
Figura 11. Adición de zeína con embudo de decantación.....	22
Figura 12. Representación de la absorbancia del método Folin-Ciocalteu.....	24
Figura 13. Patrones con concentraciones crecientes de ácido gálico que sirven para construir la curva de calibrado del método Folin-Ciocalteu.....	25
Figura 14. Curva de calibrado del método Folin-Ciocalteu.....	26
Figura 15. Comparación de las mezclas de disolventes para optimizar el proceso de extracción de antioxidantes.....	27
Figura 16. Primer ensayo para comprobar la influencia de distintas cantidades de sales en la extracción.....	29
Figura 17. Segundo ensayo para comprobar la influencia de distintas cantidades de sales en la extracción.....	30
Figura 18. Ensayo con diferentes tiempos de sonicación.....	30
Figura 19. Comparativa del proceso de extracción en una sola etapa o en varias (EtOH:H ₂ O 6:4).....	31
Figura 20. Comparativa del proceso de extracción en una sola etapa o en varias (H ₂ O).....	32
Figura 21. Comparativa del proceso de extracción en bagazo proveniente de otras variedades de uva.....	34
Figura 22. Primer ensayo de estudio de la estabilidad de los antioxidantes, tanto a bajas temperaturas como a temperaturas ambiente.....	35
Figura 23. Segundo ensayo de estudio de la estabilidad de los antioxidantes, tanto a bajas temperaturas como a temperaturas ambiente.....	36
Figura 24. Espectro visible-UV de la disolución de zeína (dilución 1:30).....	39
Figura 25. Espectro visible-UV de antioxidantes diluídos y nanopartículas de zeína (dilución 1:30).....	39
Figura 26. Nanopartículas vacías obtenidas en el ensayo A.....	40

Figura 27. Nanopartículas obtenidas en el ensayo B en una disolución conteniendo un 14,3% v/v de antioxidantes.....	41
Figura 28. Nanopartículas obtenidas en el ensayo B en una disolución conteniendo un 25% v/v de antioxidantes.....	42
Figura 29. Nanopartículas obtenidas en el ensayo C en una disolución conteniendo un 14,3% v/v de antioxidantes.....	43
Figura 30. Nanopartículas obtenidas en el ensayo C en una disolución conteniendo un 25% v/v de antioxidantes.....	43

Lista de tablas

Tabla 1. Notación de las extracciones realizadas con diferentes cantidades de sales.....	28
Tabla 2. Parámetros óptimos para la extracción de antioxidantes provenientes de bagazo de uva.....	33
Tabla 3. Valores de concentración de antioxidantes (ppm) normalizados a bajas temperaturas y T ambiente.....	35
Tabla 4. Diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según el ensayo A.....	40
Tabla 5. Diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según el ensayo B.....	41
Tabla 6. Diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según el ensayo C.....	42
Tabla 7. Valores de potencial zeta (mV) y del diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según los ensayos B y C.....	44

1.INTRODUCCIÓN

1.1.De la industria del vino en el mundo a la actividad vitivinícola asturiana.

La actividad vitivinícola es una de las labores más extendidas en el mundo, remontándose sus orígenes a 5000 años a.C. en Oriente Medio, donde las condiciones climáticas favorecían el cultivo de la vid (Portela, J. F, 2013). Esta actividad no solo ha acompañado a nuestra historia con un valor alimenticio, sino que también tiene una gran connotación cultural que ha ido variando con las diferentes culturas que han aparecido a lo largo de la historia de la humanidad y que continúa hasta nuestros días.

El vino es una bebida alcohólica que se obtiene de la uva por medio de una fermentación alcohólica de su zumo, llevada a cabo por levaduras y bacterias del ácido láctico, que producen etanol y CO₂ a partir de sus azúcares (Fleet, G.H, 2003).

Pese a comenzar siendo un producto destinado a las clases sociales más elevadas, se convirtió siglos después en un alimento básico en la dieta por sus características nutricionales y por otros posibles usos como fármaco (Portela, J. F, 2013).

En la actualidad, el cultivo de viñedos es muy importante para la economía de países de todos los continentes, impulsando el desarrollo rural de pequeños municipios, apareciendo nuevas sociedades que trabajan en el cuidado y transformación de la uva y aportando cambios a la política de dichos países. Todos ellos tienen en común el clima y las condiciones necesarias de cultivo. Acorde con los datos presentados en 2013 por la FAO (Food and Agriculture Organization), la producción mundial de uva es de aproximadamente 63 millones de toneladas, de la que un 75% se destina a la producción de vino. El continente europeo es el mayor productor, seguido por Asia que continúa creciendo y que ha superado al continente americano en las últimas décadas por su fuerte expansión (Portela, J. F, 2013; García-Lomillo, J. et al, 2017).

En cuanto a la exportación, España es el líder mundial en cuanto a lo que a venta de vino se refiere, con 22,1 millones de hectolitros en el 2017; vendiéndose a 1,25 euros por L (Referencia web 1).

La comunidad autónoma asturiana no es conocida especialmente por la tradición enológica, pero sí que cuenta actualmente con un vino con Denominación de Origen Protegida (D.O.P.), esto es, vinos cuya elaboración, transformación y producción se realizan en esa zona. Esta característica permite dar valor a la localización donde se produce, además de fusionar los primeros pasos de recogida de uva y elaboración tal y como se llevaban a cabo siglos atrás con la producción a gran escala apoyada por las nuevas tecnologías, que permiten el crecimiento en el mercado con mayores facilidades.

Aunque el inicio de la producción de esta bebida se remonta al siglo IX, fue en los años 90 cuando se crea la Asociación de Productores y Elaboradores del Vino de Cangas para conservar los terrenos de viñedos asturianos. El incremento de las explotaciones mineras provocó un fuerte

descenso de la actividad vitivinícola, pasando de 1000 hectáreas cultivadas para esta actividad a finales del siglo XIX a las 102 hectáreas de la actualidad (*Figura 1*). Por ello, las bodegas asturianas trabajan para luchar por el cultivo de uva autóctona y producción de vino a partir de ésta, haciendo a nuestro mercado más competitivo frente al resto de comunidades autónomas, a lo que la D.O.P. contribuye en gran medida.



Figura 1. Principales zonas de producción de vino D.O.P. en Asturias (tomada de Referencia web 2).

Además, Asturias es un territorio certificado como Viticultura de Montaña por el CERVIM (Centro de Investigación, Estudio, Salvaguarda, Coordinación y Valorización de la Viticultura de Montaña) o “viticultura heroica”. Las características de este tipo de viñedos son el cultivo en zonas con altitudes superiores a 500 metros sobre el nivel del mar, con más del 30% de pendiente, en terrazas o bancales y en pequeñas islas o con condiciones meteorológicas difíciles, de las que nuestra región cumple las tres últimas (Referencia web 2).

1.2. Generación de residuos aprovechables en la industria vitivinícola

Como todas las industrias, la del vino produce millones de toneladas de subproductos (bagazo, pepitas, raspones) que se almacenan innecesariamente en la industria y cuyos tratamientos generan unos sobrecostes que a las empresas no les interesa asumir. Sin embargo, algunos de estos subproductos generados son fuentes de productos de alto valor añadido y, por este motivo, el interés por su aprovechamiento está creciendo considerablemente, con usos potenciales en las industrias farmacéutica, cosmética y ganadera (entre otras). Las empresas desarrollan así nuevos productos, que les permiten diferenciarse de la competencia en el mercado.

En los últimos años, se está tratando de convertir el bagazo de uva en abono orgánico de calidad alta, minimizando así el coste de gestión de subproductos de viticultura y el de acondicionamiento de los suelos. De esta forma, se incrementan la biomasa disponible y las poblaciones de microorganismos características del ecosistema, por lo que mejoran las características de los suelos (Arvanitoyannis, I. S. et al, 2006).

En el vino, aparecen numerosas sustancias bioactivas. Muchas de estas sustancias han mostrado actividad antiinflamatoria, antibacteriana, potenciadora de la acción del sistema inmunitario, activante de determinadas enzimas involucradas en el proceso de digestión de alimentos y que permiten reducir el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular.

Un grupo de estas sustancias son los polifenoles, fracción grande y compleja de sustancias naturales con actividad antioxidante, que pueden tener implicaciones en la salud (prevención de enfermedades) y en el sector farmacéutico (Zamora, J. D, 2007).

Estos antioxidantes parece ser que tienen aplicación en todos los campos de la industria. En medicina, se está estudiando el papel de algunos de estos antioxidantes (como el resveratrol) en la prevención del envejecimiento puesto que se cree que enfermedades como el cáncer, el Alzheimer o la diabetes están estrechamente relacionadas con radicales libres. Algunos de estos compuestos pueden ser utilizados además como suplementos de la dieta. En cosmética, son útiles para tratar pieles secas o para protegerlas del envejecimiento, equilibrando también el pH de la piel (Referencia web 3; Arvanitoyannis, I. S. et al, 2006; Zamora, J. D, 2007).

En el sector alimentario, las aplicaciones son diversas. Los alimentos que contienen antioxidantes son beneficiosos para la salud ya que frenan o ralentizan el estrés oxidativo, situación peligrosa que aparece en nuestro organismo cuando pierde la homeostasis. En ese momento, pueden aparecer desórdenes, inflamaciones y enfermedades graves. Es por eso que tales alimentos pueden participar ayudando a la prevención de estas patologías.

Una terapia antioxidante podría resultar una buena alternativa para el tratamiento del estrés oxidativo y patologías relacionadas así como una forma de mejora y aprovechamiento de los alimentos que se ingieren día a día, dando lugar a un mejor entendimiento de sus posibles usos terapéuticos (Zamora, J. D, 2007; Gutiérrez, D.M et al, 2008).

1.3.Encapsulación de antioxidantes

Los polifenoles son antioxidantes naturales, frente a otro tipo de antioxidantes que se introducen en los alimentos de forma artificial, como son el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), aditivos E-320 y E-321, respectivamente. Con el fin de evitar y/o reducir situaciones de estrés oxidativo en el organismo, se buscan alternativas como es la suplementación de antioxidantes, bien sean naturales o artificiales, por medio de la encapsulación.

La encapsulación se define como el proceso en el que un agente activo (una determinada sustancia) se atrapa en un material de pared (una sustancia diferente) produciendo partículas en escala nanométrica (nanoencapsulación), micrométrica e incluso milimétrica.

Las técnicas de encapsulación buscan preservar los compuestos bioactivos naturales, aumentando su solubilidad y estabilidad así como su biodisponibilidad en el organismo sin que por ello pierdan su actividad potencial. De esta forma, factores como la luz o la humedad tardarían más tiempo en deteriorar un alimento (López, A. F. et al, 2011).

Además, este sistema nos permite controlar el destino biológico de los nutrientes tras ingerirlos.

Cuando su uso se centra en la industria alimentaria, deben utilizarse materiales que sean compatibles con la matriz alimentaria, que le den estabilidad y que mantengan sus características iniciales para que la percepción sensorial del alimento no varíe.

El empleo de nanopartículas, tanto orgánicas como inorgánicas, busca mejorar la seguridad, calidad y valor nutricional del alimento pero, en algunos casos, pueden provocar toxicidad en los alimentos al alterar la flora gastrointestinal. Por ello, hay que estudiar cómo se liberan los antioxidantes cuando se introducen encapsulados y qué efectos tiene esto sobre el organismo (McClements, D. J, 2017).

1.4.Objetivos

Este Trabajo Fin de Máster (TFM) busca estudiar el aprovechamiento de tales compuestos bioactivos para su aplicación en diferentes sectores industriales. Una vez expuesta la información relacionada con la temática del trabajo, se concluye que el bagazo de uva es un subproducto de la industria alimentaria que genera compuestos de interés: los compuestos fenólicos, que poseen propiedades antioxidantes.

Los objetivos principales del presente trabajo son:

- Evaluación del potencial de la obtención de antioxidantes a partir del bagazo de uva por medio de una extracción con disolventes orgánicos. Optimización del proceso mediante el estudio de diversos parámetros que puedan influir en el rendimiento.
- Determinación de la capacidad antioxidante del bagazo con el método Folin-Ciocalteu.
- Estudio de la encapsulación de antioxidantes en nanopartículas biocompatibles para su potencial uso como aditivos/suplementos en alimentos.

2.MARCO TEÓRICO

2.1.Compuestos presentes en el bagazo de uva

El bagazo de uva es el residuo sólido de ésta, que resulta del prensado de la uva en el proceso de obtención del vino o, lo que es lo mismo, la materia sólida restante después de extraer el jugo. Se encuentra constituido por el hollejo o la piel de la uva, las semillas y los raspones.

En la producción de vino tinto, se incluyen las pieles para llevar a cabo el paso de fermentación, mientras que en vinos blancos y rosados se elimina previo a esta etapa, lo que influye en la composición del desecho final (*Figura 2*).

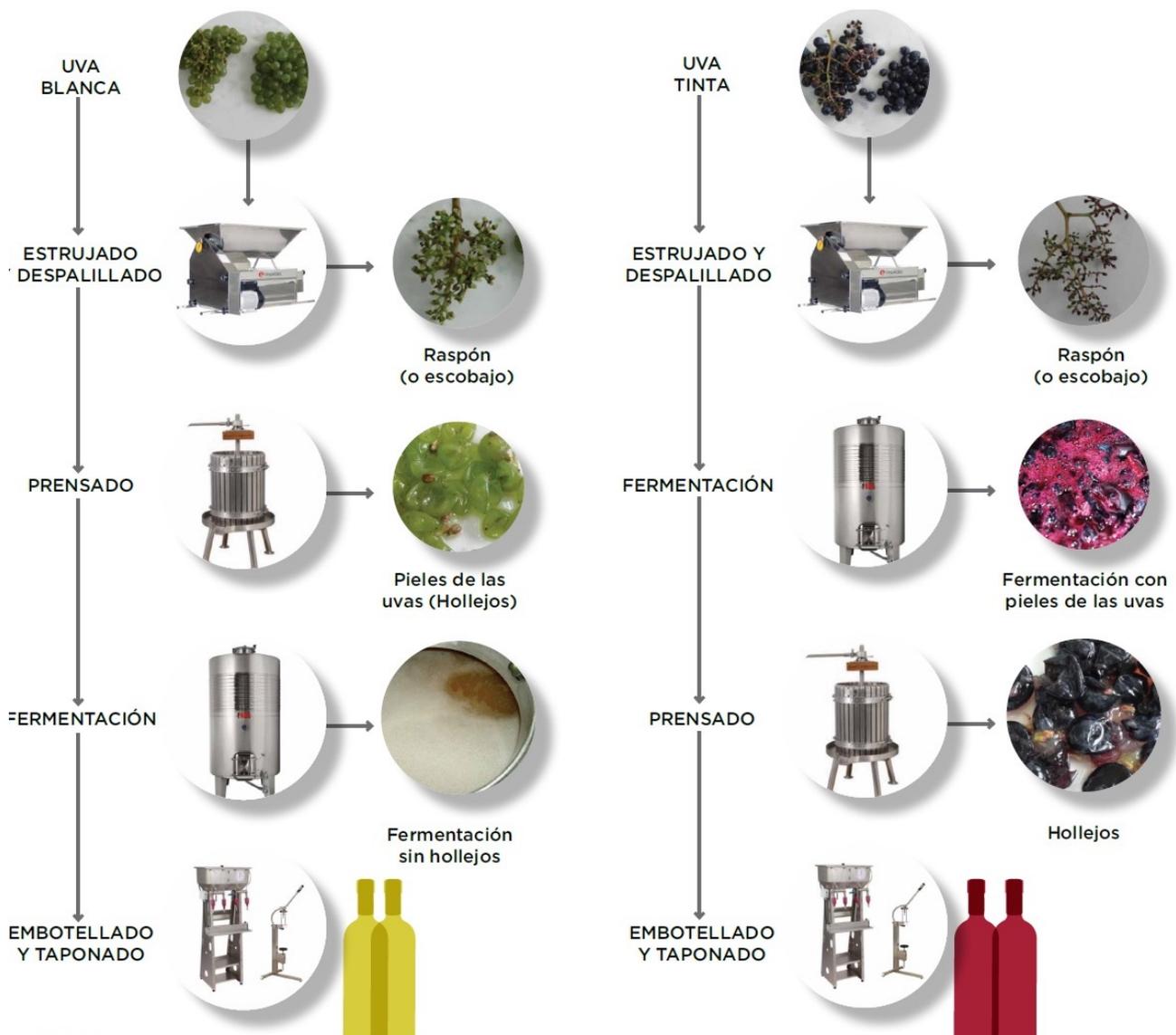


Figura 2. Proceso de elaboración del vino blanco (a la izquierda) y tinto (a la derecha) (tomada de Referencia web 4).

El bagazo de uva está compuesto por una gran cantidad de agua, fibra dietética y proteínas principalmente; así como por lípidos, azúcares y minerales.

En primer lugar, suele presentar un alto contenido de agua, encontrándose entre un 55 y un 75% de la composición final y tiene influencia en la aparición de microorganismos, lo que puede afectar a las propiedades del residuo (González–Centeno et al. 2010). La fibra dietética, por otro lado, está disponible a porcentajes que van del 43% al 75% y las proteínas, de un 6% a un 15%. Estas últimas están presentes con mayor riqueza en la piel y, en segundo lugar, en las semillas de las uvas. El contenido lipídico se encuentra entre un 14 y un 17%, constituyendo más del 90% los ácidos linoleico, oleico y palmítico. La cantidad y tipología de minerales varía en función del proceso de maceración, siendo los más abundantes las sales de potasio. Por último, la composición de compuestos fenólicos muestra notables diferencias, dependiente ésta de la interrelación de otros factores y de las prácticas vitivinícolas (García–Lomillo, J. et al, 2017).

2.2. Antioxidantes

2.2.1. Definición

En ciertas situaciones y bajo determinadas condiciones, la homeostasis de nuestro cuerpo desaparece, concentrándose en mayor proporción moléculas tóxicas, más concretamente, los radicales libres. Se trata de moléculas inestables de mucha energía (por poseer uno o varios electrones desapareados en su capa más externa) con tendencia a reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Si se producen desmesuradamente, el cuerpo se encuentra ante una situación de estrés oxidativo, causante de numerosas alteraciones fisiológicas que dan origen a diversas enfermedades.

Los antioxidantes son sustancias químicas, naturales o fabricadas artificialmente, cuya función principal es impedir y/o retardar el fenómeno de oxidación y reducir el estrés oxidativo, permitiendo a las mitocondrias el uso del oxígeno y formando complejos que frenan las reacciones que producen los radicales libres. En otras palabras, se encargan de estabilizar a los radicales libres (*Figura 3*); (Zamora, J. D, 2007).

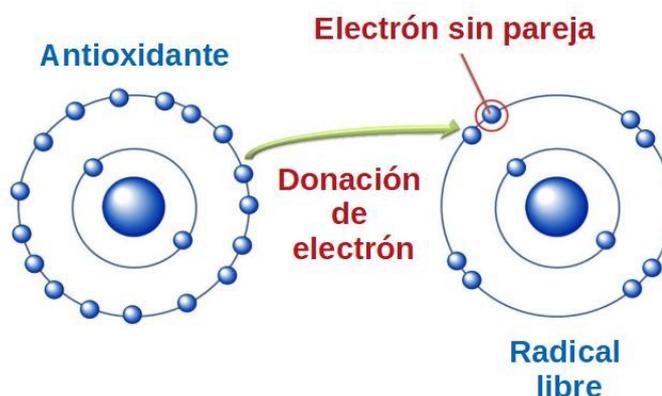


Figura 3. Acción de los antioxidantes sobre los radicales libres (tomada de Referencia web 5).

2.2.2. Clasificación

No existe una única clasificación de los antioxidantes, sino que aparecen diversas clasificaciones en función de diferentes características. En función de su afinidad por el agua, los antioxidantes

hidrofílicos son aquellos solubles en agua mientras que los hidrofóbicos son los solubles en grasas.

Otra forma de clasificar los antioxidantes es como endógenos, si el organismo es el encargado de fabricarlos o exógenos, también llamados naturales, si se ingieren con los alimentos.

A su vez, los antioxidantes endógenos se dividen en enzimáticos, si actúan de catalizadores en reacciones que usan sustratos que reaccionan con los radicales libres, y en no enzimáticos.

Los principales antioxidantes endógenos enzimáticos son:

- Superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la destrucción del anión superóxido por su transformación en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Su presencia es importante especialmente en organismos aerobios, que necesitan el oxígeno para el correcto funcionamiento de su metabolismo y, por ello, se encuentra en el interior de las mitocondrias.
- Catalasa (CAT), encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno cuando éste se encuentra a altas concentraciones. Es abundante en el hígado y en el riñón.
- Glutación peroxidasa (GPX), enzima mitocondrial que reduce el peróxido de hidrógeno (cuando se encuentra a bajas concentraciones) a radical hidropéroxido en presencia de glutación reducido, favoreciendo así la reacción redox. Este enzima ejerce además una función importante en la protección lipídica.
- Glutación reductasa, que reduce el glutación para que pueda intervenir en la reducción del peróxido de hidrógeno, en la inmunología del organismo y en la proliferación celular.

En cuanto a los antioxidantes endógenos no enzimáticos, el más importante es el ya mencionado glutación. Otros ejemplos son el ácido úrico, que forma complejos con metales y la coenzima Q, que evita la peroxidación lipídica (Referencia web 6).

Por otra parte, los grupos más importantes que se encuentran en la naturaleza (Young, I.S. & Woodside, J. V; 2001) son:

- Tocoferoles, antioxidantes que poseen un anillo de cromanol y una cadena polipronoide saturada. El tocoferol dominante en los tejidos humanos y animales es el α -tocoferol y es la forma más activa de la vitamina E (Referencia web 7).
- Carotenoides, pigmentos liposolubles que cuentan con un esqueleto de carbono y que se obtienen a partir de la ingesta de alimentos. Los carotenoides se subdividen a su vez en carotenos, como el β -caroteno o el licopeno, y xantofilas, como la luteína o la β -criptoxantina. El β -caroteno es el más relevante por su papel como provitamina A.
- Flavonoides, grupo de compuestos polifenólicos muy numeroso (se han encontrado más de 5000) encargado de inhibir la oxidasa para evitar la oxidación celular. Incluye los flavanoles, flavanoles, flavonas e isoflavonas. En este grupo se encuentra la quercetina, conocida por facilitar la creación de antioxidantes endógenos.
- Ácidos orgánicos fenólicos y polifenólicos, como son el ácido benzoico, el cinámico y sus derivados.

2.2.3. Antioxidantes presentes en el bagazo de uva

Uno de los casos más conocidos en cuanto a antioxidantes se refiere es la “paradoja francesa”: los franceses, grandes consumidores de alimentos con alto contenido en grasas saturadas, presentan una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares que países como Finlandia o Alemania. Esto se debe a su consumo regular del vino, que ejerce un papel que equilibra al organismo y genera efectos cardiosaludables. Estos beneficios para la salud se atribuyen a los compuestos fenólicos contenidos en la uva, al tratarse de los principales metabolitos secundarios de plantas que se transmiten a nuestro organismo por medio de la ingestión de alimentos que los contienen, como son la cebolla o el aceite de oliva virgen (Eva, G. C, 2004).

La facilidad de extracción de estos compuestos, así como su biodisponibilidad, dependen en gran medida de las condiciones empleadas en el proceso de vinificación, aparte de las condiciones del proceso (temperatura, T y tiempo de extracción, t_e) y del ecosistema estudiado, así como de las posibles interferencias que puedan aparecer (Arvanitoyannis, I. S. et al, 2006; Guntero, V. A et al, 2015).

Los compuestos principales del vino son los siguientes:

Las procianidinas (o taninos condensados), como la procianidina C2 (*Figura 4a*), que se encuentran en la semilla de uva.

Los flavonoles, responsables de la coloración de la piel de las uvas (sobre todo en el vino blanco). Se encuentran en concentraciones variables, de 10 a 100 mg/kg de bayas de uva.

Las antocianinas, responsables de la coloración de las uvas y el vino tintos, como la malvidina (*Figura 4b*), la peonidina (*Figura 4c*) y la delphinidina (*Figura 4d*). Por tratarse de pigmentos inestables, pueden hidrolizarse, formar polímeros y/o agrupaciones con otros compuestos o incluso precipitar. En función del pH del medio, sufren transformaciones estructurales que provocan cambios en su color y brillo. En relación con tales características, cabe destacar el fenómeno de copigmentación, que tiene lugar porque su estructura plana les permite asociarse con moléculas diferentes creando un entorno hidrofóbico que impide el ataque nucleófilo y originando un pigmento mucho más estable que por sí solas.

La composición de un vino joven depende de su concentración y tipo de antocianinas y de la copigmentación que presente, en muchos casos por interacciones con los flavan-3-oles. Estos últimos no tienen un papel directo en la coloración del vino, sino que intervienen en mayor medida en el sabor amargo y la astringencia que caracteriza el vino. Todos estos parámetros irán evolucionando a medida que el vino envejece. Los más representativos del grupo de flavan-3-oles son la (+)-catequina (*Figura 4e*) y la (-)-epicatequina (*Figura 4f*); (Cheynier V. et al, 2000; Marín, F. Z, 2013; Huang, X. et al, 2019).

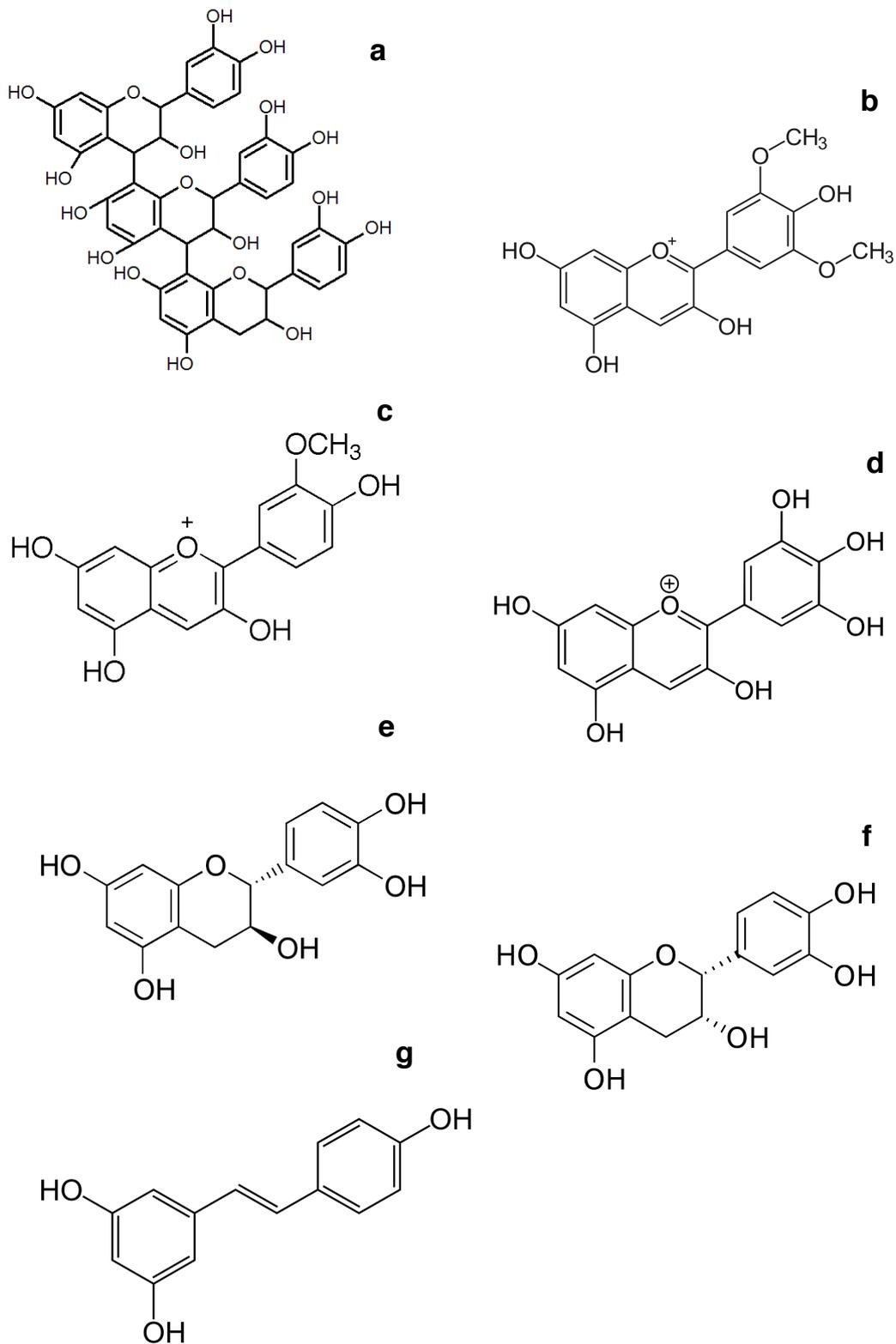


Figura 4. Ejemplos de antioxidantes presentes en el bagazo de uva.

Los estilbenos son compuestos constituidos por dos bencenos que se encuentran unidos por un puente etano o eteno, entre los que el más estudiado es el resveratrol (Figura 4g). Éste se

encuentra principalmente en la piel y las pepitas de uvas tintas y suele producirse por parte del sistema inmunitario en respuesta a una situación de estrés para la planta. Sus niveles crecen en respuesta a la exposición a ozono, a la radiación ultravioleta (UV) y a ataques fúngicos. En los últimos años, han surgido numerosos estudios sobre sus propiedades para combatir enfermedades tan conocidas como el cáncer, el Párkinson o el Alzheimer, pero el papel más importante es el de la prevención del envejecimiento al activar un gen de la longevidad (Cheynier V. et al, 2000; Marín, F. Z, 2013; Huang, X. et al, 2019).

Por último, los ácidos fenólicos conforman el grupo de los fenoles no flavoideos, como son el ácido gálico (ácido benzoico) y el ácido p-curámico (ácido cinámico).

2.3.Métodos empleados para la extracción de antioxidantes

El proceso de extracción es crucial para conseguir aislar e identificar los compuestos bioactivos de interés. Es dependiente de diversos factores como son el disolvente empleado, la estructura química de los antioxidantes en sí, el tiempo y temperatura utilizadas para llevar a cabo el proceso, la metodología y la presencia de sustancias coextraídas, que puedan causar algún tipo de interferencias o disminuir el rendimiento de la extracción (Guntero, V. A et al, 2015).

No hay una metodología de extracción que se considere óptima, pues cada una de las existentes presenta ventajas e inconvenientes diversos. En muchos casos, se busca aumentar el rendimiento por combinación de dos de ellas.

A continuación, se explican las metodologías convencionales (frente a las de nueva generación, no incluidas en el trabajo ya que en muchos casos son versiones mejoradas de las presentes).

2.3.1.Extracción por ultrasonidos

En este proceso, se utiliza un equipo que contiene un transductor encargado de generar los ultrasonidos y que está constituido por un material piezoeléctrico al que se aplica una diferencia de potencial eléctrico a través de las caras opuestas del mismo, produciendo una contracción o una expansión del material (en función de las cargas aplicadas). Estas fluctuaciones son las responsables de la generación de ondas ultrasónicas.

En un medio líquido, estas ondas ultrasónicas pueden generar suficiente presión para romper las fuerzas de cohesión del líquido, creando una burbuja (o microcavidad) que va creciendo y atrapando vapores o gases del medio. Cuando ha absorbido suficiente energía ultrasónica la burbuja no se mantiene y se origina una implosión por las altas temperaturas (hasta 5000 °C) y presiones (1000 atm). Como estas burbujas son muy pequeñas en comparación con el seno del líquido que la rodea, el calor generado se disipa rápidamente, con lo cual las condiciones experimentales se mantienen sustancialmente inalteradas. Esta combinación de factores (alta temperatura y presión micro/nano-localizadas y el rápido enfriamiento) genera unas condiciones especiales para la extracción de compuestos antioxidantes en el problema que nos ocupa.

Es un método rápido por la gran superficie de contacto entre las dos fases (sólida-líquida) y por la continua reducción del tamaño de partícula estudiado, que aumenta el área de superficie de contacto y, en consecuencia, la velocidad de la reacción (Guntero, V. A et al, 2015).

El objetivo de este proceso es, además del aumento de la velocidad, la mejora del rendimiento del proceso y, por ello, un mayor porcentaje de compuestos antioxidantes extraídos.

El equipo cuenta con un recipiente de agua que permite la transmisión de las ondas.

Puede llevarse a cabo por medio de un homogeneizador de tipo sonda o en un baño de ultrasonidos. La sonda de ultrasonidos permite una entrada de energía uniforme y homogénea, por lo que los resultados serán reproducibles en posteriores ensayos. Sin embargo, el baño de ultrasonidos presenta menor intensidad y de forma más irregular, pues los ultrasonidos no se distribuyen uniformemente en todo el tanque, lo cual dificulta la repetitividad del proceso a la hora de hacer duplicados o triplicados (Referencia web 8).

2.3.2.Extracción líquido-líquido

También conocida como extracción con disolventes, separa un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida cuando existen diferencias de solubilidad en los componentes presentes. Este proceso también puede llevarse a cabo para eliminar impurezas que van mezcladas con el compuesto de interés.

Como disolvente, suelen utilizarse mezclas de disolventes orgánicos, como son el metanol, el etanol, el cloroformo, el benceno o la acetona que deben de cumplir una serie de características: que no sean miscibles con el otro disolvente (que suele ser el agua), que el resto de componentes de la mezcla no se disuelvan en el disolvente de extracción, que no sea tóxico o inflamable y que sea suficientemente volátil para eliminarse por procesos como la destilación o la evaporación. No obstante, es difícil encontrar un disolvente que cumpla todas las características requeridas (Referencia web 9).

2.3.3.Extracción sólido-líquido

Esta técnica también recibe el nombre de lixiviación. Sirve para llevar a cabo la separación de un compuesto a partir de una muestra sólida donde se aprovecha la diferencia de solubilidad en un disolvente determinado.

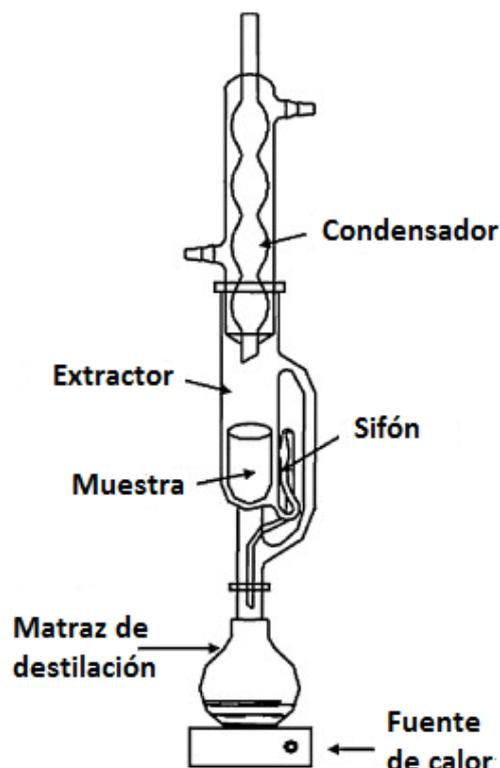


Figura 5. Sistema Soxhlet.
(De Castro, M. L. & Priego-Capote, F, 2010).

La técnica más empleada es la extracción Soxhlet (Figura

5): eficiente, selectiva y de bajo consumo energético, pese a necesitar un aporte de calor. Esto es
Fernández García, Ángela

debido a la recirculación del disolvente empleado para la extracción. La desventaja más importante frente al resto de métodos es el tiempo requerido para la extracción (horas frente a minutos en los métodos previamente mencionados).

La muestra se coloca en un soporte que se llena con el extractante condensado y, cuando el líquido alcanza un nivel determinado, el sifón aspira el disolvente con los solutos extraídos y los lleva al matraz de destilación. Este proceso se repite varias veces para completar la extracción de los analitos presentes en el sólido depositado en el cartucho de celulosa. Una vez que se han acabado los ciclos, el disolvente se evapora y quedan como residuo los analitos extraídos (De Castro, M. L. & Priego-Capote, F, 2010).

2.4.Métodos empleados para la determinación de antioxidantes

Existen diversos métodos analíticos para evaluar la actividad antioxidante en alimentos, pero ninguno es un método estandarizado. Algunos de ellos miden la capacidad estabilizante de un radical y otros la protección de una proteína frente a la oxidación. A continuación, se describen algunas de las técnicas más utilizadas, todas ellas espectrofotométricas (a excepción de la última).

2.4.1.Métodos de medida basados en la capacidad estabilizante de radicales

2.4.1.1.Método Folin-Ciocalteu

Este método sirve para medir los compuestos fenólicos totales en productos vegetales. La reacción se basa en la interacción de estos compuestos con el reactivo Folin-Ciocalteu, a pH básico, para formar un cromóforo azul que se puede determinar por medio de espectrofotometría UV-Vis a $\lambda=765$ nm, longitud de onda a la que presenta el máximo de absorción (Figura 6).

El reactivo posee una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que forman una sal de color amarillo. Una vez que reacciona con los polifenoles de la muestra, se reduce dando lugar a un complejo de color azul que presenta una absorción directamente proporcional a la concentración en polifenoles presentes (al número de grupos hidroxilo presentes).

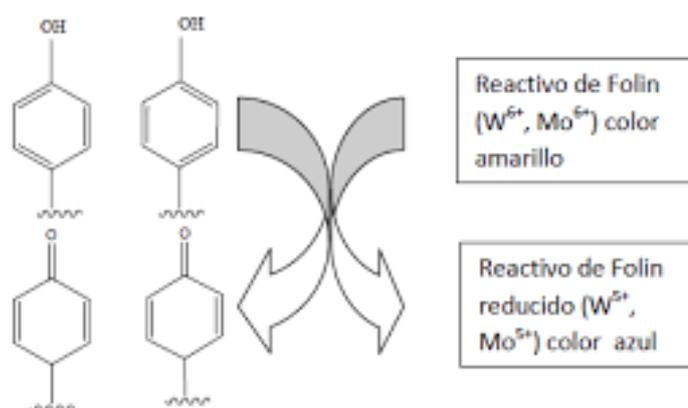


Figura 6. Reacción del reactivo de Folin (García, E. et al, 2015).

A partir de la construcción de una recta patrón con concentraciones crecientes de ácido gálico, que se utiliza como estándar, se puede cuantificar la concentración de los polifenoles (que se expresan así en equivalentes de ácido gálico).

Se trata de un método barato, sencillo y útil en un laboratorio de rutina, de gran exactitud y sensibilidad pese a las posibles interferencias por parte de otras sustancias reductoras (García, E. et al, 2015).

2.4.1.2.Otros métodos

Uno de los métodos más usados para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia está basado en la estabilidad del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·), conocido como método DPPH.

La estabilidad de este radical se atribuye a la deslocalización de un electrón que se encuentra desapareado, que da lugar a un color violeta con un máximo de absorción a $\lambda=520$ nm cuando está en solución de etanol.

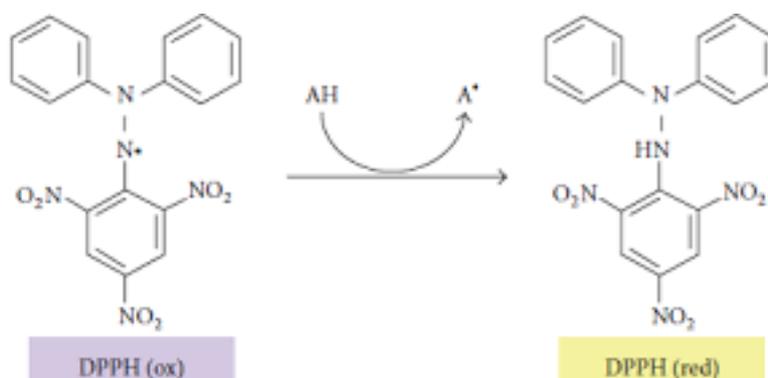


Figura 7. Reacción del radical DPPH
(Teixeira, J. et al, 2013).

Si el DPPH· reacciona con un potencial donante de hidrógeno (por ejemplo, un antioxidante), se genera la forma reducida (DPPH) y desaparece el color, que es directamente proporcional a la concentración de antioxidantes (*Figura 7*).

Se caracteriza por ser un método rápido pero las medidas que se realicen pueden verse afectadas por el espectro de absorción del DPPH (Gutiérrez, D.M et al, 2008; Pisoschi, A.M. & Negulescu, G.P, 2011; Teixeira, J. et al, 2013).

El método ABTS se basa en la capacidad antioxidante del radical del mismo nombre, generado a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico. Absorbe en el espectro UV-Vis a $\lambda=743$ nm al producirse el radical verde azulado ABTS•+ en la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. La decoloración del cromóforo disminuye cuando se inhibe la reacción por la presencia de antioxidantes, encontrándose una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de antioxidante en el medio.

La principal ventaja de esta técnica es su posible aplicación a matrices lipofílicas e hidrofílicas, ampliando el rango de actuación a diferentes matrices alimentarias (Re, R. et al, 1999).

Para construir la recta de calibrado de ambos métodos y determinar la concentración de antioxidantes presente se utiliza Trolox® como estándar (Figura 8), por lo que los resultados de los compuestos analizados van a estar expresados en relación a equivalentes de Trolox®. Éste es un análogo de la vitamina E, por lo que también comparte sus propiedades antioxidantes.

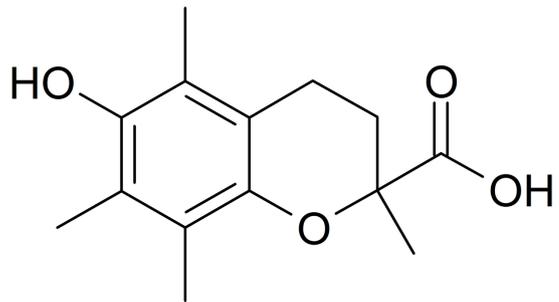


Figura 8. Fórmula química de Trolox®.

2.4.2. Método de medida basado en la protección proteica de la oxidación

El método ORAC, ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) mide, al igual que el resto de casos, la capacidad antioxidante de una sustancia.

A diferencia de los anteriores, se trata de un método fluorescente que utiliza una sonda fluorescente (como la fluoresceína) cuya señal se desactiva en presencia de sustancias generadoras de radicales libres (esto es, especies reactivas de oxígeno), como puede ser el AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida) utilizado en este ensayo.

El AAPH produce radicales peroxilo que pueden desactivar la fluorescencia de la fluoresceína.

Sin embargo, si se encuentran antioxidantes en el medio, éstos actúan absorbiendo (neutralizando) los radicales peroxilo y la fluorescencia de la fluoresceína no se verá alterada.

De nuevo, el antioxidante Trolox® es el que se utiliza como estándar para la curva de calibrado.

Esta metodología presenta diversos inconvenientes, el principal es su gran irreproducibilidad. Además, no se han encontrado evidencias de que haya una implicación real de los radicales libres en el proceso y la formación de los radicales libres sobre los que se mide la actividad (peroxilos) no ha sido demostrada todavía (Garrett A.R et al, 2010).

2.5. Métodos empleados para la encapsulación de antioxidantes

En las últimas décadas, la percepción de 'alimento saludable' ha variado notablemente, de forma que ha crecido el interés por ciertos grupos de productos y, en especial, por ciertos componentes. Los consumidores tratan de comer alimentos naturales o mínimamente procesados al tratarse de alimentos más sanos y menos perjudiciales para el medio ambiente (McClements, D. J, 2017).

La industria busca introducir ingredientes funcionales a los alimentos, que aporten algún beneficio al organismo, sin alterar sus propiedades organolépticas. Para ello, una de las opciones que más se ha estudiado es la encapsulación por medio del uso de sistemas coloidales.

Los sistemas de liberación coloidal son sistemas que cuentan con una fase dispersa (pequeñas partículas) que rodea a la fase dispersante (una sustancia diferente de la otra fase). Las dispersiones pueden ser de sólidos en líquidos, de líquidos en líquidos o de moléculas autoensambladas (Patel, A. R. & Velikov, K. P, 2011).

2.5.1. Sistemas de encapsulación para introducción en alimentos

Los principales sistemas que podrían permitir la encapsulación de antioxidantes para su posterior introducción en alimentos son los siguientes (Patel, A. R. & Velikov, K. P, 2011):

Las micelas son agrupaciones coloidales de moléculas anfífilas que se producen a una determinada concentración, la concentración micelar crítica (*Figura 9*). El pequeño tamaño de estas formaciones (<10 nm), su estabilidad termodinámica y su estabilidad coloidal la hacen una atractiva opción de encapsulación. La principal limitación que presentan es su solubilidad, que es dependiente de la especificidad y concentración del surfactante.

Los liposomas fueron el primer sistema desarrollado para la liberación de fármacos en los años 70 (*Figura 9*). Su estructura se basa en una o varias bicapas lipídicas compuestas por fosfolípidos que forman una vesícula, que rodea al núcleo. Presentan tanto dominios hidrófobos como hidrófilos, por lo que pueden transportar moléculas de diferente naturaleza sin que se degraden. Sin embargo, la materia prima supone grandes gastos y la eficacia de encapsulación con tales materias es baja.

Las emulsiones son sistemas de dispersión sin estabilidad termodinámica que se componen por dos líquidos inmiscibles y que se estabilizan por medio de moléculas de superficie activa. Las gotas que las componen varían en tamaño, desde varias decenas de nanómetros a milímetros.

Las nanopartículas son dispersiones particuladas (o bien sólidos coloidales) diseñadas a partir de polímeros, con tamaños entre 10 y 100 nm (*Figura 9*).

Los polímeros en usos alimentarios están restringidos, de forma que solo pueden usarse biopolímeros y polímeros sintéticos GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Se han estudiado polisacáridos de origen vegetal (pectina, almidón) y de origen microbiano (dextrano), proteínas de alimentos (soja, albúmina) y quitosano. Para aplicaciones industriales, algunas nanopartículas de proteína procedente de alimentos son la gelatina, la seroalbúmina bovina, la gliadina y la zeína; que son de interés por su fácil escalabilidad.

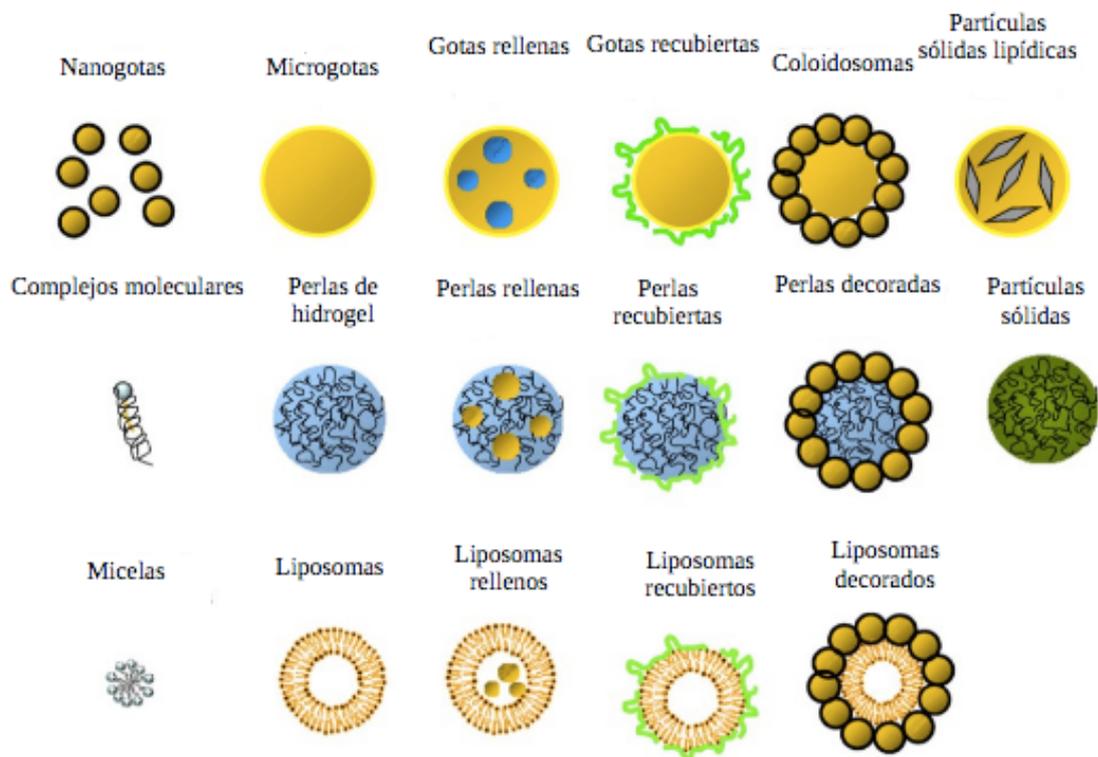


Figura 9. Principales sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos (Sponton, O. E, 2016).

2.5.2. Zeína como material de encapsulación

Dado que en este trabajo uno de los objetivos es utilizar un material biocompatible para la encapsulación de antioxidantes, se describen a continuación y de forma breve las principales características de la zeína, la proteína que se emplea como material encapsulante.

La zeína es la principal proteína de almacenamiento en la semillas de maíz (*Zea mays L.*) y ha sido objeto de estudios muy recientes por tratarse de uno de los pocos biopolímeros hidrofóbicos que han despertado un creciente interés en la industria al no difundir rápidamente en agua, como ocurre con la gelatina, la caseína o el dextrano. Su alta solubilidad en agua hace necesarias alteraciones físico-químicas que permitan crear nuevos enlaces que den lugar a partículas coloidales, etapa innecesaria si se usa la zeína (Patel, A.R. & Velikov, K.P, 2014).

Su alta hidrofobicidad es debida al alto porcentaje de aminoácidos apolares que constituyen más del 50% de su contenido total de aminoácidos: es particularmente rica en ácido glutámico, leucina, prolina y alanina. Esta característica la capacita para formar partículas coloidales por mediación del método de precipitación anti-solvente (SAS): la precipitación de las nanopartículas tiene lugar por cambios en el disolvente al mezclarlo con un segundo disolvente que es miscible en la fase orgánica, pero no es el óptimo para el material disuelto (suelen ser etanol y agua

respectivamente). Se ha demostrado que las concentraciones de etanol y zeína en la disolución son los factores de mayor influencia en el proceso.

Centrándonos en su estructura, si se estudia con un gel de electroforesis SDS-PAGE, se separa en α -, β -, γ -, y δ -zeína. La fracción más abundante es α -zeína, constituyente del 70-85% de zeína total. Las características de sus residuos polares y apolares han sido objeto de estudio para conocer la estructura proteica. Algunos estudios (Argos et al, 1982) apuntan a una estructura cilíndrica con 9 ó 10 α -hélices antiparalelas unidas por puentes ricos en glutamina (*Figura 10A*). Estudios posteriores (Matsushima et al, 1997) proponen un modelo con forma de cinta, más alargado y más flexible, estable gracias a puentes de hidrógeno intracatenarios (*Figura 10B*). Posteriormente (Momany et al, 2006), se propuso una estructura de nueve α -hélices agrupadas de tres en tres y apiladas unas sobre otras (*Figura 10C*); (Padua, G.W. & Guardioli, L.V, 2015).

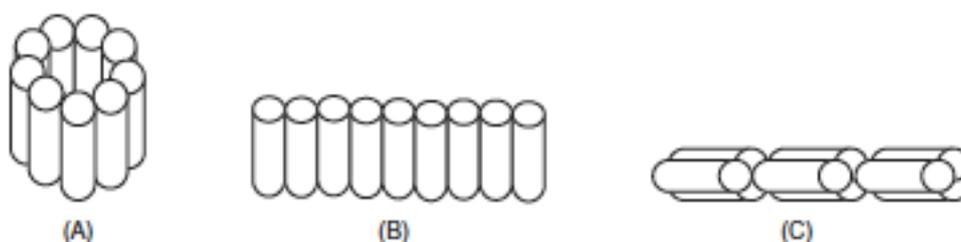


Figura 10. Modelos de la estructura molecular de la α -zeína (Padua, G.W. & Guardioli, L.V, 2015).

En cuanto a las características interesantes en el terreno de la alimentación, esta proteína presenta alta resistencia a las enzimas digestivas y, por ello, se digiere de forma lenta comenzando en el estómago y completándose en el intestino delgado, lo que permite una mayor liberación controlada (Patel, A.R. & Velikov, K.P, 2014). En este contexto, cabe definir la liberación controlada como el mecanismo que permite dirigir uno o varios compuestos a un sitio determinado con condiciones de tiempo y velocidad controladas por medio de difusión, biodegradación o presión osmótica, entre otros (López, A. F. et al, 2011).

También es una proteína biodegradable, en tanto que podría sustituir a otro tipo de materiales que conllevan largos periodos de tratamientos de reciclaje (pues no requiere ningún tipo de tratamiento). Es además un subproducto de la obtención del biodiésel, por lo que su aplicación en otros sectores es un valor añadido para las industrias (Referencia web 10).

3.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1.Muestra

El bagazo de uva que se ha empleado en este estudio es el subproducto procedente de tres variedades de uva tinta (*Vitis vinifera*) que se utilizan en la fabricación del Vino de Cangas. Éstas proceden de la Bodega VidAs, una de las cinco bodegas que trata de aumentar el cultivo de uva autóctona en nuestra comunidad autónoma. Abarca terreno de los concejos de Allande, Ibias, Pesoz, Cangas del Narcea y Tineo.

Las variedades de uva son Verdejo Negro (VN), Carrasquín (CQ) y Albarín Negro (AN) y, además, se utiliza una mezcla de éstas denominada Multivarietal (MV).

Las uvas se secan en estufa durante varios días hasta eliminación total de agua, moliéndose posteriormente en un mortero y envasándose en bolsas de vacío, que se dejan en congelador (-18°C) hasta su posterior uso.

3.2.Reactivos y disoluciones

- Agua destilada (Merck Millipore)
- Etanol absoluto (ACS,VWR Life Science AMRESCO® biochemicals)
- Cloruro de sodio, NaCl (ACS,VWR Life Science AMRESCO® biochemicals)
- Sulfato de magnesio, MgSO₄ (Grado analítico, Merck Millipore)
- Disolución 3,73 x 10⁻³ M de ácido gálico (Grado analítico, Merck Millipore)
- Disolución 0,05 M de carbonato de sodio, NaCO₃ (Grado analítico, Merck Millipore)
- Zeína purificada (Acros Organics™)

Las siglas ACS (*American Chemical Society*), hacen referencia a que el reactivo tiene grado analítico.

3.3.Equipos e instrumentación analítica

Para pesar los reactivos, se utiliza una balanza analítica Mettler PG802-S (Mettler Toledo) y el granatario Mettler AE 163 (Mettler Toledo).

Los ultrasonidos se aplican por medio de un baño de ultrasonidos digital Ultrasons-HD con calefacción (J.P. SELECTA®) y la centrifugación se realiza en la centrífuga Heraeus™ Labofuge 200 (Thermo Fisher Scientific). Los disolventes se eliminan en el rotavapor Heidolph Laborota 4000 (Heidolph Instruments).

Para la agitación, se emplea el agitador magnético LBX H03D (Labbox) y para llevar a cabo ensayos de flujo continuo, la bomba peristáltica Ismatec (ISMATEC S.A).

Las medidas de absorbancia se miden en el espectrofotómetro visible-ultravioleta Cary 60 (Agilent Technologies) con el programa informático Cary UV (aplicación Scan) y el potencial zeta se obtiene en el sistema Zetasizer Nano Z (Malvern Panalytical Ltd) con un software de mismo nombre.

Las imágenes de las nanopartículas de zeína se toman con el microscopio de transmisión electrónica JEOL-JEM 2100 F.

3.4.Extracción de antioxidantes

Tras pesar 2,0 gramos de bagazo de uva directamente extraído de las bolsas de vacío previamente mencionadas, se añade esta cantidad a un matraz de fondo redondo sobre el que se añaden 20 mL del disolvente o la mezcla de disolventes escogidos.

El matraz que contiene la muestra se lleva al baño de ultrasonidos, tapando su boca con papel Parafilm® y sumergiéndolo hasta la mitad en el baño de agua del equipo de ultrasonidos. Se seleccionan 30°C de temperatura y 30 minutos de tiempo como condiciones iniciales.

Al final del proceso de sonicación, el sólido inicial se elimina por decantación y el material líquido contenido en el matraz se transfiere a un tubo cónico de centrifuga de 20 mL de capacidad usando una pipeta Pasteur y se lleva a la centrifuga con el fin de eliminar el material remanente en suspensión. El programa de centrifugación empleado es de 5000 revoluciones por minuto (rpm), aplicado durante 5 minutos.

Se extrae el líquido sobrenadante con una pipeta Pasteur para transferirlo nuevamente al matraz, con cuidado de no arrastrar el *pellet*. El matraz se lleva al rotavapor para la eliminación del disolvente, empleando una temperatura de 45°C (por debajo del punto de ebullición del etanol, $P_{eb}=78,4^{\circ}C$) hasta eliminación completa del mismo.

El sólido remanente en el matraz se redisuelve en 10 mL de etanol, volumen final que se guarda en un tubo de centrifuga dotado de tapa en nevera (4°C) hasta posteriores análisis.

3.4.1.Selección del medio disolvente empleado para la extracción

El primer factor que se decide variar es la proporción de disolventes en la mezcla EtOH:H₂O, manteniendo un volumen final de 20 mL. Se parte en todos los casos de 2,0 gramos de VN, pero se varía la cantidad de etanol que se añade en el matraz. Se emplea:

- Etanol 100%
- Mezcla EtOH:H₂O 1:1
- Mezcla EtOH:H₂O 6:4
- Mezcla EtOH:H₂O 7:3

Estas dos últimas opciones han sido sugeridas en la bibliografía (S.Agustín-Salazar et al, 2014).

Los parámetros del baño de ultrasonidos se mantienen sin cambios: 30°C y 30 minutos de sonicación.

3.4.2. Estudio del efecto de la presencia de sales

El método se conoce como extracción en fase sólida dispersiva: QueChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) y se apoya en el uso de sales que favorecen el reparto de los solutos por un efecto “salting-out”, facilitando un equilibrio entre la fase acuosa y la fase orgánica. Requiere un segundo paso de extracción sólido-líquido para la limpieza del extracto eliminando sales e interferentes.

Siguiendo la metodología empleada por V.M Burin et al. (2014), se prueba el efecto de 4,0 g de MgSO₄ y 1,0 g de NaCl.

Para estudiar el efecto de las diversas cantidades de sales, se prueban las siguientes relaciones: 2,0 g de MgSO₄ y 0,5 g de NaCl en una extracción y 1,0 g de MgSO₄ y 0,25 g de NaCl en otra.

Los parámetros del baño de ultrasonidos se mantienen sin cambios.

3.4.3. Estudio de la variación del tiempo de sonicación

Con objeto de comprobar la influencia del tiempo de sonicación en el proceso de extracción, se llevan a cabo experimentos empleando 15, 35 y 45 minutos de sonicación, manteniendo la temperatura constante de 30°C.

3.4.4. Extracción simple y extracciones sucesivas

La metodología empleada hasta el momento se repite en dos etapas de extracción sucesiva, esto es, una vez se ha realizado la primera, al residuo sólido se añaden otros 20 mL de la mezcla de disolventes escogida y se somete al tratamiento de sonicación. Los volúmenes se guardan en tubos separados, distinguiendo las etapas de fraccionamiento.

A su vez, estos datos se comparan con una nueva extracción simple realizada en una sola fase pero con el mismo volumen final (40 mL) de mezcla de disolventes. Se almacena en un solo tubo puesto que el paso de sonicación se realiza una vez.

El fraccionamiento se decide hacer con mismos volúmenes de agua para comprobar su rendimiento en el proceso. Los parámetros del baño de ultrasonidos se mantienen sin cambios.

3.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el método Folin-Ciocalteu

Se preparan, en primer lugar, las disoluciones de ácido gálico y de carbonato de sodio. Se pesan 0,005 g de ácido gálico que se llevan a un volumen total de agua destilada de 10 mL en un matraz aforado y se pesan 0,75 g de NaCO₃ que se llevan a otro matraz aforado de volumen total 10 mL. Se agitan para que se disuelva completamente el sólido.

Se preparan cinco patrones para construir la recta de calibrado variando las cantidades de ácido gálico de modo que se obtengan concentraciones finales en el intervalo de: $1,16 \times 10^{-5}$ y $1,16 \times 10^{-4}$ M. Todos los matraces contienen una concentración final de NaCO_3 0,05 M y una concentración final del reactivo de Folin del 1% v/v. Las disoluciones se llevan a volumen final con agua destilada.

Las muestras, dada su alta concentración en antioxidantes, deben ser previamente diluídas en una relación 1:10 (1 mL de extracto + 9 mL de EtOH). Para su medida, se preparan disoluciones de manera tal que resulten ser 1% v/v del reactivo de Folin, 5% v/v en muestra y 0,05 M en NaCO_3 .

Antes de la medida de absorbancia a $\lambda=760$ nm en el espectrofotómetro UV-Vis, todas las disoluciones se dejan reaccionar una hora en ausencia de luz.

Para medir la capacidad antioxidante a las muestras, las medidas se realizan pasadas 24 horas tras la realización del proceso de extracción y haberse mantenido el extracto de las muestras en nevera.

3.6. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes extraídos

Se comprueba la estabilidad del extracto conteniendo los antioxidantes provenientes de las muestras en dos condiciones: a bajas temperaturas y condiciones ambientales estables. En el caso de bajas temperaturas, la refrigeración se realiza a 4°C en nevera mientras que para la estabilidad de las condiciones ambientales, se utiliza una estufa a 25°C.

3.7. Encapsulación en nanopartículas de zeína

3.7.1. Preparación de nanopartículas

Siguiendo el protocolo de J.C.Chong Cheung et. al (2017) con ligeras modificaciones, se pesan 2,50 gramos de zeína que se llevan a disolución en 100 mL de EtOH:H₂O 9:1, manteniéndolo en agitación magnética durante una hora. Para la formación de las nanocápsulas, se estudiaron tres procedimientos:

Ensayo A: Síntesis en una sola etapa

En un vaso de precipitados conteniendo 30 mL de agua destilada en agitación se añaden, simultáneamente, 10 mL de la disolución de zeína y el extracto de la muestra conteniendo los antioxidantes.

Ensayo B: Síntesis con adiciones discretas

En un vaso de precipitados conteniendo 30 mL de agua más el volumen deseado del extracto de las muestras conteniendo los antioxidantes en agitación, se añaden 10 mL de disolución de zeína gota a gota con control manual (*Figura 11*).

La adición del volumen final de zeína se completa en un tiempo inferior a 2 minutos.

Ensayo C: Síntesis en continuo

En un vaso de precipitados conteniendo 30 mL de agua más el volumen deseado del extracto de las muestras conteniendo los antioxidantes en agitación, se van adicionando los 10 mL de zeína de manera continua (mediante el empleo de una bomba peristáltica), con un caudal constante de 2 mL/min.

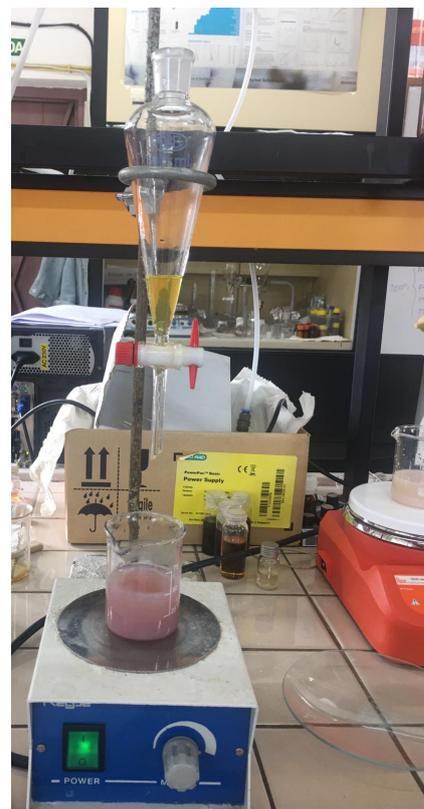


Figura 11. Adición de zeína con embudo de decantación.

Con el fin de realizar estudios comparativos de la síntesis, éstas se llevaron a cabo siguiendo los mismos protocolos pero en ausencia del extracto de muestra conteniendo los antioxidantes (nanopartículas vacías).

Una vez se han sintetizado las nanopartículas, en todos los ensayos se elimina el etanol en el rotavapor tras dos horas y media de la disolución en agitación y el resto de muestra líquida se lleva a la nevera, tapando la boca del matraz con papel Parafilm® para su conservación.

3.7.2. Estudio espectrofotométrico UV-Vis

Los procesos de síntesis se siguen realizando los espectros de absorbancia UV-Vis en las distintas etapas. Se registran los espectros de los antioxidantes y de la zeína por separado, antes de iniciar el procedimiento de la formación de las nanocápsulas. Además, se registran los espectros de la mezcla de agua con antioxidantes en agitación y de la mezcla final, esto es, donde se encuentran las nanopartículas de zeína ya formadas conteniendo antioxidantes en su interior.

Con fines comparativos, las muestras se someten a diluciones 1:30, 1:100 y 1:300, respectivamente.

3.7.3. Estudio del tamaño de las nanopartículas

Se toma una muestra de 1 mL de cada una de las nanopartículas sintetizadas y se transfieren a un tubo Eppendorf®, sometiéndolas a un proceso de liofilización. Las características morfológicas de las nanopartículas liofilizadas se estudian usando un microscopio de transmisión electrónica.

Se toman imágenes tanto de las nanopartículas vacías como de las nanopartículas en las que se han incorporado los antioxidantes. Para obtenerlas, se deposita una pequeña cantidad del producto liofilizado en una rejilla de cobre con una película de carbono amorfo.

Para conocer el tamaño de las nanopartículas a partir de las imágenes, se emplea el programa informático ImageJ, calculándose la media y la desviación típica.

3.7.4. Potencial zeta de las nanopartículas

Se toma unos μL de cada una de las nanopartículas sintetizadas y se transfieren a la celda de flujo del equipo, procediéndose a las medidas.

4.RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

4.1.Cuantificación de la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en el bagazo de uva

El objetivo principal de este estudio es conocer la cantidad de compuestos antioxidantes que se pueden aprovechar para fines industriales a partir del bagazo de uva, subproducto de la industria vitivinícola que se utiliza como materia prima en este trabajo. Este subproducto se desecha sin darle ningún tipo de uso, por lo que sería interesante encontrar vías de aprovechamiento de bagazo para reducir su nivel (que genera sobrecostes a la industria vitivinícola) e incrementar los beneficios económicos.

Por esta razón, debe elegirse un método de cuantificación de estos compuestos bioactivos, escogiéndose el método Folin-Ciocalteu, muy utilizado para realizar análisis de compuestos polifenólicos en distintos tipos de extractos vegetales. Esta técnica, desarrollada a mediados de los años 60, se basa en una reacción redox (oxidación-reducción) en la que tiene lugar la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, que es una mezcla de dos ácidos (fosfomolibdico y fosfotúngstico) causantes de la coloración amarilla del compuesto. En la oxidación, se genera un complejo que presenta coloración azul a $\lambda=765$ nm, directamente proporcional a la concentración de antioxidantes de la muestra estudiada (Figura 12), (Muñoz-Bernal Ó.A et al, 2017).

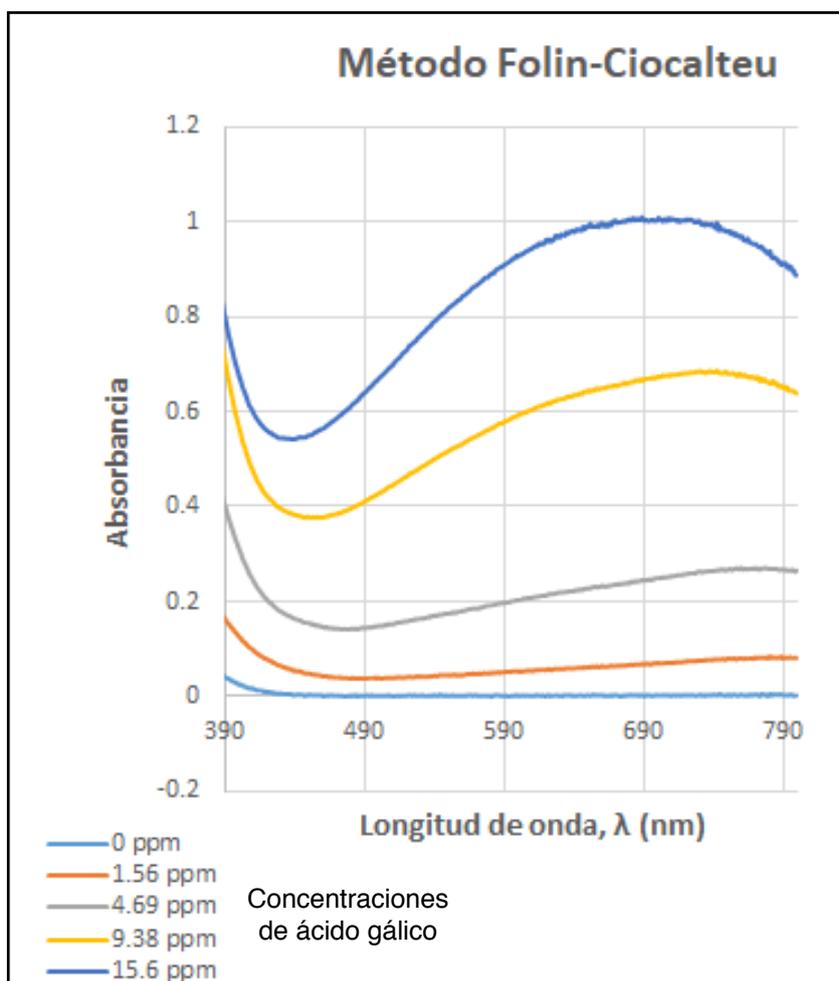


Figura 12. Representación de la absorbancia del método Folin-Ciocalteu. Las concentraciones (0 ppm - 15.6 ppm de ácido gálico) corresponden a los patrones preparados en este trabajo.

Esta metodología se ha mantenido invariable con el paso de los años por mostrar, en general, gran exactitud y sencillez. Además, ha permitido obtener buenos resultados en trabajos previos realizados por el grupo de investigación RECOMOL, dentro del cual se ha realizado este trabajo. En los últimos años, se ha aplicado a la cuantificación de compuestos bioactivos en la magaya de manzana, subproducto de la industria sidrera que se quiere reducir por su impacto medioambiental (Moreira B, 2017; Liu W, 2017).

El bagazo de uva es un material con presencia de distintos tipos de compuestos con actividad antioxidante, por lo que no es posible utilizar uno de ellos como patrón para la determinación de la concentración en la muestra. En su lugar, se utiliza el ácido gálico como estándar para hacer una curva de calibrado al ser una sustancia estable y relativamente barata. Existen estudios que han demostrado que la respuesta del ácido gálico es equivalente a la mayoría de las sustancias polifenólicas presentes en el vino (Waterhouse, A.1999).

En este caso, se preparan cinco patrones en el intervalo $1,16 \times 10^{-5}$ y $1,16 \times 10^{-4}$ M de concentración final de ácido gálico (Figura 13). Una vez medidas sus absorbancias, se utilizan los valores obtenidos a $\lambda=765$ nm para construir la curva de calibrado (Figura 14).

El factor de regresión (R^2) de esta curva es cercano a 1 ($R^2=0,9968$). Este factor refleja la bondad del ajuste del modelo a la variable estudiada así que, cuanto más se acerca a 1 este valor, mejor es el ajuste a la concentración de antioxidantes en el bagazo. Por lo tanto, el modelo es bastante fiable.

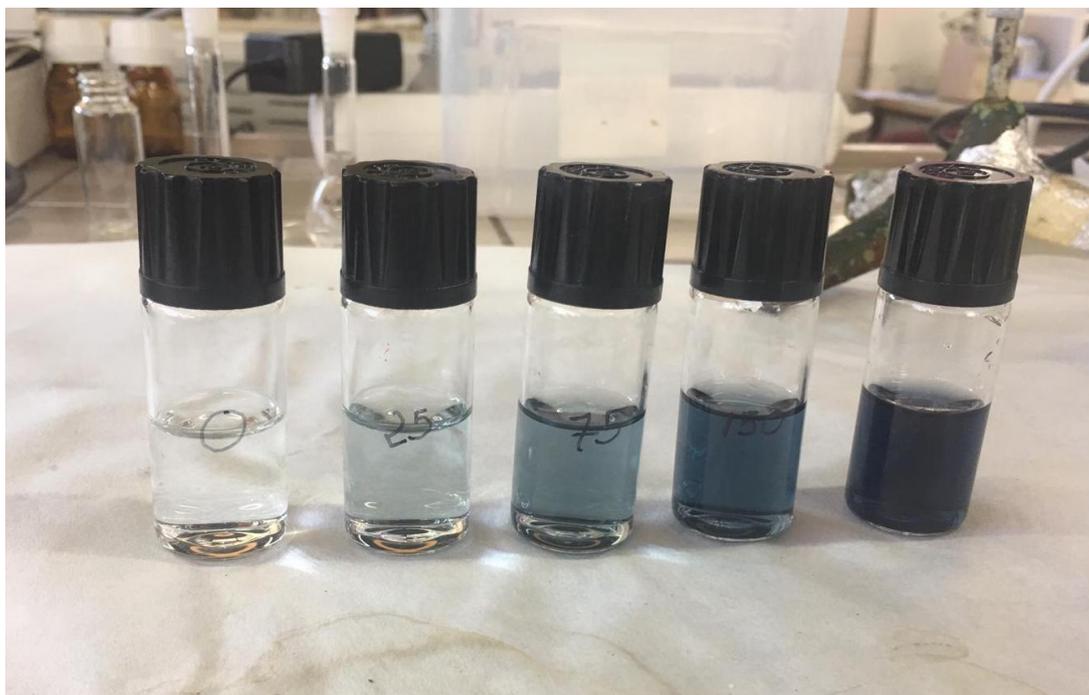


Figura 13. Patrones con concentraciones crecientes de ácido gálico que sirven para construir la curva de calibrado del método Folin-Ciocalteu.

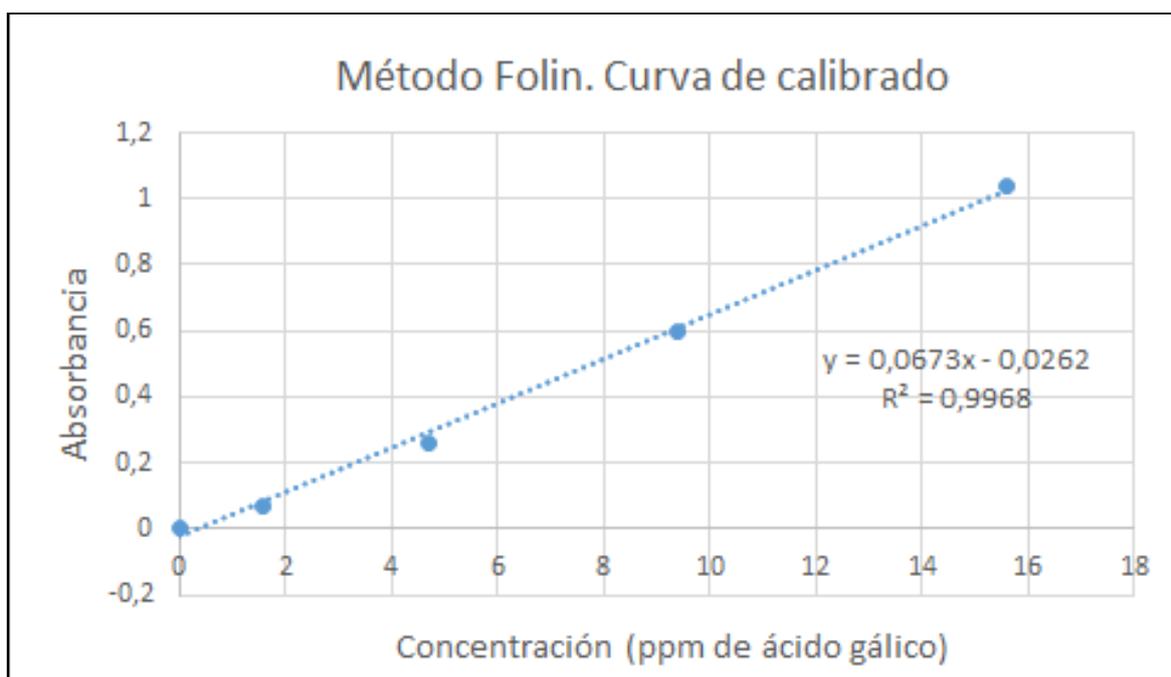


Figura 14. Curva de calibrado del método Folin-Ciocalteu.

El modelo de regresión lineal es óptimo para nuestro estudio, pues el intervalo que interesa para obtener las concentraciones de antioxidantes es lineal y, por ello, mayor absorbancia indica mayor concentración. La recta tiene una ecuación de $y = 0,0673x - 0,0262$ (0,0673 es la pendiente de la recta y 0,0262 la ordenada en el origen); donde la variable 'y' es la absorbancia medida en el espectrofotómetro UV-Vis y la variable 'x' es la concentración, expresada en equivalentes de ácido gálico por ser el estándar.

Con el fin único de evitar irreproducibilidad al realizar diversas extracciones, se opta por preparar los patrones del método cada día en el momento en el que se van a realizar las medidas de las muestras.

4.2.Optimización de la extracción de antioxidantes

Se busca optimizar la extracción de los antioxidantes a partir del bagazo de uva mediante el estudio de algunos parámetros que pueden influir en el proceso, como son el tiempo de sonicación o la mezcla de disolventes utilizada. Este paso se realiza porque la metodología que resulte adecuada a nivel de laboratorio podría estudiarse para aplicación a escala industrial con el fin de aprovechar este subproducto como fuente de compuestos bioactivos, que ya se ha mencionado que se utilizan en campos de la industria muy variados.

Como material de partida, se parte siempre de la misma cantidad de bagazo (2,0 gramos) para que las variaciones no sean nunca función de la cantidad de muestra sólida. Se comienza utilizando una variedad, en este caso, Verdejo Negro (VN).

En el proceso de extracción, se combina la extracción sólido-líquido (con disolventes orgánicos) asistida por ultrasonidos para aumentar el rendimiento del proceso y obtener un mayor porcentaje de compuestos bioactivos.

4.2.1. Elección del medio disolvente

El medio disolvente en el que se va a trabajar para llevar a cabo la extracción sólido-líquido es el primer parámetro que se estudia.

En la bibliografía consultada (S. Agustín-Salazar et al, 2014), se utilizan disolventes orgánicos, entre los que se plantean el etanol (EtOH), el metanol (MeOH) y la acetona (ACE). Las combinaciones que llevan a mejores resultados son EtOH:H₂O 6:4, MeOH-H₂O-ACE 3:3.5:3.5 y EtOH:H₂O 7:3. La segunda opción se descarta al usar metanol, un compuesto más agresivo para el medio ambiente que el etanol. Los estudios más recientes buscan sustituir los solventes más agresivos con el medio ambiente para su preservación. Por otro lado, se están usando tres disolventes, lo que resulta ser una opción menos económica que las otras (que usan tan solo dos). De esta forma, se procede a utilizar EtOH en las otras dos opciones, esto es, EtOH:H₂O 6:4 y 7:3.

Además, el agua es uno de los disolventes más baratos que existen en el mercado y se prueba a aumentar su proporción en la mezcla con el objetivo de reducir costes de disolventes en el proceso de extracción. Se estudia la mezcla EtOH:H₂O 1:1.

Por los buenos resultados obtenidos con el EtOH y su menor impacto medioambiental cuando se le compara con otros disolventes orgánicos, se estudia su uso como único disolvente (EtOH 100%).

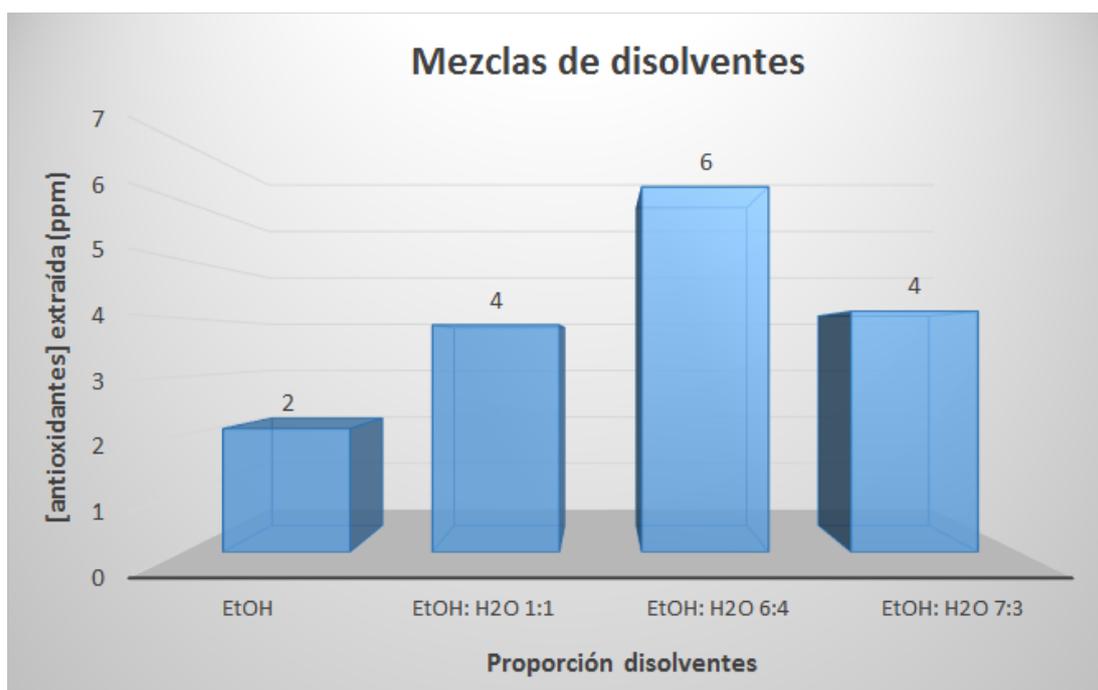


Figura 15. Comparación de las mezclas de disolventes para optimizar el proceso de extracción de antioxidantes.

Como se puede ver en la *Figura 15*, una combinación de etanol con agua da lugar al doble de concentración de antioxidantes extraídos que el etanol por sí solo, por lo que se descarta el uso de este último. Esto beneficiaría a las industrias al realizar menos inversiones en los disolventes utilizados (pues el agua tiene un precio más bajo que el etanol).

Acorde con la bibliografía, las mejores mezclas son EtOH:H₂O 6:4 y 7:3 y, entre éstas, la primera resulta en un 30% más de rendimiento en la extracción de antioxidantes.

En consecuencia, se continúan posteriores ensayos utilizando una mezcla de disolventes EtOH:H₂O 6:4.

4.2.2. Presencia de sales

El método QueChERS es muy efectivo al involucrar el proceso de “salting-out”, que favorece la extracción. Por ello, en este trabajo se plantea su uso para la mejora del rendimiento del proceso estudiado.

Las sales que se decide añadir son el MgSO₄ para la reducción del contenido de agua en la muestra y el NaCl para aumentar el rendimiento del proceso (ésta es usada en la mayoría de los casos).

En la bibliografía consultada (V.M Burin et al, 2014), se utilizan 4,0 gramos de MgSO₄ y 1,0 gramos de NaCl, por lo que se toma esta cantidad para el trabajo. Se estudian también otras cantidades, pero en igual relación (4:1) para hacer una comparativa de los resultados: 2,0 g de NaCl y 0,5 g de MgSO₄ y 1,0 g de NaCl y 0,25 g de MgSO₄, respectivamente.

En los gráficos que siguen esta explicación, se sigue la siguiente notación (*Tabla 1*):

Tabla 1. Notación de las extracciones realizadas con diferentes cantidades de sales.

Notación	Cantidad MgSO ₄ (g)	Cantidad NaCl (g)
4 – 1	4,0	1,0
2 – 0.5	2,0	0,50
1 – 0.25	1,0	0,25

Este ensayo se hace por duplicado, al no tener datos para comparar en la bibliografía consultada y por la ya mencionada irreproducibilidad de la extracción en el baño de ultrasonidos.

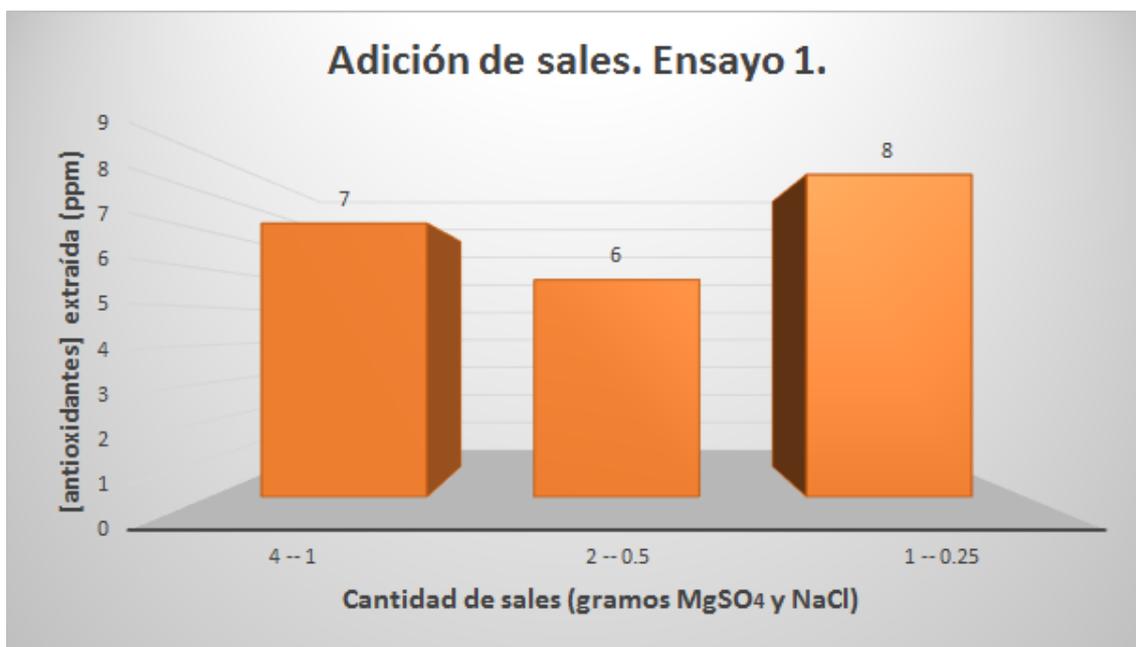


Figura 16. Primer ensayo para comprobar la influencia de distintas cantidades de sales en la extracción.

En ambos ensayos (*Figuras 16 - 17*), se puede ver un incremento de concentración respecto a los ensayos sin adición de sales (*Figura 15*). Por este motivo, se concluye que la adición de sales da lugar a mejoras en la extracción. En la bibliografía consultada, su uso separado de la extracción sólido-líquido da menores rendimientos que si se combinan, como en este trabajo, ambos métodos.

En el primer ensayo (*Figura 16*), se obtienen mejores resultados con la concentración de sales más baja, esto es, con 1,25 gramos totales. Sin embargo, no se encuentra una tendencia directa o inversamente proporcional a medida que decrece la concentración de sales: hay un decrecimiento inicial, seguido por un crecimiento de la concentración de antioxidantes al disminuir la concentración de sales. Por ello, se decide repetir el ensayo con las mismas concentraciones y bajo las mismas condiciones estudiadas.

En el segundo ensayo (*Figura 17*), los resultados se oponen a lo visto anteriormente. La concentración óptima sería la intermedia.

Su efecto sí ha resultado ser positivo, pero habría que realizar un estudio mucho más exhaustivo para conocer realmente las razones por las que no existe una tendencia definida. No obstante, la cantidad de sales que presenta un valor estable en ambos ensayos es la más baja, por lo que se decide escogerla, esto es, 1,0 gramos de MgSO₄ y 0,25 gramos de NaCl. Su adición se realiza en los ensayos posteriores.



Figura 17. Segundo ensayo para comprobar la influencia de distintas cantidades de sales en la extracción.

4.2.3. Influencia del tiempo de sonicación

En la industria, se busca alcanzar un equilibrio entre la rentabilidad del proceso en cuanto a obtención de producto y en base a factores como los costes energéticos y la mano de obra, que están directamente relacionados con el tiempo que dura el proceso.

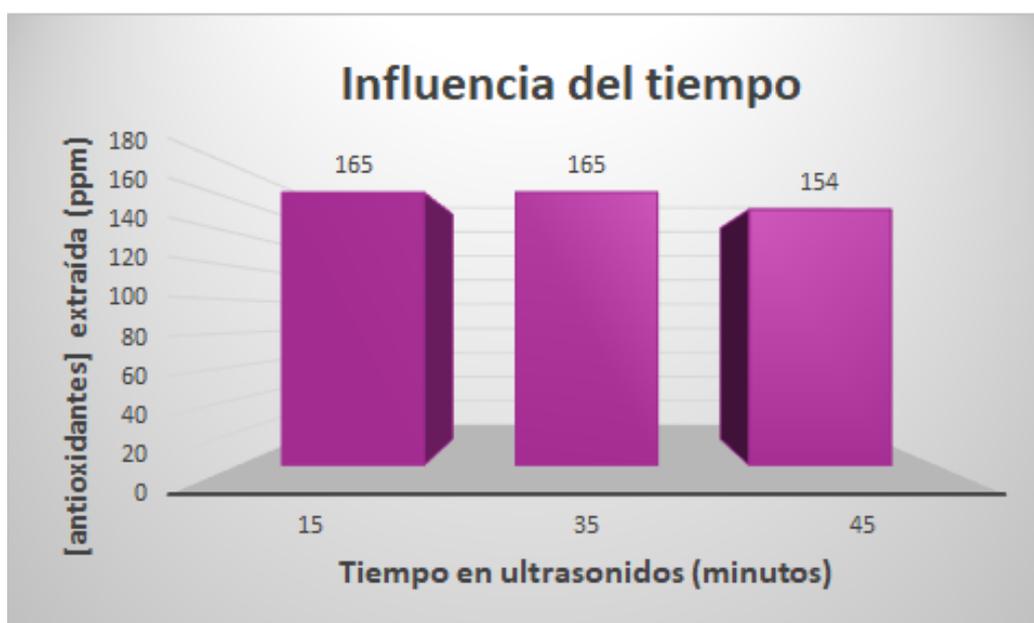


Figura 18. Ensayo con diferentes tiempos de sonicación.

Como se ha mencionado anteriormente, el uso del baño de ultrasonidos mejora la extracción de antioxidantes. Se ha fijado como tiempo inicial 30 minutos, pero se desea estudiar si ligeras

variaciones en el tiempo de sonicación serían significativas en cuanto a rendimiento del proceso se refiere. Con el fin de hacer la extracción de forma rápida, se prueba a fijar 15, 35 y 45 minutos (*Figura 18*).

De los resultados obtenidos, se puede inferir que no existen grandes diferencias entre los tiempos escogidos, por lo que se decide fijar el inicial (30 minutos) para posteriores ensayos. El tiempo es un factor importante de optimizar, pero existen autores que sugieren tiempos muy cortos de extracción mientras que otros se decantan por ensayos duraderos (de bastantes horas).

Estudios consultados (Spigno G. et al, 2007) confirman que antes de las 20 horas se alcanza su máximo de extracción y pasado este tiempo, la concentración de polifenoles extraídos empieza a disminuir. Este fenómeno podría deberse a reacciones de degradación o bien de polimerización de estos compuestos, por lo que habría que hacer un ensayo a tiempo prolongado para confirmar las variaciones por el factor tiempo.

Si fuera de interés para otras aplicaciones, podrían estudiarse tiempos superiores a 45 minutos y ver si la ligera reducción de la concentración que se ve a este tiempo en la *Figura 18* es real o se debe a la incertidumbre de la medida.

4.2.4. Estudio de la extracción en etapas sucesivas

Siguiendo con la rentabilidad del proceso si se llevara a nivel industrial, otra de las posibilidades que se estudian es la realización de la extracción empleando varias etapas. Se sabe que, en las extracciones líquido-líquido, si se desea extraer un soluto de una disolución, es preferible utilizar pequeñas porciones del disolvente en varias etapas que una etapa de extracción con el mismo volumen total de disolvente. Por este motivo, cuanto mayor es el número de extracciones con volúmenes pequeños de disolvente, mayor es la cantidad de producto extraído.

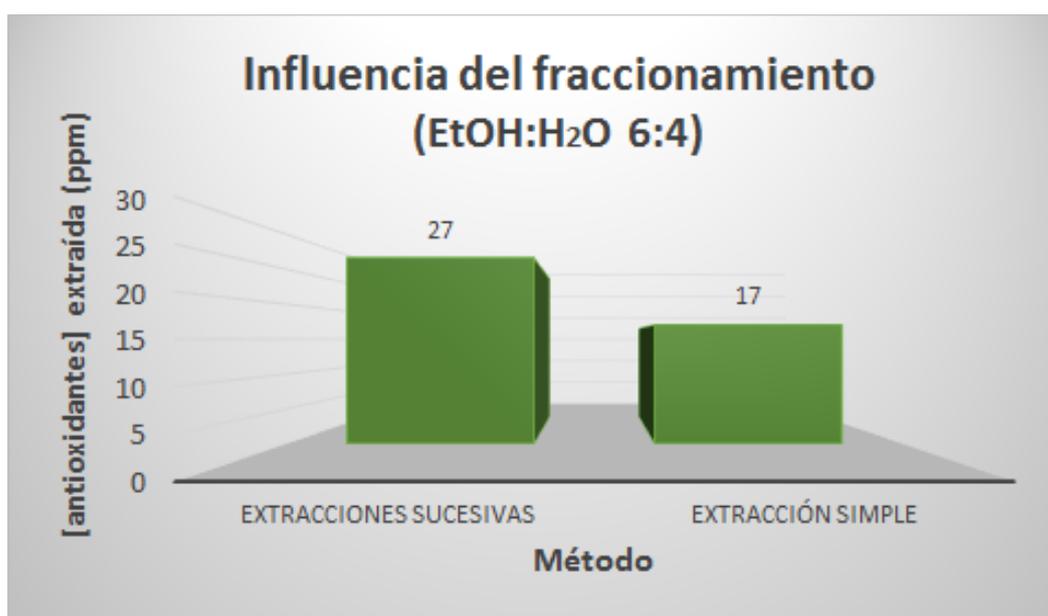


Figura 19. Comparativa del proceso de extracción en una sola etapa o en varias (EtOH:H₂O 6:4).

Es por ello que se pretende verificar que este fenómeno se extiende, en nuestro caso, a la extracción sólido-líquido. Para ello, se diseñaron dos experimentos: un experimento con una única etapa de volumen de extracción 40 mL y otro empleando dos etapas, de 20 mL cada una.

En la *Figura 19*, puede verse como el tratamiento de extracción realizado en varias etapas duplica el rendimiento de extracción de los compuestos antioxidantes extraídos cuando se compara a la extracción simple. Este fenómeno podría indicar que, en cada etapa, se ha alcanzado un grado de saturación en relación al tiempo de tratamiento empleado que no permite extracción de más compuestos. La suma de ambas etapas sumaría así el doble que la extracción que se realiza en una sola etapa.

En conclusión, desde el punto de vista del rendimiento del proceso, es evidente que la extracción en dos etapas mejora la metodología y abarata el coste del disolvente (pues se haría recircular el mismo), pero la implicación de una nueva etapa hace que el procedimiento sea más largo.

Se estudia la posibilidad de reducir los costes del disolvente llevando a cabo el mismo procedimiento pero, en vez de utilizar la mezcla EtOH:H₂O 6:4, probando con agua destilada (*Figura 20*). Al ser un disolvente más barato pero menos eficaz que la mezcla mencionada, se desea comprobar si su rendimiento aumentaría al dividir el proceso en dos etapas sucesivas.

El fraccionamiento sí tiene, nuevamente, un efecto positivo en el proceso, pero las diferencias entre ambas metodologías son menores puesto que la concentración de antioxidantes extraída es mucho menor que en el caso anterior, por lo que se concluye que el agua es buen disolvente para realizar la extracción pero funciona mejor en combinación con etanol, como se ha demostrado previamente.

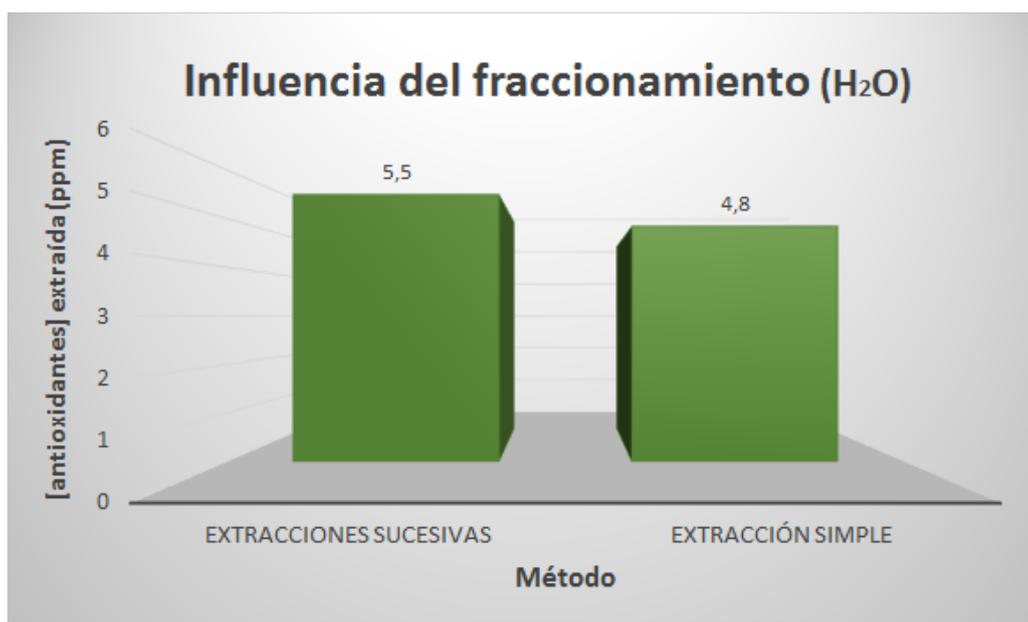


Figura 20. Comparativa del proceso de extracción en una sola etapa o en varias (H₂O).

Se presentan a continuación los parámetros óptimos para la extracción de antioxidantes una vez se han realizado los estudios de diferentes parámetros con influencia en el proceso (*Tabla 2*):

Tabla 2. Parámetros óptimos para la extracción de antioxidantes provenientes de bagazo de uva.

Parámetro	
Medio disolvente	Mezcla EtOH:H ₂ O 6:4
Adición de sales	Positiva. 1,0 g de MgSO ₄ y 0,25 g de NaCl
Tiempo	No hay diferencias. 30 minutos
Tipo de extracción	Etapas sucesivas

4.2.5. Aplicación de la metodología desarrollada a otras variedades de uva

Una vez se han decidido los parámetros experimentales (*Tabla 2*) para la extracción de antioxidantes a partir de bagazo de uva de la variedad Verdejo Negro, se lleva a cabo el mismo procedimiento con el resto de variedades (*Figura 21*), es decir, tanto con Carrasquín y Albarín Negro como con la mezcla de las tres (Multivarietal).

Como puede verse en la presente figura, no se han observado diferencias importantes de concentración de antioxidantes al final del proceso de extracción. Esta falta de variabilidad en los resultados podría entenderse al tratarse de variedades de uvas tintas y que se cosechan en la misma extensión de viñedos (Bodega VidAs), por lo que crecen bajo las mismas condiciones climáticas de temperatura, humedad y presión de aire.

Sería interesante abordar este tema de manera más amplia extendiendo el estudio a las mismas variedades de uva en diferentes entornos. Se podría trabajar también con más variedades de uva y cultivadas en diferentes viñedos.

De esta forma, se esperarían resultados diferentes si se confrontase una de las variedades de este trabajo con la misma variedad, pero proveniente de otra bodega con diversa localización y, en consecuencia, con condiciones climáticas y tratamientos en la cosecha diferentes.

La concentración de antioxidantes podría verse afectada al comparar una de estas variedades de uva tinta con una variedad de uva blanca de la misma bodega, pues su composición y sus propiedades son diferentes.

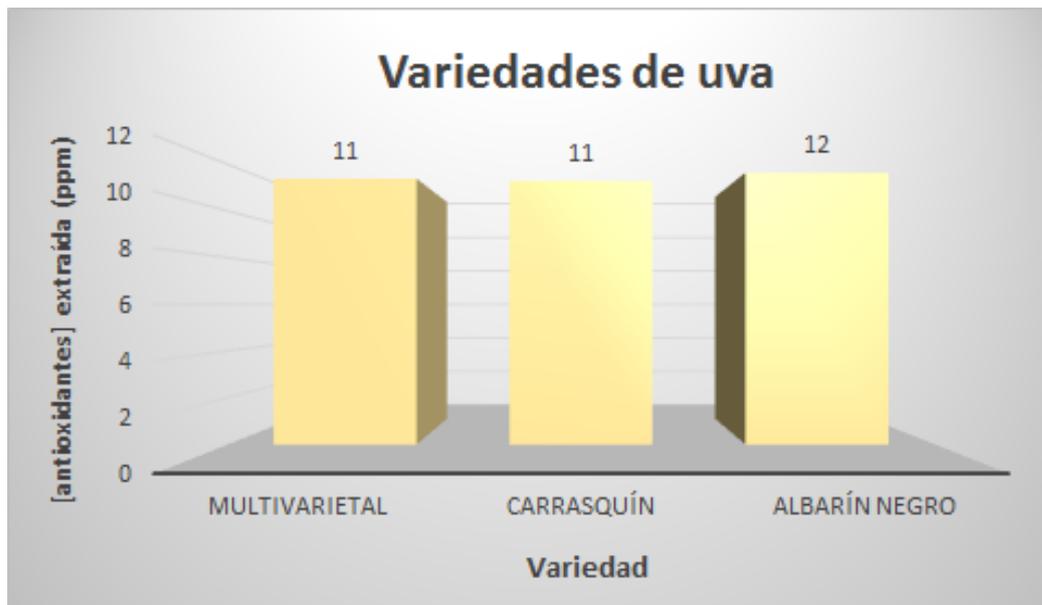


Figura 21. Comparativa del proceso de extracción en bagazo proveniente de otras variedades de uva.

4.3. Estabilidad de los antioxidantes a diferentes temperaturas

Es probable que los antioxidantes obtenidos no se empleen inmediatamente o que su empleo sea en otras empresas, así que su conservación reviste importancia para no disminuir la calidad del producto, pero sin aumentar los costes debidos a un almacenamiento con necesidades específicas.

Es por este motivo que se decide llevar a cabo un estudio de la estabilidad de los antioxidantes una vez se han extraído del bagazo de uva.

El estudio se hace a diario, tomando una medida cada 24 horas en el espectrofotómetro UV-Vis y se obtiene la concentración de compuestos bioactivos con el método Folin-Ciocalteu. Las extracciones se realizan con los parámetros óptimos escogidos anteriormente (*Tabla 2*) a excepción de la extracción en etapas sucesivas, evitando ralentizar el proceso.

Ensayo 1 de estabilidad: Muestras independientes almacenadas en disolución

En el primer ensayo realizado, se hacen dos extracciones con los parámetros escogidos y con iguales condiciones de temperatura y tiempo de sonicación. El material de partida (bagazo de uva de variedad VN) es diferente. Cada uno de los extractos se conserva a una temperatura: tras sacar cada matraz del rotavapor, el extracto húmedo se guarda en nevera (4°C) o en estufa (25°C). La conservación en nevera representa bajas temperaturas mientras que la conservación en estufa representa temperatura ambiente.

Las medidas se realizan a las 24 horas de hacer la extracción (día 1), 48 (día 2), 72 (día 3) y 96 horas (día 4) respectivamente (*Figura 22*).

Como el material del que se parte no es el mismo, se ha decidido normalizar los valores para compararlos fácilmente (*Tabla 3*).

Para ambas temperaturas de conservación, se ve una disminución de la concentración de antioxidantes entre las 24 y las 48 horas, de lo que se deduce que la mayor pérdida de antioxidantes tiene lugar en estas primeras 48 horas. El resto de días poseen mayor estabilidad, por lo que habría que hacer un ensayo de mayor duración para conocer cuál es el momento en el que se pierde por completo la concentración de antioxidantes obtenida.

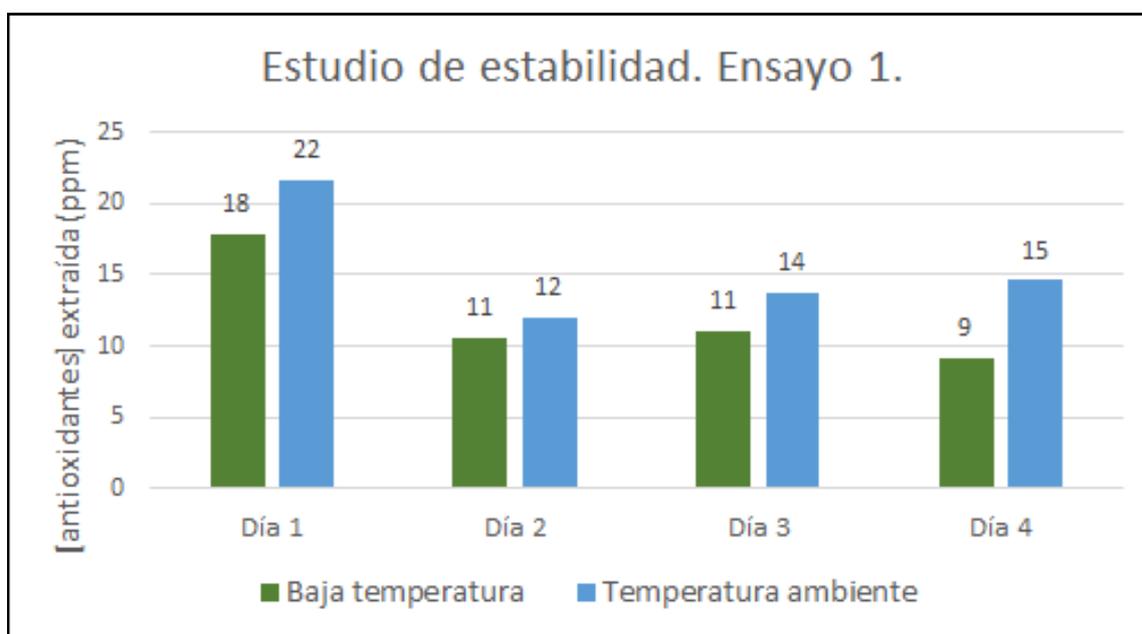


Figura 22. Primer ensayo de estudio de la estabilidad en los antioxidantes, tanto a bajas temperaturas como a temperaturas ambiente. Duración: 4 días.

Tabla 3. Valores de concentración de antioxidantes (ppm) normalizados a bajas temperaturas y T ambiente.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Antioxidantes a T Bajas (%)	100	61	61	50
Antioxidantes a T Ambiente (%)	100	55	64	68

En el matraz que se conserva a bajas temperaturas, existe más estabilidad con el paso de los días que en el matraz a temperatura ambiente, donde existe un aparente crecimiento de la concentración de antioxidantes a medida que avanza el tiempo. Esto no es posible puesto que no se añade más sólido ni disolvente con el paso de los días. Este leve aumento podría relacionarse con la concentración del sólido al perderse progresivamente disolvente pues, pese a tapar la boca del matraz para su almacenamiento, siempre existe un porcentaje de evaporación que puede falsear los resultados.

Como estos resultados no son concluyentes, se decide llevar a cabo un segundo ensayo.

Ensayo 2 de estabilidad: Muestra única almacenando el extracto seco

En este segundo ensayo, se varía el material de partida para evitar normalizar los resultados que se obtienen diariamente y hacerlos comparativos, como se ha hecho en el Ensayo 1. Inicialmente, se parte del mismo material y el volumen de extracto resultante se divide en dos matraces: la mitad del volumen total del extracto se conserva a bajas temperaturas y, la otra mitad, a temperatura ambiente. A partir de aquí, se estudian como dos muestras diferentes.

También se modifica la forma de conservación del extracto: en vez de almacenarlo como extracto húmedo (en 10 mL de EtOH), se guarda como extracto seco. Se elimina el disolvente para su conservación y se añade de nuevo cada día antes de preparar la muestra para medirla con el método Folin-Ciocalteu, pues la manipulación del extracto en estado sólido es más sencilla.

Dada la irreproducibilidad previamente mencionada de esta metodología, se decide tomar una medida de la concentración de antioxidantes en el mismo día que se realiza la extracción para comprobar si hay una disminución significativa en las primeras 24 horas de conservación de los antioxidantes extraídos.

El extracto se mide en el momento en el que se obtiene (día 0), a las 24 (día 1), 48 (día 2), 72 (día 3) y 144 horas (día 6) del proceso de extracción (*Figura 23*).

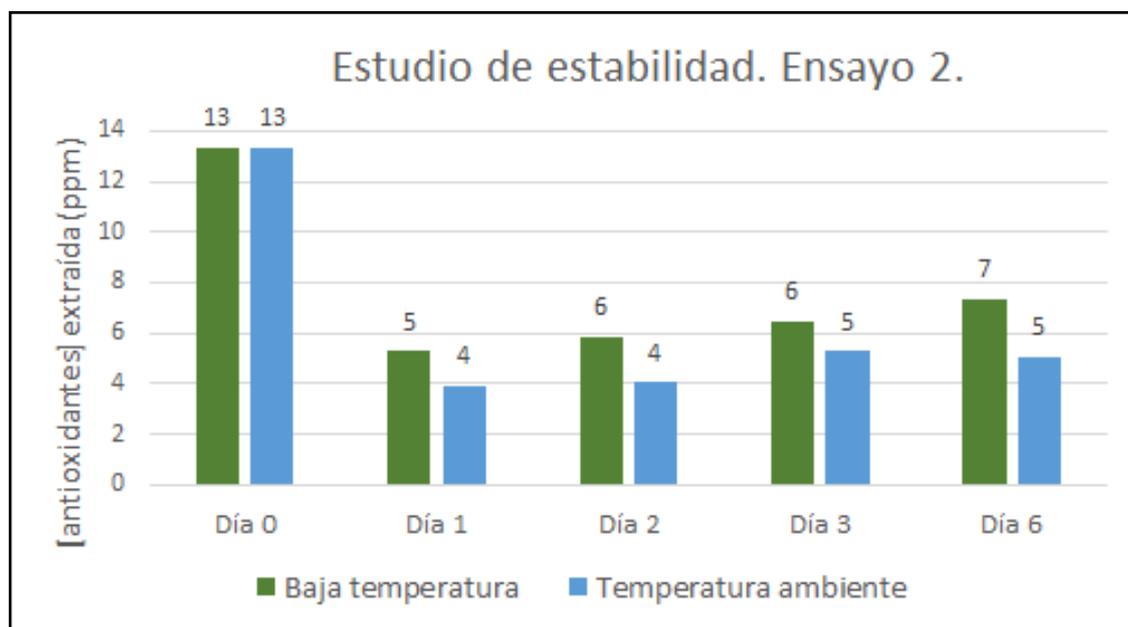


Figura 23. Segundo ensayo de estudio de la estabilidad en los antioxidantes, tanto a bajas temperaturas como a temperaturas ambiente. Duración: 6 días.

Nuevamente, se puede comprobar que, en ambos casos, en las primeras 24 horas se encuentra el momento de mayor degradación de los antioxidantes, por lo que es recomendable su uso cuando se han obtenido o bien, contemplar una opción de conservación de éstos (como es la

encapsulación, mencionada anteriormente). El resto de los días, la concentración de antioxidantes se mantiene más estable.

Podría hacerse un ensayo que midiera la concentración de estos compuestos bioactivos cada 48 ó 72 horas, pero de mayor duración (por ejemplo, 15 días) para estudiar así su estabilidad y los posibles factores de influencia en ésta.

Las bajas temperaturas (4°C) conllevan a una mejor conservación de los compuestos bioactivos extraídos que las temperaturas ambientales, que podrían permitir la degradación de los antioxidantes o la polimerización de éstos.

4.4. Encapsulación de antioxidantes en nanopartículas de zeína

Los usos de la nanotecnología se han extendido a todo tipo de industrias y, concretamente, en la industria alimentaria se centran en la calidad y seguridad alimentaria y en el desarrollo de nuevos productos. En cuanto al desarrollo de nuevos productos, puede afirmarse que la encapsulación es una de las vías que permite la mejora de los alimentos de forma que no pierdan su valor nutricional ni su estabilidad bajo condiciones de luz, oxígeno, etc. y se enmascaren las características organolépticas. El uso de sistemas de liberación controlada a esta escala permite controlar la liberación de un agente determinado (en el caso de este trabajo, los antioxidantes procedentes del bagazo de uva) a la matriz en la que se encuentra encapsulado (Dasgupta, N. et al, 2015).

Cuando hemos obtenido los compuestos antioxidantes a partir del bagazo de uva, se escogen de entre los principales sistemas de encapsulación para introducción en alimentos antes mencionados las nanopartículas para realizar este estudio. Se toma esta decisión por tratarse de un sistema fácilmente detectable y de sencilla caracterización morfológica (con la ayuda de la microscopía de transmisión electrónica). La razón por la que los compuestos bioactivos no se añaden directamente al alimento y se encapsulan es porque su encapsulación permite una mejor manipulación para introducción directa en alimentos y les aporta una mayor estabilidad, que dará lugar a una mejor liberación controlada.

Teniendo en cuenta las restricciones existentes en el uso de algunos polímeros para alimentación y buscando un material que no tenga gran impacto medioambiental, nos hemos decantado por la zeína como material de encapsulación. La zeína es un polímero natural hidrofóbico, por lo que difunde lentamente en agua, con alta resistencia a las enzimas digestivas, lo que aumenta el control de la liberación de los antioxidantes y biodegradable, así que no requiere ningún tratamiento de reciclaje.

Se han realizado, en esta parte del trabajo, tres ensayos (A, B y C) para sintetizar las nanopartículas. El ensayo A se basa en una síntesis en una sola etapa añadiendo la disolución de zeína y el extracto de antioxidantes simultáneamente. El ensayo B es una síntesis con adiciones discretas (con control manual) de la disolución de zeína sobre un vaso conteniendo agua y

antioxidantes en agitación mientras que el ensayo C es una síntesis de nanopartículas en continuo, pues se añade la disolución de zeína con la ayuda de una bomba peristáltica que mantiene el caudal constante.

Se llevan a cabo estudios de caracterización (tanto de las vacías como de aquellas conteniendo antioxidantes) por medio del análisis de sus características espectroscópicas, morfológicas (forma y tamaño) y de estabilidad.

A continuación, se exponen los datos obtenidos al analizar cada una de las características mencionadas.

4.4.1. Estudio de la absorbancia

El proceso de encapsulación de antioxidantes en nanopartículas de zeína se trata de seguir a partir de medidas de absorbancia así que, cuando se realiza el ensayo B, se toman muestras de todas las etapas del proceso de síntesis de nanopartículas de zeína para su medida en el espectrofotómetro UV-Vis.

En este caso, se presentan solamente los gráficos de los resultados obtenidos con dilución 1:30 (*Figuras 24-25*), puesto que los obtenidos con diluciones 1:100 y 1:300 resultan en las mismas conclusiones, pero en ellos es más difícil comprobar su efecto.

En la *Figura 24*, se muestran los espectros de la disolución inicial de zeína (a tiempo inicial, referida en el gráfico como *Zeína 0h*) y de la disolución de zeína tras una hora en agitación (referida en el gráfico como *Zeína 1h*), momento en el que se va a añadir un volumen de ésta a la mezcla de los antioxidantes y el agua en agitación. Puede verse que, a medida que pasa el tiempo, los espectros difieren aun tratándose de la misma disolución, por lo que se entiende que hay un reordenamiento de la proteína en la disolución (con posible formación de nanopartículas) que hace que la absorbancia aumente conforme pasa el tiempo ($\lambda=282$ nm).

En la *Figura 25*, se presentan los espectros de absorción de los antioxidantes en el volumen elegido de agua (referido en el gráfico como *Antioxidantes diluídos*) y las nanopartículas de zeína con el antioxidante ya incluido en su interior, después de dos horas y media en agitación (referidas en el gráfico como *Nanopartículas finales*). En este caso, puede comprobarse la influencia de los antioxidantes en las nanopartículas de zeína, pues tienen contribución al aumento de la absorción de las nanopartículas de zeína y se puede intuir un ligero desplazamiento de la absorción ($\lambda=275$ nm).

No obstante, el procedimiento es difícil de seguir empleando esta metodología, por lo que posteriores estudios podrían servirse de otras técnicas, como la espectrofotometría de infrarrojo.

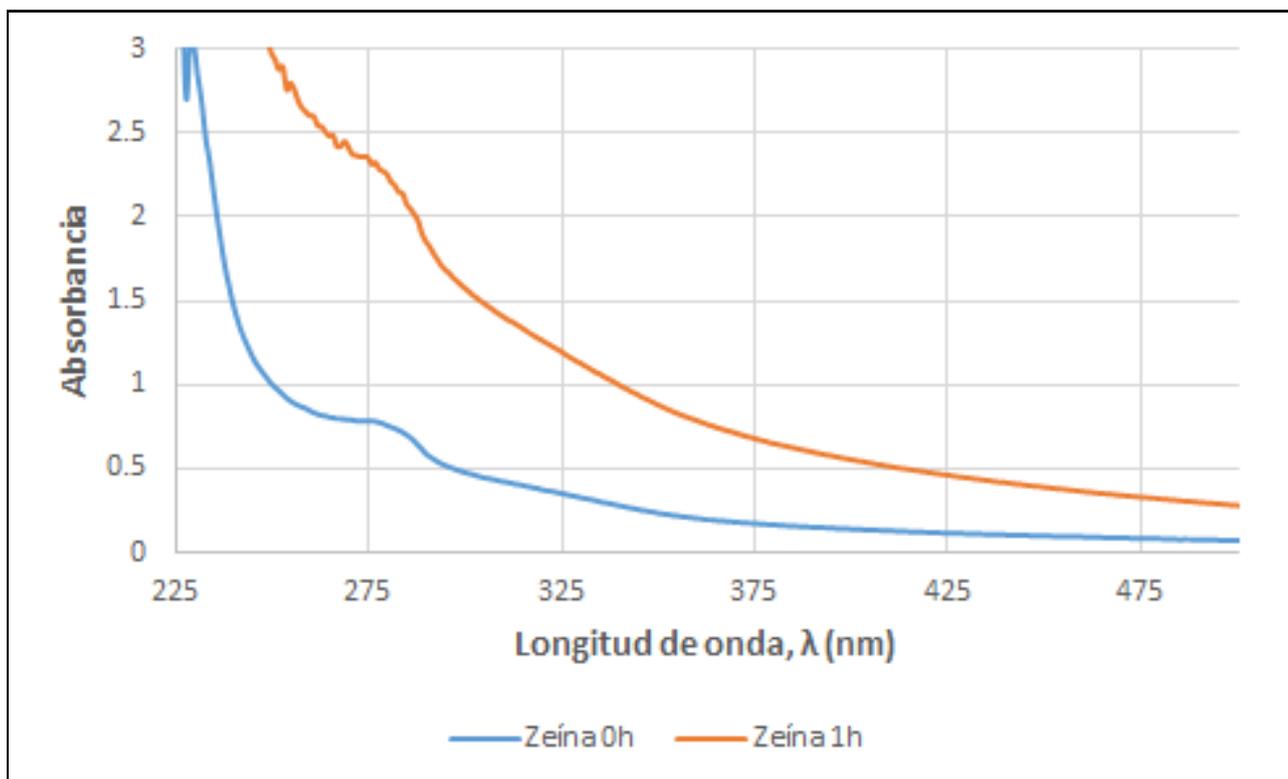


Figura 24. Espectro visible-UV de la disolución de zeína (dilución 1:30).

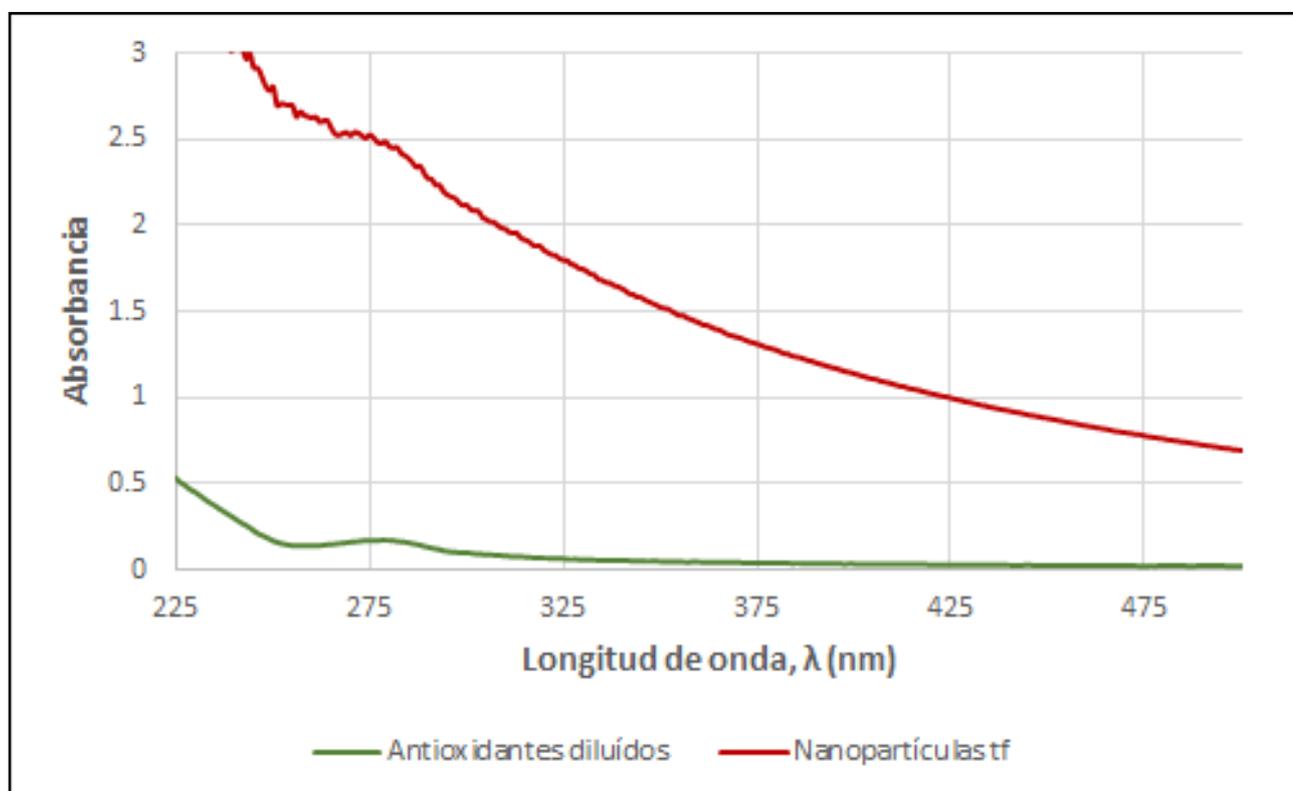


Figura 25. Espectro visible-UV de antioxidantes diluídos y nanopartículas de zeína (dilución 1:30).

4.4.2. Caracterización morfológica de las nanopartículas sintetizadas

Las muestras de las nanopartículas sintetizadas mediante los tres ensayos (A, B y C) se analizan por TEM para conocer su forma y se puede ver que presentan una morfología esférica.

El tamaño se calcula a partir de las imágenes obtenidas con el programa ImageJ.

Ensayo A: Síntesis en una sola etapa

Como puede verse en la *Tabla 4*, en este ensayo no hay diferencias significativas entre las nanopartículas sintetizadas, estén vacías o en una disolución conteniendo 6,3% y 14,3% v/v del extracto de antioxidantes. Tampoco se aprecian diferencias al añadir antioxidantes en la mezcla de síntesis, lo que nos lleva a pensar que el exceso de zeína favorece la formación de nanopartículas, independientemente de la naturaleza de la disolución en la que se encuentran.

En las imágenes al microscopio (*Figura 26*), puede verse cómo las nanopartículas se han formado correctamente y presentan una polimerización intermedia bastante abundante, con agrupaciones de nanopartículas. Por todo ello, este ensayo se descarta para posteriores análisis.

Tabla 4. Diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según el ensayo A. Para las muestras de nanopartículas vacías, se han hecho dos ensayos (A1 y A2).

MUESTRA	Diámetro promedio de nanopartícula con ImageJ (nm)
Vacías A1	120 ± 35
Vacías A2	90 ± 20
Disolución 6,3% v/v de antioxidantes	96 ± 34
Disolución 14,3% v/v de antioxidantes	156 ± 22

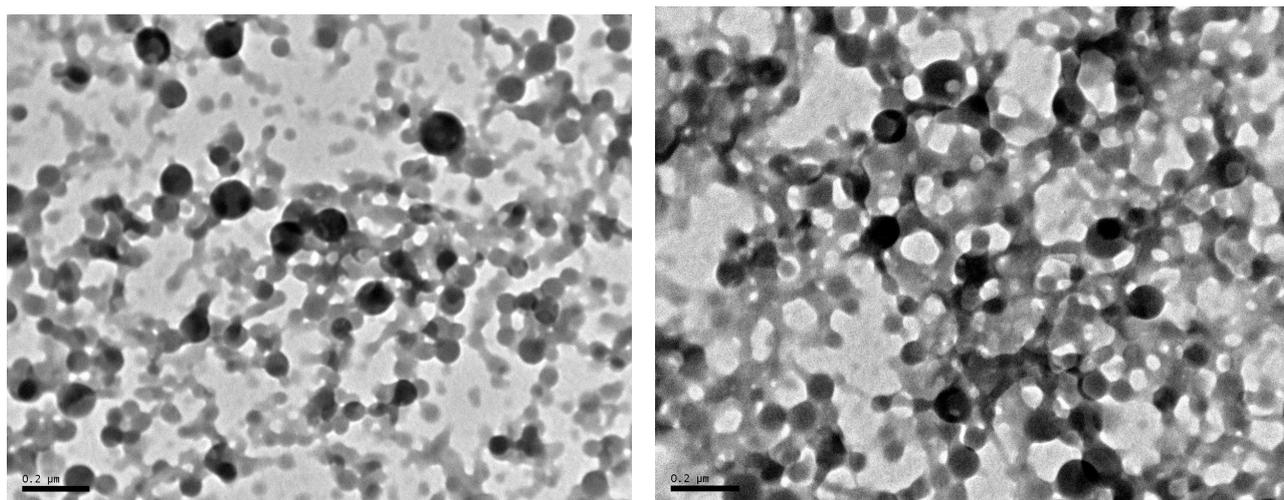


Figura 26. Nanopartículas vacías obtenidas en el ensayo A (ensayo A1 a la izquierda y ensayo A2 a la derecha). En negro, las nanopartículas de zeína. [Aumento del microscopio: 50000x].

Ensayo B: Síntesis con adiciones discretas

Dado que en el anterior ensayo no han interactuado la zeína y los antioxidantes, se decide agregar la zeína lentamente con el fin de evitar el problema cinético y las pseudoestructuras constituidas en el caso anterior. En este segundo ensayo, se mantiene la concentración de antioxidantes superior del ensayo A (14,3% v/v) y se duplica (25% v/v) para comprobar si una mayor cantidad de extracto aumenta la eficacia del proceso (*Tabla 5*).

Tabla 5. Diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según el ensayo B.

MUESTRA	Diámetro promedio de nanopartícula con ImageJ (nm)	Diámetro promedio de nanopartícula con Zetasizer (nm)
Vacías	83 ± 14	128 ± 0,3
Disolución 14,3% v/v de antioxidantes	131 ± 22	169 ± 3
Disolución 25% v/v de antioxidantes	238 ± 111	192 ± 23

Se puede observar que las nanopartículas de zeína sintetizadas en agua son más pequeñas que sus respectivas síntesis en presencia del extracto de antioxidantes, hecho que se puede deber a que la interacción con la zeína permite una mejor reordenación de la proteína y, en consecuencia, un aumento de las nanocápsulas formadas.

No obstante, si se hace una comparativa de las imágenes, puede verse que las nanopartículas conteniendo una disolución del 14,3% v/v de antioxidantes (*Figura 27*) presentan un tamaño más uniforme que las que contienen una disolución del 25% v/v (*Figura 28*), muestra que presenta una mayor dispersión. Esto podría deberse a la existencia de dos poblaciones en cuanto a tamaños se refiere, por lo que sería necesario un estudio más exhaustivo para poder confirmarlo. En ambos casos puede verse una menor formación de agregados al incrementarse la formación de nanopartículas y, por ello, su repulsión.

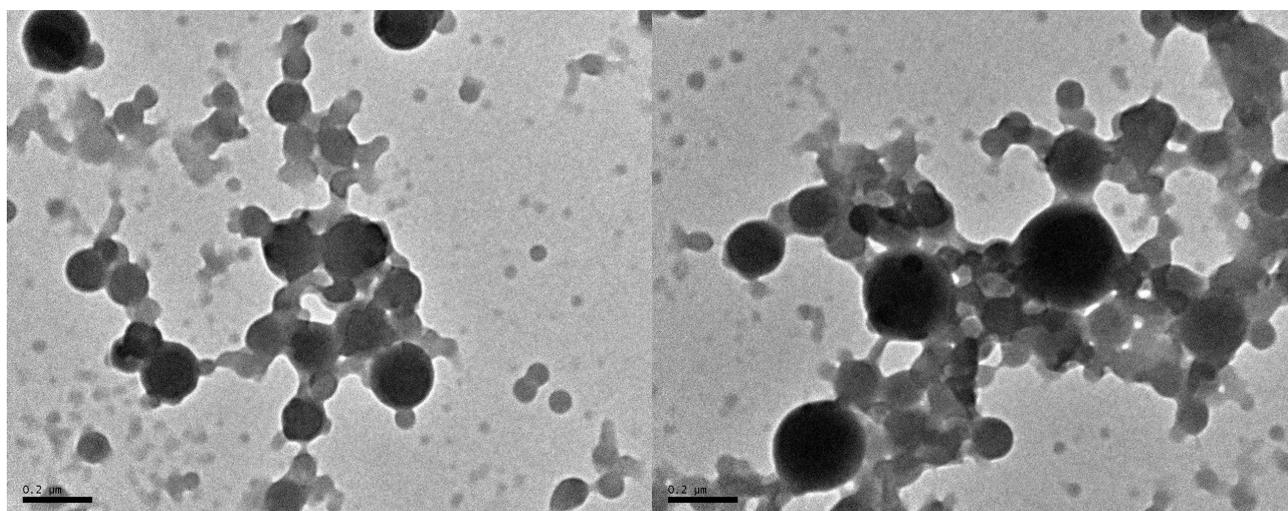


Figura 27. Nanopartículas obtenidas en el ensayo B en una disolución conteniendo un 14,3% v/v antioxidantes. [Aumento del microscopio: 50000x].

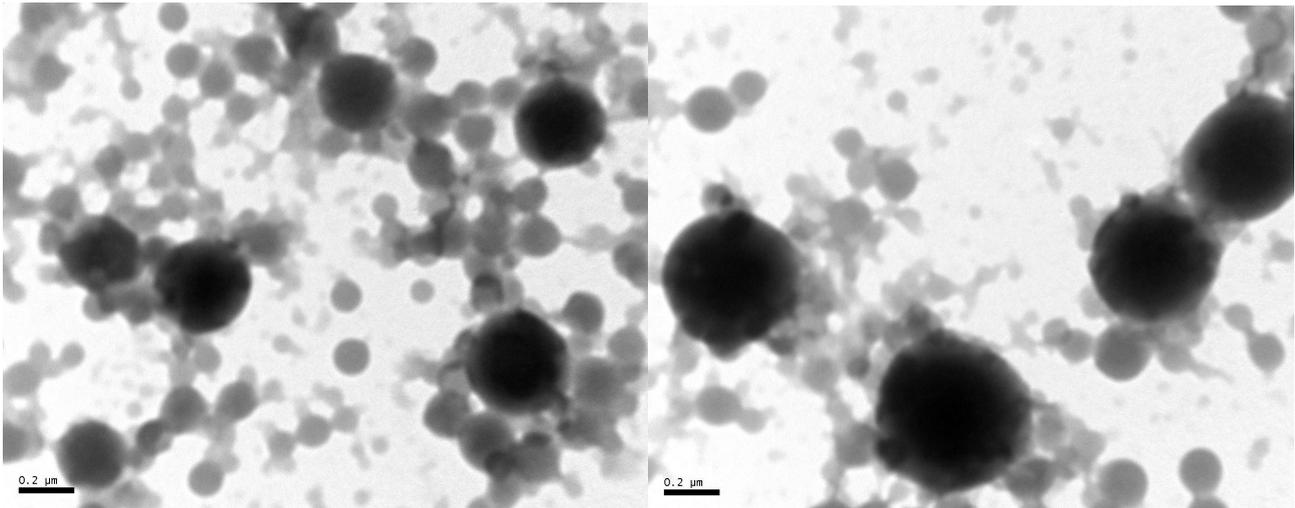


Figura 28. Nanopartículas obtenidas en el ensayo B en una disolución conteniendo un 25% v/v de antioxidantes. [Aumento del microscopio: 40000x].

Ensayo C: Síntesis en continuo

Como se mejoró bastante la síntesis, se decide reproducirla pero duplicando el tiempo de adición (con una duración de 5 minutos). La diferencia radica en el uso de una bomba peristáltica para conseguir un caudal constante.

Para este ensayo, se mantienen las concentraciones de 14,3% v/v (Figura 29) y 25% v/v (Figura 30) de extracto de antioxidantes porque han dado buenos resultados de encapsulación y de definición de tamaños en el ensayo B. También se estudian nanopartículas vacías (Tabla 6).

Tabla 6. Diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según el ensayo C.

MUESTRA	Diámetro promedio de nanopartícula con ImageJ (nm)	Diámetro promedio de nanopartícula con Zetasizer (nm)
Vacías	149 ± 39	99 ± 1
Disolución 14,3% v/v de antioxidantes	228 ± 73	155 ± 9
Disolución 25% v/v de antioxidantes	241 ± 52	206 ± 4

Nuevamente se observa, como en el ensayo B, que en presencia de compuestos antioxidantes se produce un aumento del tamaño de las partículas. Al igual que en el caso anterior, el diámetro promedio y, en consecuencia, el volumen de la partícula crecen a medida que aumenta la concentración de extracto de antioxidantes añadida para la síntesis.

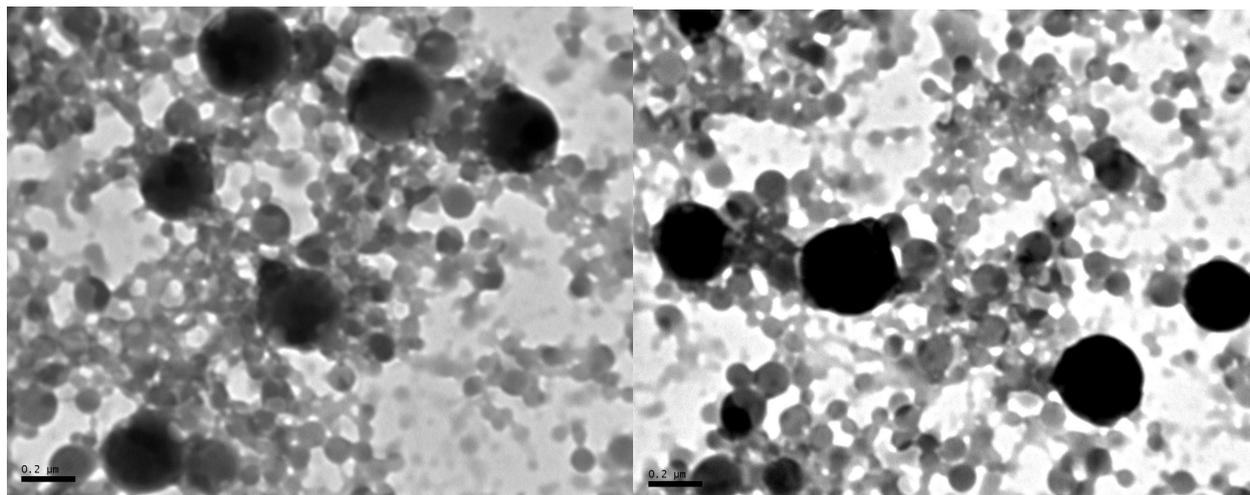


Figura 29. Nanopartículas obtenidas en el ensayo C en una disolución conteniendo 14,3% v/v de antioxidantes. [Aumento del microscopio: 40000x].

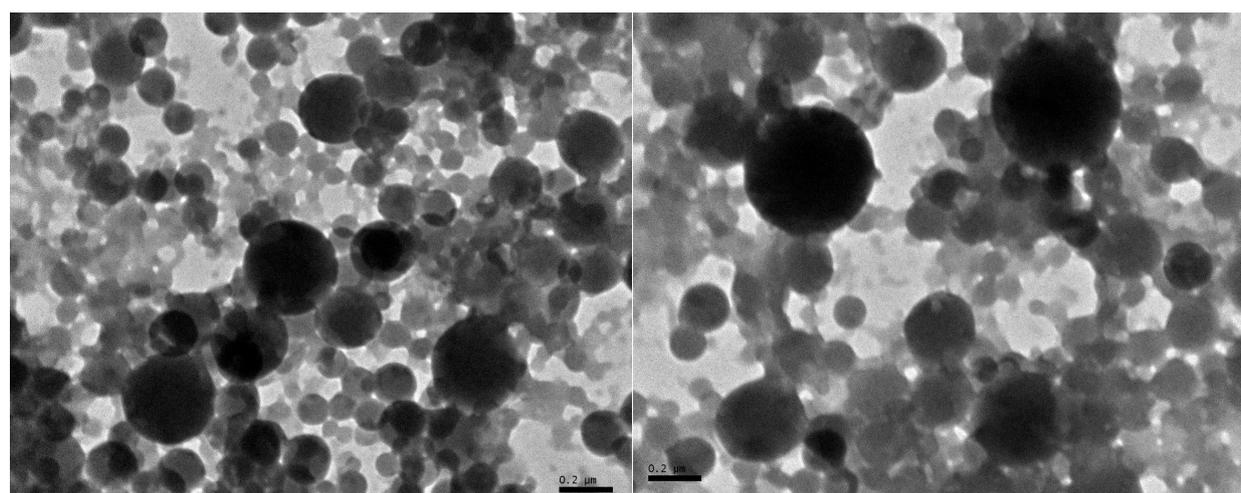


Figura 30. Nanopartículas obtenidas en el ensayo C en una disolución conteniendo 25% v/v de antioxidantes. [Aumento del microscopio: 40000x].

En conclusión y teniendo en cuenta las desviaciones estándar de los diámetros de las nanopartículas obtenidos, podemos inferir que las nanopartículas vacías tienen un diámetro promedio de 83 nm cuando se hacen adiciones discretas y de 149 nm cuando la síntesis se lleva a cabo en continuo. De igual forma, las nanopartículas que contienen una disolución 14,3% v/v de antioxidantes tienen un diámetro promedio de 131 nm en un ensayo discreto y de 228 nm en un ensayo continuo. Por último, aquellas que contienen una disolución 25% v/v de extracto antioxidantes poseen un diámetro medio de 238 nm al realizar adiciones discretas y de 241 nm cuando el goteo es continuo.

Puede afirmarse que la síntesis en continuo da lugar a nanopartículas más pequeñas que el ensayo con adiciones discretas. Una explicación a este fenómeno podría ser que el ensayo C es más prolongado que el B y que, por tanto, permite una mayor reorganización de las nanopartículas. Este dato debe relacionarse con la estabilidad, que se explica a continuación.

4.4.3. Estudio del potencial zeta

El potencial zeta, también conocido como potencial electrocinético, se define como la diferencia de potencial entre los límites de fase entre sólidos y líquidos. Es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en ésta y desestabilizarla.

En sistemas coloidales, es un indicador de la estabilidad de una dispersión: Cuanto mayor es su valor (en valor absoluto), más estable es el coloide. A medida que su valor disminuye, las partículas se aproximan más aglomerándose y aumentan la posibilidad de colisión. Para su determinación, el equipo mide la velocidad a la que la partícula que está cargada se mueve al someterse a un campo eléctrico.

Para este estudio, se utilizaron tanto las muestras pertenecientes al ensayo B (notación *Tabla 7*: E-B) como las correspondientes al ensayo C (notación *Tabla 7*: E-C).

Tabla 7. Valores de potencial zeta (mV) y del diámetro promedio (nm) de las nanopartículas de zeína sintetizadas según los ensayos B y C.

MUESTRA	Potencial zeta (mV)	Diámetro promedio (nm)
E-B vacías	-13,5 ± 0,9	128 ± 0,3
E-B Disolución 6.3% v/v de antioxidantes	-17,6 ± 0,3	169 ± 3
E-B Disolución 14.3% v/v de antioxidantes	-17,3 ± 2,8	192 ± 23
E-C vacías	-9,7 ± 1	99 ± 1
E-C Disolución 6.3% v/v de antioxidantes	-12,9 ± 2,9	155 ± 9
E-C Disolución 14.3% v/v de antioxidantes	-1,8 ± 0,1	206 ± 4

En primer lugar, puede afirmarse que las nanopartículas sintetizadas por adiciones discretas en el Ensayo B son más estables que las sintetizadas según el Ensayo C, pues presentan valores más negativos. La síntesis en continuo permite que los antioxidantes tengan más tiempo a reorganizarse en la capa de zeína y exista una menor repulsión entre ellas mientras que las adiciones discretas no dejan tanto tiempo para que esto ocurra y tienen, por esta razón, la conformación de sus capas más constante.

Este equipo también ofrece medidas del diámetro promedio (en nm) de las muestras analizadas (*Tabla 7*), que guardan correlación con los obtenidos en el TEM (*Tablas 5-6*).

En consecuencia, la metodología más adecuada para sintetizar las nanopartículas de zeína que liberarán compuestos antioxidantes en el organismo es la metodología del ensayo B, esto es, por medio de adiciones discretas puesto que se obtienen las nanopartículas de mayor tamaño y de mayor estabilidad.

5. CONCLUSIONES

Los estudios realizados demuestran que las metodologías desarrolladas, tanto la extracción como la posible encapsulación de los antioxidantes, tienen un potencial para dar respuesta a los objetivos planteados, que se pueden concretar en los siguientes puntos:

- Se optimizaron los parámetros a utilizar en una extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos de los compuestos antioxidantes presentes en el bagazo de uvas tintas autóctonas. Los parámetros escogidos son el medio disolvente EtOH: H₂O 6:4 y la adición de sales (1,0 g de MgSO₄ y 0,25 g de NaCl). Tiempos cortos de sonicación no tienen influencia en el proceso y la extracción en etapas sucesivas tiene efectos positivos.
- Se cuantificó la capacidad antioxidante de estos compuestos por el método Folin-Ciocalteu, que también permitió llevar a cabo un estudio de la estabilidad para la conservación de los antioxidantes, más estables a bajas temperaturas que a temperatura ambiente.
- Se consiguieron sintetizar nanopartículas de zeína para encapsular los antioxidantes. La metodología que dio lugar a nanopartículas de mayor tamaño y más estables fue la síntesis con adición discreta de la disolución de zeína.
- Los resultados obtenidos en este estudio abren puertas a las nanopartículas de zeína como medio para introducir compuestos de interés en los alimentos y, por tanto, aportar beneficios a nuestro organismo.

6.ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
ACS	<i>American Chemical Society</i> (sociedad americana de química)
ACE	Acetona
AN	Albarín negro (variedad de uva)
a.C.	Antes de Cristo
atm	Atmósfera(s)
CQ	Carrasquín (variedad de uva)
D.O.P	Denominación de Origen Protegida
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EtOH	Etanol
kg	Kilogramo(s)
L	Litro
µL	Microlitro(s)
mg	Miligramo(s)
M	Molar (moles/L)
MeOH	Metanol
MV	Multivarietal (variedad de uva)
nm	Nanómetro(s)
ORAC	
P _{eb}	Punto de ebullición
Q	Caudal
T	Temperatura
t _e	Tiempo de extracción
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VN	Verdejo Negro (variedad de uva)
α	Alfa
β	Beta
°C	Grados Celsius
λ	Longitud de onda
®	Marca registrada
™	Marca registrada
% v/v	Porcentaje volumen a volumen

7. BIBLIOGRAFÍA

Agustin-Salazar, S., Medina-Juárez, L. A., Soto-Valdez, H., Manzanares-López, F., & Gámez-Meza, N. (2014). Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Australian journal of grape and wine research*, 20(2), 208-213.

Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., & Mavromatis, A. (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(5), 475-487.

Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155-163.

Cheyrier V., Moutounet M., Sarni-Manchado P.: Los compuestos fenólicos. En: C. Flanzy (ed.). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Mundiprensa, 2000: 114-36.

Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R., & Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food: from field to plate. *Food Research International*, 69, 381-400.

De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.

Eva, G. C. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista OFFARM*, 23(6), 80-84.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 11-22.

García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica.

García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 3-22.

Garrett AR, Murray BK, Robison RA, O'Neill KL (2010). Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II: Methods in Molecular Biology* (series), Donald J Armstrong (ed) 594: 251-62.

Guntero, V. A., Martini, R. E., Longo, M., Ciparicci, S., & Andreatta, A. E. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. CAIQ2015-VII Congreso Argentino de ingeniería química. 3ras. Jornadas Argentinas de seguridad de procesos.

Gutiérrez, D. M., Ortiz, C. A., & Mendoza, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal [serie en internet]. *Simposio Metrología*, 220 (1018): 1-5.

Huang, X., Liu, Y., Zou, Y., Liang, X., Peng, Y., McClements, D. J., & Hu, K. (2019). Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids*, 93, 261-269.

Liu W. (2017). Antioxidantes en magaya de manzana: extracción, caracterización y encapsulación en nanopartículas de origen vegetal. Trabajo Fin de Máster. Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, Universidad de Oviedo.

López, A. F., Deladino, L., Alba, S. N., & Miriam, N. M. (2011). Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1).

Marín, F. Z. (2013). La química del color del vino. ACE: *Revista de enología*, (140), 2.

McClements, D. J. (2017). The future of food colloids: Next-generation nanoparticle delivery systems. *Current opinion in colloid & interface science*, 28, 7-14.

Moreira, B. (2017). Determinación de la capacidad/actividad antioxidante de la *magaya* de sidra asturiana. Trabajo Fin de Máster. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas, Universidad de Oviedo.

Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28.

Padua, G. W., & Guardiola, L. V. (2015). Microcapsules Produced from Zein. *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* (3-20). Academic Press.

Patel, A. R., & Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1958-1964.

- Patel, A. R., & Velikov, K. P. (2014). Zein as a source of functional colloidal nano-and microstructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 450-458.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.
- Portela, J. F. (2013). La evolución reciente del sector vitivinícola internacional. *GeoGraphos: Revista Digital para Estudiantes de Geografía y Ciencias Sociales*, 4(39), 171-192.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.
- Sponton, O. E. (2016). Desarrollo de nanopartículas biopoliméricas para la encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed research international*, 2013.
- Waterhouse, A. (1999). Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. *American Journal of Enology and viticulture*, 28, 1-3.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1), 17-26.

PÁGINAS WEB

- [1]https://elpais.com/economia/2018/04/26/actualidad/1524755902_232432.html [consultado el 8 de junio de 2019]
- [2] <http://www.vinosdeasturias.es/consejoregulador.php> [consultado el 9 de junio de 2019]
- [3] <https://www.catadelvino.com/> [consultado el 9 de junio de 2019]
- [4]<https://alimentosanocuerposano.com/2018/07/30/radicales-libres-y-antioxidantes/> [consultado el 5 de julio de 2019]
- [5]<https://www.ecoticias.com/residuos-reciclaje/104842/Residuos-elaboracion-desarrollar-productos-alimenticios-cosmeticos-farmaceuticos> [consultado el 9 de junio de 2019]
- [6]<http://news.eduvirama.com/mecanismos-de-defensa-antioxidante-endogena/> [consultado el 28 de junio de 2019]
- [7] <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/tocoferol> [consultado el 10 de junio de 2019]
- [8]<https://www.hielscher.com/es/probe-type-sonication-vs-ultrasonic-bath-an-efficiency-comparison.htm> [consultado el 10 de junio de 2019]
- [9]http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_fona.html [consultado el 11 de junio de 2019]
- [10]<https://www.agenciasinc.es/Noticias/La-zeina-una-alternativa-sostenible-a-los-materiales-plasticos-en-biosensores> [consultado el 16 de junio de 2019]